

JOAQUIM PINTO NUNES NETO

INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM HAMSTERS DOURADOS (*Mesocricetus auratus*) E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA PARCIAL DE CINCO PHLEBOVIRUS (*BUNYAVIRIDAE*) DO COMPLEXO CANDIRU ISOLADOS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários

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

Banca Examinadora: Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto  
Universidade Federal do Pará

Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma  
Universidade Federal do Pará

Dr. José Antônio Picanço Diniz  
Instituto Evandro Chagas

Suplente: Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes  
Instituto Evandro Chagas

Belém, 07 de dezembro de 2007

## DEDICATÓRIA

*A Deus, minha família e amigos*

## EPÍGRAFE

*“A mente que se abre a uma nova idéia  
jamais voltará ao seu tamanho original”  
(Albert Einstein)*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por tudo de bom que aconteceu em minha vida.

Aos meus pais, José Antônio Bitencourt Nunes e Júlia Faial Nunes pelo amor e compreensão que sempre me dedicaram.

Aos meus irmãos, Cristiano Augusto Faial Nunes e Luciano Augusto Fayal Nunes, pelo incentivo e amizade.

Às minhas tias Maria de Nazaré Bittencourt Nunes e Maria Emília Bittencourt Nunes, pelo amor que sempre demonstraram por mim.

A meu orientador, Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos, pelos ensinamentos, incentivos e sobre tudo pela paciência demonstrada ao longo desse trabalho.

Ao Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes pelo grande apoio na realização das técnicas de biologia molecular, e leitura crítica dos originais.

À Dra. Conceição Vieira, pelo apoio em todas as etapas de realização deste trabalho e pela amizade demonstrada por mim.

À Dra. Valéria Carvalho, pelo apoio e amizade ao longo do curso de mestrado, e pelo apoio na realização de muitas etapas deste trabalho.

Ao amigo Samir Casseb, pela ajuda nas técnicas de biologia molecular.

À Dra. Olinda Macedo, da Seção de Virologia do IEC, pela colaboração no seqüenciamento nucleotídico.

À Dra. Eliana Vieira, pela amizade e colaboração nas técnicas de cultivo celular e imunofluorescência.

Ao Dr. José Antônio Diniz pelo apoio com o material fotográfico.

Ao Dr. Juarez Quaresma pela participação na realização dos exames histopatológicos e na técnica de imunohistoquímica deste trabalho.

Ao Dr. Antonio Carlos Vallinoto e Dr. Luiz Fernando, pelas sugestões de correção deste texto na qualificação.

Aos Srs. Basílio Buna e Geraldo Mendes pelo auxílio na técnica de infecção experimental.

Aos meus amigos do laboratório de entomologia, Hamilton Monteiro, Hélio Saraiva Francisco Castro, Patrick Cantuária e Orlando Vaz pela amizade e ensinamentos.

À Dra. Elisabeth Santos, diretora do Instituto Evandro Chagas, por ter proporcionado condições para a realização desse trabalho.

Aos funcionários da biblioteca do IEC, pelo envio dos artigos solicitados.

A todos que desenvolvem seus trabalhos na Secção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas, pois todos direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro que contribuiu para a minha permanência no curso de mestrado.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
RESUMO.....	16
ABSTRAT.....	17
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE VÍRUS.....	18
1.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE ARBOVÍRUS.....	19
<b>1.2.1 Arbovírus no Brasil.....</b>	<b>21</b>
<b>1.2.2 Propriedades físico – químicas dos arbovírus.....</b>	<b>22</b>
<b>1.2.3 Características patológicas dos arbovírus.....</b>	<b>24</b>
1.3 FAMÍLIA <i>BUNYAVIRIDAE</i> .....	26
<b>1.3.1 Propriedades físico - químicas da família <i>Bunyaviridae</i>.....</b>	<b>28</b>
<b>1.3.2 Replicação viral dos membros da família <i>Bunyaviridae</i>.....</b>	<b>32</b>
1.4 GÊNERO <i>PHLEBOVIRUS</i> .....	34
<b>1.4.1 Infecção experimental com <i>Phlebovirus</i>.....</b>	<b>38</b>
<b>1.4.2 Propriedades físico - químicas do gênero <i>Phlebovirus</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>1.4.3 <i>Phlebovirus</i> isolados na Amazônia brasileira.....</b>	<b>43</b>
1.5 OBJETIVOS.....	45
<b>1.5.1 Objetivo geral.....</b>	<b>45</b>
<b>1.5.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>45</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
2.1 MATERIAL.....	47
<b>2.1.1 Amostras virais.....</b>	<b>47</b>
<b>2.1.2 Animais.....</b>	<b>49</b>
2.2 MÉTODOS.....	49
<b>2.2.1 Infecção experimental.....</b>	<b>49</b>
2.2.1.1 Preparação do estoque viral.....	50
2.2.1.2 Titulação viral.....	51

2.2.1.3	Viabilidade de infecção em cultivos celulares.....	52
2.2.1.4	Imunofluorescência indireta.....	55
2.2.1.5	Infecção experimental em hamsters dourados.....	56
2.2.1.6	Viremia.....	58
2.2.1.7	Análise histopatológica.....	58
2.2.1.8	Produção do soro homólogo.....	60
2.2.1.9	Deteção do antígeno viral pela técnica de imunohistoquímica.....	60
<b>2.2.2</b>	<b>Caracterização genética.....</b>	<b>62</b>
2.2.2.1	Extração do RNA viral.....	63
2.2.2.2	Amplificação parcial dos segmentos PRNA e MRNA pela técnica da transcrição – reversa seguida de reação em cadeia mediada pela polimerase (RT-PCR).....	64
2.2.2.3	Seqüenciamento nucleotídico.....	66
2.2.2.4	Análise das seqüências e filogenia.....	68
<b>3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>70</b>
3.1	INFECCÃO EXPERIMENTAL.....	70
3.1.1	Suscetibilidade de camundongos e hamsters aos flebovírus..	70
3.1.2	Valores de titulação viral e viremia.....	70
3.1.3	Viabilidade de infecção em cultivos celulares e IFI.....	71
3.1.4	Análise histopatológica.....	73
3.1.5	Deteção do antígeno viral pela técnica de imunohistoquímica.....	77
3.2	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA.....	79

<b>3.2.1</b>	Amplificação e seqüenciamento parcial dos segmentos PRNA e MRNA.....	79
<b>3.2.2</b>	Obtenção e análise das seqüências parciais dos segmentos PRNA e MRNA.....	80
<b>3.2.3</b>	<b>Filogenia</b> .....	84
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	90
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	100
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	102
	<b>ANEXOS</b> .....	121

## LISTA DE FIGURAS

	<b>página</b>
Figura 1 - Exemplo genérico de ciclo de manutenção dos Arbovírus em natureza.....	20
Figura 2 - Representação esquemática da partícula viral dos membros da família <i>Bunyaviridae</i> .....	29
Figura 3 - Estratégias de codificação de RNA dos vírus pertencentes a diferentes gêneros da família <i>Bunyaviridae</i> .....	32
Figura 4 - Estratégia de replicação dos membros da família <i>Bunyaviridae</i> .....	34
Figura 5 - Localização geográfica aproximada das amostras originais dos flebovírus do complexo Candiru isolados na Amazônia brasileira.....	48
Figura 6 - Inoculação por via intracerebral em camundongo albino suíço recém nascido.....	51
Figura 7 - Inoculação por via intraperitoneal em hamster dourado com flebovírus usados neste estudo.....	56
Figura 8 - Exemplo de autopsia de hamster dourado infectado com flebovírus para retirada de fragmentos de tecidos para estudos patológicos.....	57
Figura 9 - Esquema dos procedimentos de histopatologia utilizados neste estudo.....	59
Figura 10 - Esquemas dos procedimentos de imunohistoquímica usados neste estudo.....	62
Figura 11 - Esquema do procedimento de extração do RNA viral adotado neste estudo.....	64

Figura 12 - Esquema da técnica de RT - PCR utilizada neste estudo.....	66
Figura 13 - Fotos de ECP.....	72
Figura 14 - Resultados dos testes de IFI com os flebovírus.....	73
Figura 15 - Aspectos histopatológicos do Baço, Fígado e Pulmões.....	74
Figura 16 - Aspectos histopatológicos dos Rins e Sistema Nervoso Central.....	75
Figura 17 - Padrão de imunomarcção pela técnica de imunohistoquímica em tecido hepático de hamsters com 6 dpi.....	78
Figura 18 - Fotografia de gel de agarose 1,2 % com amostras amplificadas dos flebovírus utilizados neste estudo mostrando bandas com diferentes pesos moleculares para os segmentos MRNA e PRNA.....	79
Figura 19 - Análise filogenética do segmento PRNA (parcial) dos flebovírus pertencentes ao complexo Candiru pelo método de NJ.....	85
Figura 20 - Análise filogenética do segmento MRNA (parcial) dos flebovírus pertencentes ao complexo Candiru pelo método de NJ.....	87
Figura 21 - Filogenia dos segmentos MRNA e PRNA dos flebovírus do Complexo Candiru e o <i>Virus Punta Toro</i> .....	89

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

	<b>página</b>
Quadro 1 - Características gerais das famílias com arbovírus segundo algumas características físico-químicas.....	24
Quadro 2 - Arbovírus patogênicos para humanos isolados no Brasil, 1954 – 2005.....	25
Quadro 3 - Os cinco gêneros da família <i>Bunyaviridae</i> .....	28
Quadro 4 - Tamanho em nucleotídeos da seqüência completa dos três segmentos de alguns membros da família <i>Bunyaviridae</i> .....	31
Quadro 5 - Flebovírus isolados na Amazônia brasileira.....	44
Quadro 6 - Amostras do Complexo Candiru estudadas.....	47
Quadro 7 - Iniciadores usados na amplificação parcial dos segmentos PRNA e MRNA dos flebovírus em estudo.....	65
Quadro 8 - Maior valor de titulação em camundongos recém nascidos e viremia em hamsters para os cinco flebovírus amazônicos estudados.....	70
Tabela 1 - Relacionamento genético do segmento PRNA (parcial) dos flebovírus do Complexo Candiru com outros flebovírus.....	82
Tabela 2 - Relacionamento genético do segmento MRNA (parcial) dos flebovírus do Complexo Candiru com outros flebovírus.....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS

A - Adenina

C - Citosina

BeAN - Amostra viral isolada em Belém de material biológico de animal

CEPAN - Comitê de Ética em Pesquisa com Animais

cm<sup>2</sup> - Centímetro quadrado

ddATP - Dideoxynucleotídeo adenosina trifosfato

ddCTP - Dideoxynucleotídeo citosina trifosfato

ddGTP - Dideoxynucleotídeo guanidina trifosfato

ddTTP - Dideoxynucleotídeo timidina trifosfato

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DNAc - Ácido desoxirribonucléico complementar

DNTP - Dinucleotídeo trifosfato

DL<sub>50</sub> - Dose capaz de matar 50% dos animais inoculados

dpi - Dias pós inoculação

DTT - Ditioneitol

ECP - Efeito Citopático

EDTA - Ácido etileno diamino tetra acético

FC - Fixação do Complemento

G - Guanina

g - Gramas

HE - Hematoxilina - Eosina

IEC - Instituto Evandro Chagas

IFI - Imunofluorescência indireta

IH - Inibição da hemaglutinação

KCl - Cloreto de potássio

KDa - Kilodaltons

mg - Miligramas

MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de magnésio

mL - Mililitros

mm - Milímetro

MP - Máxima parcimônia

MS - Ministério da Saúde

MV - Máxima verossimilhança

NaCl - Cloreto de sódio

NJ - *Neighbor Joining* (Agrupamento de vizinhos)

nt - Nucleotídeos

pb - Pares de base

pH - Potencial hidrogeniônico

pmol - picomol

PA - Para análise

PBS - Solução salina fosfatada

PCR - Reação em cadeia mediada pela polimerase

RNA - Ácido ribonucléico

RNAc - Ácido ribonucléico complementar

RNAm - Ácido ribonucléico mensageiro

rpm - Rotações por minuto

SAARB - Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde

T - Timina

TA - Temperatura ambiente

TN - Teste de Neutralização

TNRP - Teste de Neutralização com redução de Placa

UI - Unidades internacionais

vic - Via intracerebral

vim - Via intramuscular

vip - Via intraperitoneal

$\mu\text{g}$  - Micrograma

$\mu\text{m}$  - micrômetro

$\mu\text{M}$  - Micromolar

$\mu\text{mol}$  - Micromol

$\mu\text{L}$  - Microlitro

## RESUMO

Os flebovírus (família *Bunyaviridae*; gênero *Phlebovirus*), possuem importância considerável em saúde pública, pois podem causar uma variedade de síndromes clínicas. Na região amazônica brasileira até o momento já foram isolados 23 flebovírus sendo que quatro se destacam por terem sido isolados de humanos: *Virus Alenquer*, *Virus Candiru*, *Virus Morumbi* e *Virus Serra Norte*. Estes mais o *Virus Itaituba*, isolado de *Didelphis marsupialis*, fazem parte do Complexo Candiru (grupo Candiru) e foram utilizados para estudos de caracterização genética e de infecção experimental em hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*). Os Hamsters mostraram-se suscetíveis a infecção por esses flebovírus, apesar de não terem apresentado sinais de doença. A análise histopatológica demonstrou aspectos lesionais no fígado, nos rins, no baço, nos pulmões e no sistema nervoso central, sendo as lesões mais intensas no fígado comprovadas pela presença dos antígenos virais empregando a técnica de imunohistoquímica. A análise das seqüências nucleotídicas parciais dos segmentos PRNA e MRNA obtidas para os cinco flebovírus estudados mostraram maior similaridade genética entre si do que com outros membros do gênero *Phlebovirus*. Sendo as mesmas geneticamente mais relacionadas ao *Virus Punta Toro*. Filogeneticamente, independentemente do segmento genômico analisado, os cinco flebovírus constituem um grupo monofilético, sendo que a análise pelo método de máxima verossimilhança demonstrou diferentes origens evolutivas para os segmentos de RNA o que sugere a ocorrência de rearranjo genético em natureza entre estes cinco flebovírus amazônicos.

Palavras-chaves: *Phlebovirus*, Complexo Candiru, caracterização genética, infecção experimental, Hamsters.

## ABSTRACT

The phleboviruses (family *Bunyaviridae*, genus *Phlebovirus*) are of considerable public health importance, due to their association with human diseases causing different clinical syndromes. In the Brazilian Amazon region, 23 phleboviruses were presently isolated, four of them have been isolated from humans: *Alenquer virus*, *Candiru virus*, *Morumbi virus*, and *Serra Norte virus*. These and *Itaituba virus*, isolated from *Didelphis marsupialis* belong to the Candiru Complex (Candiru group) and were used for studies on genetic characterization and experimental infection using gold hamsters (*Mesocricetus auratus*) as animal model. Hamsters showed to be susceptible to infection by these viruses; however signs of disease were not observed. The histopathological analysis demonstrated damages in the liver, kidneys, lung, and central nervous system. More intense lesions were observed in the liver which were characterized by the presence of viral antigens detected by immunohistochemistry assay. The analysis of the partial SRNA and MRNA nucleotide sequences obtained for the five studied phleboviruses showed more similarity among them than with other members of the genus *Phlebovirus*. Moreover, it was demonstrated that these phleboviruses were more genetically related to *Punta Toro virus*. Phylogenetically, regardless of the genome segment analyzed, the five phleboviruses constitute a monophyletic group. In addition the analysis by maximum likelihood method demonstrated different evolutionary origins for the RNA segments, suggesting the occurrence of natural genetic reassortment among the five Amazonian phleboviruses.

Key words: *Phlebovirus*, Candiru Complex, genetic characterization, experimental infection, Hamsters.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE VÍRUS

Os vírus são considerados biosistemas elementares que apresentam algumas características encontradas em seres vivos, como genoma e capacidade de adaptarem-se as mudanças do micro-ambiente em que se encontram. Entretanto, não podem captar ou armazenar energia e não são funcionalmente ativos fora da célula hospedeira (Van Regenmortel, 2000; Van Regenmortel & Mahy, 2004).

O vírus só se torna parte de um sistema vivo, quando seu genoma é interiorizado na célula hospedeira e a produção de novas partículas torna-se possível, por meio da utilização do metabolismo celular. Durante esse processo de replicação pode ocorrer alterações genômicas, proporcionando ao vírus uma variabilidade genética intrínseca, que permite sua adaptação através da seleção natural, o que garante sua sobrevivência (Van Regenmortel, 2000).

Os vírus são constituídos por apenas um tipo de ácido nucléico: o ácido desoxirribonucléico (DNA) ou ácido ribonucléico (RNA), o qual está envolvido por uma estrutura de natureza protéica, o capsídeo, composta de unidades denominadas capsômeros. Ao conjunto de capsídeo e ácido nucléico denomina-se nucleocapsídeo, que pode ser circundado ou não por um envelope lípidico. Os vírus com envelope possuem ainda glicoproteínas sob a forma de projeções (Oliveira, 1994; Pelczar Jr *et al.*, 1997). De acordo com análises ultraestruturais, os capsídeos virais podem apresentar simetria cúbica (icosaédrica), helicoidal ou ainda estruturas complexas (Harrison *et al.*, 1996).

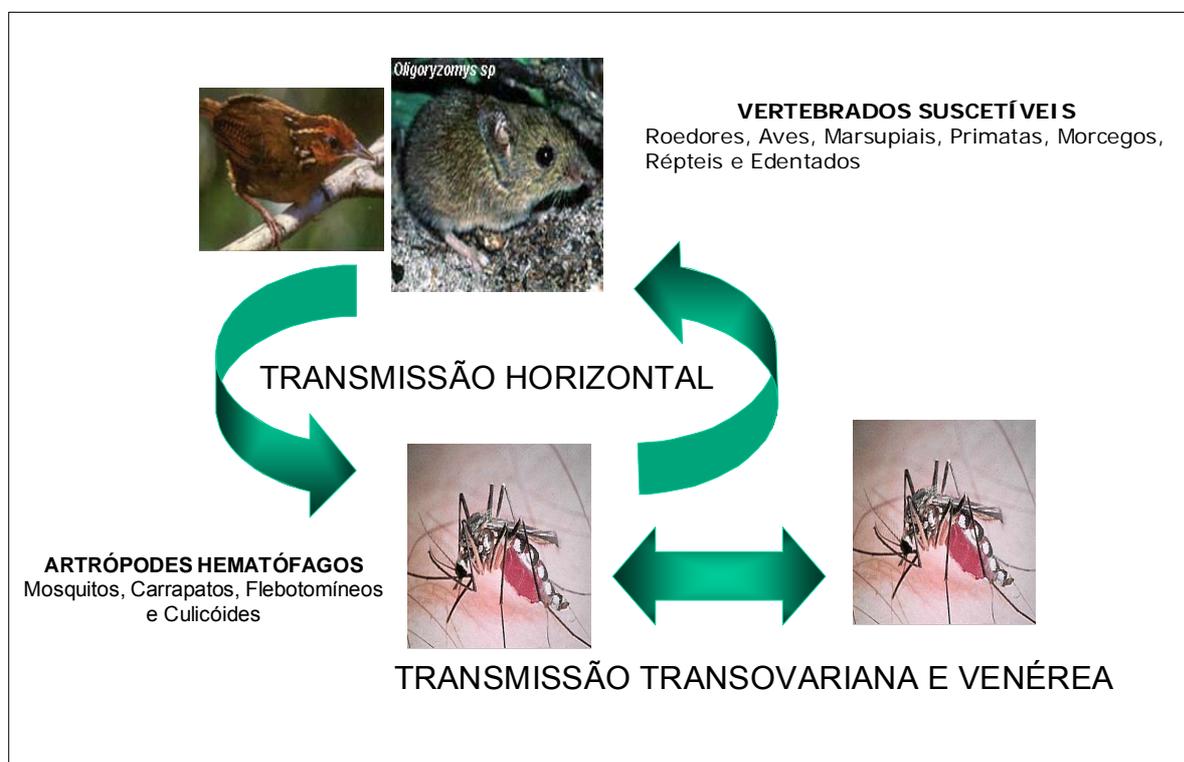
## 1.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE ARBOVÍRUS

O termo arbovírus refere-se ao principal mecanismo biológico pelo qual os vírus transmitidos por insetos hematófagos são perpetuados em natureza. Os arbovírus são mantidos em ciclos entre artrópodes hematófagos – vertebrados susceptíveis - artrópodes hematófagos, ciclos esses que, geralmente não resultam no envolvimento de seres humanos. Na maioria das vezes, a transmissão envolve uma complexa interação entre vírus, vetor artrópode e hospedeiro vertebrado. A competência do vetor, que é a sua habilidade de tornar-se infectado e de transmitir o vírus a um hospedeiro vertebrado, é determinada por diversos fatores, incluindo o próprio vírus, fatores genéticos, concentração viral no hospedeiro vertebrado infectado, ambiente, temperatura, barreiras do intestino e outros ainda não bem compreendidos (Calisher, 1998).

Artrópodes hematófagos de muitas espécies podem servir como vetores de manutenção ou de disseminação. Vetores que amplificam o vírus podem ter altas taxas de infecção e baixas taxas de transmissão, que muitas vezes é compensada por uma grande densidade populacional e grande propensão para alimentar-se sobre uma eclética variedade de espécies de hospedeiros vertebrados (Calisher, 1998).

Os hospedeiros vertebrados dos arbovírus também têm um papel crítico na manutenção e amplificação viral; nestes, a replicação deverá ser suficiente para que possa servir como fonte de infecção para o hospedeiro invertebrado no momento do repasto sangüíneo, ou seja, o título viral tem que ser elevado o suficiente para garantir a infecção dos vetores artrópodes. Além

disso, o tamanho populacional dos vertebrados suscetíveis deverá, também, ser grande o suficiente para que promova um contato com outros artrópodes. Um único hospedeiro vertebrado infectado poderá servir como fonte de infecção para muitos artrópodes, de tal maneira que estes artrópodes possam tornar-se uma fonte de amplificação viral em situações epidêmicas (Figura 1). (Calisher, 1998).



**Figura 1** - Exemplo genérico de ciclo de manutenção dos Arbovírus em natureza.

Fonte: Azevedo *et al.*, 2007.

A distribuição geográfica dos arbovírus é ampla. Com efeito, esses vírus têm sido isolados em todos os continentes tanto nas regiões tropicais quanto nas temperadas, com exceção da Antártida. Todavia, observa-se uma nítida predominância dos arbovírus nas regiões tropicais, que oferecerem condições ecológicas mais favoráveis; isso ocorre devido, nos trópicos, existir maior biodiversidade o que favorece a coexistência de grande diversidade de vetores e hospedeiros vertebrados em todas as épocas do ano, ao passo que nos países de clima temperado, o ciclo é interrompido durante o inverno, reiniciando-se na primavera ou verão (Dégallier *et al.*, 1990).

### **1.2.1 Arbovírus no Brasil**

A distribuição por continente dos isolamentos originais dos 537 arbovírus registrados no Catálogo Internacional de Arbovírus ,incluindo outros Vírus de vertebrados (Karabatsos,1985) é a seguinte: África com 135, Ásia com 78, Austrália e ilhas do Pacífico 60, Europa 35, América do Norte 91 e América do Sul 138 (Karabatsos, 2002).

No Brasil já foram isolados pelo menos 210 tipos diferentes de arbovírus, dos quais 196 foram na Amazônia brasileira, sendo 160 deles considerados novos isolados para o Brasil e 100 dos quais, os estudos de caracterização já foram concluídos, e são novos para a ciência (Azevedo *et al.*, 2007). Muitos destes vírus jamais foram encontrados fora dessa região, e diversos deles ainda não foram registrados no Catálogo Internacional de Arbovírus, incluindo outros Vírus de vertebrados (Pinheiro *et al.*, 1997; Vasconcelos *et al.*, 1998).Tal achado é fruto de estudos ao longo de mais de

cinco décadas realizados pelo Instituto Evandro Chagas (IEC), reunindo um acervo de aproximadamente 12.000 isolamentos de arbovírus e de outros vírus de vertebrados (Vasconcelos *et al.*, 2001, Azevedo *et al.*, 2007).

Dos tipos antigênicos encontrados na região amazônica brasileira, 34 estão associados com infecções humanas (Vasconcelos *et al.*, 1998; Travassos da Rosa *et al.*, 1997; 2000; Azevedo *et al.*, 2007). Assim, a floresta Amazônica é uma das maiores reservas de arbovírus do mundo. Tal fato ocorre não só devido às condições climáticas que favorecem a existência da grande diversidade de fauna e flora, com abundante variedade de artrópodes hematófagos e animais silvestres, que constituem os elementos essenciais para a manutenção desses vírus (Travassos da Rosa *et al.*, 1997).

### **1.2.2 Propriedades físico – químicas dos arbovírus**

A classificação dos arbovírus pode ser feita de acordo com suas propriedades antigênicas ou segundo suas características físico-químicas (Karabatsos, 1985).

As propriedades antigênicas classificam esses agentes em grupos antigênicos, com base nos resultados de testes sorológicos, como: fixação do complemento (FC); inibição de hemaglutinação (IH) e teste de neutralização (TN) (Casals, 1967). Quando dois ou mais vírus apresentam cruzamento sorológico, passam a constituir um grupo antigênico; os três primeiros grupos constituídos foram designados pelas letras: A, B e C e os demais receberam o nome do primeiro vírus isolado no respectivo grupo (Casals, 1957).

Com base em suas propriedades físico-químicas, a maioria dos arbovírus está distribuída em cinco famílias: *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Togaviridae* (Van Regenmortel, 2000; Fauquet *et al.*, 2005).

Os arbovírus possuem genoma constituído por RNA, exceto o vírus da peste suína africana que apresenta DNA, e é transmitido por artrópodes (Fauquet *et al.*, 2005). O RNA dos arbovírus pode ser segmentado ou não e, apresentar-se com uma ou duas fitas nucleotídicas. Os arbovírus com genomas não segmentados estão incluídos nas famílias *Flaviviridae*, *Rhabdoviridae* e *Togaviridae* enquanto aqueles com genomas segmentados incluem-se nas famílias *Bunyaviridae* e *Reoviridae* (Quadro 1) (Beaty *et al.*, 1988).

Os arbovírus das famílias *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Rhabdoviridae* e *Togaviridadae* apresentam acentuada sensibilidade aos solventes lipídicos (éter e clorofórmio), e a detergentes (desoxicolato de sódio) enquanto que, os membros da família *Reoviridae*, são pouco sensíveis (ou resistentes) aos mesmos. Essa sensibilidade ou resistência deve-se a presença ou ausência do envelope lipídico, respectivamente. Via de regra, os arbovírus são lábeis em pH ácido e estáveis em pH alcalino. São rapidamente inativados a 56 °C, mas preservam-se bem quando mantidos à temperatura de -70 °C ou, se liofilizados e mantidos à temperatura de -20 °C (Pinheiro *et al.*, 1997).

**Quadro 1** - Características gerais das famílias com arbovírus segundo algumas características físico-químicas.

Família	Envelope	Simetria Viral	Genoma	Tamanho da partícula
<i>Bunyaviridae</i>	Sim	Helicoidal	RNA de fita simples, polaridade (-) segmentado.	80-120 nm
<i>Flaviviridae</i>	Sim	Icosaédrica	RNA de fita simples, polaridade (+) não segmentado.	45-60 nm
<i>Reoviridae</i>	Não	Icosaédrica	RNA de fita dupla, polaridade (+/-) segmentado.	60-80 nm
<i>Rhabdoviridae</i>	Sim	Helicoidal	RNA de fita simples, polaridade (-) não segmentado.	180 nm / 75 nm
<i>Togaviridae</i>	Sim	Icosaédrica	RNA de fita simples, polaridade (+) não segmentado.	60-70 nm

Fonte: Adaptado de Van Regenmortel, 2000.

### 1.2.3 Características patológicas dos arbovírus

As arboviroses podem constituir importantes problemas de saúde pública e econômico-financeiro em todos os continentes com exceção da Antártida . De fato mais de 100 espécies de arbovírus são conhecidos por causarem doenças no homem, 40 deles infectam animais domésticos e, pelo menos, vinte causam epidemias (Karabastsos, 1985). Entre os arbovírus conhecidos no Brasil, 37 têm sido incriminados como causadores de doença humana (Quadro 2), dentre estes, cinco destacam-se por estarem associados a epidemias: *Virus dengue*, *Virus febre amarela*, *Virus Mayaro*, *Virus Oropouche* e *Virus Rocio* (Vasconcelos *et al.*, 1992; Travassos da Rosa *et al.*, 1997; 2000).

**Quadro 2** - Arbovírus patogênicos para humanos isolados no Brasil, 1954 - 2005.

Quadro Clínico	Gênero	Vírus	Infecção	
			Natural	Laboratorial
Febre	<i>Alphavirus</i>	<i>Virus Mucambo</i>	+	-
	<i>Alphavirus</i>	<i>Virus Pixuna</i>	-	+
	<i>Orthobunyavirus</i>	<i>Virus Tacaiuma</i>	+	-
	<i>Orthobunyavirus</i>	<i>Virus Xingu</i>	+	-
	<i>Orthobunyavirus</i>	<i>Virus Apeu</i>	+	-
	<i>Orthobunyavirus</i>	<i>Virus Caraparu</i>	+	+
	<i>Orthobunyavirus</i>	<i>Virus Itaqui</i>	+	-
	<i>Orthobunyavirus</i>	<i>Virus Marituba</i>	+	-
	<i>Orthobunyavirus</i>	<i>Virus Murutucu</i>	+	-
	<i>Orthobunyavirus</i>	<i>Virus Nepuyo</i>	-	-
	<i>Orthobunyavirus</i>	<i>Virus Oriboca</i>	+	-
	<i>Orthobunyavirus</i>	<i>Virus Guaroa</i>	+	-
	<i>Orthobunyavirus</i>	<i>Virus Catu</i>	+	-
	<i>Orthobunyavirus</i>	<i>Virus Guama</i>	+	-
	<i>Orthobunyavirus</i>	<i>Virus Oropouche</i>	+	+
	<i>Flavivirus</i>	<i>Virus Bussuquara</i>	-	-
	<i>Flavivirus</i>	<i>Virus Ilheus</i>	+	-
	<i>Phlebovirus</i>	<i>Virus Alenquer</i>	+	-
	<i>Phlebovirus</i>	<i>Virus Candiru</i>	+	-
	<i>Phlebovirus</i>	<i>Virus Morumbi</i>	+	-
<i>Phlebovirus</i>	<i>Virus Serra Norte</i>	+	-	
<i>Vesiculovirus</i>	<i>Virus Jurona</i>	+	-	
<i>Vesiculovirus</i>	<i>Virus Piry</i>	-	+	
Febre exantemática	<i>Alphavirus</i>	<i>Virus Mayaro</i>	+	+
	<i>Flavivirus</i>	<i>Virus dengue 1</i>	+	-
	<i>Flavivirus</i>	<i>Virus dengue 4</i>	+	-
Febre hemorrágica	<i>Flavivirus</i>	<i>Virus febre amarela</i>	+	-
	<i>Flavivirus</i>	<i>Virus dengue 2</i>	+	-
	<i>Flavivirus</i>	<i>Virus dengue 3</i>	+	-
Encefalite	<i>Alphavirus</i>	<i>Virus EEE*</i>	-	-
	<i>Alphavirus</i>	<i>Virus EEV *</i>	-	+
	<i>Alphavirus</i>	<i>Virus EEO*</i>	-	-
	<i>Orthobunyavirus</i>	<i>Virus Tucunduba</i>	+	-
	<i>Flavivirus</i>	<i>Virus Rocío</i>	+	-
<i>Flavivirus</i>	<i>Virus ESL*</i>	+	-	

\* EEE (Encefalite eqüina leste), EEV (Encefalite eqüina venezuelana), EEO (Encefalite eqüina oeste) e ESL (Encefalite Saint Louis).

Fonte: Modificado de Vasconcelos *et al.*, 2001.

A natureza da doença produzida no homem varia conforme o tipo de arbovírus responsável pela infecção. A maioria provoca uma síndrome febril, por vezes acompanhada de exantema, que cursa sem causar morte ou incapacitação; enquanto outros determinam quadros hemorrágicos (dengue e febre amarela) ou encefalite (Rocio e Encefalite Saint Louis), observando-se significativa letalidade (Pinheiro *et al.*, 1997; Travassos da Rosa *et al.*, 1997; 1998). É oportuno frisar que o mesmo arbovírus é capaz de causar diferentes síndromes clínicas e, por outro lado, a mesma sintomatologia pode ser determinada por diferentes arbovírus (Travassos da Rosa *et al.*, 2000).

Com exceção do *Virus dengue*, todos os demais arbovírus isolados pela Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas (SAARB) do IEC, mostram-se patogênicos para camundongos albinos suíços recém-nascidos, ocasionando, sobretudo quadro de encefalite fatal. Depois do sistema nervoso central, o fígado parece ser o órgão alvo mais comum de agressão desses vírus nos referidos animais (Araújo, 1980; Dias, 1986).

Durante a infecção natural em mamíferos, os arbovírus apresentam tropismo a vários órgãos, induzindo fusão celular em baixo pH. Em adição, alguns arbovírus determinam redução na síntese protéica das células de hospedeiros vertebrados (Van Regenmortel, 2000).

### 1.3 FAMÍLIA *BUNYAVIRIDAE*

Os vírus da família *Bunyaviridae* são encontrados, em todo mundo. A maioria deles é constituída por arbovírus mantidos em natureza por transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados susceptíveis e artrópodes

hematófagos, tais como: mosquitos, flebotomíneos, maruins e carrapatos. Os hospedeiros são principalmente primatas, roedores, marsupiais e aves. Mais de 60 membros desta família têm sido reconhecidos por causarem doença em humanos ou animais; alguns, inclusive, causam doenças em aves marinhas ou em plantas (Calisher, 1996).

Segundo o oitavo relatório do Comitê Internacional de Taxonomia Viral (Fauquet *et al.*, 2005) a família *Bunyaviridae* registra 288 tipos diferentes de vírus, distribuídos em cinco gêneros de acordo com suas propriedades físico químicas e antigênicas. Existem atualmente, 148 vírus no gênero *Orthobunyavirus* ; 42 no gênero *Hantavirus* ; 31 no gênero *Nairovirus* ; 53 no gênero *Phlebovirus* e 14 no gênero *Tospovirus*; dezenove vírus adicionais têm características da família *Bunyaviridae* e foram colocados em grupos sorológicos, mas não foram assinalados em nenhum gênero, além destes existem 21 vírus não grupados e não classificados, com morfologia similar de *Bunyaviridae*, para a maioria dos quais nenhuma caracterização bioquímica tem sido informada para determinar seu "Status" taxonômico (Fauquet *et al.*, 2005). Entre os membros desta família, alguns, são reconhecidamente patogênicos para humanos, vertebrados silvestres ou plantas, por comprometerem simultaneamente diversos órgãos ou tecidos, entre os quais temos: *Orthobunyavirus* (*Virus La Crosse*, *Virus Oropouche*, *Virus Akabane*); *Nairovirus* (*Virus Crimean-Congo hemorrhagic fever*, *Virus Nairobi sheep disease*); *Phlebovirus* (*Virus Rift Valley fever*, *Sandfly Fever virus*); *Hantavirus* (*Virus Hantaan*, *Virus Puumala*, *Virus Sin nombre*) e *Tospovirus* (*Virus tomato spotted wilt* ), sendo que os dois últimos gêneros, não são considerados

arbovírus. Outros *Bunyaviridae* ocasionam doenças febris ou encefalites em humanos (Quadro 3) (Brés, 1988).

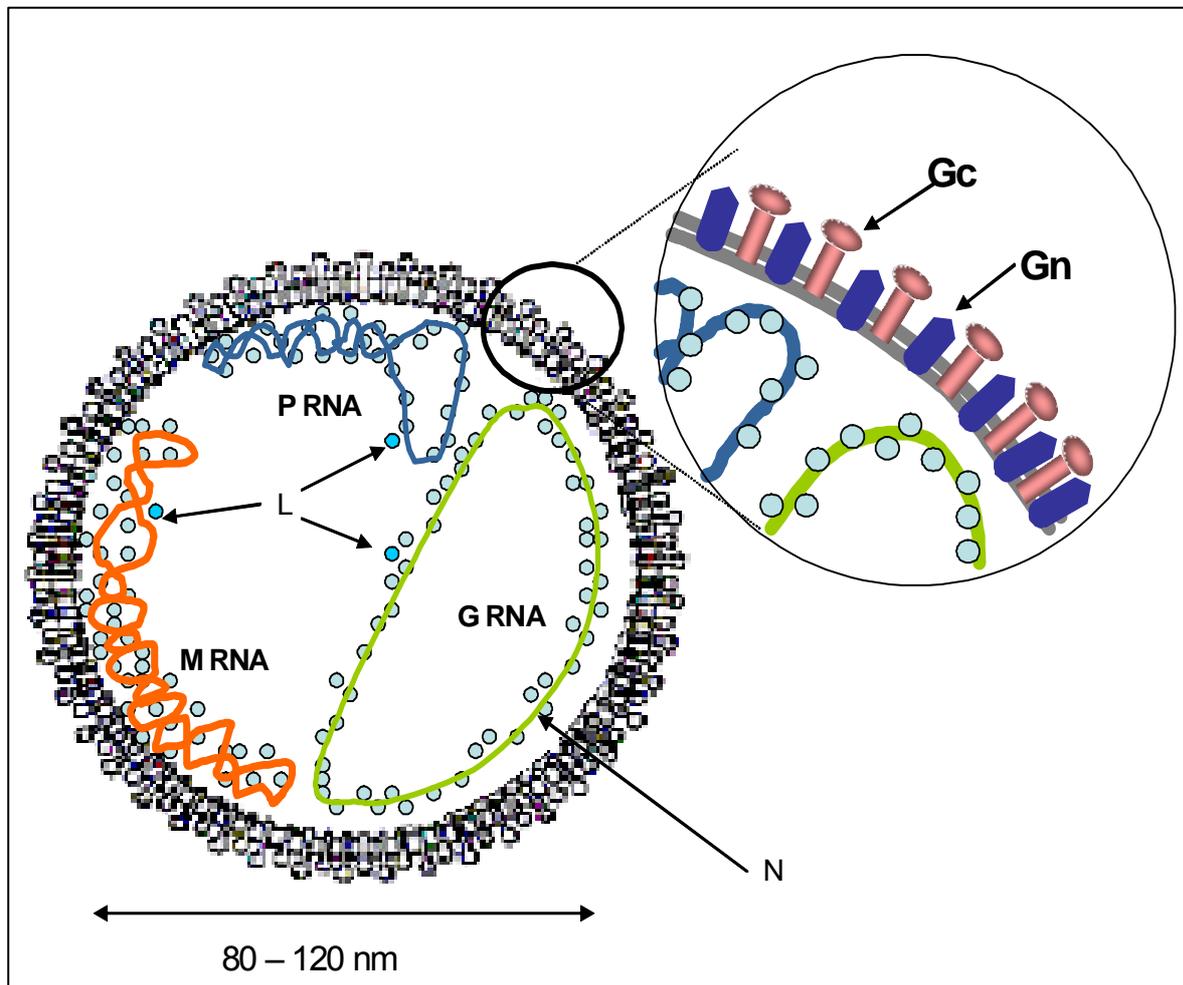
**Quadro 3** - Os cinco gêneros da família *Bunyaviridae*.

Família	Gênero	Espécie Tipo	Hospedeiros	Classificação
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Orthobunyavirus</i>	<i>Virus Bunyamwera</i>	Vertebrados	Arbovírus
	<i>Phlebovirus</i>	<i>Virus Sandfly fever Sicilian</i>	Vertebrados	Arbovírus
	<i>Nairovirus</i>	<i>Virus Nairobi sheep disease</i>	Vertebrados	Arbovírus
	<i>Hantavirus</i>	<i>Virus Hantaan</i>	Vertebrados	Não Arbovírus
	<i>Tospovirus</i>	<i>Virus tomato spotted wilt</i>	Plantas	Não Arbovírus

Fonte: Modificado de <http://www-micro.msb.le.ac.uk/3035/Bunyaviruses.html>.

### 1.3.1 Propriedades físico – químicas da família *Bunyaviridae*

Os membros da família *Bunyaviridae* são vírus de RNA, esféricos e envelopados, medindo de 80 a 120 nm de diâmetro, que possuem projeções glicoprotéicas na superfície de 5 a 10 nm, e que estão fixadas em uma matriz lipídica de 5 nm de espessura. O envelope viral é normalmente derivado das membranas do Complexo de Golgi ou da própria membrana celular citoplasmática da célula hospedeira (Figura 2) (Fauquet *et al.*, 2005).



**Figura 2** - Representação esquemática da partícula viral dos membros da família *Bunyaviridae*.

Fonte: Adaptado de Fauquet *et al.*, 2005.

Esses vírus possuem composição química aproximada de 2 % de RNA, 58 % de proteínas, 33 % de lipídeos, e 7 % de carboidratos (*Virus Uukuniemi*) (Schmaljohn,1996; Mertz,1997). Apresentam RNA de fita simples que é trissegmentado, dois segmentos têm polaridade negativa (RNAc) e são denominados grande (G), com 6.875 nucleotídeos (*Virus Bunyamwera*) e médio (M), com 4.458 nucleotídeos (*Virus Bunyamwera*). O terceiro segmento, denominado pequeno (P), possui 961 nucleotídeos (*Virus Bunyamwera*) e pode ser *ambisense* em alguns membros da família (Lees *et al.*, 1986; Elliott, 1989 a; 1989 b; Fauquet *et al.*, 2005; Mertz, 1997).

Os tamanhos dos três segmentos genômicos variam entre os cinco diferentes gêneros da família *Bunyaviridae* (Quadro 4), e as seqüências complementares 5' e 3' terminais oferecem ligações estáveis, não covalentes, com pareamento de bases, o que permite aos segmentos apresentar-se em forma circular. O vírus apresenta, também, uma RNA polimerase (cap-dependente), de 240 a 260 kDa, denominada L. As extremidades dos segmentos de RNA servem como sítio de reconhecimento para a polimerase viral (Schmaljohn, 1996).

**Quadro 4** - Tamanho em nucleotídeos, da seqüência completa dos três segmentos de alguns membros da família *Bunyaviridae*.

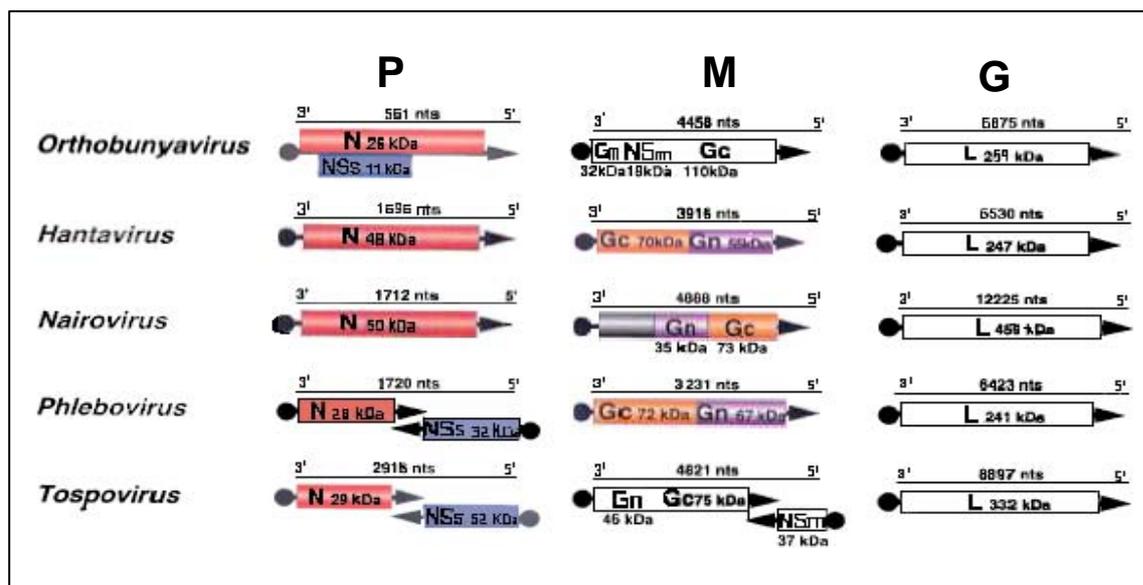
Gênero	Vírus	Segmento de RNA		
		G	M	P
<i>Orthobunyavirus</i>	<i>Virus Bunyamwera</i>	6.875	4.458	961
<i>Hantavirus</i>	<i>Virus Hantaan</i>	6.533	3.616	1.696
<i>Nairovirus</i>	<i>Virus Dugbe</i>	12.255	4.888	1.712
<i>Phlebovirus</i>	<i>Virus Rift Valley fever</i>	6.404	3.884	1.690
<i>Tospovirus</i>	<i>Virus tomato spotted wilt</i>	8.897	4.821	2.916

Fonte: Adaptado de Fauquet *et al.*, 2005.

As proteínas estruturais dos vírus da família *Bunyaviridae* são a ribonucleoproteína N, com 26,5 kDa, que é codificada no segmento P do RNA viral e as glicoproteínas Gn e Gc do envelope viral, que são proteínas estruturais, codificadas no segmento M. A proteína L, que possui atividade de RNA polimerase é codificada no segmento G. O segmento P é ambisense em vários membros da família, sendo a cadeia aberta de leitura da nucleoproteína N, localizada na primeira metade do segmento, próximo à extremidade 5' e à proteína NSs, na segunda metade (Pekosz & Gonzáles-Scarano, 1996; Schmaljohn, 1996; Fauquet *et al.*, 2005).

Além das proteínas estruturais, existem proteínas não estruturais, NSs e NSm. A proteína NSs de 7,5 kDa atua como um fator de virulência, ajudando o vírus a desviar a síntese protéica da célula hospedeira e inibindo a síntese de interferon (Bridgen *et al.*, 2001), além de controlar a atividade da

polimerase no processo de replicação viral (Weber *et al.*, 2001). A proteína NSm de 11 kDa, provavelmente está envolvida no processo de montagem da partícula viral (Figura 3) (Nakitare & Elliott, 1993).



**Figura 3** - Estratégias de codificação de RNA dos vírus pertencentes a diferentes gêneros da família *Bunyviridae*.

Fonte: Modificado de Fauquet *et al.*, 2005.

### 1.3.2 Replicação viral dos membros da família *Bunyviridae*

A infecção por vírus da família *Bunyviridae* inicia-se pela ligação viral à membrana celular, sendo ligantes a proteína Gn para células de vertebrados e a proteína Gc para células de artrópodes (Mertz, 1997).

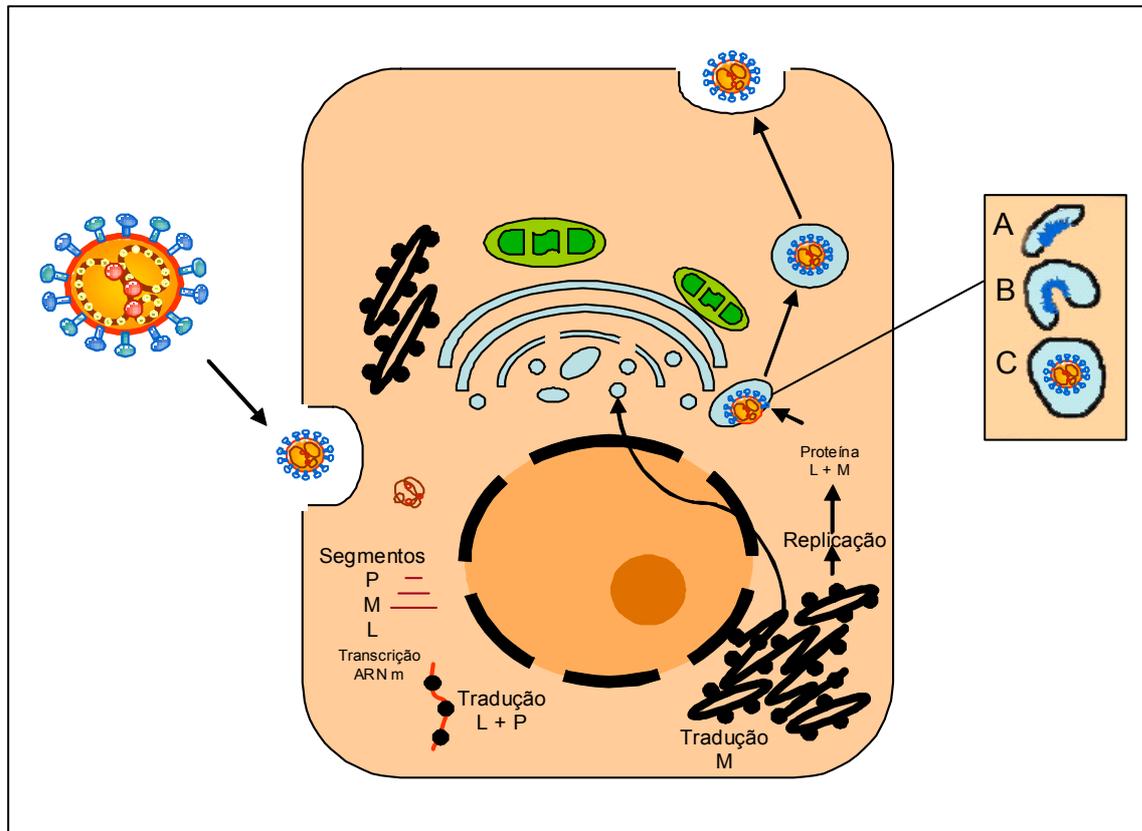
Os vírus invadem a célula, por endocitose, e fundem seu envelope a membranas endossômicas, o que permite ao nucleocapsídeo viral atingir o citoplasma. Caracteristicamente, o genoma viral permanece como ribonucleoproteína, sem desnudamento total do capsídeo, que se apresenta com formato circular, associado às numerosas cópias de proteína N e poucas cópias de Proteína L (RNA polimerase) (Schmaljohn,1996; Fauquet *et al* ., 2005).

Primeiramente, utilizando a polimerase viral, ocorre uma transcrição primária de RNA (-) do vírus para RNA (+) mensageiro (RNAm) e uma replicação a RNA (+) complementar. Em seguida, em ribossomas livres, inicia-se uma rápida tradução dos RNAm dos segmentos G e P. As proteínas N e NSs de phlebovírus estão presentes no citoplasma da célula infectada duas horas após a infecção. Tradução, também, ocorre com o RNAm do segmento M, o qual se liga a ribossomos de membrana do retículo endoplasmático rugoso e ali ocorre a síntese de uma poliproteína. Em determinado momento, a polimerase viral muda sua função de transcrição primária de RNAm do genoma viral para a replicação do genoma da progênie (Schmaljohn,1996 ).

Inicia-se a transcrição do RNA (+) complementar, a partir do terminal 3', produzindo-se um RNA (-) encapsulado na progênie viral. A poliproteína codificada pelo segmento M é clivada, formando as proteínas Gn e Gc, as quais são, em seguida, glicosiladas no complexo de Golgi (Schmaljohn,1996; Fauquet *et al*.,2005).

A montagem viral ocorre após o acúmulo das glicoproteínas no complexo de Golgi, em seguida a partícula viral brota através de vesículas do

complexo de Golgi. Finalmente, a progênie viral é liberada por exocitose com fusão das membranas das vesículas citoplasmáticas à membrana celular (Figura 4) (Schmaljohn, 1996; Fauquet *et al.*, 2005).



**Figura 4** - Estratégia de replicação dos membros da família *Bunyaviridae*.

Fonte: Adaptado de Schmaljohn (1996).

#### 1.4 GÊNERO *PHLEBOVIRUS*

Historicamente os flebovírus causaram doenças de importância militar, tendo ocorrido em tropas Austríacas estacionadas no mar Adriático, e

foi um problema persistente entre as tropas coloniais britânicas na Índia e no Paquistão (Anderson *et al.*, 1941).

Durante a segunda guerra mundial, grande numero de soldados americanos, britânicos e germânicos ficaram doentes no norte da África e na região do Mediterrâneo, doenças essas causadas por flebovírus (Walker, 1941).

Epidemias causadas por flebovírus são comuns na Europa central e em regiões da antiga União Soviética, nos meses de verão, ocorrendo também entre turistas que visitam o mar negro, tendo ocorrido uma epidemia na Sérvia em 1948, onde mais de um milhão de pessoas ficaram doentes (Pavlovsky, 1947; Guelmino & Jevtic, 1955; Tesh & Papaevangelou, 1977).

Ainda no Velho Mundo, a ocorrência de epidemias e casos isolados de doença é observada em áreas endêmicas da Europa, da África e da Ásia, onde nativos, turistas e militares, tornam-se alvos dessas arboviroses (Laughlin *et al.*, 1979; Ehrnst *et al.*, 1985).

No Novo Mundo, durante a década de 1960, arbovírus desse gênero foram identificados, inicialmente nas Américas do Sul e Central e posteriormente na América do Norte (Mclean, 1972; Srihongse & Johnson, 1974; Calisher *et al.*, 1977).

O gênero *Phlebovirus* contém 53 tipos virais conhecidos que são divididos em dois grupos antigênicos principais: O grupo da febre dos flebotomos (*Sandfly Fever*), com 24 membros e o grupo Uukuniemi com treze membros, e mais 16 vírus não agrupados em nenhum grupo antigênico. O grupo da febre dos flebotomos é dividido em oito sorocomplexos (Bujaru,

Candiru, Chilibre, Frijoles, Punta Toro, Rift Valley fever, Salehebad e Sandfly fever Naples), listados no oitavo relatório do Comitê Internacional de Taxonomia Viral (Fauquet *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2007 a ;2007 b). Cinco sorocomplexos adicionais foram recentemente definidos, a saber: Aguacate, Chagres, Arboledas, Arumowot e Tapara (Travassos da Rosa, dados não publicados).

Os vírus do grupo da febre dos flebótomos são transmitidos por flebótomos, culicídeos e ceratopogonídeos, já os vírus do grupo Uukuniemi são transmitidos por carrapatos (Elliott *et al.*, 2000; Fauquet *et al.*, 2005).

Os vírus do gênero *Phlebovirus* (*Bunyaviridae*), são de importância considerável em saúde pública, porque podem causar uma variedade de síndromes clínicas, que variam de uma doença febril autolimitada, com ou sem exantema, até retinites, encefalites, meningoencefalites e febre hemorrágica fatal (Bartelloni & Tesh 1976; Laughlin *et al.*, 1979; Meegan *et al.*, 1979; Peters & Slone, 1982, Tesh, 1988; Nicoletti *et al.* 1991; Braitto *et al.* 1998).

Entre os vírus do grupo dos flebótomos registrados, oito destacam-se por sua importância médica: *Virus Sandfly fever Sicilian*, *Virus Sandfly fever Naples*, *Virus Toscana*, *Virus Rift Valley fever*, *Virus Chagres*, *Virus Punta Toro*, *Virus Candiru* e *Virus Alenquer*, todos isolados de pessoas com quadro clínico de doença febril aguda (Karabatsos, 1985). Podemos incluir a esses outros dois vírus também isolados de humanos, mas ainda não registrados no Catálogo Internacional de Arbovírus, incluindo outros Vírus de Vertebrados, a saber: *Virus Morumbi* e *Virus Serra Norte*, isolados de pacientes apresentando quadro febril agudo autolimitado (Rodrigues *et al.*, 1998). Existem evidências

sorológicas que outros vírus do grupo causam infecção em humanos, são eles: *Virus Arumowot*, *Virus Bujaru*, *Virus Itaporanga*, *Virus Gabek forest*, *Virus Gordil*, *Virus Karinabad* e *Virus Saint Floris* (Tesh *et al.*, 1982).

O *Virus Rift Valley fever* é o único que produz doença em humanos e animais domésticos (Tesh, 1988). Sendo que em humanos esse vírus causa desde um quadro febril autolimitado até encefalites, e hepatites fatais acompanhadas de hemorragias, sendo que crianças são afetadas com mais severidade. Quadros não usuais como retinites têm sido também descritos com certa freqüência e costumam ser graves. Entre animais jovens, bezerros e cordeiros, a maioria morre por hepatite aguda, ressalta-se que abortos são freqüentes entre animais infectados com esse vírus (Vialat *et al.*, 2000).

O grupo Uukuniemi é constituído por apenas um sorogrupo, composto por treze vírus (Fauquet *et al.*, 2005), e foi considerado no passado um gênero isolado, mas atualmente está incluído no gênero *Phlebovirus*, por apresentar significativas relações antigênicas e seqüências protéicas homólogas com os vírus desse gênero, quando comparado com outros gêneros (Murphy *et al.*, 1995).

Diversos vírus do grupo da febre dos flebótomos, mas nenhum do grupo Uukuniemi têm sido associados a doenças em humanos, embora anticorpos para vírus desse grupo tenham sido detectados em populações humanas (Tesh, 1988; Beaty & Calisher, 1991). Os vírus do grupo Uukuniemi têm sido utilizados há mais de 35 anos como modelo para estudar a estrutura e replicação da família *Bunyaviridae* (Simons *et al.*, 1990; Overby *et al.*, 2006).

#### 1.4.1 Infecção experimental com *Phlebovirus*

Primatas não-humanos, camundongos, e hamsters têm sido usados de maneira sistemática como modelos experimentais para o estudo dos arbovírus. Em camundongos, por exemplo, o *Virus febre amarela*, determina encefalite fatal. Porém, em macacos a infecção experimental causa tropismo similar ao observado no homem, ou seja, viscerotropismo, tendo o fígado como principal órgão alvo. Este tipo de manifestação clínica nos símios transformou esses animais em modelo ideal para estudos experimentais com o *Virus febre amarela* em função da semelhança com o quadro apresentado pelos seres humanos. No entanto, as questões éticas e os elevados custos dos experimentos com esses animais inviabilizam os estudos em primatas. Assim os hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*), têm sido usados como alternativa de modelo para o estudo do viscerotropismo do *Virus febre amarela*, uma vez que há vantagens econômicas, aliadas ao fácil manejo destes animais em laboratório. Hamsters jovens infectados experimentalmente com o *Virus febre amarela* apresentam o vírus na corrente sangüínea com cerca de dois dias pós-inoculação (dpi) (Tesh *et al.*, 2001). As lesões teciduais são encontradas, sobretudo nos lóbulos hepáticos, inclusive com necrose médio-zonal análoga à que ocorre com os humanos e símios. (Xiao *et al.*, 2001; Vasconcelos, 2003).

Nos primeiros estudos de infecção experimental com flebovírus, visando compreender melhor a evolução do quadro clínico, taxa mínima infectante, dose letal média e imunidade específica e cruzada para flebovírus

do Velho Mundo, foram utilizados voluntários humanos em estudos desenvolvidos por Sabin (1948), Bartelloni & Tesh (1976) e Tesh (1990).

Experimentos utilizando símios também foram desenvolvidos. Estudos com macacos *Rhesus*, demonstraram a ocorrência de febre em dois dentre seis animais inoculados com o *Virus Sandfly fever Sicilian*, por via intracerebral (vic) e intramuscular (vim), sendo também observados sinais de comprometimento neurológico, como tumores e tonturas na fase inicial da doença, mas exames histopatológicos posteriores não revelaram lesões no sistema nervoso central e medula espinhal (Behbehani *et al.*, 1967). Outro estudo, desta vez utilizando macacos do gênero *Cynomolgus*, demonstrou que os animais apresentavam infectividade, sem, apresentar sinais clínicos, e os estudos de imunohistoquímica, não permitiram a detecção de antígenos virais em tecido muscular dos símios (McClain *et al.*, 1997).

Estudos experimentais utilizando-se camundongos inoculados com o *Virus Punta Toro*, por via subcutânea, revelaram tendência para o aparecimento de necrose hepatocelular extensa, que levava invariavelmente a morte em quatro dias quando eram utilizados camundongos com menos de cinco semanas de vida; no entanto quando eram utilizados camundongos com oito semanas de vida os pesquisadores verificaram que quase 95 % desses animais conseguiam eliminar o vírus da circulação, após uma infecção de 48 horas e isso ocorria devido à presença de interferon no organismo dos animais (Pifat & Smith, 1987).

Alguns estudos tendo camundongos suíços recém nascidos (*Mus musculus*) como modelo para infecção experimental de *Phlebovirus* do

Complexo Candiru foram realizados, e os autores encontraram lesões intensas na análise de tecidos hepático e nervoso (Araújo *et al.*, 1993; 1996; Ohashi & Brasil, 1997; Pessoa, 1998; Barros, 2000).

O recente sucesso no desenvolvimento de um modelo de infecção para o *Virus Punta Toro*, utilizando hamsters, provê uma oportunidade da utilização desse modelo para estudo de doenças severas causadas por flebovírus (Ding *et al.*, 2005).

#### **1.4.2 Propriedades físico - químicas do gênero *Phlebovirus***

As primeiras observações sobre a morfologia dos flebovírus foram feitas por microscopia eletrônica, mediante a técnica de contrastação negativa do *Virus Uukuiemi*. O *Virus Uukiniemi* apresenta partículas esféricas, com diâmetro variando entre 80 e 120 nm; superfície com arranjo hexagonal regular de subunidades, que parecem capsômeros ociosos, com projeção medindo em torno de 9 nm (Saikku & Von Bonsdorff, 1968; Saikku *et al.*, 1970).

A classificação sorológica atual dos flebovírus é insatisfatória, por causa da pouca informação genética sobre os mesmos (Liu *et al.*, 2003). Os vírus desse gênero são classificados atualmente por seus relacionamentos sorológicos. As relações antigênicas entre os vírus determinados pelo teste de IH são usadas para determinar gênero, enquanto o teste de FC se presta para determinar o sorogrupo e a colocação em um complexo, já o TN e o teste de neutralização com redução de placa (TNRP) para a diferenciação do sorotipo e do subtipo, sendo o TNRP o método sorológico mais sensível para a classificação de flebovírus e por todos esses testes os flebovírus apresentam

variados graus de reação cruzada, sendo normalmente reações fracas (Tesh *et al.*, 1976, 1982; Travassos da Rosa *et al.*, 1983; Liu *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2007 a).

O genoma do gênero *Phlebovirus*, como ocorre em outros gêneros da família *Bunyaviridae*, compreende três segmentos de RNA de fita simples, helicoidais e suplementares, denominados, G (Grande), M (Médio) e P (Pequeno), e cada um dos segmentos contribui de forma diferente para a patogênese viral. Os segmentos G e M são de polaridade negativa. O segmento G codifica a proteína L, uma proteína com função de RNA polimerase dependente de RNA, enquanto o segmento MRNA codifica as glicoproteínas de superfície Gn e Gc e a proteína não estrutural NSm, por outro lado, nos flebovírus o segmento PRNA utiliza uma estratégia ambisense e produz duas proteínas, a nucleoproteína estrutural N no sentido anti-senso e a não estrutural NSs na direção senso (figura 3), já tendo sido demonstrado que essas duas proteínas são os principais determinantes para a patogênese dos flebovirus. Internamente cada segmento parece conter uma única seqüência primária sem sobreposição entre os mesmos (Petterson *et al.*, 1977, Roberson *et al.*, 1979; Fauquet *et al.*, 2005, Nichol *et al.*, 2005., Nunes *et al.*, 2005, Perrone *et al.*, 2007). Pouco se sabe sobre as propriedades do segmento GRNA em flebovírus; a proteína L, presumivelmente possui função de transcriptase viral, porém são necessários mais estudos para elucidar a estratégia de expressão desse segmento, assim como as propriedades funcionais de seu produto gênico com maior exatidão (Bishop, 1990).

O segmento MRNA dos flebovírus já foi bastante estudado, para os seguintes vírus; *Virus Rift Valley fever*, *Virus Toscana*, *Virus Punta Toro* e *Virus Uukuniemi* (Collet *et al.*,1985 ; Ihara *et al.*,1985; Ronnholm & Pettersson, 1987; Di Bonito *et al.*,1997; Liu *et al.*, 2003).

As glicoproteínas, Gn e Gc são importantes para a infecção viral, patogênese e imunidade viral, sendo alvos dos anticorpos (Keegan & Collet,1986; Pifat *et al.*,1988). A atividade biológica é depende da estrutura terciária dessas glicoproteínas e mesmo uma única substituição de amino ácido pode comprometer essa atividade (Schmaljohn *et al.*, 1990).

Como estão expostas na superfície dos vírus, as glicoproteínas devem sofrer pressão seletiva de hospedeiro, e é provável que elas variem de cepa para cepa, particularmente os epítomos que entram em contato com os anticorpos. Conseqüentemente, a análise do segmento MRNA pode fornecer uma aproximação mais sensível à classificação dos flebovírus (Liu *et al.*, 2003). Assim como seu estudo é importante para uma futura produção de vacina recombinante (Bishop, 1990).

Enquanto que o estudo do segmento PRNA é importante tanto para o entendimento dos mecanismos de patogênese, como para auxiliar nos estudos de rearranjo viral dentro do gênero *Phlebovirus* (Bishop,1990; Nunes *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2007 b).

### 1.4.3 *Phlebovirus* isolados na Amazônia brasileira

Na Amazônia brasileira, já foram isolados 23 flebovírus, sendo dez ainda não registrados no Catalogo Internacional de Arbovírus, incluindo outros vírus de vertebrados e quatro ainda não grupados em complexos sorológicos (Quadro 5) (Travassos da Rosa *et al.*, 1983; Vasconcelos, P.F.C., comunicação pessoal).

Desse total de 23 flebovírus isolados na Amazônia brasileira, quatro foram obtidos de amostras de sangue de seres humanos com doença febril aguda autolimitada e os demais foram isolados de marsupiais, roedores, flebotomíneos (*Lutzomyia*) e mosquitos (*Culex* e *Coquillettidia*) (Aitken *et al.*, 1975, Rodrigues *et al.*, 1998; Travassos da Rosa *et al.*, 1998).

Um fato importante é que até o momento todos os quatro vírus isolados de seres humanos, quais sejam *Virus Candiru*, *Virus Alenquer*, *Virus Serra Norte* e *Virus Morumbi* pertencem ao mesmo complexo antigênico, o Complexo Candiru (Vasconcelos *et al.*, 1992). Ainda dentro deste complexo inclui-se o *Virus Itaituba*, isolado uma única vez do sangue de um marsupial da espécie *Didelphis marsupialis* (Rodrigues *et al.*, 1998).

**Quadro 5** - Flebovírus isolados na Amazônia brasileira.

<b>VÍRUS</b>	<b>DATA DE ISOLAMENTO</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>FONTE</b>	<b>LOCAL</b>
<i>Virus Alenquer</i>	05-31-1976	Sangue	Humano	Alenquer - PA
<i>Virus Ambe</i>	01-14-1982	Artrópode	<i>Phlebotominae sp</i>	Altamira - PA
<i>Virus Anhangá</i>	10-01-1962	Víscera	<i>Choloepus brasiliensis</i>	Castanhal - PA
<i>Virus Ariquemes</i>	30-12-1988	Artrópode	<i>Lutzomyia sp</i>	Samuel - RO
<i>Virus Belterra</i>	09-22-1978	Víscera	<i>Proechimys longicaudatus</i>	Belterra - PA
<i>Virus Bujaru</i>	10-26-1962	Sangue	<i>Proechimys guyannensis</i>	Belém - PA
<i>Virus Candiru</i>	09-27-1960	Sangue	Humano	Ipixuna - PA
<i>Virus Icoaraci</i>	10-16-1960	Víscera	<i>Nectomys squamipes</i>	Belém - PA
<i>Virus Itaituba</i>	12-08-1971	Sangue	<i>Didelphis marsupialis</i>	Itaituba - PA
<i>Virus Itaporanga</i>	11-10-1963	Víscera	Rato (sentinela)	Belém - PA
<i>Virus Jacunda</i>	10-31-1984	Víscera	<i>Myoprocta agouchi</i>	Tucuruí - PA
<i>Virus Joa</i>	03-29-1979	Artrópode	<i>Lutzomyia sp</i>	Altamira - PA
<i>Virus Morumbi</i>	04-12-1988	Sangue	Humano	Tucuruí - PA
<i>Virus Mucura</i>	30-05-1985	Artrópode	<i>Anopheles (Nyss) triannulatus</i>	Tucuruí - PA
<i>Virus Munguba</i>	09-20-1980	Artrópode	<i>Lutzomyia umbratilis</i>	Monte Dourado - PA
<i>Virus Oriximina</i>	07-03-1980	Artrópode	<i>Lutzomyia sp</i>	Oriximiná - PA
			<i>Oryzomys goeldi</i>	
<i>Virus Pacui</i>	02-10-1961	Sangue	<i>Lutzomyia flaviscutellata</i>	Ipixuna - PA
<i>Virus Salobo</i>	04-09-1997	Sangue	<i>Proechimys sp</i>	Carajás - PA
<i>Virus Serra Norte</i>	03-01-1991	Sangue	Humano	Carajás - PA
<i>Virus Tapara</i>	02-04-1983	Artrópode	<i>Phlebotominae sp</i>	Altamira - PA
<i>Virus Turuna</i>	07-26-1978	Artrópode	<i>Lutzomyia sp</i>	Oriximiná - PA
<i>Virus Uriurana</i>	12-16-1985	Artrópode	<i>Phlebotominae sp</i>	Tucuruí - PA
<i>Virus Urucuri</i>	04-19-1966	Sangue	<i>Proechimys guyannensis</i>	Belém - PA

Fonte: Modificado de Rodrigues *et al.*, 1998.

## 1.5 OBJETIVOS

### 1.5.1 Objetivo geral

Realizar a caracterização genética parcial de cinco flebovírus do complexo Candiru isolados na Amazônia brasileira e desenvolver estudos de infecção experimental em hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) com os mesmos flebovírus.

### 1.5.2 Objetivos específicos

- Verificar a viabilidade da infecção por via intraperitoneal com os *Virus Alenquer*, *Virus Candiru*, *Virus Itaituba*, *Virus Morumbi* e *Virus Serra Norte* em hamsters dourados jovens (*Mesocricetus auratus*).
- Verificar a suscetibilidade de culturas celulares de *Aedes albopictus* (clone C6/36) e células de *Cercopithecus aethiops* (VERO) a infecção pelos flebovírus do Complexo Candiru em estudo.
- Determinar os níveis de viremia em hamsters inoculados com esses flebovírus.
- Realizar estudos histopatológicos de órgãos (pulmões, rins, fígado, cérebro, baço e coração) de hamsters dourados inoculados com os flebovírus e determinar o principal órgão alvo para os mesmos.
- Demonstrar a presença de antígenos virais no tecido hepático dos animais infectados com os cinco flebovírus usados neste estudo, através da técnica de imunohistoquímica.
- Amplificar e seqüenciar parte do genoma dos segmentos PRNA e MRNA dos cinco flebovírus do Complexo Candiru em estudo.

- Analisar filogeneticamente as seqüências obtidas quanto à homologia ao nível de nucleotídeo e aminoácido.
- Verificar a possibilidade de existência de rearranjo genético em natureza entre os flebovírus estudados, mediante análise das árvores filogenéticas obtidas para os segmentos PRNA e MRNA.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 Amostras virais

Nesse estudo foram utilizadas cinco amostras de vírus do Complexo Candiru, gênero *Phlebovirus* (família: *Bunyaviridae*), isoladas na Amazônia brasileira (Figura 5). As informações referentes à sua distribuição geográfica, hospedeiro e ano de isolamento encontram-se assinaladas no Quadro 6. As amostras virais foram obtidas da coleção de vírus da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do IEC / SVS / MS, Belém-Pará.

**Quadro 6** - Amostras do Complexo Candiru estudadas.

Vírus	Hospedeiro	Localidade	Ano de Isolamento
<i>Virus Alenquer</i> (BeH301101)	Homem	Alenquer	1976
<i>Virus Candiru</i> (BeH22511)	Homem	Rodovia Belém-Brasília Ipixuna-PA	1960
<i>Virus Itaituba</i> (BeAn 213452)	<i>Didelphis marsupialis</i>	Itaituba	1971
<i>Virus Morumbi</i> (BeH475236)	Homem	Novo Repartimento	1988
<i>Virus Serra Norte</i> (BeH 505240)	Homem	Carajás	1991



### **2.1.2 Animais**

No estudo foram utilizados 120 hamsters dourados jovens (*Mesocricetus auratus*), e 570 camundongos albinos suíços recém-nascidos (*Mus musculus*), sendo todos os animais cedidos pelo IEC. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPAN) do IEC (anexo 1), e acompanhados por um médico veterinário. Após os procedimentos a serem descritos na metodologia, todos os animais foram sacrificados, acondicionados em sacos plásticos e mantidos à – 20 °C até o momento do seu transporte à sede do IEC de Ananindeua, onde foram incinerados.

## **2.2 MÉTODOS**

A metodologia está dividida em duas partes: Infecção experimental e caracterização genética.

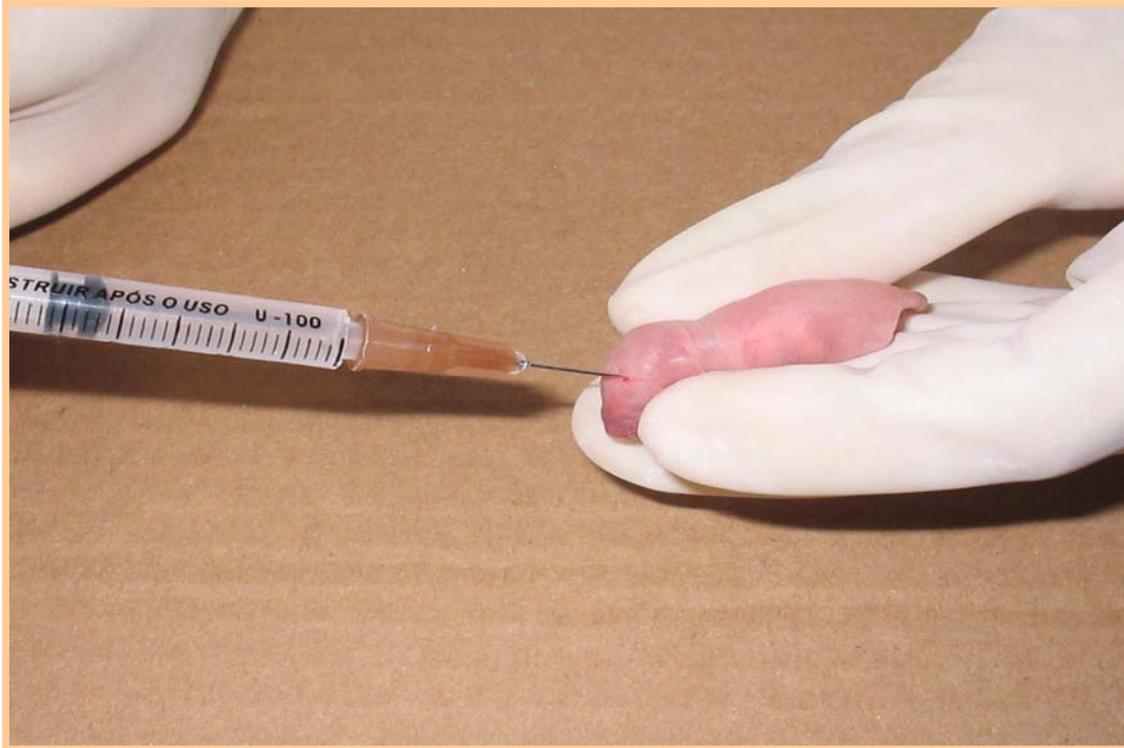
### **2.2.1 Infecção experimental**

Para a infecção experimental foram utilizadas as seguintes etapas: I) Preparação do estoque viral; II) Titulação viral; III) Viabilidade de infecção em cultivos celulares; IV) Imunofluorescência indireta; V) Infecção experimental em hamsters dourados; VI) Viremia; VII) Análise Histopatológica; VIII) Produção de soro homologa; IX) Detecção do antígeno viral pela técnica de imunohistoquímica.

### 2.2.1.1 Preparação do estoque viral

Como fontes de vírus foram utilizadas amostras do estoque viral (*Virus Alenquer*, *Virus Itaituba* e *Virus Candiru*) e protótipos virais liofilizados (*Virus Morumbi* e *Virus Serra Norte*). As amostras liofilizadas foram hidratadas com 0,5 mL de água destilada estéril, sendo posteriormente adicionado 0,5 mL de solução de albumina bovina 0,75 % em solução salina tamponada (PBS) contendo penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100µg/mL) (Beaty *et al.*, 1989).

Em seguida, para o preparo do estoque viral foram realizadas inoculações por vic de 0,02 mL do inóculo viral recém preparado, em camundongos albinos suíços recém-nascidos ( 2 - 3 dias), utilizando-se para esse procedimento seringas de 1mL e agulhas de 12,7 mm X 0,33 mm (Figura 6). Todos os procedimentos foram feitos em cabine de fluxo laminar classe II B2, e os camundongos foram colocados em número de seis por gaiola acompanhada por uma mãe recém parida. Estes camundongos foram observados diariamente no biotério da SAARB até adoecerem, sendo então retirados e acondicionados em sacos plásticos devidamente fechados e identificados para cada tipo viral, e estocados em freezer a -70 °C até o momento de uso.



**Figura 6** - Inoculação por via intracerebral em camundongo albino suíço recém-nascido.

#### 2.2.1.2 Titulação viral

A titulação viral foi realizada partindo-se de uma suspensão de cérebro de camundongo do estoque infectado com o vírus em estudo. Os mesmos tiveram os cérebros retirados e macerados em gral e pistilo de porcelana, e acrescido de PBS (1,8 mL por cérebro), contendo albumina bovina a 0,75 % e os antibióticos penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), nas diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ . Cada diluição foi inoculada por vic, na quantidade de 0,02 mL por camundongo recém-nascido (2-3 dias de idade), utilizando-se para esse procedimento seringas de 1 mL e agulhas de 12,7 mm x 0,33 mm. Todos os procedimentos foram feitos nas mesmas condições

descritas no item anterior, sendo os mesmos observados diariamente e tendo as informações em relação a doença ou morte anotados em um cartão de inoculação ( anexo 2 ).

O título viral foi calculado através do método de Reed & Muench (1938), sendo expresso em  $DL_{50} / 0,02 \text{ mL}$ , ou seja, a dose capaz de matar 50 % dos animais inoculados.

### 2.2.1.3 Viabilidade de infecção em cultivos celulares

Duas linhagens celulares foram utilizadas para investigar a viabilidade de infecção pelos cinco phlebovirus em estudo:

– Células de linhagem contínua de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), VERO, utilizadas nos experimentos foram originadas de uma linhagem doada pelo controle de qualidade da vacina de febre amarela de Biomanguinhos da Fundação Osvaldo Cruz. Para manutenção dessas células, foram feitas passagens semanais trocando-se o meio nessa ocasião ou quando o pH tornava-se ácido (amarelo). Quando as células formavam uma monocamada eram consideradas prontas para serem utilizadas nos experimentos ou passadas para manutenção. Para as células em manutenção, utilizavam-se garrafas plásticas de 25 cm<sup>2</sup>. A técnica utilizada na preparação de garrafas e tubos para os experimentos, foi a da tripsinização. No início dos trabalhos foi feita uma assepsia rigorosa na sala de cultura, passando-se álcool a 70 % em todos os materiais a serem utilizados no fluxo laminar.

Após observação da monocamada celular em microscópio invertido (Zeiss modelo Axiovert S100) com objetiva de 20 X, retirou-se o meio de cultura da mesma, e a camada celular foi então lavada rapidamente com tripsina (2mL), para retirar o excesso de soro.

Em seguida, foi adicionado um pequeno volume de tripsina 0,25 % (0,5 mL) sobre as células, para que as mesmas começassem a desprender-se da garrafa; quando as células estavam soltas acrescentou-se um pequeno volume de meio 199 (5 mL) com 10 % de SBF sendo em seguida feita a homogeneização com pipetações sucessivas (pipeta automática). A suspensão obtida foi então distribuída em outras garrafas na proporção de 1:3 para manutenção. As suspensões celulares divididas foram complementadas com meio 199 acrescido de 10 % de SBF, levadas para incubação em estufa a 37 °C até o momento de serem utilizadas ou passadas novamente.

As células foram colocadas em estufa (NAPCO) com 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C. O meio de crescimento utilizado para as células VERO, foi o meio 199 suplementado com 2 % de L-glutamina 2 mM , 1 % de HEPES , 10 % de soro bovino fetal (SBF), penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 mg/mL) e 1,5 g/L de bicarbonato de sódio (Lennette, 1995). Antes das células serem infectadas, o meio de crescimento foi trocado pelo meio de manutenção, o qual é semelhante ao de crescimento, exceto na concentração de SBF que diminui para 2 % (Lennette, 1995). Após o meio de manutenção ser adicionado à garrafa (4 mL), a mesma foi inoculada com 1 mL de suspensão viral. Após a inoculação, as células foram mantidas em estufa a 37 °C.

– Células de linhagem contínua de *Aedes albopictus* (clone C6/36), foram mantidas através de passagens seriadas semanalmente em garrafas plásticas de 25 cm<sup>2</sup> e armazenadas à temperatura ambiente (TA). O meio utilizado foi o de Leibowitz modificado acrescido de glutamina (L-15), acrescido de tryptose fosfato, aminoácidos não essenciais, penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 mg/mL), 5 % de SBF para o meio de crescimento e 2 % para o meio de manutenção. As células foram observadas em microscópio óptico invertido (Axiovert S100) até a formação da monocamada, quando era trocado o meio de crescimento pelo de manutenção (4 mL), estando prontas para serem utilizadas nos experimentos.

Em ambas as linhagens (VERO e C6/36), foi usado 1 mL do sobrenadante das suspensões virais provenientes do macerado de cérebro de camundongo recém-nascido na diluição de 10<sup>-1</sup>, preparadas como no item anterior, sendo previamente filtradas em membranas de filtros Millipore de 0,22 µm, e inoculadas após formação da monocamada celular, as mesmas foram observadas diariamente em microscópio óptico invertido na tentativa de se visualizar o efeito citopático (ECP). Quando a monocamada celular apresentou aproximadamente 75 % de ECP após dez dpi, as monocamadas foram fotografadas (máquina fotográfica Cânon power short G6 acoplada em microscópio óptico invertido Axiovert S100) e depois as garrafas foram levadas à cabine de fluxo laminar para o material ser alicotado, parte destas foi utilizada no teste de imunofluorescência indireta (IFI) e o restante armazenado a -70 °C.

#### 2.2.1.4 Imunofluorescência indireta

Para a realização da técnica de IFI foi utilizado o método estabelecido por Gubler *et al.* (1984). Foram utilizadas células C6/36 e VERO infectadas com as amostras virais, bem como, células não infectadas (controle negativo).

A suspensão viral colocada nas lâminas foi seca e imediatamente fixada com acetona durante quinze minutos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sendo então, as lâminas secas à TA. Após a secagem foram acrescentados  $10\text{ }\mu\text{L}$  de soro homólogo, na diluição de 1: 20 em PBS pH 7, 4, sendo as lâminas posteriormente incubadas em câmara úmida na estufa a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 30 minutos. A seguir as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS por cinco minutos cada e, uma vez rapidamente, com água destilada e, em seguida secas a TA. Após isto, foram adicionados  $10\text{ }\mu\text{L}$  de conjugado anti -camundongo, na diluição de 1:800 em PBS (pH 7,4), sendo as lâminas incubadas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  em câmara úmida durante 30 minutos. Foram então, lavadas como anteriormente. Finalmente, as lâminas foram secas à TA, e montadas com glicerina tamponada, pH 8,2 e lamínulas de vidro. A leitura foi realizada em microscópio para fluorescência (ZEISS modelo Axiophot) com epi-iluminação, usando ocular de 10 x e objetiva de 40 x de aumento, foram feitas fotografias em microscópio ótico modelo Axioskop 40 com câmara fotográfica Axiocam HCr acoplada, ambos fabricados pela ZEISS.

### 2.2.1.5 Infecção experimental em hamsters dourados

Para os estudos de infecção experimental, foram utilizados para cada um dos cinco flebovírus, 24 hamsters dourados jovens, com até quatro semanas de idade, os mesmos foram anestesiados pela inalação de éter etílico PA (Masone, 2003), e inoculados com 0,1 mL de suspensão viral a 10 % ( preparada a partir de cérebro de camundongo recém nascido infectado), por via intraperitoneal (vip), utilizando-se nesse procedimento seringas de 1 mL e agulhas de 25 mm x 0.7 mm (Figura 7).



**Figura 7** - Inoculação por via intraperitoneal em hamster dourado com flebovírus usados neste estudo.

Após a inoculação hamsters foram observados quanto à presença de sinais de doença e coletados diariamente, em número de três animais por dia (dois inoculados e um controle), por flebovírus inoculado até o sétimo dpi, e três no vigésimo primeiro dpi. Esses hamsters eram anestesiados através de inalação de éter etílico PA (Massone, 2003) sendo o sangue retirado por punção intracardiaca, em seguida sacrificados e os órgãos retirados e fixados em formalina tamponada 10 % (Figura 8).



**Figura 8** - Exemplo de autópsia de hamster dourado infectado com flebovírus para retirada de fragmentos de tecidos para estudos patológicos.

O procedimento anestésico foi realizado da seguinte maneira: cada animal foi colocado em um recipiente fechado contendo o anestésico citado, e mantido neste local por aproximadamente 50 segundos, após o seu desfalecimento, o mesmo foi levado a um fluxo laminar classe II B2, e submetido à dissecação para retirada dos órgãos. Em seguida os animais utilizados foram armazenados em sacos plásticos e mantidos congelados à -20 °C até o momento do seu transporte à sede do IEC em Ananindeua, onde foram incinerados.

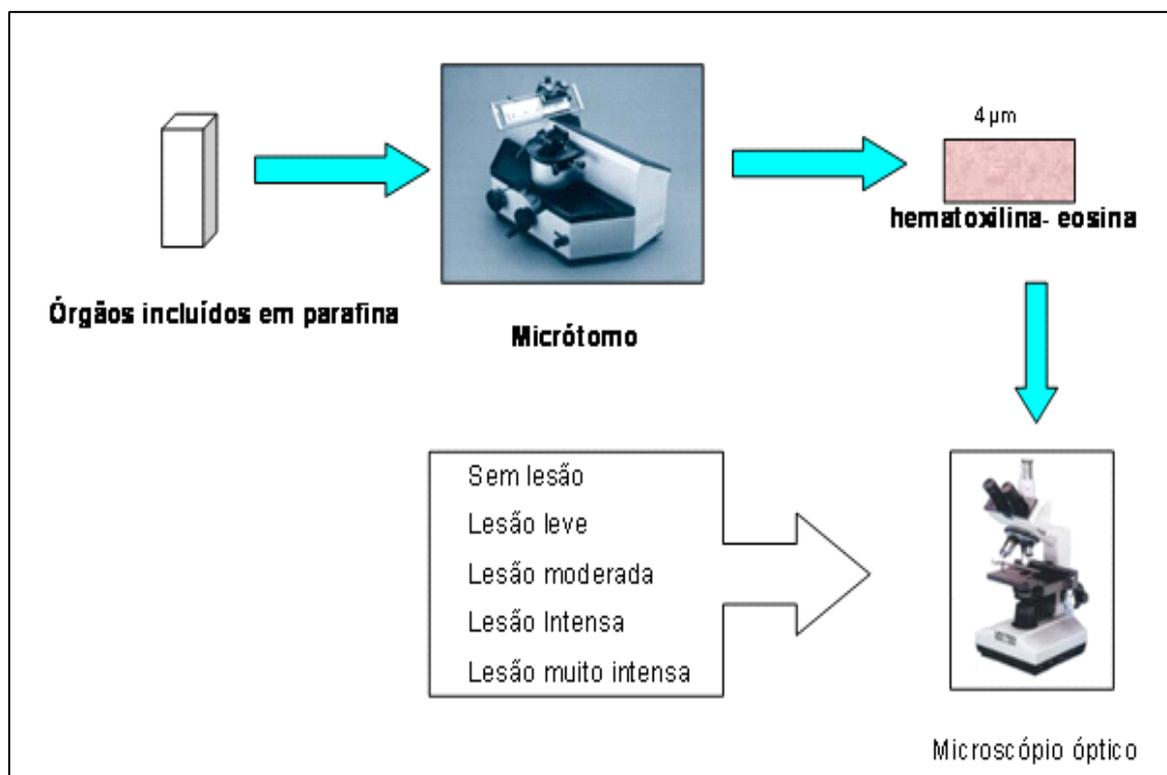
#### 2.2.1.6 Viremia

A partir das amostras de sangue coletadas dos hamsters, foram preparadas diluições seriadas de  $10 \times (10^{-1} \text{ a } 10^{-7})$  em solução fosfato-salina tamponada pH 7,4 contendo albumina bovina a 0,75 % e antibióticos (100UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina), as quais foram inoculadas por vic em camundongos albinos suíços recém-nascidos, de dois a três dias de idade. O título viral também foi calculado segundo o método de Reed & Muench (1938), sendo expresso como  $DL_{50}/0,02 \text{ mL}$ .

#### 2.2.1.7 Análise histopatológica

Para os estudos histopatológicos, os órgãos retirados e fixados em formalina tamponada 10 %, foram incluídos em parafina e as matrizes teciduais foram submetidas à microtomia obtendo-se cortes de 4 µm que em seguida foram corados pela técnica de hematoxilina - eosina (HE) (Prophet *et al.*,1992; Michalany,1998; Barros,2000). As lâminas foram examinadas em microscópio

óptico da marca Nikon modelo Eclipse E 200 e fotografadas com câmera fotográfica modelo Axiocam HCr acoplada em microscópio óptico modelo Axiophot, ambos da marca ZEISS. A análise dos eventos foi avaliada adotando-se os seguintes escores: sem lesão, lesão leve, lesão moderada, lesão intensa, lesão muito intensa (Figura 9) (Xiao *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2007).



**Figura 9** - Esquema dos procedimentos de histopatologia utilizados neste estudo.

#### 2.2.1.8 Produção do soro homólogo

Os soros homólogos contra os cinco flebovírus usados neste estudo foram produzidos a partir da imunização de camundongos suíços jovens. O esquema de imunização consistiu de quatro injeções por vip, administradas em intervalos de sete dias, na quantidade de 0,2 mL por animal. Os antígenos imunizantes foram preparados a partir de cérebro de camundongos infectados com cada um dos cinco vírus em estudo em uma suspensão a 10 % em solução de NaCl a 0,85% (Casals, 1967). Os animais foram mantidos no biotério da SAARB em número de seis por gaiola, devidamente alimentados. A punção intracardiaca foi feita após intervalo mínimo de sete dias após a última injeção, sendo que o sangue colhido foi centrifugado a 2.800 rpm durante sete minutos. O soro foi separado e conservado à -20 °C, para ser utilizado em testes sorológicos. Para a realização da sangria os animais estavam anestesiados com éter etílico PA (Massone, 2003).

#### 2.2.1.9 Detecção do antígeno viral pela técnica de imunohistoquímica

Os cortes histológicos de 4 µm de espessura de fígado obtidos a partir das matrizes embebidas em parafina foram colhidos em lâminas previamente tratadas com solução adesiva de 3 amino-propyltriethoxy-silane (Sigma Chemical Co.). A seguir, as lâminas foram desparafinadas em dois banhos de xilol a 56 °C durante 30 minutos e à TA durante vinte minutos; depois hidratados em seqüência decrescente de etanol (absoluto, 95 % e 70 %) e água corrente durante cinco minutos cada.

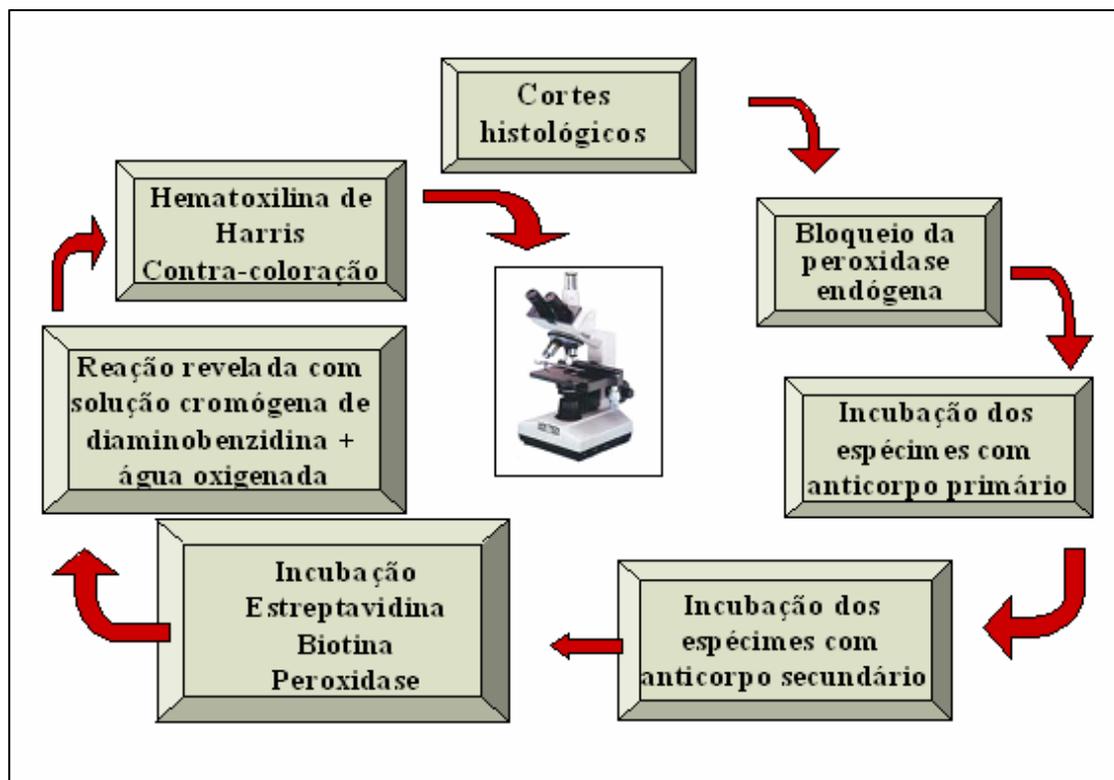
Posteriormente, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena, em câmara escura com três incubações com água oxigenada a 3 % por dez minutos cada, e em seguida as lâminas foram novamente lavadas em água corrente e água destilada por dez minutos.

Na etapa seguinte, foi feita a incubação dos espécimes com os anticorpos primários policlonais obtidos de camundongos jovens diluídos em solução 1 % de albumina bovina fração V (SERVA cód. 11930) acrescida de azida sódica 0,1 % em PBS pH 7,4, permanecendo durante a noite a temperatura de 4 °C.

Após duas lavagens com PBS por cinco minutos cada, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário anti - IGg de camundongo, marcado com biotina, por 30 minutos a 37 °C e em seguida as lâminas foram incubadas com o complexo estreptavidina-biotina peroxidase por 30 minutos a temperatura de 37 °C.

A reação foi revelada com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3'- diaminobenzidina, SIGMA Chemical Co.) a 0,03 % acrescida de 1,2 mL de água oxigenada a 3 %.

Os cortes histológicos foram lavados em água corrente por dez minutos, contracolorados com hematoxilina de Harris por dez segundos, sendo posteriormente lavados em água corrente, desidratados em etanol e diafanizados em xilol (Figura 10). A montagem das lâminas foi feita com resina Permunt (Fisher Scientific Co.) (Hsu *et al.*, 1981). A leitura das lâminas e fotografias foram realizadas com microscópio Axiophot e máquina fotográfica Axiocam HCr, ambos da marca ZEISS.



**Figura 10** - Esquemas dos procedimentos de imunohistoquímica usados neste estudo.

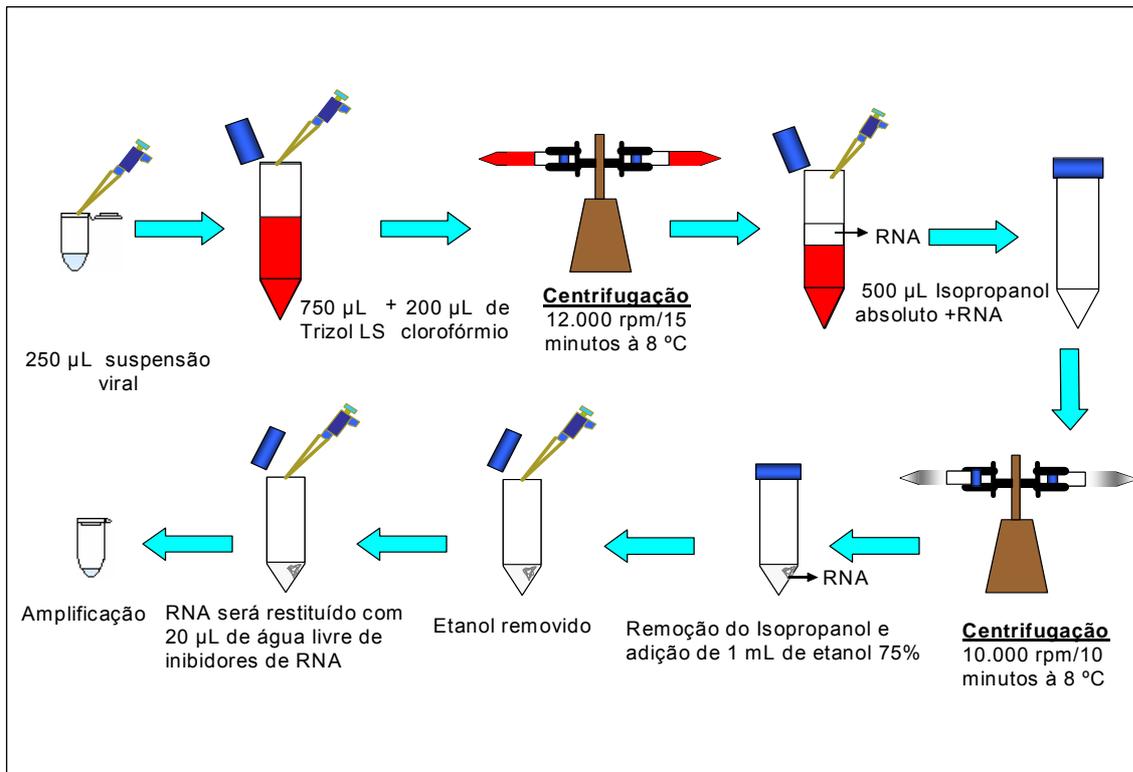
### 2.2.2 Caracterização genética

Para a caracterização genética foram utilizadas as seguintes etapas:

- I) Extração do RNA viral;
- II) Amplificação parcial dos segmentos PRNA e MRNA pela técnica da Transcrição-Reversa seguida de Reação em Cadeia mediada pela Polimerase (RT-PCR);
- III) Seqüenciamento nucleotídico ;
- IV) Análise das seqüências e Filogenia

### 2.2.2.1 Extração do RNA viral

O RNA viral foi extraído diretamente da suspensão de cérebro de camundongos recém nascidos infectados utilizando a técnica do TRIZOL LS reagente (Invitrogen) conforme descrição do fabricante. Brevemente, no interior de microtubos de 1,5 mL, o volume de 750 µL de TRIZOL LS foi adicionado a 250 µL de material contendo partículas virais (suspensão viral proveniente da maceração de cérebro de camundongos) e incubados a TA (em média 25 °C ), por cinco minutos para que a lise das partículas virais ocorresse, seguido da adição de 200 µL de clorofórmio absoluto; posteriormente os tubos foram agitados em vortex e incubados a TA ,por dez minutos. Em seguida os tubos foram centrifugados durante quinze minutos a 12.000 rpm a 8 °C. A fase transparente (aquosa) contendo o RNA viral foi transferida para um novo microtubo estéril e 500 µL de isopranoal absoluto (MERCK,Germany) foram, adicionados para auxiliar a precipitação do RNA, com incubação a TA durante dez minutos seguida de centrifugação a 10.000 rpm a 8 °C durante dez minutos. O isopranoal foi removido cuidadosamente e o RNA precipitado, lavado com 1 mL de etanol 75 % (MERCK) e centrifugado a 8.000 rpm durante 5 minutos a 8 °C. Finalmente o etanol foi retirado, o RNA seco a vácuo, posteriormente reconstituído com 20 µL de água livre de inibidores de RNA e utilizado imediatamente para amplificação do genoma viral (Figura 11).



**Figura 11** - Esquema do procedimento de extração do RNA viral adotado neste estudo.

### 2.2.2.2 Amplificação parcial dos segmentos PRNA e MRNA pela técnica da transcrição - reversa seguida de reação em cadeia mediada pela polimerase (RT-PCR)

A amplificação parcial dos segmentos PRNA e MRNA dos flebovírus foi realizada pela técnica de RT-PCR em duas etapas empregando-se iniciadores degenerados desenhados com base em regiões relativamente conservadas do segmento MRNA do *Virus Rift Valley fever*, *Virus Toscana* e *Virus Uukuniemi* (Liu *et al.*, 2003), e regiões altamente conservadas dos

segmentos PRNA do *Virus Rift Valley fever*, *Virus Uukuniemi*, *Virus Punta Toro*, *Virus Sandfly fever Sicilian* e *Virus Toscana* ( Xu *et al.*, 2007a).

Para a síntese do DNA complementar (DNAc), no lugar de iniciadores específicos, foi utilizado um iniciador randômico (Invitrogen). A reação incluiu 5 µL de RNA (1 µg), 4 µL de tampão de RT 5X (Tris/HCl 250 mM pH 8.3; KCl 375 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM), DTT 0,2 µmol, 400 µmol de iniciador randômico, 40 unidades de inibidor de RNA (Invitrogen) e 50 unidades de enzima RT SuperScript II (Invitrogen) ajustada para o volume final de 20 µL. A reação foi realizada inicialmente a 25 °C por dez minutos seguida por uma hora a 42 °C e finalizada a 70 °C por quinze minutos.

A PCR foi realizada para um volume final de 50 µL composta por 2 µL (2 µg) do DNAc e 48 µL da mistura de PCR constituída de tampão de PCR 1X (Tris/HCl 10 mM pH 8,3; KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM), 40 µM dos iniciadores degenerados ou conservados (xu *et al.*, 2007a) (Quadro 7), 200 µmol de DNTPs (Invitrogen), 2,5 unidades de Taq DNA polymerase (Invitrogen) .

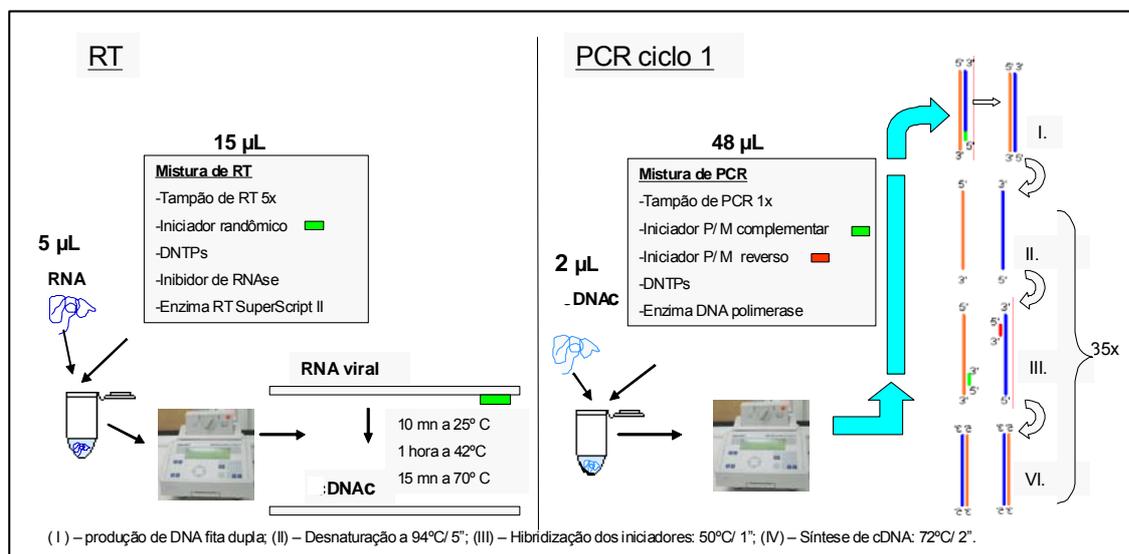
**Quadro 7** - Iniciadores usados na amplificação parcial dos segmentos PRNA e MRNA dos flebovírus em estudo.

Iniciadores	Seqüência (5' →3')	Polaridade	Tamanho esperado
Ph-M-2FM*	GGVMTSMTHAATTAYCAGTGYCA	+	600 pb
Ph-M-3RM*	CAYCTYCKNGARCTNARRCA	-	600 pb
PHLV- END**	GGGGGGGGGGACACAAAG	+	500 pb
PH-S-DR-RVF**	AAAGCTGGGGTGCATCAT	-	500 pb

\* Iniciadores Degenerados

\*\* Iniciadores Conservados

A PCR foi realizada num total de 35 ciclos, cada um composto por etapas de 94 °C por cinco minutos, 50 °C por 1 minuto e 72 °C por dois minutos (Figura 12). Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1,2 % corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). Em seguida foram retirados do gel e purificados usando um kit comercial (Qiaquick RNA gel extraction kit, Qiagen).



**Figura 12** - Esquema da técnica de RT - PCR utilizada neste estudo.

### 2.2.2.3 Seqüenciamento nucleotídico

O seqüenciamento do DNAc previamente purificado foi realizado utilizando o kit *ABI PRISM Dye Terminator* (Applied Biosystems) cujas reações foram processadas em seqüenciador automático *ABI PRISM 3100* (Applied Biosystems) pelo emprego do método de terminação de cadeia por

dideoxirribonucleotídeos 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 DNA (A, C, T, G) localizados na extremidade 3' (Sanger *et al.*, 1977).

O seqüenciamento das amostras pelo método automático foi realizado como descrito a seguir: a reação de seqüenciamento foi composta pela mistura de 5 µL (80 ng) de DNAc , 4 µL de tampão de reação contendo os dideoxynucleotídeos fluorescentes ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP (*Terminator reaction mix*), 1 µL (3,5 pmol) dos iniciadores específicos (Quadro 7), sendo as mesmas 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 dez segundos, hibridização dos iniciadores a 50 °C por cinco segundos e síntese à 60 °C por quatro minutos. Precipitação do DNA pela adição de 80 µL de isopropanol 75 %, sendo as amostras em seguida incubadas por vinte minutos a temperatura ambiente e posteriormente centrifugadas por 25 minutos à 14.000 rpm a 8 °C; o isopropanol foi removido e as amostras, lavadas com 250 µL de etanol a 70 %; e novamente centrifugados a 12.000 rpm por cinco minutos à 8 °C. O excesso de etanol foi removido das amostras mediante incubação a 90 °C por dois minutos. Finalmente o DNA foi reconstituído com 5 µL de solução de formamida (pH 7) e azul dextran-EDTA (pH 8), na proporção 5:1, respectivamente.

A eletroforese no seqüenciador automático foi realizada durante aproximadamente sete horas, quando então os fragmentos de DNA marcados eram separados de acordo com seus tamanhos (diferença de um 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 seqüenciador.

#### 2. 2.2.4 Análise das seqüências e filogenia

As seqüências nucleotídicas obtidas para os segmentos PRNA e MRNA referentes aos flebovírus utilizados no estudo foram inicialmente analisados quanto a qualidade utilizando o programa, SeqMan star 5.03 © (DNA star inc.), e posteriormente, comparadas entre si e com seqüências de outros membros do gênero *Phlebovirus* cujas seqüências nucleotídicas encontram-se disponíveis no banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), pelo método de alinhamento múltiplo utilizando o programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) . As árvores filogenéticas foram construídas usando os métodos de agrupamento de vizinhos (*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 3.0 (Kumar *et al.*, 2004).

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 introduzida para gerar maior confiabilidade aos valores dos grupamentos (Felsenstein, 1985). O enraizamento da árvore filogenética foi feito utilizando seqüências do *Virus Uukuniemi* que funcionaram como grupo externo proporcionando uma análise mais fidedigna do relacionamento genético dos flebovírus. O método de MV foi aplicado utilizando o teste de Kishinov - 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 RNA.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 INFECÇÃO EXPERIMENTAL

##### 3.1.1 Suscetibilidade de camundongos e hamsters aos flebovírus

Camundongos suíços recém nascidos foram suscetíveis à infecção com os vírus em estudo, apresentando, sinais como: tremores, paralisia de membros, aumento do volume abdominal e anorexia. Esses sinais apareciam 2 dpi, e os animais evoluíram para o óbito entre 3 e 4 dpi.

Os hamsters em nenhum momento ao longo do estudo experimental apresentaram sinais de doença, mostrando-se sempre ativos, e bem nutridos.

##### 3.1.2 Valores de titulação viral e viremia

Os valores de titulação viral e viremia encontrados para cada um dos cinco flebovírus estudados, possuem correlação direta com o número de passagem em camundongos suíços recém-nascidos (Quadro 8).

**Quadro 8** - Maior valor de titulação em camundongos recém nascidos e viremia em hamsters para os cinco flebovírus amazônicos estudados.

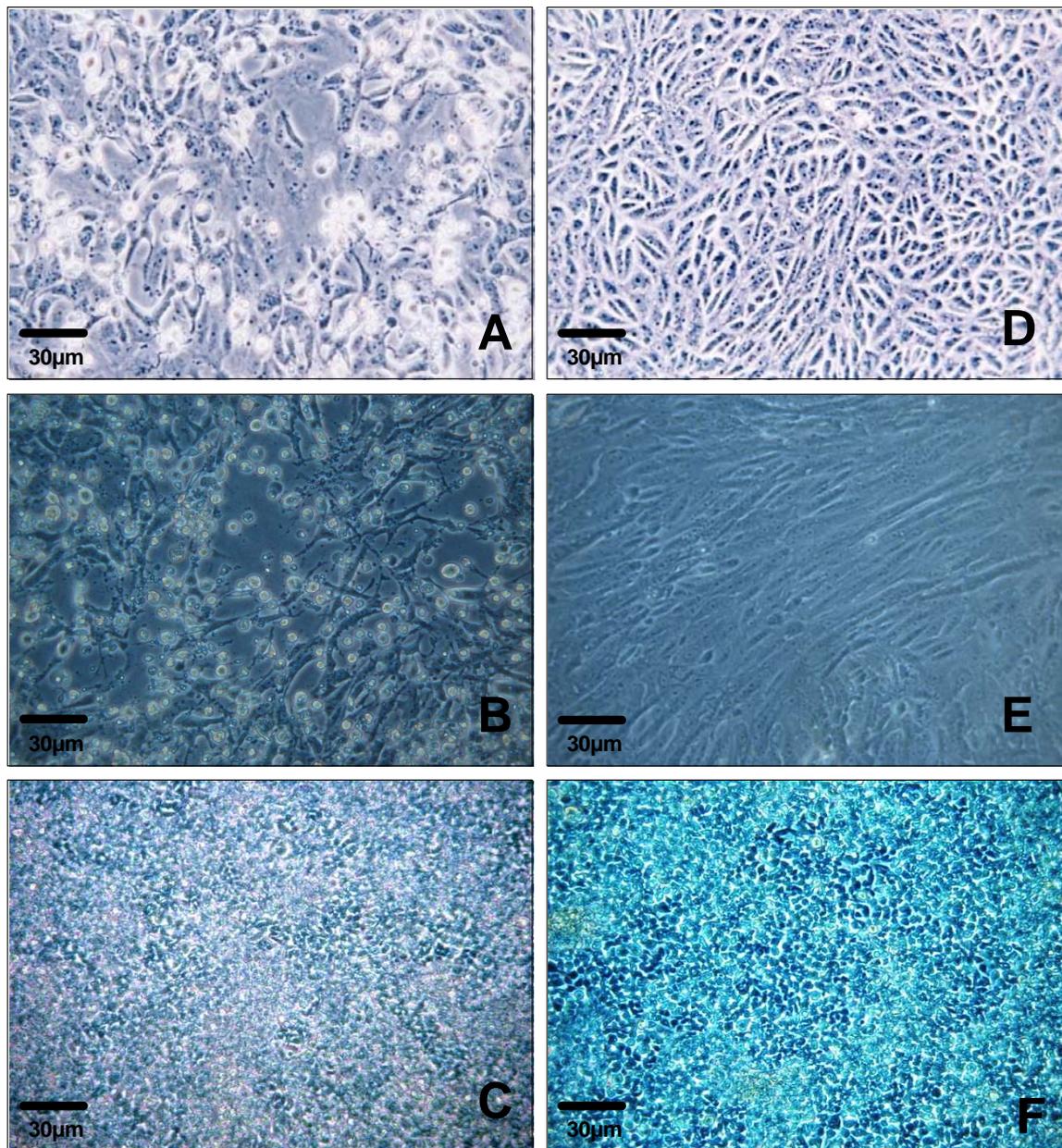
Vírus	Alenquer	Candiru	Itaituba	Morumbi	Serra Norte
*Passagem	7	26	9	4	2
**Titulo viral	5,6	7,6	7,2	5	3,2
**Viremia	≤ 0,6	≥1,7	≤ 0,8	≤ 0,6	0

\* Número de passagens do Vírus em camundongos Suíços recém-nascidos.

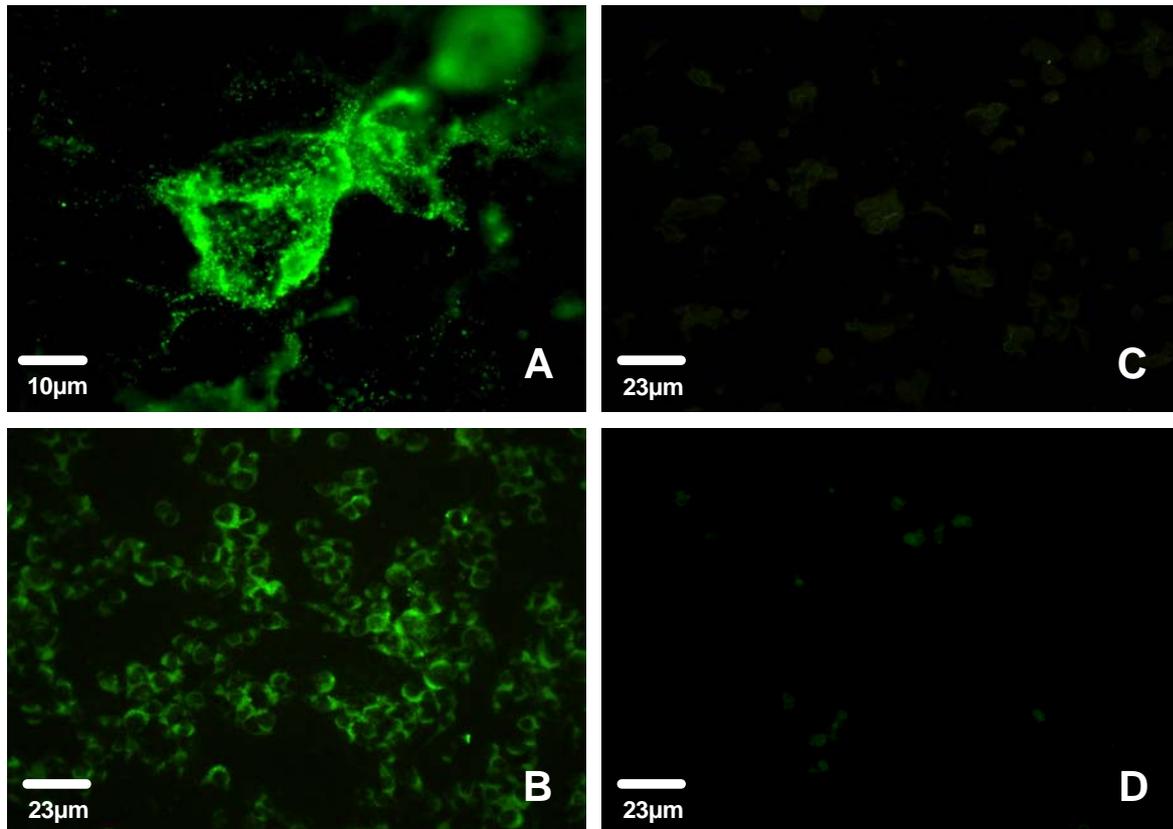
\*\* Expresso em  $DL_{50} / 0,02 \text{ mL}$

### 3.1.3 Viabilidade de infecção em cultivos celulares e IFI

Os sistemas celulares utilizados no estudo mostraram-se eficientes para a replicação e manutenção dos cinco flebovírus em estudo, sendo que as células VERO, na primeira passagem apresentaram 75 % de ECP em média com 5 dpi para quase todos os vírus inoculados exceto o *Virus Serra Norte* (7 dpi), na segunda passagem essas células apresentaram mais de 75% de ECP com 2 dpi, para todos os vírus utilizados (Figura 13). Para as células C6/36 não foi possível visualizar ECP para nenhuma das passagens mesmo após 10 dpi (figura 13). A replicação viral para ambas as linhagens celulares, foi confirmada por testes IFI (Figura 14).



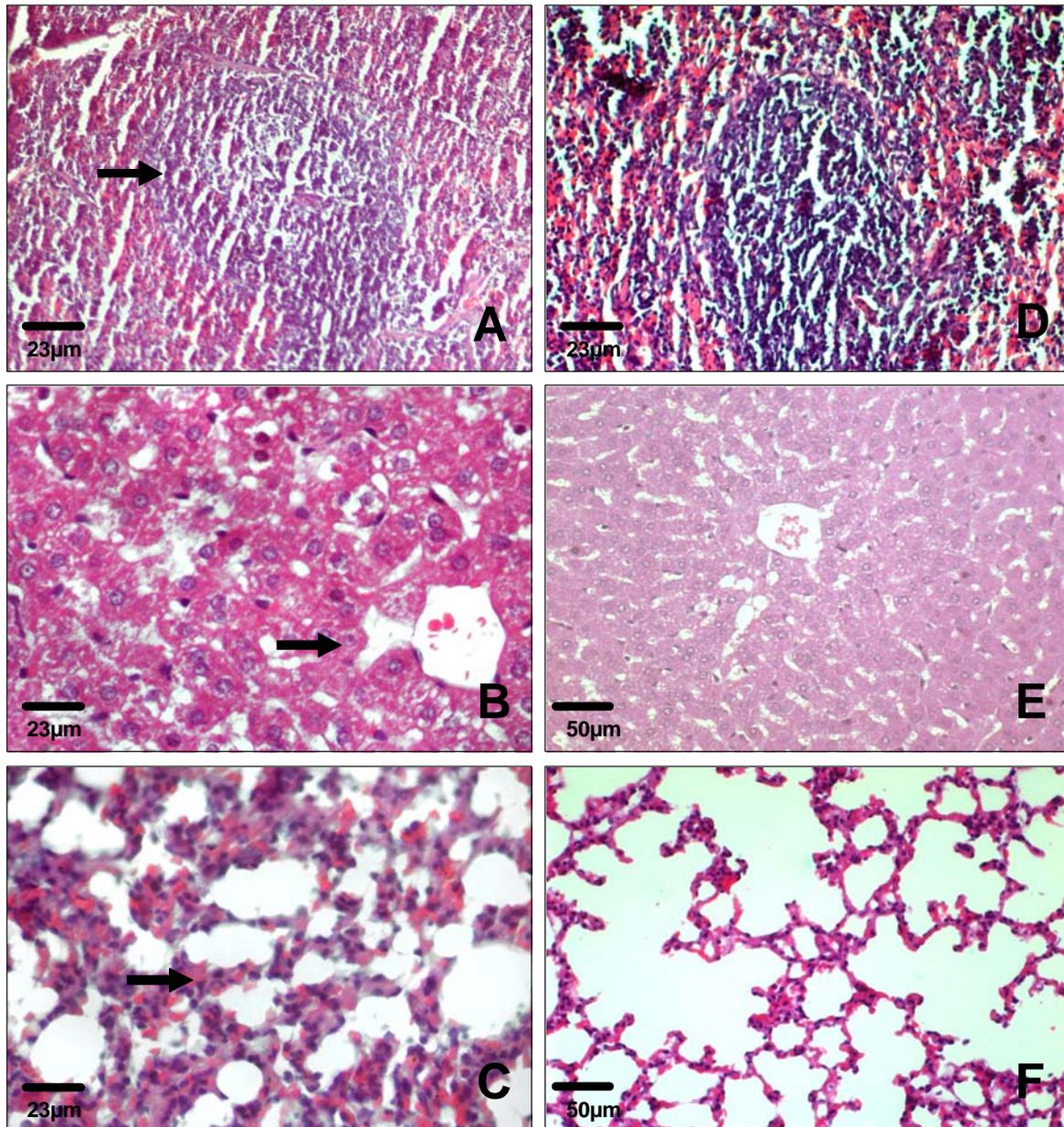
**Figura 13** - Fotos de ECP: Células VERO infectadas com 1° passagem do *Virus Morumbi*, 5 dpi (A); Células VERO infectadas com 2° passagem do *Virus Itaituba*, 2 dpi (B); Células C6/36 inoculadas com *Virus Itaituba*, 2 dpi (C). Controles negativos não infectados: D, E e F.



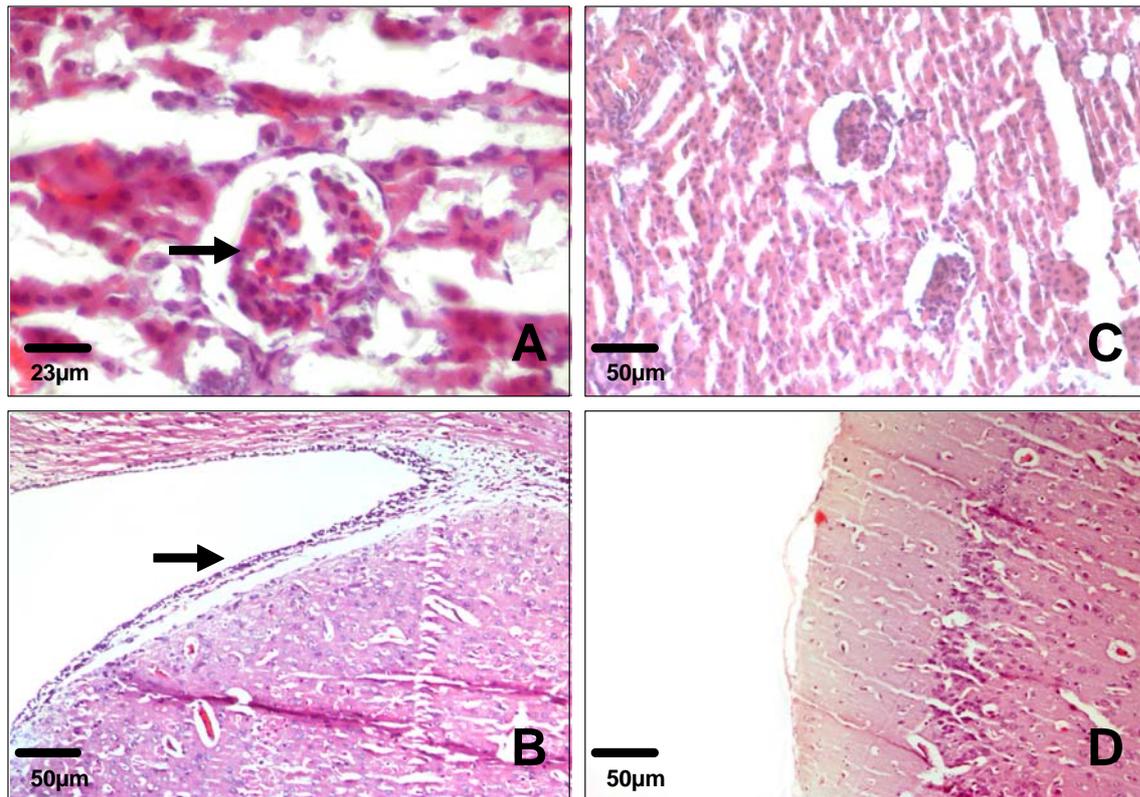
**Figura 14** – Resultados dos testes de IFI com os flebovírus: Células VERO infectadas com *Virus Alenquer* com 2 dpi (A); Células C6/36 infectadas com o *Virus Morumbi* com 2dpi, (B); Controles negativos não infectados, C e D.

### 3.1.4 Análise histopatológica

A análise histopatológica demonstrou que a reação tecidual foi semelhante e caracteristicamente localizada no fígado, nos rins, no baço, nos pulmões e no sistema nervoso central (Figura 15 e figura 16), apesar dos diferentes flebovírus inoculados em hamsters.



**Figura 15** - Aspectos histopatológicos observados em baço infectado com o *Virus Morumbi* com 6 dpi (A), Fígado infectado com o *Virus Candiru* com 6 dpi (B) e pulmão infectado com o *Virus Morumbi* com 6 dpi (C). Seta indica a hiperplasia de polpa branca do tecido esplênico (A), tumefação de hepatócitos (B) e inflamação com congestão de paredes alveolares (C). No fígado as lesões foram mais pronunciadas e associadas à tumefação, também foram observadas focos de necrose e congestão sinusoidal. Controles negativos não infectados: Baço (D), Fígado (E) e Pulmão (F).



**Figura 16** - Aspectos histopatológicos observados em rim infectado com o *Virus Serra Norte* com 6 dpi (A) e sistema nervoso central infectado com o *Virus Morumbi* com 6 dpi (B). A seta indica presença de congênção glomerular (A) e sistema nervoso central com leve edema e infiltrado inflamatório linfomononuclear permeando membranas meningeas (B). Controles negativos não infectados: rim (C) e sistema nervoso central (D).

O espectro de lesão mostrou variação de intensidade de acordo com o tempo de inoculação nos primeiros dias pós-inoculação as lesões foram discretas, apresentando pico de intensidade entre 5 e 7 dpi. O aspecto lesional foi ligeiramente menos intenso entre 7 e 21 dpi, porém apresentando intensa atividade regenerativa associada, nos diferentes órgãos acometidos e para os

cinco diferentes agentes virais. As alterações verificadas em cada tecido encontram-se descritas a seguir:

– No fígado as alterações do parênquima hepático foram caracterizadas pela presença predominante de tumefação e em menor intensidade necrose lítica de hepatócitos, com início em 2 dpi. Os espaços-porta mostraram infiltrados inflamatórios de linfomononucleares de leve a moderada intensidade, acompanhado de congestão local, sobretudo entre 5 e 7 dpi. Aspectos regenerativos hepatocitários não foram comuns e, quando ocorreram, eram representados por dupla-placa.

– No sistema nervoso central alterações foram observadas, sobretudo nas meninges, sendo caracterizadas por edema e congestão acompanhados de infiltrado de linfócitos, plasmócitos e raros neutrófilos mais proeminentes com 5 e 6 dpi. No parênquima cerebral, focos de necrose e congestão acompanhados de edema foram característicos.

– O baço apresentou hiperplasia de polpa branca e proeminência de polpa vermelha. Agregados linfóides mostraram nítida hiperplasia quando comparados aos controles normais não infectados. As alterações esplênicas foram mais proeminentes com 5 e 6 dpi.

– Nos rins não foram observadas alterações significativas do parênquima renal e, quando estas estavam presentes, eram constituídas por congestão e leve infiltração de linfócitos no interstício. Os glomérulos não apresentaram alterações significativas além de leve congestão. Foi observada tumefação de células tubulares renais de leve intensidade, sobretudo com 6 e 7 dpi.

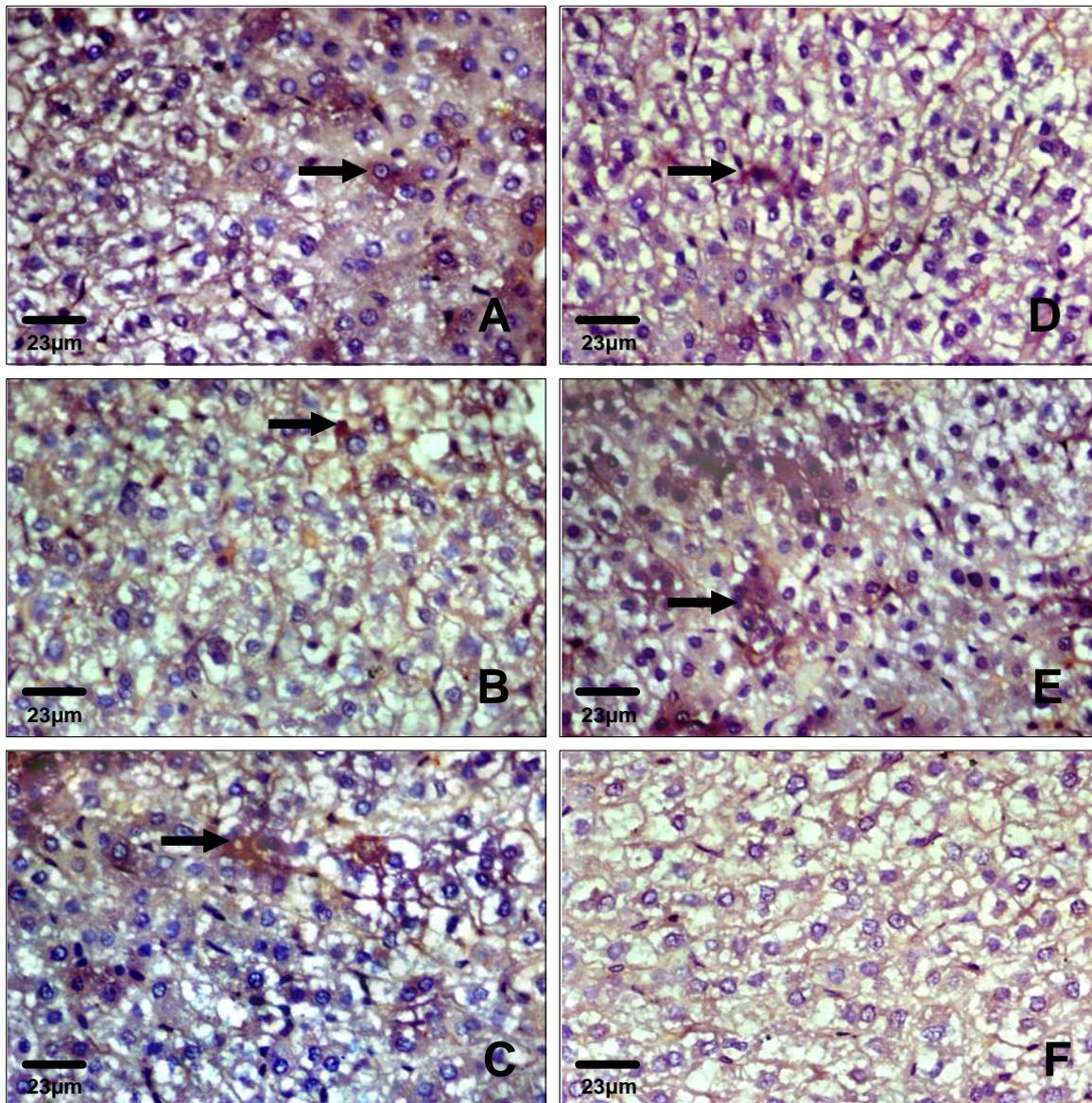
– Nos Pulmões as alterações foram caracterizadas por congestão, hemorragia e infiltração inflamatória de linfomononucleares, sobretudo no interstício pulmonar. Houve variação na intensidade de lesões nos diferentes dpi iniciando em geral com congestão no 1 e 2 dpi, acentuando-se após 3 dpi. Esse quadro histológico foi acompanhado de infiltrado inflamatório de linfócitos e plasmócitos de moderada intensidade e distribuídos ao longo da parede dos alvéolos, sem necrose ou edema e exsudato intra-alveolar.

– O coração apresentou alterações muito discretas encontradas, sobretudo com 7 dpi, e que se caracterizaram mais como alterações decorrentes de distúrbios sistêmicos conseqüentes à infecção, do que propriamente pelo tropismo viral.

Apesar das lesões encontradas no fígado e sistema nervoso central, e que foram ligeiramente mais intensas que nos outros órgãos, as alterações no baço, rins, pulmões e coração são concordantes com o observado nos animais inoculados e que se caracterizou pela presença discreta ou mesmo ausência de sintomas.

### **3.1.5 Detecção do antígeno viral pela técnica de imunohistoquímica**

A infecção do tecido hepático dos hamsters foi comprovada pela presença do antígeno viral revelada pela reação de imunohistoquímica para todos os flebovírus em estudo. Essa reação foi bem mais evidente com 7 dpi, ocorrendo imunomarcção acastanhada característica distribuída no citoplasma das células (Figura 17).

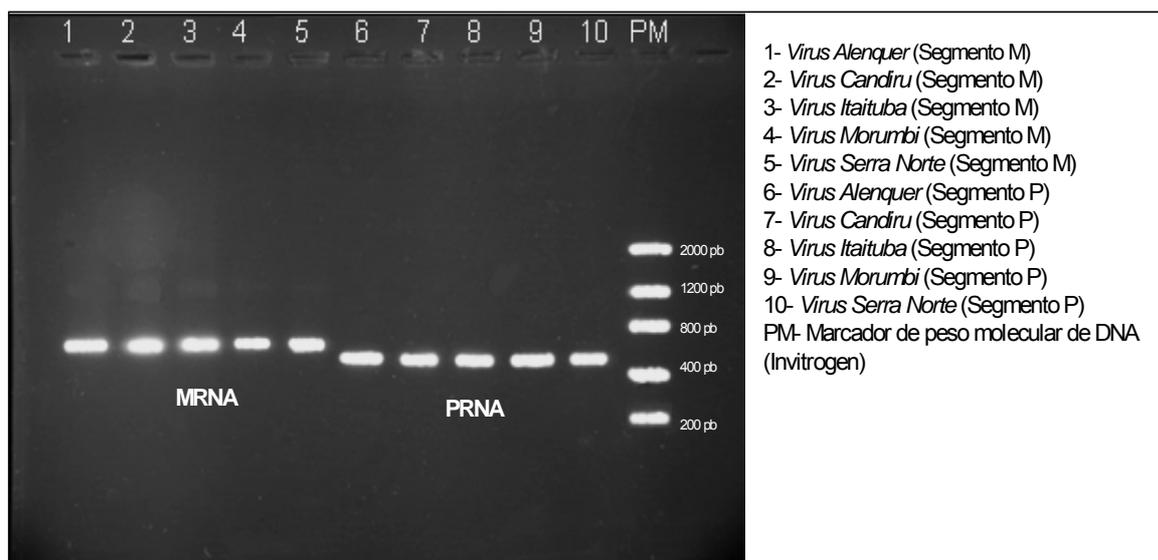


**Figura 17** - Padrão de imunomarcção pela técnica de imunohistoquímica em tecido hepático de hamsters com 6 dpi: *Virus Alenquer* (A), *Virus Candiru* (B), *Virus Itaituba* (C), *Virus Morumbi* (D), *Virus Serra Norte* (E) e controle negativo não infectado (F). Setas indicam antígenos virais. Notar positividade caracterizada por áreas acastanhadas no citoplasma dos hepatócitos.

## 3.2 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

### 3.2.1 Amplificação e seqüenciamento parcial dos segmentos PRNA e MRNA

Foi possível visualizar em gel de agarose 1,2 % corado com brometo de etídio (0,5µg/ mL) os produtos da amplificação parcial dos segmentos PRNA e MRNA dos cinco flebovírus estudados (Figura 18), os quais foram purificados e seqüenciados posteriormente.



**Figura 18** - Fotografia de gel de agarose 1,2 % com amostras amplificadas dos flebovírus utilizados neste estudo mostrando bandas com diferentes pesos moleculares para os segmentos MRNA e PRNA.

### 3.2.2 Obtenção e análise das seqüências parciais dos segmentos PRNA e MRNA

As seqüências nucleotídicas parciais dos segmentos PRNA e MRNA foram obtidas para os cinco flebovírus pertencentes ao complexo antigênico Candiru (*Virus Morumbi*, *Virus Itaituba*, *Virus Alenquer*, *Virus Candiru* e *Virus Serra Norte*) objeto deste estudo. Sendo que as mesmas mostraram considerável homologia com seqüências parciais dos genes N (PRNA), variando de 39,8 % a 59,3 % de identidade nucleotídica e de 40 % a 60,2 % de identidade aminoacídica, já para o gene Gn (MRNA) essa variação foi de 35,7 % a 57,1 % de identidade nucleotídica e de 36 % a 58,2 % de identidade aminoacídica com outros flebovírus. Para o segmento PRNA as seqüências parciais corresponderam às posições nucleotídicas de 4 a 460, de 4 a 467, de 4 a 509, de 4 a 473, de 4 a 490 em comparação com a mesma região dos seguintes flebovírus: *Virus Punta Toro*, *Virus Rift Valley fever*, *Virus Toscana*, *Virus Sandfly fever Sicilian* e *Virus Uukuniemi*, respectivamente. Em relação ao segmento MRNA, as posições nucleotídicas obedecendo à mesma ordem dos vírus acima mencionada foram: de 2127 a 2668, de 1762 a 2315, 2191 a 2750, 2195 a 2745, e de 1195 a 1784.

A análise das seqüências empregando o método de alinhamento múltiplo do programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) evidenciou maior grau de similaridade entre os cinco membros amazônicos do Complexo Candiru do que com outros flebovírus pertencentes aos complexos Rift Valley (*Virus Rift Valley fever*, *Virus Belterra*, *Virus Icoaraci*, *Virus Salobo*), Frijoles (*Virus Frijoles* e *Virus Joa*), Sandfly fever Naples (*Virus Sandfly fever Naples* e *Virus*

*Toscana*), Uukuniemi (*Virus Uukuniemi*) e o não agrupado *Virus Sandfly fever Sicilian*. Em relação ao segmento PRNA a identidade genética entre os membros estudados variou de 64 % (*Virus Alenquer* e *Virus Candiru*) a 92,9 % (*Virus Candiru* e *Virus Serra Norte*), em suas seqüências nucleotídicas, e de 64,9 % (*Virus Alenquer* e *Virus Candiru*) a 93,1% (*Virus Candiru* e *Virus Serra Norte*), para as seqüências aminoacídicas. Para o segmento MRNA, o grau de similaridade nucleotídica variou de 56,9 % (*Virus Alenquer*, *Virus Candiru* e *Virus Itaituba*) a 92,1% (*Virus Alenquer* e *Virus Morumbi*), e 57 % (*Virus Alenquer* e *Virus Itaituba*) a 92,8% (*Virus Alenquer* e *Virus Morumbi*) de similaridade nas seqüências aminoacídicas. Independentemente do segmento analisado, os flebovírus estudados mostraram maior similaridade genética com o *Virus Punta Toro* (média de 57,54 % e de 58,14 % para o segmento PRNA e 53,76 % e 54,52 % para o segmento MRNA, em similaridade nucleotídica e aminoacídica respectivamente) (Tabelas 1 e 2).

**TABELA 1** - Relacionamento genético do segmento PRNA (parcial) dos flebovírus do complexo Candiru com outros flebovírus.

Vírus	Alenquer	Candiru	Itaituba	Morumbi	Serra Norte	PT	RVF	SFS	Belterra	Salobo	BeAn 416992	Frijoles	Icoaraci	Joa	SFN	TOS	UUK
<b>Alenquer</b>	***	64	67,5	68,9	64,8	57	51,7	47,4	52,4	54,6	54,6	49,3	53,7	52	50,7	50,7	42,5
<b>Candiru</b>	<b>64,9</b>	***	80,5	87,2	92,9	57,6	51,7	48,3	51,9	53	53,4	49,8	52,1	51,1	49,2	49,2	40,2
<b>Itaituba</b>	<b>68,1</b>	<b>81,5</b>	***	76,1	72,2	59,3	55,5	53,2	53,2	55,5	55,1	53,2	54,4	53,4	53,4	53,4	42,4
<b>Morumbi</b>	<b>70</b>	<b>88</b>	<b>76,8</b>	***	85,7	57,5	49,9	46,5	51,6	52,4	52,2	49,9	52	51,2	49,7	49,7	39,8
<b>Serra Norte</b>	<b>67</b>	<b>93,1</b>	<b>73</b>	<b>86</b>	***	56,3	53,7	51	54,1	55	54,1	51,4	54,3	53	49,4	49,4	40,1
PT	57,1	58,2	60,2	57,2	58	***	59,7	54,9	35,7	35,8	35,9	35,5	35,8	38,1	56,6	56,6	45,4
RVF	56,8	50,3	57	51,8	52	60	***	59,8	36,6	36,4	36,3	33,7	35	34,4	53,4	53,4	48,5
SFS	51,8	47	55	48	49	55,2	60	***	35,4	35,5	35,5	32,7	34,5	33,2	51,1	51,1	47,4
Belterra	55	52	55	53	53,1	36	37,1	36	***	90,3	89,5	66,9	81,9	63,9	55,9	55,9	44,1
Salobo	55,9	53	57,1	55,1	54,8	36,1	37,2	36,2	91,1	***	98,3	67,5	80,9	64,3	56,6	56,6	43,9
BeAn 416992	55	53	57	55,1	55	36,1	37,2	36,2	90	99,8	***	67,1	80,4	64,9	56,6	56,6	44,5
Frijoles	52	50	54,2	50	50	36	34,2	33	67,3	68,1	68	***	66	77,4	56,8	56,8	43,4
Icoaraci	55,2	52,8	55	54,1	53	36	36,3	35,1	82,4	81	81,3	66,9	***	64,6	57,3	57,3	45,3
Joa	53,9	52	54	53	52,3	38,9	34,6	34	67	65,1	65	78	65	***	55,9	55,9	42,8
SFN	51	50	54,1	51	50,2	57,2	54,2	52	56,2	57	57	57,2	58,6	56,3	***	91,5	43,7
TOS	51	50	53,8	51	50,2	57,2	54,2	52	56,2	57	57	57,2	58,6	56,3	92,3	***	43,7
UUK	43	41,3	42,9	40	40,5	46,2	49	48,1	44,9	44,2	44,8	44,3	46	43	44	44	***

Números não negritados correspondem ao percentual de identidade nucleotídica.

Números negritados correspondem ao percentual de identidade aminoacídica.

Área em cinza corresponde aos flebovírus pertencentes ao complexo Candiru utilizados neste estudo.

\*\*\* 100 % de homologia entre as seqüências nucleotídicas e aminoacídica.

PT (Punta Toro), RVF (Rift Valley fever), SFS (Sandfly fever Sicilian), SFN (Sandfly fever Napoles), TOS (Toscana), UUK (Uukuniemi).

**Tabela 2** - Relacionamento genético do segmento MRNA (parcial) dos flebovírus do complexo Candiru com outros flebovírus.

Vírus	Alenquer	Candiru	Itaituba	Morumbi	Serra Norte	PT	RVF	SFS	Belterra	Salobo	BeAn 416992	Frijoles	Icoaraci	Joa	SFN	TOS	UUK
<b>Alenquer</b>	***	59,8	56,9	92,1	58,1	53	43,7	43,5	43,1	39	39,6	43,7	41,7	45,1	44,6	45,9	38,6
<b>Candiru</b>	<b>60,1</b>	***	56,9	57,6	60,1	54,9	47,7	43,9	44,1	44,3	44,3	45,9	42,5	44,5	43,1	44,1	37,4
<b>Itaituba</b>	<b>57</b>	<b>57,3</b>	***	57	61,9	52,1	43,7	39,7	40,5	42,1	42,1	42,7	39,9	43,5	44,5	42,3	35,7
<b>Morumbi</b>	<b>92,8</b>	<b>58,3</b>	<b>57,9</b>	***	57,6	51,7	44,4	44	43	39,3	39,9	43	42,4	43	42,3	45,6	37,9
<b>Serra Norte</b>	<b>59</b>	<b>61</b>	<b>62,5</b>	<b>58,1</b>	***	57,1	44,8	43,3	44,4	44	44,6	45,4	44,2	47,2	45,2	45,4	37,7
<b>PT</b>	<b>53,9</b>	<b>55,5</b>	<b>53</b>	<b>52</b>	<b>58,2</b>	***	45,1	47,3	45,7	43,6	44,1	44,3	41,4	45,1	46,7	47,3	37,9
<b>RVF</b>	<b>44,2</b>	<b>48,1</b>	<b>44</b>	<b>45,2</b>	<b>45,6</b>	<b>46,2</b>	***	47,1	39,7	40	40,2	47,9	43,6	45,1	43,9	44,5	37,7
<b>SFS</b>	<b>44,3</b>	<b>44,4</b>	<b>40</b>	<b>45</b>	<b>44,2</b>	<b>48,1</b>	<b>48</b>	***	38,5	38	38,3	43,8	37,8	43,5	42,6	44,8	35,3
<b>Belterra</b>	<b>44</b>	<b>44,8</b>	<b>41</b>	<b>43,9</b>	<b>45,2</b>	<b>46,4</b>	<b>40,1</b>	<b>39,3</b>	***	78,6	78,8	47,4	61,3	46,6	42,3	40,8	34
<b>Salobo</b>	<b>40,2</b>	<b>45</b>	<b>43,2</b>	<b>40,1</b>	<b>44,8</b>	<b>44,6</b>	<b>40,8</b>	<b>38,8</b>	<b>79,5</b>	***	98,9	47	63,5	47,9	43,9	43	35,2
<b>BeAn 416992</b>	<b>40</b>	<b>45</b>	<b>43,2</b>	<b>40,2</b>	<b>45</b>	<b>46,1</b>	<b>41</b>	<b>39</b>	<b>79,8</b>	<b>100</b>	***	47,2	63,2	48,7	42,7	42,9	35,5
<b>Frijoles</b>	<b>44,2</b>	<b>46,7</b>	<b>43,2</b>	<b>43,9</b>	<b>46,2</b>	<b>45</b>	<b>48,2</b>	<b>44,5</b>	<b>48</b>	<b>48</b>	<b>48,2</b>	***	45,9	65,5	41,5	42,2	35,9
<b>Icoaraci</b>	<b>42</b>	<b>43,2</b>	<b>40,1</b>	<b>43</b>	<b>45</b>	<b>42</b>	<b>44,2</b>	<b>38,2</b>	<b>62</b>	<b>64,8</b>	<b>64,5</b>	<b>46,5</b>	***	45,3	42,2	39,7	36,5
<b>Joa</b>	<b>46,1</b>	<b>45,6</b>	<b>43,7</b>	<b>43,9</b>	<b>48</b>	<b>45,9</b>	<b>45,9</b>	<b>44,1</b>	<b>47,5</b>	<b>48,5</b>	<b>49,3</b>	<b>66,4</b>	<b>46,3</b>	***	43,4	45,4	35,9
<b>SFN</b>	<b>45,2</b>	<b>43,5</b>	<b>44,9</b>	<b>43</b>	<b>45,9</b>	<b>47</b>	<b>44,1</b>	<b>43,2</b>	<b>43,1</b>	<b>44,5</b>	<b>43,6</b>	<b>42,3</b>	<b>42,5</b>	<b>45,2</b>	***	88,7	34,2
<b>TOS</b>	<b>46,4</b>	<b>44,9</b>	<b>42,9</b>	<b>46,1</b>	<b>46,1</b>	<b>48,1</b>	<b>45,1</b>	<b>45,5</b>	<b>41,1</b>	<b>43,8</b>	<b>44,1</b>	<b>43,3</b>	<b>40,2</b>	<b>46,5</b>	<b>90,1</b>	***	36,4
<b>UUK</b>	<b>39,2</b>	<b>38,2</b>	<b>36</b>	<b>38,3</b>	<b>38</b>	<b>38,3</b>	<b>38,3</b>	<b>36</b>	<b>35,2</b>	<b>36,1</b>	<b>36,5</b>	<b>36,2</b>	<b>37,2</b>	<b>36,2</b>	<b>35,8</b>	<b>37,2</b>	***

Números não negritados correspondem ao percentual de identidade nucleotídica.

Números negritados correspondem ao percentual de identidade aminoacídica.

Área em cinza corresponde aos flebovírus pertencentes ao complexo Candiru utilizados neste estudo.

\*\*\* 100 % de homologia entre as seqüências nucleotídicas e aminoacídico.

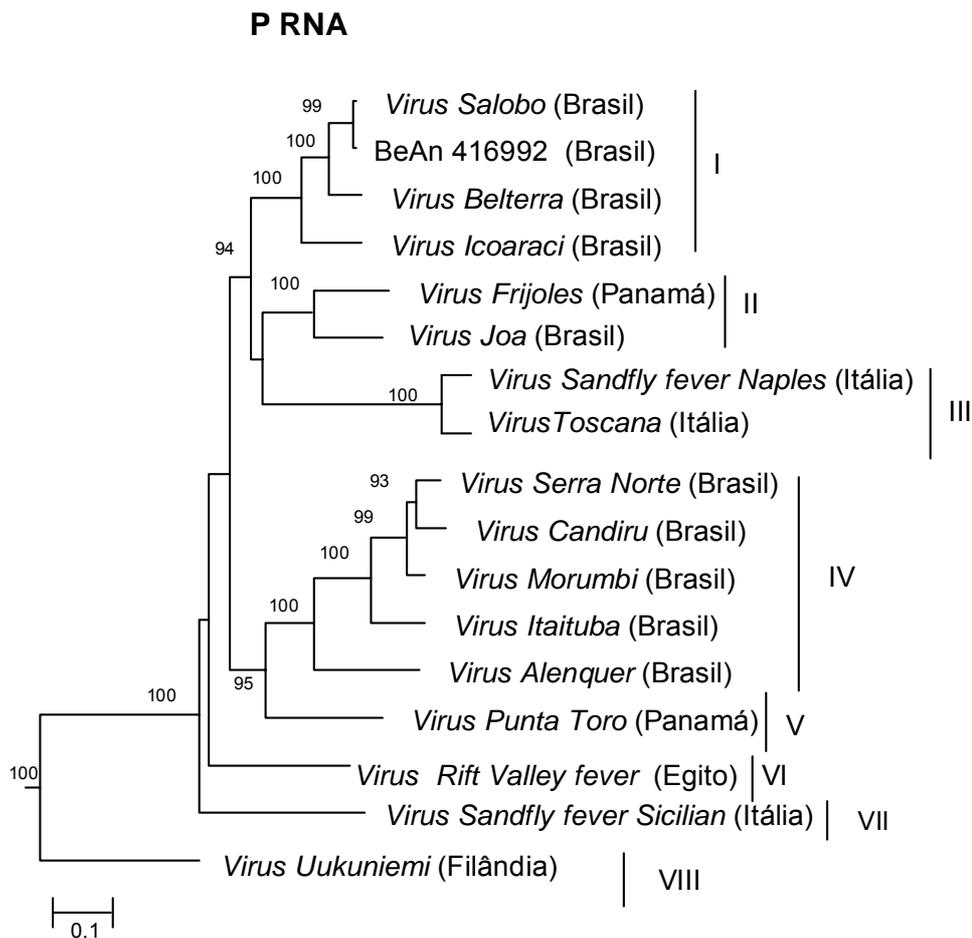
PT (Punta Toro), RVF (Rift Valley fever), SFS (Sandfly fever Sicilian), SFN (Sandfly fever Napoles), TOS (Toscana), UUK (Uukuniemi).

### 3.2.3 Filogenia

A análise filogenética das seqüências nucleotídicas para os cinco flebovírus em estudo (*Virus Alenquer*, *Virus Candiru*, *Virus Itaituba*, *Virus Morumbi* e *Virus Serra Norte*), foi realizada com o objetivo de estabelecer a relação genética entre esses flebovírus, bem como destes com outros flebovírus pertencentes a outros complexos antigênicos desse gênero. As árvores filogenéticas construídas pelos métodos de NJ e MP evidenciaram topologias semelhantes mostrando valores de *bootstrap* consistentes, no entanto a análise de NJ evidenciou valores de *bootstrap* relativamente maiores, sendo, portanto escolhida para a análise final.

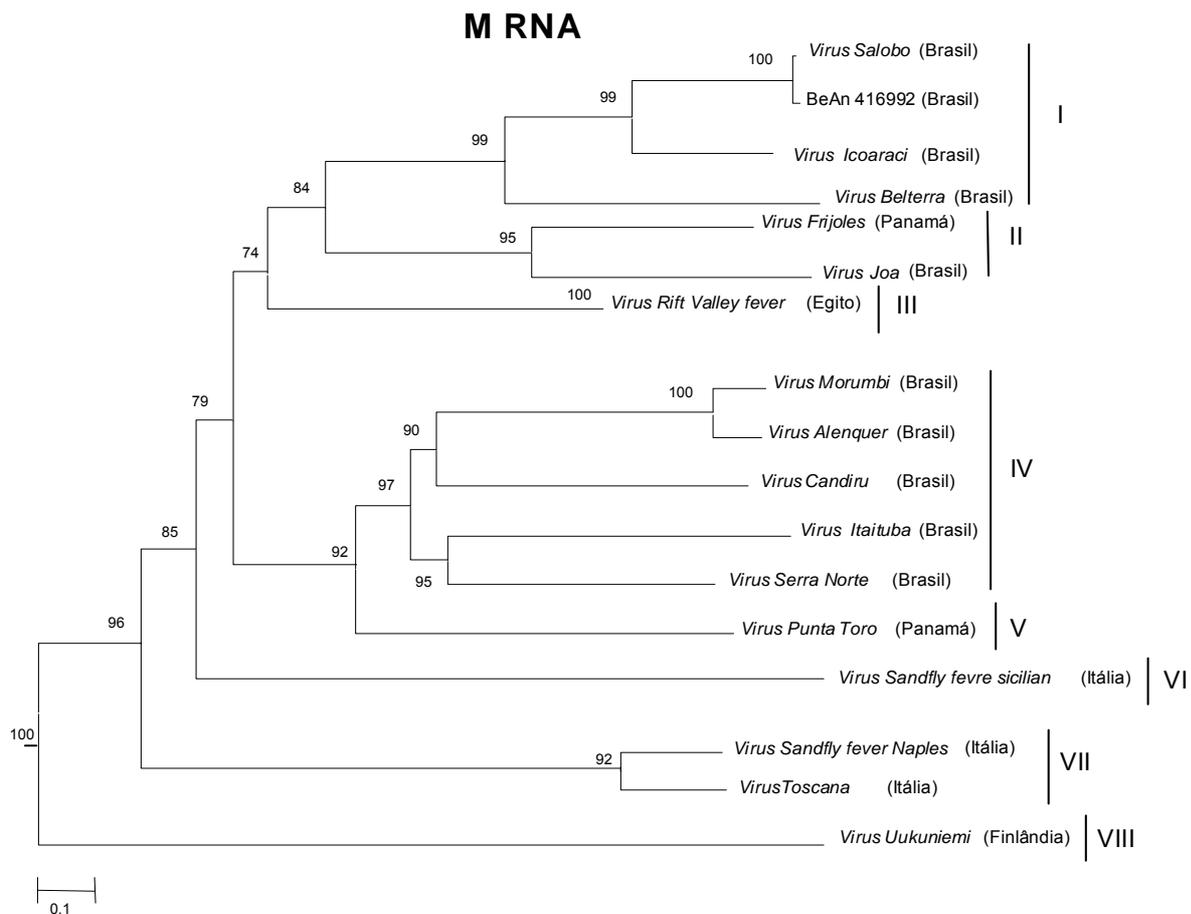
A filogenia comparativa dos flebovírus do Complexo Candiru e outros flebovírus, tendo como base as seqüências parciais dos segmentos PRNA e MRNA evidenciou que independentemente do segmento genômico os *Virus Alenquer*, *Virus Candiru*, *Virus Itaituba*, *Virus Serra Norte* e *Virus Morumbi*, constituem um grupo monofilético, ou seja, vírus que compartilham ou foram originados de um ancestral comum, sendo estes geneticamente mais relacionados ao *Virus Punta Toro* (Figuras 19 e 20).

Para o segmento PRNA, os flebovírus foram distribuídos em oito grupos filogenéticos principais denominados: I (*Virus Salobo*, BeAn 416992, *Virus Belterra*, e *Virus Icoaraci*), II (*Virus Frijoles* e *Virus Joa*), III (*Virus Sandfly fever Naples* e *Virus Toscana*), IV (*Virus Alenquer*, *Virus Candiru*, *Virus Itaituba*, *Virus Serra Norte* e *Virus Morumbi*), V (*Virus Punta Toro*), VI (*Virus Rift Valley fever*), VII (*Virus Sandfly fever Sicilian*) e VIII (*Virus Uukuniemi*) (Figura 19).



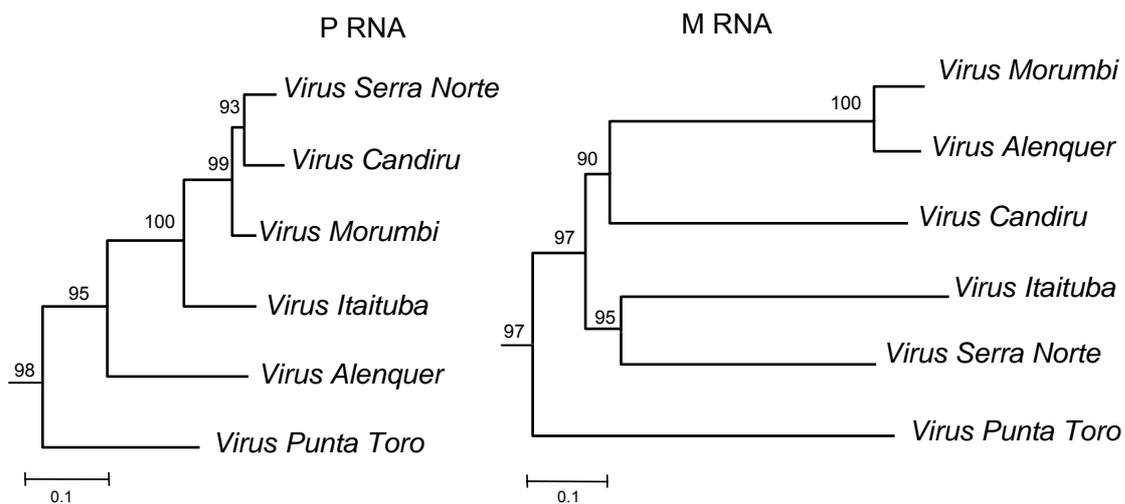
**Figura 19** - Análise filogenética do segmento PRNA ( $\pm$  500nt) dos flebovírus pertencentes ao complexo Candiru pelo método de NJ. As seqüências parciais do segmento PRNA correspondem às posições nucleotídicas dos seguintes vírus: *Virus Punta Toro* (4 a 460), *Virus Rift Valley fever* (4 a 467), *Virus Toscana* (4 a 509), *Virus Sandfly fever Sicilian* (4 a 473) e *Virus Uukuniemi* (4 a 490). Os Valores percentuais de *bootstrap* (1000 réplicas) encontram-se acima de cada nó da árvore. Valor exibido na barra corresponde a 10% de divergência nucleotídica. A árvore foi enraizada utilizando-se o *Virus Uukuniemi* como grupo externo.

Para o segmento MRNA, oito grupos filogenéticos foram também observados em relação aos flebovírus estudados (I a VIII). O grupo I incluiu os flebovírus amazônicos *Virus Salobo*, BeAn 416992, *Virus Icoaraci* e *Virus Belterra*; o grupo II foi representado pelos *Virus Frijoles* e *Virus Joa*, no grupo III encontra-se o *Virus Rift Valley fever*. O grupo IV incluiu os membros do Complexo Candiru (*Virus Alenquer*, *Virus Candiru*, *Virus Itaituba*, *Virus Serra Norte* e *Virus Morumbi*), enquanto que os grupos, V e VI, foram representados respectivamente pelos *Virus Punta Toro* e *Virus Sandfly fever Sicilian*, o grupo VII pelo *Virus Sandfly fever Naples* e *Virus Toscana*, e o grupo VIII pelo *Virus Uukuniemi* (Figura 20).



**Figura 20** - Análise filogenética do segmento MRNA ( $\pm$  600 nt) dos flebovírus pertencentes ao complexo Candiru pelo método de NJ. As seqüências parciais do segmento MRNA correspondem às posições nucleotídicas dos seguintes vírus: *Virus Punta Toro* (2127 a 2668), *Virus Rift Valley fever* (1762 a 2315), *Virus Toscana* (2191 a 2750), *Virus Sandfly fever Sicilian* (2195 a 2745) e *Virus Uukuniemi* (1195 a 1784). Os Valores percentuais de *bootstrap* (1000 réplicas) encontram-se acima de cada nó da árvore. Valor exibido na barra corresponde a 10% de divergência nucleotídica. A árvore foi enraizada utilizando-se o *Virus Uukuniemi* como grupo externo.

Os resultados obtidos pela análise filogenética para os cinco flebovírus do Complexo Candiru objeto deste estudo, evidenciaram diferenças topológicas entre as árvores construídas para os segmentos PRNA e MRNA, aonde, por exemplo, o *Virus Serra Norte* mostrou-se mais geneticamente relacionado pelo segmento PRNA ao *Virus Candiru*, enquanto que pelo segmento MRNA, assemelhou-se mais ao *Virus Itaituba*. Outro exemplo pode ser citado para o *Virus Morumbi*, que pela filogenia construída para o segmento MRNA, agrupou-se com o *Virus Alenquer*, enquanto que pelo segmento PRNA relacionou-se mais aos *Virus Candiru* e *Virus Serra Norte* (Figura 21). A análise de MV aplicando o método de Kishino-Hasegawa para as topologias obtidas a partir das seqüências parciais dos diferentes segmentos genômicos dos flebovírus do soro grupo Candiru evidenciou um valor de  $p = 10^{-6}$  ( $p < 0,05$ ), sendo este valor estatisticamente significativo.



**Figura 21** - Filogenia dos segmentos MRNA ( $\pm 600$  nt) e PRNA ( $\pm 500$  nt) dos flebovírus do Complexo Candiru e o *Virus Punta Toro*. As seqüências parciais dos segmentos PRNA e MRNA correspondem às posições nucleotídicas do *Virus Punta Toro* (4 a 460 e de 2127 a 2668 nucleotídeos) respectivamente. Os valores de *Bootstraps* (1000 réplicas) obtido para o método de NJ encontram-se localizado acima de cada nó principal e os números exibidos nas barras representam 10% de divergência nucleotídica.

#### 4 DISCUSSÃO

Na Amazônia brasileira até o momento 23 vírus pertencentes ao gênero *Phlebovirus* já foram isolados; destes quatro se destacam por terem sido isolados a partir de sangue de humanos febris (*Virus Alenquer*, *Virus Candiru*, *Virus Morumbi* e *Virus Serra Norte*). Esses vírus, mais o *Virus Itaituba* (isolado de *Didelphis marsupialis*), fazem parte do Complexo Candiru, e foram objetos desse estudo que teve como objetivo a caracterização genética parcial dos mesmos e o desenvolvimento de um modelo de infecção experimental utilizando-se hamsters dourados jovens (*Mesocricetus auratus*), na tentativa de obter dados sobre filogenia e patogenia desses flebovírus do Complexo Candiru isolados na Amazônia brasileira.

As linhagens de células C6/36 e VERO mostraram - se suscetíveis à infecção pelos cinco flebovírus estudados, porém demonstraram reações diferentes. As células VERO apresentaram ECP pronunciado, com mudança na morfologia das células, e morte celular enquanto que células C6/36 não apresentaram ECP, sendo a replicação viral confirmada por teste de IFI, esses resultados corroboram com os observados por diversos pesquisadores que trabalharam na interação de células provenientes de Artrópodes e vertebrados com membros da família *Bunyaviridae*, dentre os quais podemos citar Newton *et al.* (1981) e Elliott & Wilkie (1986) ao trabalharem com o *Virus Bunyamwera* e Carvalho *et al.* (1986), ao trabalharem na replicação do *Virus Marituba*, e trabalhos com a replicação de vários membros do gênero *Phlebovirus* em cultivos de células VERO, como os realizados por Liu *et al.* (2003) e Xu *et al.* (2007 a; 2007 b).

A viremia obtida em hamsters para os flebovírus em estudo foi muito discreta e não houve detecção da mesma para o *Virus Serra Norte*, o que se contrapõe à viremia encontrada para o *Virus Punta Toro* (amostras Adames e Balliet), que foi relativamente elevada nesses animais (Perrone *et al.*, 2007). Esses resultados encontrados para os flebovírus do Complexo Candiru, talvez tenham ocorrido por termos feito apenas uma passagem dos vírus em hamsters, antes da utilização do sangue destes no teste de viremia. De fato, a passagem sucessiva de um vírus em hamsters costuma elevar o título da viremia como foi observado em estudos realizados por Tesh *et al.* (2001) para o *Virus febre amarela* e Xiao *et al.* (2001,2003) com o *Virus West Nile*, que mostraram que o aumento do número de passagem em hamsters fez a cepa viral se adaptar ao modelo experimental, aumentando assim seu potencial patogênico e conseqüentemente o título viral.

Em um outro estudo, foi detectada viremia em hamsters infectados com o flebovírus, *Virus Gabek Forest* (amostra Sud An 754-61) que com 2 e 3 dpi mostram altos títulos e, interessantemente com 4 dpi todos os animais morreram (Tesh & Duboise, 1987). Esses achados são diferentes dos dados obtidos neste ensaio. Níveis de viremia também foram observados em hamsters infectados por esse vírus com 1 dia pós-infecção e cujos títulos se mostraram marcadamente elevados já com 2 dpi. (Fisher *et al.*, 2003).

A amostra Adames (Panamá) do *Virus Punta Toro* do gênero *Phlebovirus*, família *Bunyaviridae*, determinou em hamsters infectados lesões no baço que foram predominantes na polpa vermelha e que consistiram de lise e degeneração de leucócitos circulantes, principalmente, neutrófilos, bem como

de células reticuloendoteliais (Anderson *et al.*, 1990). Esses resultados contrastam com os do presente trabalho que evidenciou hiperplasia de polpa branca e proeminência de polpa vermelha. É interessante observar que os agregados linfóides apontaram para nítida hiperplasia esplênica em comparação aos órgãos dos animais não-infectados. Por outro lado, Fisher *et al.* (2003) encontraram necrose tanto da polpa branca como da polpa vermelha e carriorexis causadas pelo *Virus Gobek Forest*.

No fígado desses animais esses autores observaram moderada a severa necrose de hepatócitos causada pela referida amostra viral o que corrobora o achado de necrose de hepatócitos verificado em nosso estudo; necrose hepatocelular também é referida por Perrone *et al.* (2007) em hamsters causada pelo *Virus Punta Toro* e pela amostra Balliet, que produziu uma necrose menos extensiva. Também foi verificada necrose em hamsters infectados pelo *Virus Punta Toro* por Fisher *et al.* (2003).

A amostra Balliet do *Virus Punta Toro* determinou no tecido hepático de hamsters intenso infiltrado focal de neutrófilos que contrasta com os resultados desse experimento uma vez que foi encontrado infiltrado inflamatório de linfomononucleares de leve a moderada intensidade. Infiltrado inflamatório também foi verificado no fígado de hamsters infectados pelo *Virus Gabek Forest* (Fisher *et al.*, 2003). Além disso, vacuolização citoplasmática foi verificada em tecido hepático de hamsters infectados por esse vírus (Fisher *et al.*, 2003), resultado esse que não foi encontrado no presente estudo.

Igualmente, necrose de hepatócitos, no entanto, originada pelo *Virus da febre amarela* é citada por Quaresma *et al.* (2005; 2007), assim como,

infiltrado por células linfomononucleares (Quaresma *et al.*, 2005) à semelhança do obtido nesse trabalho e do mesmo modo, com infiltrado predominante composto por células mononucleares (Quaresma *et al.*, 2007).

Em um estudo de infecção experimental utilizando camundongos albinos suíços Ohashi & Brasil (1997), identificaram tumefação turva do citoplasma hepaticário, com focos de necrose, congestão sinusoidal e infiltrado inflamatório e focos de eritropoiese em todos os tempos analisados em um estudo com o *Virus Serra Norte*, o que foi observado também em nossos estudos com hamsters.

O estudo ultraestrutural da patologia hepática experimental pelo *Virus Serra Norte* em camundongos albinos suíços feito por Pessoa (1998) confirma seu hepatotropismo produzindo lesões multifocais com características de hepatite viral, com lesões degenerativas que evoluem para necrose de hepatócitos, com presença de poucas células inflamatórias, achados também presente em nossos estudos.

Em outro estudo também utilizando camundongos albinos suíços, Barros (2000) inoculou por três vias, o *Virus Morumbi*, determinou como melhor meio de inoculação a via intraperitoneal, observando a presença do antígeno viral 3 dpi, resultando num quadro de hepatite aguda e intensa, porém autolimitada tendendo a desaparecer com o avançar dos dias, o que foi demonstrado pelos achados de regeneração hepática nos camundongos sobreviventes. Esses achados são iguais aos obtidos em nosso estudo, uma vez que foi intensa a atividade regenerativa do fígado entre 7 e 21dpi.

Anormalidades histológicas no cérebro dos hamsters infectados pelo *Virus Punta Toro*, não foram observadas (Fisher *et al.*, 2003) o que diverge dos dados deste experimento, pois alterações no sistema nervoso central, especificamente no parênquima cerebral, foram encontrados típicos focos de necrose e congestão acompanhados de edema após a inoculação por vip com todos os cinco flebovírus.

No entanto Ohashi & Brasil (1997), observaram em cortes do sistema nervoso central de camundongos suíços albinos inoculados com o *Virus Serra Norte*, a presença de edema do parênquima cerebral e necrose neural isolada e, nas meninges as lesões foram caracterizadas por edema, congestão vascular e infiltrado linfocitário discreto, aspectos lesionais observados também em nosso estudo.

Nos rins dos hamsters infectados pelo *Virus Punta Toro* não foram localizadas alterações (Fisher *et al.*, 2003) o que corrobora os resultados do trabalho com os flebovírus do Complexo Candiru, uma vez que nos dois experimentos as lesões não foram significativas ou expressivas neste órgão, o que também foi observado por Ohashi & Brasil (1997), quando infectaram camundongos albinos suíços com o *Virus Serra Norte*. Por outro lado, resultados diferentes dos achados deste estudo foram obtidos pela constatação de necrose glomerular em hamsters infectados pelo *Virus Gabek Forest* (Fisher *et al.*, 2003). Esses autores observaram ainda tumefação de células tubulares renais de leve intensidade o que diverge dos resultados de Fisher *et al.* (2003) que não detectaram mudanças nos túbulos renais dos animais.

A análise dos pulmões revelou alterações importantes como, infiltrado inflamatório de linfomononucleares, sobretudo no interstício pulmonar. A presença desse processo inflamatório é um achado próximo da descrição de inflamação intersticial encontrada em hamsters infectados com *Virus Punta Toro* (Fisher *et al.*, 2003). No nosso estudo não houve constatação de necrose nos pulmões o que contrasta com o achado de Fisher *et al.* (2003) que encontraram necrose pulmonar em alguns animais infectados pelo *Virus Punta Toro* com 2 dpi. Por outro lado, é importante assinalar que hamsters infectados pelo *Virus Gabek Forest* desenvolveram pneumonia intersticial (Fisher *et al.*, 2003).

Em relação ao coração Ohashi & Brasil (1997) não encontraram alterações significativas, relatando ausência de lesões inflamatórias ou necróticas. Esses dados corroboram os achados deste trabalho, no qual observou-se que o coração apresentou alterações muito discretas encontradas sobretudo com 7 dpi, e que se caracterizaram mais como alterações decorrentes de distúrbios sistêmicos conseqüentes à infecção, do que propriamente pelo tropismo viral.

A técnica de imunohistoquímica confirmou a presença de antígeno viral dos cinco flebovírus do Complexo Candiru no tecido hepático de hamsters dourados, caracterizado por imunomarcção acastanhada distribuída no citoplasma das células. Esses achados são corroborados por inúmeros trabalhos que indicam o fígado como órgão alvo principal para a replicação de flebovírus dentre os quais podemos citar: Anderson Jr *et al.* (1990); Perters *et al.* (1994); Pessoa, 1998; Barros, 2000; Fisher *et al.* (2003) e Ding *et al.* (2005).

Os vírus pertencentes ao gênero *Phlebovirus*, assim como outros vírus cujo genoma é composto por RNA segmentado, provavelmente trocam seus segmentos genômicos para dar origem a linhagens virais distintas, o que ocorre, possivelmente, pelo rearranjo genético entre vírus geneticamente relacionados. Este importante mecanismo evolutivo tem sido demonstrado para diferentes arbovírus tais como o *Virus Oropouche* (Saeed *et al.*, 2001), Ngari (Briese *et al.*, 2005) e certos membros do grupo C (Nunes *et al.*, 2005), todos pertencentes ao gênero *Orthobunyavirus* da família *Bunyaviridae*. Lowen *et al.* (2005), sugerem que o rearranjo genético possivelmente interfere na virulência de determinadas cepas. Em adição, sabe-se que modificações introduzidas no genoma viral sejam decorrentes, sobretudo por rearranjo genético, mutações pontuais ou recombinação, que podem contribuir significativamente para a evolução destes agentes virais (De Filippis & Villareal, 2001). Resalta-se, entretanto, que muito pouco se sabe a respeito do real papel destes mecanismos na geração de biodiversidade entre os RNA vírus com genoma segmentado (Nunes *et al.*, 2005).

Em relação à caracterização genética dos cinco flebovírus, o presente estudo foi direcionado a um grupo de flebovírus isolados na Amazônia brasileira e que foram caracterizados antígenicamente como membros do Complexo Candiru. A correlação de dados antigênicos aos genéticos é complicada devido a grande variabilidade genética e da diversidade dos produtos gênicos dos flebovírus, no entanto nossos achados corroboram com os resultados de trabalhos de tentativa de agrupamento antigênico realizados por Tesh (1982,1989), que por TNRP detectou relacionamento antigênico entre

os membros do Complexo Candiru, e destes com o *Virus Punta Toro*, resultado confirmado por Travassos da Rosa (1983), realizando a tentativa de agrupamento por FC, tendo na época incluído o *Virus Punta Toro* ao Complexo Candiru.

Independente do segmento genômico analisado, os *Virus Alenquer*, *Virus Candiru*, *Virus Itaituba*, *Virus Morumbi* e *Virus Serra Norte*, antigenicamente reconhecidos como membros do Complexo Candiru, foram agrupados em uma única e distinta clade constituindo um grupo monofilético, cujos valores de *bootstraps* superiores a 95 %, sugerem alta estabilidade nas topologias destes vírus bem como a existência de um ancestral comum, no caso, provavelmente, o *Virus Punta Toro*, ou outro vírus ainda desconhecido e geneticamente mais relacionado (Figuras 19 e 20). No entanto, de acordo com os dados da figura 21, as árvores filogenéticas obtidas para cada segmento genômico sugerem diferenças topológicas marcantes envolvendo os flebovírus estudados. De fato, diferentes pares genéticos foram formados para o segmento PRNA (*Virus Serra Norte* e *Virus Candiru*; *Virus Itaituba* mais relacionado ao *Virus Morumbi*) e para o segmento MRNA (*Virus Itaituba* e *Virus Serra Norte*; *Virus Morumbi* e *Virus Alenquer*). Esses dados sugerem a ocorrência de rearranjos genéticos dos genomas desses vírus em natureza, como anteriormente descrito para outros *Bunyaviridae* (Saeed *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2003; Nunes *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2007 a; 2007 b).

A análise pelo método de Máxima Verossimilhança 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 ( $P=10^{-6}$ ;  $p<0,05$ ). Estes resultados indicam que as topologias obtidas para os segmentos PRNA e MRNA foram diferentes, sugerindo que cada segmento de RNA apresentou uma história evolutiva distinta (Figura 21).

Finalmente, as topologias fornecidas pela filogenia dos segmentos PRNA e MRNA dos cinco flebovírus em estudo e que foram isolados na Amazônia brasileira, mostraram-se diferentes quando comparadas entre si. Os dados genéticos e sorológicos confirmam que estes vírus constituem um grupo antigênico e geneticamente distinto dos demais vírus incluídos no gênero *Phlebovirus*, inclusive de outros flebovírus brasileiros como os *Virus Belterra*, *Virus Icoaraci*, *Virus Salobo* e *Virus Joa*, bem como outros que também foram isolados na Amazônia brasileira. É válido ressaltar que a posição destes vírus na árvore filogenética não apresenta correlação com a distribuição geográfica (Figuras 19 e 20). Entretanto estudos prévios baseados na filogenia do segmento MRNA (seqüências parciais) de 26 diferentes flebovírus, alguns amazônicos sugerem que o rearranjo genético pode ocorrer entre dois flebovírus geneticamente relacionados, e que coexistem circulando simultaneamente no mesmo nicho ecológico em uma mesma região geográfica (Liu *et al.*, 2003).

Este estudo também demonstrou que a obtenção de seqüências nucleotídicas para diferentes flebovírus pode proporcionar um melhor entendimento a respeito do relacionamento genético entre eles, bem como deve servir para o aprimoramento das informações a respeito da epidemiologia molecular, e contribuir para o melhor entendimento do papel do rearranjo

genético na evolução destes vírus como mecanismo de geração de biodiversidade viral.

## 5 CONCLUSÕES

– Hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*), são susceptíveis à infecção pelos flebovírus estudados, mas nenhum, dos animais inoculados apresentou sinais de doença ou óbito.

– As culturas celulares de *Aedes albopictus* (clone C6/36) e *Cercopithecus aethiops* (VERO) mostraram-se susceptíveis a infecção pelos flebovírus em estudo.

– Os valores de viremia para cada um dos cinco flebovírus, mostraram correlação direta com o número de passagem destes em camundongos albinos suíços.

– A análise histopatológica demonstrou que apesar dos diferentes vírus inoculados, a reação tecidual foi semelhante e caracteristicamente localizada no fígado, nos rins, no baço, nos pulmões e no sistema nervoso central, sendo mais intensas, no tecido hepático.

– A presença dos antígenos virais no tecido hepático foi comprovada pela técnica de imunohistoquímica.

– Foi possível amplificar e seqüenciar parte do genoma dos segmentos PRNA e MRNA dos cinco flebovírus amazônicos do Complexo Candiru com sucesso.

– A análise filogenética das seqüências obtidas mostra que independente do segmento genômico analisado os flebovírus do Complexo Candiru constituem um grupo monofilético, distinto dos demais flebovírus seqüenciados.

– As árvores filogenéticas obtidas para cada segmento genômico sugerem diferenças topológicas marcantes envolvendo os flebovírus estudados, sendo que diferentes pares genéticos foram formados para o segmento PRNA e MRNA, sugerindo que rearranjos genéticos dos genomas desses vírus ocorreram em natureza.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, T. H. G., WOODALL, J.P., PAES DE ANDRADE A.H., BENSABATH, G., SHOPE, R.E. *Pacui virus*, Phlebotomine flies and small mammals in Brazil: an epidemiological study. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **24**: 358-368, 1975.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W. Local alignment statistics. **Methods on Enzymology**, **266**: 460-480, 1996.
- ANDERSON, W. M. E. Clinical observations on sandfly fever in the Peshawar district. **Journal Army Medical Corps**, **77**: 225, 1941.
- ANDERSON JR, G. W. , SLAYTER, M. V., HALL, W., PETERS, C. J. Pathogenesis of a phleboviral infection (Punta Toro virus) in golden Syrian hamsters. **Archives of Virology**, **114(3-4)**: 203-12, 1990.
- ARAÚJO, R. Alterações ultraestruturais na infecção experimental com arbovírus na Amazônia. **Simpósio Internacional sobre Arbovírus dos Trópicos e Febres Hemorrágicas**. Belém, Pará, Brasil, p. 175-192, 1980.
- AZEVEDO, R.S.S., MARTINS, L.C. RODRIGUES, S.R., TRAVASSOS DA ROSA, J.F. S, VASCONCELOS, P.F.C. ARBOVIROSES. In: **Infectologia Pediátrica 3ª ed.** FARHAT, K.K., CARVALHO, L.H.F.R., SUCCI, R.C.M. (coord.). São Paulo: Editora Atheneu, 2007. pg. 533-552.
- BARTELLONI, P. J. & Tesh, R. B. Clinical and serologic responses of volunteers infected with phlebotomus fever virus (Sicilian type). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **25**: 456-462. 1976.
- BARROS, V.L.R.S. **Arbovírus Morumbi (Phlebovirus: Bunyaviridae)-**

- Estudo Histopatológico e Imuno-Histopatológico do Fígado na Infecção Experimental em Camundongos: comparação entre as vias cerebral, intraperitoneal e subcutânea.** Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical)- Belém, Universidade Federal do Pará, 2000, 134 p.
- BEATY, B. J., TRENT, D. W., ROEHRIG, J. T. Virus variation and evolution: Mechanisms and epidemiological significance. In: **The Arboviruses: Epidemiology and Ecology.** Monath, T. P. (ed.). Boca Raton: CRC Press, 1988.
- BEATY, B. J., CALISHER, C. H., SHOPE, R. E. Arbovirus Diagnostic Procedure for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections. In: **American Public Health Association.** Schmidt, N. I., Emmons, R. W. (eds). 6<sup>th</sup> Edition., Washington, 1989. p.795 - 855.
- BEATY, B.J., CALISHER, C.H. Bunyaviridae- natural history. **Current Topics Microbiology and Immunology**,169: 27,1991.
- BEHBEHANI, A. M., HILLER, M. S., LENAHAN, M. F., WENNER, H. A. Responses of monkeys to California encephalitis, Sicilian, Sandfly and Turlok arboviroses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **16 (1)**: 63-73,1967.
- BISHOP, D. H. L. *Bunyaviridae* end their replication. Part I : Strutura of *Bunyaviridae*. In: **Virology.** B. N. Fields & D. M. Knip. (eds). Raven, New York, *Virology*, 2<sup>nd</sup> , 1990. p. 1155-1169
- BRAITO, A., CIUFOLINI, M. G., PIPPI, L., CORBISIERO, R., FIORENTINI, C., GISTRÌ, A., TOSCANO, L. Phlebotomus-transmitted *Toscana virus* infections of the central nervous system: a seven-year experience in

- Tuscany. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases** 30: 505-508, 1998.
- BRÉS, P. Impact of arboviruses on human and animal health. In: **The arboviruses**. Monath. T. P. Flórida: CRC Press, 1988, v.1, p. 1-18.
- BRIDGEN, A., FRIEDMANN, W., FAZAKERLEY, J.K., ELLIOT, R.M. Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 98: 664-669, 2001.
- CALISHER, C. H. History, classification, and taxonomy of viruses in the family *Bunyaviridae*. In: **The Bunyaviridae**. Elliot, R. M. (ed.) Scotland: University of Glasgow, Institute of Virology, 1996. v. 1, p. 1-15.
- CALISHER, C. H. Evolutionary, ecological and Taxonomic relationships between arboviruses of Florida, U. S. A. and Brazil. In: **An overview Arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. Travassos da Rosa, A. P. A., Vasconcelos, P. F. C., Travassos da Rosa, J. F. S (ed.) Belém-Pa, Instituto Evandro Chagas. 1998. p. 32-41.
- CARVALHO, M.G.C., FRUGULHETTI, I.C., REBELLO, M.A. Marituba (Bunyaviridae) Virus Replication in Cultured *Aedes albopictus* Cells and L-A9 Cells. **Archives of Virology** 90: 325 – 335, 1986.
- CASALS, J. The arthropod-borne group of animal viruses. In: **Transactions New York Academic Science**, v. 19, 1957. p. 219-235.
- CASALS, J. Immunological Techniques for animals viruses. In: **Methods in Virology**. Maramorosh, K., Koprowski, H. (eds.). New York, Academic Press. 3:1967. p. 75-81.

- COLLET, M.S., PURCHIO, A. F., KEEGAN, K., FRAZIER, S., HAYS, W., ANDERSON, D.K., PARKER, M.D., SCHMALJHON, C., SCHMIDT, J. Complete nucleotide sequence of the mRNA segment of Rift Valley fever virus. **Virology**, **144**: 220, 1985.
- DE FILIPPIS, V.R., VILLAREAL, L.P. Vírus Evolution. In: **Fields Virology**. Knipe DM, Howley PM, Volume 1. Fourth edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 353-370.
- DÉGALLIER, N., SÁ FILHO, G. C., SILVA, O. V., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. Comportamento de pouso sobre partes do corpo humano, em mosquitos da floresta Amazônica (Díptera: Culicidae). In: **Boletim do Museu Emílio Goeldi** (Série de Zoologia). 6(2): 97-108, 1990.
- DI BONITO, P., MOCHI, S., GRÒ, M. C., FORTINI, D., GIORGI, C. Organization of the M genomic segment of Toscana phlebovirus. **Journal of General Virology**, **78** : 77-81, 1997.
- DIAS, L. B. Patologia natural e experimental de arbovírus e vírus correlatos isolados na Amazônia. In: **Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical**. Belém, Fundação de Serviços de Saúde Pública, (1), 1986. p.439-450.
- DING, X., Xu, F., CHEN, H., TESH, R. B., S-Y, X. Apoptosis of Hepatocytes Caused by *Punta Toro Virus* (*Bunyaviridae: Phlebovirus*) and Its Implication for *Phlebovirus* Pathogenesis. **American Journal Pathology** **167(4)**: 1043-1049, 2005.

- EHRNST,A. PETERS,C.J., NIKLASSON,B., SVENDMYR,A., HOLMGREN,B.  
Neurovirulent Toscana virus (A sandfly fever virus) in Swedish man after  
visit to Portugal. **The lancet**, p. 1211213,May 1985.
- ELLIOTT, R.M., WILKIE, M.L. Persistent Infection of *Aedes albopictus* C6/36  
Cells by Bunyamwera Virus. **Virology** **150**: 21- 32, 1986.
- 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.
- ELLIOT, R.M., Molecular biology of *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.  
Genus *Phlebovirus*. In: **Virus taxonomy. Classification and  
Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International  
Committee on Taxonomy of Viruses**, pp. 614-616. Edited by M. H. V.  
Van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L.. Bishop, E. B. Carstens, M. K.  
Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A., Mayo, D.J. McGeoch, C. R. Pringle  
& R. B. Wickner. San Diego ; Academic Press. 2000.
- FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U., BALL,  
L.A. *Bunyaviridae*. In: **Virus Taxonomy Classification and Nomenclature  
of Viruses. Eighth report of the International Committee on Taxonomy**

of viruses. **Virology Division. International Union of Microbiological Societies.** Fauquet, C. M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberguer, U., Ball, L.A. Elsevier, Academic Press, 2005. p. 695-704.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Molecular Biology and Evolution.** **39:** 783-791, 1985.

**GÊNEROS DA FAMÍLIA *BUNYAVIRIDAE*.** Disponível em: < <http://www-micro.msb.le.ac.uk/3035/Bunyaviruses.html>. Acesso em: 26/ 02/ 06.

FISHER, A. F., TESH, R. B., TONRY, J., GUZMAN, H., LIU, D., XIAO, S. Y. Induction of severe disease in hamsters by two sandfly fever group viruses, Punta Toro and Gabek Forest (*Phlebovirus, Bunyaviridae*), similar to that caused by Rift Valley fever virus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** **69 (3):** 269-276, 2003.

GOLDMAN, N., ANDERSON, J.P., RODRIGO, A.G., Likelihood-Based test of Topologies in Phylogenetics. **Systematic Biology,** **49(4):** 652-670, 2000.

GUBLER, D. J., KUNO, G., SATHER, G.E. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** **33 (1):** 158- 165, 1984.

GUELMINO, D.J., JEVTIC, M. An Epidemiological and Hematological Study of Sandfly Fever in Serbia. **Acta Tropica,** **12:** 179 , 1955.

HARRISON, S. D., SKEHEL, J. J., WILEY, D. C. Virus structure In: **Virology.** Fields, B. N., Knipe, D. M., Honley, P.M. (ed.), 3<sup>a</sup> ed. New York : Raven Pren , 1996, 1: 59-99.

- 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.
- HSU, S. M., RAINE, L., FANGER, H. Use of avidin- biotin- peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, **29**: 577-580, 1981.
- KARABATSOS, N. **International Catalogue of Arboviruses, Including Certain Other Viruses of Vertebrates**, 3<sup>rd</sup>. Ed. San Antonio, USA: The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1985. p.1141.
- KARABATSOS, N. **Annual Report on the Catalogue of Arthropod-Borne and Selected Vertebrate Viruses of the World**. San Antonio, USA: The American Committee on Arthropod-Borne Viruses. Issue n° 108, 2002.
- KEEGAN, K., COLLETT, M. S. Use of bacterial expression Cloning to define the amino acid sequences of antigenic determinants on the G2 glycoprotein of Rift Valley fever virus. **Journal of Virology**, **58**: 263-270, 1986.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, **16**: 111-120, 1980.
- KUMAR, S., TAMURA, K., NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetic Analyses**. Version 1.01. The Pennsylvania State University, 2000.
- LAUGHLIN, L. W., MEEGAN, J. M., STRAUSBAUGH, L. J., MORENS, D. M., WATTEN, R. H. Epidemic Rift Valley fever in Egypt: Observations of the

spectrum of human illness. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **73**: n. 6, p. 630-633, 1979.

LENNETTE, D. A. General principles of laboratory diagnostic methods for viral, rickettsial and chlamydial infections. In: **Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections**. Lennette, E. H., Lennette, D. A., Lennette, E. T. (eds.). Seventh edition, American Public Health Association, Washington, USA. 1995. p. 3-25.

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.

LIU, D -Y., TESH, R. B., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A ., CLARENCE, J. P., YANG, Z., GUZMAN, H., XIAO., S-Y. Phylogenetic relationships among members of the genus *Phlebovirus* (*Bunyaviridae*) based on partial M segment sequence analyses. **Journal of General Virology**, **84**: 465-473, 2003.

LOWEN, A.C., BOYD, A., FAZAKERLEY, J.K., ELLIOTT, R. M. Attenuation of Bunyavirus Replication by Rearrangement of Viral Coding and Noncoding S.equences. **Journal of Virology** . **79**: 6940-6946, 2005.

**MAPA DO ESTADO DO PARÁ**. Disponível em: < <http://www.mapas-brasil.com/para.htm> >. Acesso em 10/ 03/ 2006.

MARTINS, L. C., DINIZ, J. A. P., SILVA, E. V. P., BARROS, V. L. R. S., MONTEIRO. H. A. O., AZEVEDO, R. S. S., QUARESMA, J. A. S., VASCONCELOS, P. F. C. Characterization of Minaçu vírus (Reoviridae:

- Orbivirus) and pathological changes in experimentally infected newborn mice. **International Journal of Experimental Pathology**, **88**: 63-73, 2007.
- MASSONE, F. **Anestesiologia Veterinária: Farmacologia e Técnicas**, 4<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003. p.105.; p.237.
- MacCLAIN, D.J., SUMMERS, P. L., PRATT, W. D., DAVIS, K.J, JENNINGS, G.B. Experimental infection of nonhuman primates with Sandfly fever Virus. **American Journal of Medicine and Hygiene**, **56 (5)**: 554-560, 1997.
- MEEGAN, J. M., NIKLASSON, B. , BENGTSSON, E. Spread of Rift Valley fever virus from continental Africa. **Lancet** **ii**, 1184-1185, 1979.
- MERTZ, G.J. *Bunyaviridae*: bunyaviruses, phleboviruses, nairoviruses, and hantaviruses. In: **Clinical Virology**. Richman, D.D., Whitley, R.J., Hayden, F.G. (eds.). Churchill-Livingstone, New York, 1997. p. 943-972.
- MICHALANY, I. **Técnica Histológica em Anatomia Patológica: com instruções para cirurgião, enfermeira e citotécnico**. 3. ed. São Paulo, EPU, 1998. 295 p.
- MURPHY, F.A., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., GHABRIAL, S.A., JARVIS, A.W., MARTELLI, G.P., MAYO, M.A., SUMMERS, M.D. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. **Archives of Virology**. Supplement 10. Springer verlag. Wien- New York, 300-315, 1995.
- NAKITARE, G. W., ELLIOTT, R. M. Expression of the Bunyamwera virus M genome segment and the intracellular localization of NSm. **Virology**, **195**: 511-520, 1993.

- NEWTON, S.E., SHORT, N.J., DALGARNO, L. Bunyamwera Virus Replication in Cultured *Aedes albopictus* (Mosquito) Cells: Establishment of a Persistent Viral Infection. **Journal of Virology** **38 (3)**: 1015 – 1024 , 1981.
- NICHOL, S. T., BEATY, B. J., ELLIOTT, R. M., GOLDBACH, R., PLYUSNIN, A., SCHMALJOHN, C. S. , TESH, R. B. Genus Phlebovirus. In **Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**, .Edited by C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L. A. Ball. San Diego, CA: Elsevier Academic Press. p. 709–711, 2005.
- NICOLETTI, L., VERANI, P.; CACIOLLI, S., CIUFOLINI, M. G., RENZI, A., BARTOLOZZI, D., PACI, P.; LEONCINI, F., PADAVANI, P., TRAINI, E., BALDERESCHI, M., BALDUCCI, M. Central nervous system involvement during infection by *Phlebovirus Toscana* of residents in natural foci in central Italy (1977-1988). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **45**: 429-434, 1991.
- NUNES, M. R. T., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., WEAVER, S. C., TESH, R. B., VASCONCELOS, P. F. C. Molecular Epidemiology of Group C Viruses (*Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus*) Isolated in the Américas. **Journal of Virology**, **79(16)**: 10561–10570, 2005.
- OHASHI, C.B., BRASIL, R.A. **Estudo da Infecção Experimental de Camundongos Albinos Suíços Recém-Nascidos com o Vírus Serra Norte (H 505240) em Microscopia Ótica**. TCC (Requisito a obtenção do grau de Médico) - Belém, Universidade Federal do Pará, 1997.42p.
- OVERBY, A.K., POPOV, V., ETIENNE, P.A.N., PETTERSSON, R.F. Generation and Analysis of Infectious Virus-Like Particles of Uukuniemi

- Virus (*Bunyaviridae*): a Useful System for Studying Bunyaviridae Packaging and budding. **Journal of Virology**, **80 (21)**: 10428-10435, 2006.
- OLIVEIRA, L. H. S. Introdução ao estudo dos vírus. In: **Virologia humana**. Oliveira, L. h. S. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1994.p. 1-18.
- PAVLOVSKY, E.N. Sandfly Fever and Its Vector. **State Medical Publishing Office, Leningred**, 1947.
- PEKOSZ A & GONZÁLEZ-SCARANO F. The extracelullar domain of *La Crosse Virus* G1 forms oligomers and undergoes pH- dependent conformational changes. **Virology**, **225**: 243-247, 1996.
- PELCZAR JR, M. J., CHAN, E. C.S., KRIEG, N. R. **Mcrobiologia: Conceitos e Aplicação**. 2<sup>a</sup> ed., vol 1, Makron Books, São Paulo, Brasil, 1997, 527p.
- PERRONE L.A.,NARAYANAN K., WORTHY M., and C. J. PETERS.The S Segment of Punta Toro Virus (*Bunyaviridae*, *Phlebovirus*) Is a Major Determinant of Lethality in the Syrian Hamster and Codes for a Type I Interferon Antagonist. **Journal of Varology**, **81(2)**: 884–892,2007
- PETERS, C. J., SLONE, T.W. Inbred rat strains mimic the disparate human response to Rift Valley fever virus infection. **Journal of Medical Virology**, **10**: 45-54, 1982.
- PESSOA,S.D. **Estudo ultraestrutural das alterações hepáticas causadas pelo vírus Serra Norte em camundongos albinos swiss recém nascidos**. Trabalho de conclusão de curso (Requisito a btenção de grau de Médico), Belém, Universidade Federal do Pará,1998,45p.

- PETTERSON, R. F.; HEWLETT, M. J.; BALTIMORE, D.; COFFIN, J. M. The genome of *Uukuniemi virus* consists of the three unique RNA segments. **Cell**, **11**: 51, 1977.
- PIFAT, D. Y., SMITH, J.F. Punta Toro virus infection of C 57 BL/ 6 J MICE: a model for phlebovirus- induced disease. **Microbial Pathogenesis**, **3**: 409 – 422, 1987
- PINHEIRO, F.P., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., VASCONCELOS, P.F.C. Arboviroses. In: **Tratado de Infectologia**. R. Veronesi & R. Focaccia (eds.). São Paulo, Editora Ateneu, 1997 p. 169-180.
- PROPHET, E. B., MILLIS, B., ARRINGTON, I. B., SOBIN, L. M. Laboratory methods in histotechnology. Washington, **American Registry of Pathology**, 1992. 3-80 p.
- QUARESMA, J. A. S., BARROS, V. L. R., FERNANDES, E. R., PAGLIARI, C., TAKAKURA, C., VASCONCELOS, P. F. C., ANDRADE-JR, H. F., DUARTE, M. I. S. Reconsideration on histopathology and ultrastructural aspects of the human liver in yellow fever. **Acta Tropica**, **94**: 116-127, 2005.
- QUARESMA, J. A. S., BARROS, V. L. R. S., PAGLIARI, C., FERNANDES, E. R., ANDRADE-JÚNIOR, H. F., VASCONCELOS, P. F. C., DUARTE, M. I. S. Hepatocyte lesions and cellular immune response in yellow fever infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **101**: 161-168, 2007.
- REED, L. S., MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Hygiene**, **27**: 493-497, 1938.

- ROBERSON, G., EL-SAID, L. H., BRANDT, W., DALRYMPLE, J., BISHOP, D. H. L. Biochemical studies on the Phlebotomus fever group viruses (*Bunyaviridae* family). **Journal of Virology**, **30**: 339-350, 1979.
- RODRIGUES, S. G., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., VASCONCELOS, P. F. C., TRAVASSOS DA ROSA, E. S., TESH, R. B., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. Characterization of two new Phleboviruses associated with human illness from the Amazon Region of Brazil. In: **An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries**, Travassos da Rosa, A. P. A., Vasconcelos, P. F. C., Travassos da Rosa, J. F. S (ed) Belém, Instituto Evandro Chagas. 1998, p. 100-106.
- RONNHOLM, R., PETTERSSON, R. F. Complete nucleotide sequence of the M RNA segment of Uukuniemi virus encoding the membrane glycoproteins G1 and G2. **Virology**, **160**: 191-202, 1987.
- SABIN, A. Phlebotomus fever. In: **Viral and Rickettsial diseases of man**. River, T. M. (ed). Philadelphia : LIPPINCOTT, 1948. P. 454-461.
- 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.
- SAIKKU, P., VON BONSDORFF, C. H. Electron microscopy of the *Uukuniemi virus*, an ungrouped arbovirus. **Virology**, **34**: p. 804, 1968.
- SAIKKU, P., VON BONSDORFF, C. H., OKER-BLOM, N. The structure of *Uukuniemi virus*, **Acta Virologica**, **14**: 103-107, 1970.

- 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. *Bunyaviridae*: the virus and their replication .In: **Fields Virology**. Fields, B. N. & Knipe, D. M., 3<sup>rd</sup>. ed., Philadelphia: Raven Press, 1996. p. 1447- 1471.
- SIMONS,J.F., HELLMAN, U. ,PETTERSSON, R.F. UUKUNIEMI Virus S RNA : Ambisense Coding Strategy, Packaging of Complementary Strands into Virions, and Homology to Members of the Genus *Phlebovirus*. **Journal of Virology**, **80**:10428-10435, 2006.
- SWOFFORD, D. L. **PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other methods, version 4**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1999.
- TESH,R.B.,SAIDI,S.,GAJDAMOVIC,S.J.,RODAHAIN;VESENJAK-HIRJAN,J. Serological studies on the epidemiology of sandfly fever in the Old World. **Bulletin world health organization**,**54**:663-674, 1976
- TESH, R. B., PAPAEVANGELOU, G. Effect of insecticide spraying for malaria control on the incidence of sandfly fever in Athens, Greece. **American Journal of Tropical Medicine end Hygiene**, **26**: 163, 1977.
- TESH,R.B., CLARENCE,J.P.,MEEGAN,J.M. STUDIES ON THE ANTIGENIC RELATIONSHIP AMONG PHLEBOVIRUSES. **American Journal of Tropical Medicine end Hygiene**, **31(1)**: 149-155, 1982.

- TESH, R. B., DUBOISE, M. Viremia and immune response with sequential phlebovirus infections. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 36 (3):** 662 -668, 1987.
- TESH, R. B. The genus *Phlebovirus* and its vectors. **Annals and Reviews of Entomology, 33:** 168-181, 1988.
- TESH, R. B., BOSHELL, J., YOUNG, D. G., MORALES, A., CARRASQUILLA, C. F., CORREDOR, A., MODI, D. B., TRAVASSOS DA ROSA, McCLEAN, R. B., RODRIGUES, C., GAITAN, M. O. Characterization of five new phleboviruses recently isolated from sand flies in tropical America. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 40 (5):** 529 – 533 ,1989.
- TESH, R.B. Febre do Flebótomo. In: Tratado de medicina interna. wyngaarden, j.b; Smith, L.H. Cecil. 18° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990.v. 2, p. 1589.
- TESH, R. B., GUZMAN, H., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., VASCONCELOS, P. F. C., DIAS, L. B., BUNNELL, J. F., ZHANG, H., XIAO, S-Y. Experimental Yellow Fever Virus Infection in the Golden hamster (*Mesocricetus auratus*). I Virologic, Biochemical and Immunologic Studies. **The Journal of Infectious Diseases, 183:** 1431-1436, 2001.
- THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F. AND D. G. HIGGINS. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research 24:** 4876-4882, 1997.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., TESH, D. B., PINHEIRO, F. P., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., PETERSON, N. E. Characterization of eight new Phlebotomus fever serogroup arboviruses (*Bunyaviridae: Phlebovirus*) from the Amazon Region of Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **32**: 1164-1171, 1983.

TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S., PINHEIRO, F.P., VASCONCELOS, P.F.C. Arboviroses. In: **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico**. Leão, R.N.Q. (eds.). Belém, Cejup: UEPA: Instituto Evandro Chagas, 1997. p. 207-225.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., PINHEIRO, F. P., TRAVASSOS DA ROSA, E. S., RODRIGUES, S. G., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., VASCONCELOS, P. F. C. Arboviroses. In: **Infectologia pediátrica**. Farhat, C. K., Carvalho, E. S., Carvalho, L. H. F. R., Succì, R. C. M. (2 ed.). São Paulo, Editora Atheneu, 1998. p.358-367.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., PINHEIRO, F. P., TRAVASSOS DA ROSA, E. S., RODRIGUES, S. G., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., VASCONCELOS, P. F. V. Arboviroses In: **Doenças infecciosas na infância e adolescência**. Tonelli, E. & Lincoln, S. F. (ed.) Rio de Janeiro: Medsi, 2<sup>a</sup> ed.V. 168: 986-1015, 2000.

VAN REGENMORTEL, M. H. V. Introduction to the species conception virus taxonomy In: **Virus taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses**. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of viruses Van Regenmortel, M. H. V.; Fauquet, C. M.; Bishop, D.H. L.; Cartens, E. B.; Estes, M.K.; Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A.;

McGeoch, D. J.; Pringle, C.R.; Wickner, R.B. (eds). p, 03-16, Academic Express: San Diego, 2000.

VAN REGENMORTEL, M. H. V., MAHY, B. Emerging issues in virus taxonomy. **Emerging Infectious Diseases**, **10**: 8-13, 2004

VASCONCELOS, P. F. C., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., DEGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., PINHEIRO, F. P. Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazonia. **Ciência e Cultura**, **44 (2/3)**: 117-124, 1992.

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 (ed.), Belém, Instituto Evandro Chagas, 1998. p.72-99.

VASCONCELOS, P. F. C., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., GUERREIRO, S. R., TRAVASSOS DA ROSA, E. S., DÉGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. **Caderno de saúde Pública, Rio de Janeiro**, **17 (suplemento)**; 155-164, 2001.

VASCONCELOS, P. F. C. Febre Amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **36 (2)**: 275-293 2003.

- VIALAT, P. A., BILLECOCQ, A. K., BOULOY, M. The S Segment of Rift Valley Fever Phlebovirus (*Bunyaviridae*) Carries Determinants for Attenuation and Virulence in Mice. **Journal of Virology**, **74 (3)**: 1538- 1543 , 2000.
- WALKER, A. S. Clinical impressions of an epidemic of sandfly fever in Palestine during 1940. **The Medical Journal of Austrália** , **1**: 345, 1941.
- WEBER, F., DUNN, E.F., BRIDGEN, A., ELLIOT, R.M. The Bunyamwera virus nonstructural protein NSs inhibits viral RNA polymerase in a minireplicon system. **Virology**, **281**: 67-74, 2001.
- XIAO, S. Y., GUZMAN, H., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., ZHU, H. B., TESH, R. B. Alteration of clinical outcome and histopathology of yellow fever virus infection in a hamster model by previous infection with heterologous flaviviruses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **68(6)**: 695-703, 2003.
- XIAO, S-Y., ZHIN, H., GUZMIN, H., TESH, R. B. Experimental Yellow Fever infection in the golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). **II Pathology journal Infect Disease**, **183**: 1437-1444, 2001.
- XU, F., LIU, D., NUNES, M.R.T., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., TESH, R.B., SHU-YUAN XIAO. Antigenic and Genetic Relationship among Rift Valley Fever Virus and Other Selected Members of the Genus *Phlebovirus* (*Bunyaviridae*) .**American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **76 (6)** : 1194-1200. 2007.
- XU, F., LIU, D., CHEN, H., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., TESH, R.B., SHU-YUAN XIAO. Phylogenetic relationships among sandfly fever group viruses

(*Phlebovirus: Bunyaviridae*) based on the small genome segment. **Journal of General Virology**, **88** : 2312-2319, 2007.

## ANEXOS

## Anexo 1 - Carta de aprovação do CEPAN- IEC



Parecer nº 0009/2007/CEPAN/IEC/SVS/MS

Protocolo CEPAN - nº 0005/2007

Ananindeua/PA, 20 de março de 2007.

Projeto: **“Infecção experimental em hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) e caracterização molecular do segmento M RNA de PHLEBOVIRUS (BUNYAVIRIDAE) do Complexo candiru isolados na Amazônia brasileira”.**

Pesquisador Responsável: PEDRO FERNANDO DA COSTA VASCONCELOS

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais-CEPAN do Instituto Evandro Chagas, em sua reunião realizada no dia 08/03/2007, cientificamos que o projeto acima foi considerado **aprovado**.

Recomendamos ao coordenador responsável que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados a este CEPAN, anualmente, a partir do início do projeto.

Atenciosamente,

  
Paulo Henrique Gomes de Castro  
Médico Veterinário - CRMV 0908-PA / AP  
PAULO HENRIQUE GOMES DE CASTRO  
Coordenador do CEPAN/IEC

**Anexo 2 - Cartão de inoculação**

M.S. - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE  
INSTITUTO EVANDRO CHAGAS

**CARTÃO DE INOCULAÇÃO**

GRUPO	AMOSTRA																					DATA		
IDADE	INOC.																					VOL.		
DATA																								
DIA	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
E	1																							
?	2																							
D	3																							
M	4																							
+	5																							
-	6																							
Total																								

FNS/IEC - 44