

VALÉRIA LIMA CARVALHO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO *Virus Melao* CEPAS BE
AR 633512 E BE AR 8033 (*Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus*) E
INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM HAMSTERS DOURADOS
(*Mesocricetus auratus*)**

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: Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos.

Belém-Pará
2007

VALÉRIA LIMA CARVALHO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO *Virus Melao* CEPAS BE AR
633512 e BE AR 8033 (*Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus*) E
INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM HAMSTERS DOURADOS
(*Mesocricetus auratus*)

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: Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos
Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, IEC/SVS/MS.

Banca Examinadora:

Membros titulares: Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto
Departamento de Patologia-ICB/ UFPA

Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes
Seção de Arbovirologia e F. Hemorrágicas-IEC/SVS/MS

Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma
Departamento de Patologia - NMT/UFPA

Belém, 25 de maio de 2007

DEDICATÓRIA

A Deus e a Nossa Senhora, por terem permitido que este trabalho se realizasse e que as dificuldades fossem superadas. Pelas oportunidades e força espiritual. Por todo amor que Eles têm por nós. Por estarem sempre guiando minha vida.

À minha mãe, Creuza, por estar sempre ao meu lado me incentivando, me encorajando e apoiando. Obrigada pelos anos de sua vida dedicados a mim e à minha irmã; por fazer o possível e o impossível pela nossa educação e formação profissional.

À minha irmã Vanessa, pelas palavras de conforto nas horas em que mais precisei principalmente às vésperas da qualificação; por sempre me ajudar e por ser esse anjo da guarda que Deus enviou para mim.

A meu pai Antônio, que por mais distante que esteja de mim, já contribuiu para minha educação no passado; e sei que torce muito pela minha realização profissional.

À minha avó Alvina, pelo apoio nas horas difíceis.

EPÍGRAFE

*“O Senhor é meu pastor e nada me faltará”
(Salmo 23)*

*“Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos.
Fazer ou não fazer algo só depende de nossa vontade e perseverança.”
(Albert Einstein)*

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter permitido a realização deste trabalho, por ter me dado forças para prosseguir até o final, enfrentando as dificuldades que surgiram nesta caminhada até a conclusão deste trabalho. E pelas pessoas maravilhosas que colocou no meu caminho para me auxiliarem.

Aos meus familiares, pelo apoio e colaboração que sempre me deram, estando sempre presentes, me incentivando nas horas boas e difíceis.

Ao meu orientador, Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos, pelo grande apoio, paciência, excelente orientação e contribuição na minha formação profissional.

À Dra. Conceição Vieira, pelos ensinamentos e encaminhamento, desde a Iniciação Científica até o Mestrado. Por ser essa pessoa amiga, sempre me auxiliando nas horas que preciso; e por ter contribuído bastante para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Márcio Nunes pelo grande apoio, paciência e encaminhamento na etapa de caracterização molecular deste trabalho.

Ao Dr. Samir Casseb pela amizade e grande apoio na realização das técnicas de biologia molecular deste estudo.

Ao Dr. Joaquim Nunes Neto pelo companheirismo e apoio em algumas etapas deste trabalho.

Ao Dr. Juarez Quaresma pela paciência e participação na realização da histopatologia e imunohistoquímica deste trabalho.

À Dra. Eliana Pinto da Silva pela amizade e apoio nos cultivos celulares.

Ao Dr. Manoel Gomes e às funcionárias da Seção de Patologia do Instituto Evandro Chagas (IEC), Socorro e Maria das Dores, pela participação na realização das dosagens bioquímicas deste trabalho.

À Profa. Fernanda Sagica e ao amigo Patrick Cantuária pelo apoio nas análises estatísticas.

À Dra. Ândrea Kely Santos e aos pesquisadores do Laboratório de Genética do ICB da UFPA, pela colaboração em parte do seqüenciamento nucleotídico do presente estudo.

Aos pesquisadores e técnicos da unidade de Microscopia Eletrônica do IEC, em especial ao Dr. José Antônio Diniz.

A Antônio Gregório Dias Junior, pelo melhoramento das pranchas de fotos, nesta versão final do trabalho.

Ao IEC, por ter permitido que este trabalho fosse realizado em seus laboratórios.

A todos os funcionários do biotério da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas (SAARB) do Instituto Evandro Chagas, em especial à Aldair, pelo apoio no fornecimento e manutenção dos animais de laboratório.

A todos os funcionários, contratados e estagiários da SAARB do Instituto Evandro Chagas, em especial, Ercília, Geraldo, Basílio, Helena, Francisco, Hélio, Hamilton, Armando, Orlando, Nazaré, Lívia Martins, Lívia Casseb, Janiffer, Daniele Medeiros, Daniele Henriques, Luíz, Iveraldo, Mário, Denise, Mary, Rose, Américo, João, Cléber, Jonas, Osvaldo, Maria, Raimundo, Maxwell, Elpidia, Eliana, Elizabeth, Sueli, Assis, Ana Cecília, Maria dos Remédios, Socorro, Natividade, Adriana, Darlene, Anderson, Samuel.

À minha turma de mestrado, pela união e amizade ao longo dos vários meses de disciplinas.

Aos professores do curso de mestrado do programa de Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, pelos conhecimentos transmitidos.

A CAPES, pelo fornecimento da minha bolsa de estudo, o que contribuiu bastante para a minha permanência no curso de mestrado.

Aos animais de laboratório, hamsters, camundongos, entre outros; todos foram fundamentais para este trabalho, sendo estes também, os responsáveis pela concretização de mais esta etapa de minha vida, a obtenção do grau de Mestre. A todos estes animais solicitados pela ciência para o estudo de novos vírus, o meu respeito e eterna gratidão.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	15
RESUMO	16
ABSTRAT	17
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 ARBOVÍRUS	18
1.2 FAMÍLIA <i>Bunyaviridae</i>	23
1.2.1 Propriedades biológicas dos vírus da família <i>Bunyaviridae</i>	24
1.2.2 Organização do genoma dos vírus pertencentes ao gênero <i>Orthobunyavirus</i>	28
1.3 SOROGRUPO CALIFÓRNIA	29
1.3.1 Relacionamento antigênico dos vírus do Sorogrupo Califórnia	30
1.3.2 Aspectos da ecoepidemiologia dos vírus do sorogrupo Califórnia	31
1.3.3 Infecção em cultura de células e infecção experimental em hospedeiros vertebrados com vírus do sorogrupo Califórnia	33
1.4 <i>Virus Melao</i> (VMEL)	34
1.4.1 Evidências de infecção por cepas do VMEL	36
1.5 CEPA VIRAL BE AR 633512	36
1.6 <i>Ochlerotatus (Ochlerotatus) scapularis</i>	39
1.7 OBJETIVOS	41
1.7.1 Objetivo Geral	41
1.7.2 Objetivos Específicos	41
2 MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1 MATERIAL	42
2.1.1 Cepas virais	42
2.1.2 Animais	43
2.2 MÉTODOS	43

2.2.1	Infecção experimental	43
2.2.1.1	Preparação de estoque e titulação viral em camundongos.....	44
2.2.1.2	Infecção experimental nos hamsters.....	44
2.2.1.3	Viremia.....	46
2.2.1.4	Preparação do sorohiperimune.....	47
2.2.1.5	Teste de neutralização.....	48
2.2.1.6	Análises histopatológicas.....	49
2.2.1.7	Detecção de antígeno viral pela técnica de imunohistoquímica.....	50
2.2.1.8	Exames para verificação das funções hepática e renal.....	51
2.2.1.9	Análise estatística.....	51
2.2.2	Caracterização molecular	52
2.2.2.1	Propagação viral em cultura de células VERO.....	52
2.2.2.2	Extração do RNA viral.....	53
2.2.2.3	Amplificação dos genes N, Gn e Gc pela técnica de Transcrição Reversa – Reação em Cadeia mediada pela Polimerase (RT-PCR).....	55
2.2.2.4	Análise dos produtos da RT-PCR.....	57
2.2.2.5	Purificação do cDNA.....	58
2.2.2.6	Seqüenciamento nucleotídico.....	59
2.2.2.7	Filogenia.....	61
2.2.2.8	Estrutura secundária dos genes Gn e Gc.....	62
3	RESULTADOS	63
3.1	INFECCÃO EXPERIMENTAL	63
3.1.1	Suscetibilidade dos camundongos e hamsters às cepas do VMEL	63
3.1.2	Viremia e titulação viral	64
3.1.3	Detecção de anticorpos neutralizantes	66
3.1.4	Avaliação e análise estatística dos resultados dos testes bioquímicos para verificação das funções hepática e renal	67
3.1.4.1	Cepa viral BE AR 633512.....	67

3.1.4.2	Cepa viral BE AR 8033	71
3.1.5	Comparação dos resultados obtidos na verificação das funções hepática e renal da cepa BE AR 633512, da cepa BE AR 8033 e dos animais controles.....	76
3.1.6	Análise Histopatológica	78
3.1.6.1	Cepa BE AR 633512	79
3.1.6.2	Cepa BE AR 8033	83
3.1.7	Imunohistoquímica	87
3.2	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	89
3.2.1	Análise genética dos genes N, Gn e Gc	89
3.2.2	Análise filogenética	92
3.2.3	Análise estrutural dos genes Gn e Gc	97
4	DISCUSSÃO	101
5	CONCLUSÕES.....	119
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121
	ANEXO 1.....	139

LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1 - Representação esquemática da partícula viral dos vírus da família <i>Bunyaviridae</i>	26
Figura 2 - Organização do genoma dos vírus do gênero <i>Orthobunyavirus</i>	29
Figura 3 - Mapa mostrando a localização de Port-of-Spain, Trinidad, local onde o VMEL (TRVL 9375) foi isolado pela primeira vez.....	35
Figura 4 - Mapa do Estado de Rondônia, mostrando a localização do município de Alta Floresta do Oeste.....	37
Figura 5 - Mosquito da espécie <i>Ochlerotatus scapularis</i>	40
Figura 6 - Representação esquemática para obtenção do soro hiperimune....	47
Figura 7 - Representação esquemática do teste de neutralização.....	49
Figura 8 - Representação esquemática da técnica de extração de RNA pelo método do TRIZOL LS ®.....	54
Figura 9 - Iniciadores específicos para o VMEL utilizados para amplificação dos genes N, Gn e Gc pela técnica de RT-PCR.....	57
Figura 10 - Hamsters doentes após infecção com a cepa BE AR 633512.....	63
Figura 11 - Viremia da cepa BE AR 633512 do 1º ao 7º dia e com 21 dias pós-inoculação.....	64
Figura 12 – Viremia da cepa BE AR 8033 do 1º ao 7º dia e com 21 dias pós-inoculação.....	65
Figura 13 - Título, em ILN, de anticorpos neutralizantes contra às cepas virais BE AR 633512 e BE AR 8033.....	66

Figura 14 - Uréia dos animais infectados com a cepa BE AR 633512 e dos animais controles.....	68
Figura 15 - Creatinina dos animais infectados com a cepa BE AR 633512 e dos animais controles.....	69
Figura 16 - AST dos animais infectados com a cepa BE AR 633512 e dos animais controles.....	70
Figura 17 - ALT dos animais infectados com a cepa BE AR 633512 e dos animais controle.....	71
Figura 18 - Uréia dos animais infectados com a cepa BE AR 8033 e dos animais controles.....	72
Figura 19 - Creatinina dos animais infectados com a cepa BE AR 8033 e dos animais controles.....	73
Figura 20 - AST dos animais infectados com a cepa BE AR 8033 e dos animais controles.....	74
Figura 21 - ALT dos animais infectados com a cepa BE AR 8033 e dos animais controles.....	75
Figura 22 - Comparação dos valores de uréia entre os animais controles e os animais infectados com a cepa BE AR 633512 e com a cepa BE AR 8033.....	76
Figura 23 - Comparação dos valores de creatinina entre os animais controles e os animais infectados com a cepa BE AR 633512 e com a cepa BE AR 8033.....	77

Figura 24 - Comparação dos valores de AST entre os animais controles e os animais infectados com a cepa BE AR 633512 e com a cepa BE AR 8033.....	77
Figura 25 - Comparação dos valores de ALT entre os animais controles e os animais infectados com a cepa BE AR 633512 e com a cepa BE AR 8033....	78
Figura 26 - Histopatologia do SNC, Fígado e Baço dos hamsters controle e infectados com a cepa BE AR 633512.....	81
Figura 27 - Histopatologia do Rim, Pulmão e Miocárdio dos hamsters controle e infectados com a cepa BE AR 633512.....	82
Figura 28 - Histopatologia do SNC, Fígado e Baço dos hamsters controles e infectados com a cepa BE AR 8033.....	84
Figura 29 - Histopatologia do Rim, Pulmão e Miocárdio dos hamsters controle e infectados com a cepa BE AR 8033.....	86
Figura 30 - Imunohistoquímica em cortes de fígado, SNC e rim de hamsters infectados com as cepas do VMEL, BE AR 633512 e BE AR 8033.....	88
Figura 31 - Análise filogenética do gene N do protótipo do VMEL, TRVL 9375, e cepas BE AR 633512 e BE AR 8033, utilizando o método de NJ.....	95
Figura 32 - Análise filogenética do gene Gn do protótipo do VMEL, TRVL 9375, e cepas BE AR 633512 e BE AR 8033, utilizando o método de NJ.....	96
Figura 33 - Análise filogenética do gene Gc do protótipo do VMEL, TRVL 9375, e cepas BE AR 633512 e BE AR 8033, utilizando o método de NJ.....	97
Figura 34 - Estrutura secundária do RNA (gene Gn) das cepas do VMEL, BE AR 633512, BE AR 8033 e do protótipo TRVL 9375	99

Figura 35 - Estrutura secundária do RNA (gene Gc) das cepas do VMEL, BE AR 633512, BE AR 8033 e do protótipo TRVL 9375	100
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

AA - aminoácido

ALT - Aminotransferase alanina sérica

AST - Aminotransferase aspartato sérica

BE AR - amostra viral isolada a partir de artrópodes no município de Belém- PA

CAL - Cadeia aberta de leitura

dpi - dia pós-infecção

ECP - Efeito citopático

ic - intracerebral

IEC - Instituto Evandro Chagas

ILN - Índice logarítmico de neutralização

ip – intraperitoneal

M-RNA - Segmento M do RNA

MP - Máxima parsimônia

MV - Máxima verossimilhança

NJ - *Neighbor joining* (Agrupamento de vizinhos)

nt - nucleotídeo

P-RNA - Segmento P do RNA

PBS - Solução salina fosfatada

si - mutação do tipo transição

SNC - Sistema Nervoso Central

sv - mutação do tipo transversão

VDEN - *Virus Dengue*

VFA - *Virus Febre Amarela*

VKEY - *Virus Keystone*

VMAY - *Virus Mayaro*

VMEL - *Virus Melao*

VORO - *Virus Oropouche*

VSDN - *Virus Serra do Navio*

RESUMO

As cepas do *Virus Melao* (VMEL), BE AR 8033 e BE AR 633512 foram isoladas de mosquitos *Ochlerotatus* (*Ochlerotatus*) *scapularis*, em Belém- PA (1955) e Alta Floresta do Oeste- RO (2000), respectivamente. Este trabalho teve como objetivo caracterizar molecularmente as cepas BE AR 633512 e BE AR 8033 e realizar estudos histopatológicos, bioquímicos e imunológicos comparativos em hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*). Hamsters mostraram suscetibilidade às cepas do VMEL. A viremia em hamsters para BE AR 633512 ocorreu do 3º ao 6º dias pós-infecção (dpi.), e para a cepa BE AR 8033 ocorreu no 2º dpi. Anticorpos neutralizantes para ambas as cepas foram detectados a partir de 5 dpi., e se mantiveram até 30 dpi. As cepas testadas alteraram os marcadores bioquímicos AST, ALT e uréia, enquanto que a creatinina só apresentou alteração estatisticamente significativa nos animais infectados com a cepa viral BE AR 633512, em comparação aos animais controles não infectados. Alterações histopatológicas foram observadas no SNC, fígado, rim e baço dos hamsters infectados pelas cepas do VMEL, sendo a infecção nesses órgãos confirmada por imunohistoquímica. A cepa BE AR 633512 foi mais virulenta e patogênica para hamsters que a cepa BE AR 8033. A análise genética dos genes N, Gn e Gc revelou que para os genes N e Gn, a cepa BE AR 8033 e do protótipo VMEL (TRVL 9375) são mais geneticamente relacionados. Para o gene Gc, a cepa BE AR 8033 é mais relacionada com a cepa BE AR 633512, sendo que esta última cepa apresentou maior variabilidade genética, principalmente no gene Gn com várias substituições de aminoácidos, mas as mutações no gene Gc provavelmente foram responsáveis pelo aumento da virulência e patogenicidade em hamsters.

ABSTRACT

The *Melao Virus* (MELV) strains, BE AR 8033 e BE AR 633512 were isolated from lots of *Ochlerotatus* (*Ochlerotatus*) *scapularis* mosquitoes, in Belém- PA (1955) and Alta Floresta do Oeste- RO (2000), Brazil, respectively. The aim of this study was to carry out molecular characterization of the MELV strains BE AR 633512 and BE AR 8033 and to describe the histopathologic, biochemistry and immunological changes in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). Hamsters showed susceptibility to these MELV strains. The viremia produced in hamsters by BE AR 633512 strain occurred between 3 and 6 days post-infection (dpi.), and for the BE AR 8033 occurred only in the 2nd dpi. Neutralizing antibodies for both strains were initially detected on the 5th dpi. and remained up to the 30 dpi. The biochemistry markers AST, ALT and blood urea nitrogen showed values statistically significant among inoculated animals with both VMEL strains, while creatinine value it was only altered by BE AR 633512 strain. Histopathologic changes were observed in the central nervous system, liver, kidney, and spleen of the hamsters, and infection was confirmed by immunohistochemical assay in all them. Strain BE AR 633512 caused more intense tissue damage showing increases virulence and pathogenicity than BE AR 8033 strain. The genetic analysis of the N, Gn and Gc genes revealed that for N and Gn genes, the BE AR 8033 and prototype strain (TRVL 9375) are genetically more closed related, and for the Gc gene, the BE AR 8033 and BE AR 633512 strains are more related. BE AR 633512 strain showed increased genetic variability, mainly in the Gn gene, were several aminoacid changes were observed, but the Gc mutations should be responsible for the increased virulence for hamsters.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ARBOVÍRUS

Os vírus transmitidos por artrópodes hematófagos, por exemplo, insetos e carrapatos, são conhecidos como arbovírus, termo este, derivado da expressão inglesa *arthropod-borne virus*. Os arbovírus são mantidos em natureza, mediante transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados infectados e hospedeiros vertebrados suscetíveis, através da picada de artrópodes hematófagos, ou entre hospedeiros artrópodes, através da via transovariana e, possivelmente da via venérea. Esses vírus são capazes de se multiplicar e produzir viremia nos vertebrados, de se multiplicar em tecidos de artrópodes e de serem passados a novos hospedeiros vertebrados suscetíveis, após um período de incubação extrínseco (WHO,1985). Uma vez infectados, os artrópodes permanecem assim por toda sua existência (Marcondes, 2001).

Os arbovírus constituem o maior grupo conhecido de vírus, sendo registrados 537 tipos diferentes que de acordo com a terceira edição do “*International Catalogue of Arboviruses, Including Certain Other Viruses of Vertebrates*”, estão distribuídos por quase todos os continentes (Karabatsos, 1985).

Esses vírus provocam doenças conhecidas como arboviroses, que podem ocorrer de forma endêmica ou epidêmica e alguns, como por exemplo, o *Virus Oropouche* (VORO), *Virus Mayaro* (VMAY), *Virus Dengue* (VDEN) e *Virus Febre Amarela* (VFA), que circulam na Amazônia, representam sérios problemas de saúde pública, pois, além de causarem epidemias, são

responsáveis por considerável morbidade e/ou letalidade em seres humanos no Brasil e no exterior (Vasconcelos *et al.*, 1992).

Os arbovírus em sua maioria são encontrados em ambientes silvestres, no entanto, a sua presença tem sido notada periodicamente em ambientes urbanos. A distribuição geográfica dos arbovírus é ampla, tanto nas regiões tropicais como nas temperadas. Entretanto, observa-se predominância dos arbovírus nas regiões tropicais, certamente por oferecerem condições ecológicas mais favoráveis. De fato, a Amazônia Brasileira mantém a maior variedade de arbovírus até hoje reconhecida, o que se deve a grande biodiversidade encontrada nesta região (Travassos da Rosa *et al.*, 1997).

Com exceção do *Virus Dengue*, *Virus Ross River*, *Virus Encefalite Japonesa*, *Virus West Nile*, *Virus Oropouche*, *Virus Chandipura*, *Virus Chikungunya* e *Virus Febre Amarela* (ciclo urbano), os humanos parecem não desempenhar um papel essencial na manutenção e disseminação das arboviroses. A infecção humana é usualmente um acidente biológico, e os humanos são tipicamente hospedeiros finais ou tangenciais (Beaty *et al.*, 1988).

O principal mecanismo de amplificação dos arbovírus é a transmissão horizontal, a qual se baseia na transmissão entre hospedeiros vertebrados suscetíveis e vetores. Há também, a transmissão vertical, que se fundamenta na transmissão transovariana entre os artrópodes hematófagos (Consoli & Oliveira, 1994).

A distribuição dos arbovírus nas famílias virais é feita de acordo com o sistema universal de classificação, que utiliza as propriedades físico-químicas

dos mesmos (Fauquet *et al.*, 2005). Em sua maioria, os arbovírus encontram-se registrados nas famílias *Togaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Reoviridae*, *Flaviviridae* e *Bunyaviridae*. Ressalte-se, no entanto, que nem todos os membros das citadas famílias são necessariamente arbovírus. Reconhece-se ainda a existência de vírus integrantes das famílias *Arenaviridae*, *Poxviridae*, *Herpesviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Coronaviridae*, que embora registrados no Catálogo Internacional, provavelmente não sejam arbovírus. Muitos outros prováveis arbovírus não têm taxonomia definida, porquanto suas características físico-químicas ainda não são suficientemente conhecidas (Travassos da Rosa *et al.*, 1998).

O genoma dos arbovírus é constituído por ácido ribonucléico (RNA), com uma única exceção, o *Vírus da Febre Suína Africana*, que possui ácido desoxirribonucleico (DNA) (Hess, 1988). O RNA dos arbovírus pode ser segmentado ou não-segmentado, e se apresentar com uma ou duas cadeias nucleotídicas (Travassos da Rosa *et al.*, 1997). Os arbovírus com genoma não-segmentado estão incluídos nas famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae* e *Rhabdoviridae*, enquanto aqueles com genoma segmentado incluem-se nas famílias *Bunyaviridae* e *Reoviridae* (Beaty *et al.*, 1989).

Os arbovírus são patogênicos para camundongos albinos, causando encefalite nos recém-nascidos. E depois do sistema nervoso central, o fígado parece ser o órgão mais freqüentemente agredido por esses vírus (Dias, 1986).

Danos hepáticos podem ser observados concomitantemente em algumas arboviroses, principalmente nas de caráter hemorrágico; na maior parte das vezes, as lesões são de leve intensidade, mas em certos casos, são

dominantes nos quadros clínicos e anatômicos, como acontece na Febre amarela. Nesta, uma hepatite médio-zonal, com lesões degenerativas hialina e gordurosa (esteatose) em pequenas gotas, é tida como patognomônica da doença. Experimentalmente, alguns arbovírus têm demonstrado grande eletividade para o parênquima hepático, como ocorre com vários componentes do grupo C em camundongos, e com o VORO em hamsters (Araujo *et al.*, 1977; De Paola, 1972). Outros ocasionam envolvimento renal, como o *Virus Mucambo*, que determina lesões da glomerulopatia hemorrágica em camundongos (Araujo *et al.*, 1971; Dias *et al.*, 1972).

Alguns arbovírus são capazes de causar alterações bioquímicas, como o VDEN, que promove aumento discreto nos níveis de Aspartato aminotransferase sérica (AST) e Alanina aminotransferase sérica (ALT). Outros vírus como o VFA, podem elevar o nível dessas aminotransferases a valores várias vezes acima dos valores normais (Tuboi *et al.*, 2007).

As manifestações clínicas em seres humanos, decorrentes das infecções por arbovírus, podem ser reunidas genericamente em quatro distintas categorias: doença febril, febre com exantema, febre hemorrágica e encefalite (Vasconcelos *et al.*, 2003).

A confirmação do diagnóstico das infecções por arbovírus é feita mediante o isolamento do agente, testes sorológicos, detecção do genoma, detecção de antígenos virais e histopatologia. A histopatologia tem grande importância para o diagnóstico de algumas arboviroses, principalmente as que apresentam tropismo por algum órgão específico, como é o caso do VFA, que apresenta o fígado como órgão alvo da infecção (Fonseca & Figueiredo, 1996).

Além desses testes específicos, há também alguns exames inespecíficos que auxiliam o diagnóstico e orientam quanto ao quadro clínico do paciente. Dentre esses testes, os mais utilizados são: o hemograma, a contagem de plaquetas, o coagulograma, a dosagem dos fatores de coagulação, as aminotransferases, a bilirrubina, a uréia, a creatinina e a dosagem da albumina sérica (Vasconcelos *et al.*, 2003).

Alguns modelos animais têm sido sistematicamente utilizados para o estudo dos arbovírus, dentre os principais, estão os camundongos, primatas não-humanos e hamsters. A inoculação do VFA em camundongos, por exemplo, desencadeia encefalite fatal. Por outro lado, a infecção experimental de macacos determina tropismo semelhante ao observado no homem, isto é, viscerotropismo tendo como principal órgão alvo, o fígado. Este tipo de apresentação clínica nos símios os transformou no modelo ideal para estudos experimentais da Febre amarela face à semelhança com o quadro desenvolvido pelos seres humanos. Entretanto, os problemas éticos e os custos elevados desses animais inviabilizam os estudos em primatas. Além destes, os hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) têm sido usados como modelo alternativo para o estudo do viscerotropismo do VFA, pois há vantagens econômicas, aliadas ao fácil manejo destes animais em laboratório (Tesh *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2001).

Em infecção experimental com hamsters jovens, o VFA foi encontrado na corrente sangüínea cerca de dois dias pós-inoculação (dpi.) (Tesh *et al.*, 2001). As lesões localizam-se nos lóbulos hepáticos, com necrose

médio-zonal semelhante à que ocorre com humanos e símios. (Xiao *et al.*, 2001; Vasconcelos, 2003).

1.2 FAMÍLIA *Bunyaviridae*

A família *Bunyaviridae* foi estabelecida em 1975, constituindo a maior família de vírus com genoma RNA, com mais de 300 sorotipos diferentes, agrupados em cinco gêneros: *Orthobunyavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus*, *Hantavirus* e *Tospovirus* (Schmaljohn *et al.*, 1986). Os gêneros *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus* e *Phlebovirus* compreendem vírus que infectam animais, e o gênero *Tospovirus* contem vírus conhecidos por infectar mais de 400 espécies em 50 famílias de plantas (Kormelink *et al.*, 1992; Peters *et al.*, 1991).

Os cinco gêneros da família *Bunyaviridae* são, primariamente, classificados em uma única família devido suas características estruturais, incluindo um genoma constituído de RNA tri-segmentado de polaridade negativa e proteínas semelhantes codificadas dentro de cada segmento do genoma (Bishop *et al.*, 1980; Porterfield *et al.*, 1975).

A grande maioria dos vírus pertencentes a esta família são arbovírus, os quais são transmitidos por mosquitos, flebótomos e carrapatos, sendo mantidos em natureza como zoonoses (Karabatsos, 1985; Dégallier *et al.*, 1989). Fazem exceção os hantavírus, que infectam roedores e têm mecanismos de transmissão relacionados à inalação de aerossóis das excretas infectadas destes animais (Schmaljohn *et al.*, 1987). Bem assim com os tospovirus, que infectam plantas (Kormelink *et al.*, 1992).

A abordagem clássica para o estudo da taxonomia dos vírus da família *Bunyaviridae* tem sido o uso de métodos sorológicos, usando testes de neutralização (TN), inibição da hemaglutinação (IH), fixação do complemento (FC). Os testes de neutralização e de IH são empregados para detecção de determinantes antigênicos presentes nas glicoproteínas virais do envelope codificadas pelo segmento M-RNA, enquanto que o teste de FC é principalmente utilizado para detectar determinantes presentes na proteína de nucleocapsídeo, codificada pelo segmento P-RNA (Shope & Causey, 1962).

As técnicas moleculares para estudos de vírus pertencentes à família *Bunyaviridae* têm sido amplamente utilizadas, correlacionadas com os resultados dos testes sorológicos (Chu *et al.*, 1994). Nunes *et al.* (2005) citam a importância de tal correlação para os vírus da citada família, após analisar os resultados obtidos para a caracterização molecular dos vírus do grupo C, e observar que tais resultados corroboram com os resultados obtidos anteriormente por testes sorológicos clássicos, como FC, IH e TN.

1.2.1 Propriedades biológicas dos vírus da família *Bunyaviridae*

As propriedades morfológicas variam entre os vírus em cada um dos cinco gêneros. As partículas virais geralmente são esféricas ou pleomórficas, com um diâmetro de 80 a 120 nm; exibem projeções glicoprotéicas de superfície de 5 a 10 nm, as quais estão inseridas em uma camada bilipídica, o envelope, que apresenta uma espessura de aproximadamente 5 nm (Fauquet *et al.*, 2005).

O genoma destes vírus é composto por RNA de fita simples, polaridade negativa, de simetria helicoidal, e constituído por três segmentos com diferentes tamanhos, os quais são designados por G (grande), M (médio), P (pequeno) (Murphy *et al.*, 1995).

O segmento G codifica uma grande proteína, a proteína L, que se encontra associada aos três segmentos de RNA viral e apresenta a atividade de RNA polimerase RNA dependente, que é responsável pela replicação e transcrição dos segmentos genômicos de RNA. O segmento M codifica um polipeptídio precursor, que por clivagem, dá origem às glicoproteínas de superfície viral, Gn e Gc e uma proteína não-estrutural, NSm. O segmento P codifica duas proteínas, a proteína do nucleocapsídeo (N), e uma proteína não-estrutural, NSs (Elliott, 1990) (Figura 1). O tamanho aproximado destas proteínas pode ser observado no Quadro 1.

Quadro 1 - Tamanho aproximado das proteínas codificadas por cada segmento do genoma dos vírus da família *Bunyaviridae* (KDa)

RNA Proteína	<i>Orthobunyavirus</i>	<i>Hantavirus</i>	<i>Nairovirus</i>	<i>Phlebovirus</i>	<i>Tosposvirus</i>
Segmento G L	259-263	249-247	459	238-241	330-332
Segmento M Gn	29-41	68-76	30-45	50-72	46-58
Gc	108-120	52-58	72-84	55-75	72-78
NSm	15-18	---	78-85, 92-115	--- ou 78	34-37
Segmento P N	19-26	48-54	48-54	24-30	29
NSs	10-13	---	---	29-32	52

Legenda: --- = Nenhuma

Fonte: Adaptado de Fauquet *et al.* (2005).

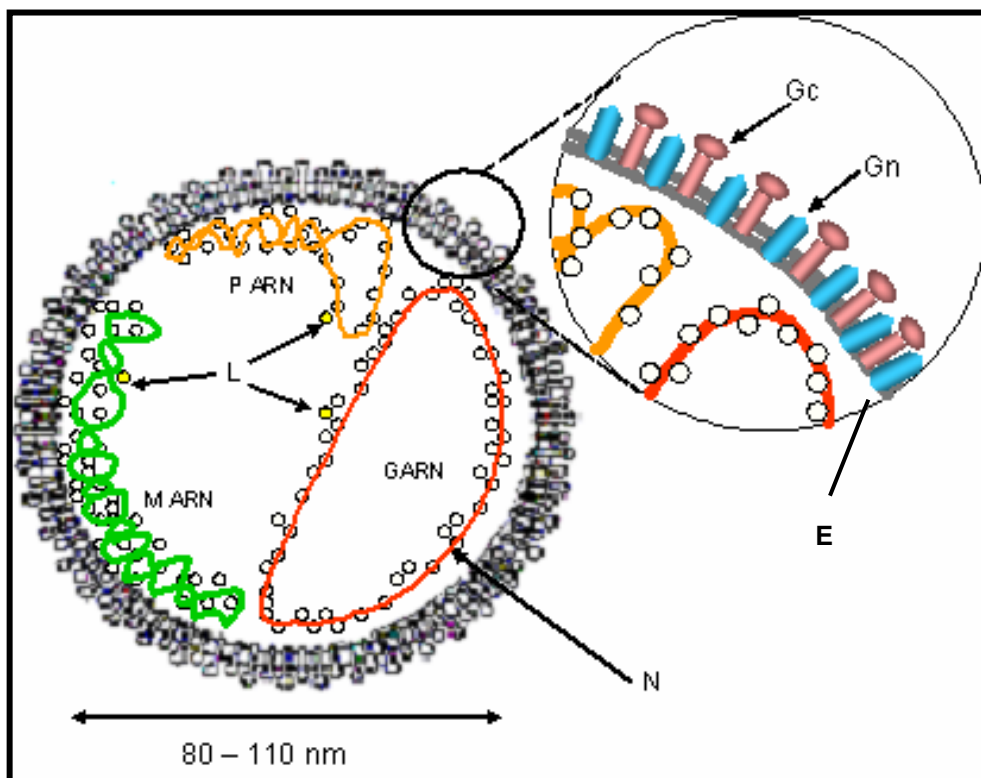


Figura 1 - Representação esquemática da partícula viral dos vírus da família *Bunyaviridae*, mostrando os três segmentos do RNA (P-RNA, M-RNA e G-RNA) associados à proteína L. Em volta de cada segmento de RNA pode se observar a proteína N, e as duas glicoproteínas, Gn e Gc, emergindo do envelope (E).

Fonte: Adaptado de Fauquet *et al.* (2005).

As proteínas mencionadas codificadas pelos segmentos de RNA genômicos possuem importantes funções biológicas para os vírus da família *Bunyaviridae*, estando fortemente relacionados a antigenicidade viral e a infectividade em vertebrados e invertebrados (interação vírus-célula hospedeira) (Gonzalez-Scarano *et al.*, 1989).

A glicoproteína Gc do envelope viral tem importantes funções biológicas. É provavelmente, um ligante que interage com os receptores de células suscetíveis do hospedeiro, pois estudos mostraram que anticorpos monoclonais anti-Gc inibem a adsorção do vírus a células suscetíveis (Kingsford & Boucquey, 1991; Ludwig *et al.*, 1991a). Esta glicoproteína é a principal determinante da fusão e entrada dos vírus do sorogrupo Califórnia na célula (Plassmeyer, *et al.*, 2005), e segundo Gonzalez-Scarano *et al.* (1987), anticorpos monoclonais anti-Gc inibem a fusão do envelope viral à célula. Outros estudos ainda sugerem que a glicoproteína Gc do *Virus La Crosse* tenha um papel importante como proteína de fusão de classe II (Plassmeyer *et al.*, 2007). Além disso, esta glicoproteína é importante na determinação da virulência em hospedeiros vertebrados, devido certas variantes do *Virus La Crosse* com mutações de ponto na proteína Gc mostrarem alteração acentuada no potencial neuro-invasivo (Gonzalez-Scarano, 1985). Também é uma proteína importante na imunidade protetora, devido certos anticorpos monoclonais anti-Gc protegerem ratos contra alguns vírus que geralmente causam a morte desses animais (Griot *et al.*, 1993). Com relação à glicoproteína Gn, esta proteína é provavelmente importante para a adsorção viral, funcionando como ligante para as células do artrópode (Mertz, 1997). A glicoproteína Gn do *Virus La Crosse* foi proposta ser um determinante para a adsorção do vírus nas células no intestino de mosquitos (Ludwig *et al.*, 1991b).

A proteína não estrutural, NSs, codificada pelo segmento P, atua como um fator de virulência, auxiliando o vírus a utilizar a síntese protéica da célula hospedeira, além de inibir a ação do interferon (Bridgen *et al.*, 2001),

atuando como antagonista do interferon tipo I (Kohl *et al.*, 2003). Outra função importante desempenhada por esta proteína é a regulação da atividade da polimerase viral (Weber *et al.*, 2001). Por outro lado, suspeita-se que a proteína não-estrutural, NSm, codificada pelo segmento M, possa estar envolvida na etapa de montagem do vírus (Nakitare & Elliott, 1993).

1.2.2 Organização do genoma dos vírus pertencentes ao gênero *Orthobunyavirus*

O segmento G codifica a proteína L (259-263 KDa), em uma única e contínua cadeia aberta de leitura (CAL), enquanto que o segmento M-RNA codifica em uma única CAL as glicoproteínas Gn (29-41 KDa) e Gc (108-120 KDa), e também uma proteína não-estrutural, NSm (15-18 KDa), a partir da clivagem de uma grande poliproteína. Já o segmento P-RNA codifica a proteína estrutural do nucleocapsídeo (N; 19-26 KDa), e uma proteína não-estrutural, NSs (10-13 KDa), em duas CAL sobrepostas (Fauquet *et al.*, 2005). A organização do genoma dos vírus pertencentes ao gênero *Orthobunyavirus* pode ser observada na Figura 2.

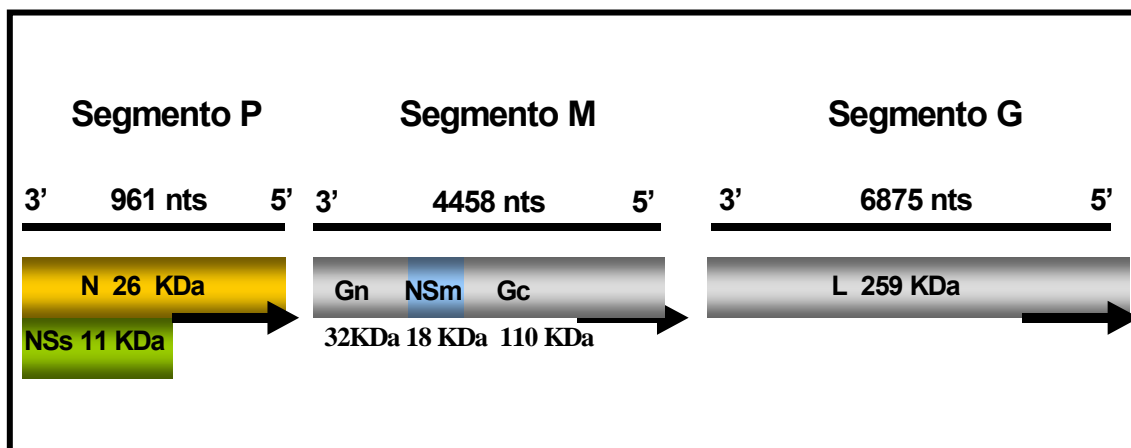


Figura 2 - Organização do genoma dos vírus do gênero *Orthobunyavirus*. Os segmentos de RNA são representados por linhas finas, sobre as quais se encontra o número de nucleotídeos (nts) de cada segmento. O sentido do RNAm é mostrado pelas setas. Os produtos dos genes, com seus tamanhos, em KDa, estão representados por retângulos.

Fonte: Adaptado de Fauquet *et al.* (2005).

1.3 SOROGRUPO CALIFÓRNIA

O protótipo do sorogrupo Califórnia é o *Virus California encephalitis* que foi obtido em Kern County, Califórnia, no ano de 1943. Desde então, outros vírus têm sido isolados, apresentando relação antigênica próxima com este vírus. Este grupo de vírus relacionados é atualmente classificado como sorogrupo Califórnia, um dos sorogrupos do gênero *Orthobunyavirus* da família *Bunyaviridae* (CDC, 1998). Este sorogrupo compreende treze vírus isolados de mosquitos ou vertebrados em várias partes do mundo (América do Norte, América do Sul e Europa), sendo que os vírus pertencentes a este sorogrupo são: *Virus Melao*, *Virus Jamestown Canyon*, *Virus Keystone*, *Virus La Crosse*,

Virus Lumbo, *Virus California encephalitis*, *Virus Inkoo*, *Virus San Angelo*, *Virus Serra do Navio*, *Virus Snowshoe hare*, *Virus South River*, *Virus Tahyna* e *Virus Trivittatus* (Fauquet *et al.*, 2005).

1.3.1. Relacionamento antigênico dos vírus do sorogrupo Califórnia

As características moleculares de genomas e proteínas dos orthobunyavírus têm sido usadas para definir o gênero *Orthobunyavirus*, considerando que dados antigênicos servem para agrupar e separar vírus dentro do gênero (Bishop *et al.*, 1980; Porterfield *et al.*, 1975).

Os vírus do sorogrupo Califórnia foram classificados dentro de complexo, tipo, subtipo e variedade com base nos resultados de testes sorológicos tais como FC, TN e IH (Bishop, 1985). De acordo com esses métodos, o sorogrupo Califórnia foi subdividido em quatro complexos: Melao, California encephalitis, Trivittatus e Guaroa (Bishop, 1985; Calisher & Karabatsos, 1988).

Por outro lado, análises comparativas dos segmentos genômicos P-RNA e M-RNA dos vírus do sorogrupo Califórnia mostraram a formação de três complexos, sendo estes: complexo Melao, complexo California encephalitis e complexo Trivittatus (Bowen *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1996; Campbell & Huang, 1999). Então, com base no estudo do segmento genômico M-RNA, que também inclui todos os vírus do sorogrupo Califórnia, o complexo Melao compreende o *Virus Jamestown Canyon*, *Virus Inkoo*, *Virus South River*, *Virus Melao*, *Virus Serra do Navio* e *Virus Keystone*. No que tange ao complexo California encephalitis, este é formado pelos seguintes vírus: *Virus Lumbo*,

Virus Tahyna, *Virus San Angelo*, *Virus California encephalitis*, *Virus La Crosse* e *Virus Snowshoe hare*. Com relação ao complexo Trivittatus, este é composto pelo vírus do mesmo nome, *Virus Trivittatus* (Campbell & Huang, 1999).

Segundo estudos sorológicos por Bishop (1985); Calisher & Karabatsos (1988) o *Virus Guaroa* está incluído no sorogrupo Califórnia, compondo o complexo Guaroa, entretanto, este vírus não foi incluído nos trabalhos mencionados com os segmentos P e M-RNA dos vírus desse sorogrupo, possivelmente pela classificação problemática desse vírus, que por testes de PRNT e IH, os quais reconhecem epítomos das glicoproteínas do envelope (M-RNA), este se inclui no sorogrupo Califórnia, enquanto que, por testes de FC, que reconhecem epítomos da proteína N (P-RNA), este vírus se inclui no sorogrupo Bunyamwera (Whitman & Shope, 1962). Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia Viral, o *Virus Guaroa* se encontra em um complexo a parte, fora tanto do sorogrupo Califórnia quanto do sorogrupo Bunyamwera, enquanto sua taxonomia viral ainda não é totalmente definida (Fauquet *et al.*, 2005).

1.3.2 Aspectos da ecoepidemiologia dos vírus do sorogrupo Califórnia

Os principais vetores dos vírus do sorogrupo Califórnia que infectam humanos são espécies de mosquitos do gênero *Aedes*, atualmente reclassificados no gênero *Ochlerotatus* (Reinert, 2000), e do gênero *Culiseta*. Na qualidade de hospedeiros vertebrados, estão incluídos os roedores como coelhos e esquilos, os animais domésticos e outros mamíferos (Gonzalez-Scarano & Nathanson, 1996).

O *Virus California encephalitis*, dois anos após o primeiro isolamento viral, foi incriminado em 1945, como agente responsável por três casos humanos de encefalite (Hammon *et al.*, 1952). Entre 1945-1996 nenhum outro caso de doença humana foi relatado (McJunkin *et al.*, 1998), sendo que o primeiro caso deste vírus como causador de encefalite humana, em mais de cinquenta anos, ocorreu em 1996, na Califórnia (Eldridge *et al.*, 2001).

Desde o primeiro relato de isolamento do *Virus California encephalitis*, o número de vírus do sorogrupo tem aumentado gradualmente, sendo reconhecido que diversos outros vírus deste sorogrupo infectam humanos (Calisher, 1983), como é o caso do *Virus Jamestown Canyon*, *Virus La Crosse* e *Virus Tahyna* (CDC, 1998).

A encefalite humana devido à infecção viral por membros do sorogrupo Califórnia é, principalmente, causada pelo *Virus La Crosse*. Nos Estados Unidos a notificação de casos teve início em 1963, com o reconhecimento deste vírus como importante agente etiológico de encefalite causada por arbovírus, e que acomete principalmente crianças e trabalhadores de silvicultura (Kappus *et al.*, 1983; White & Fenner, 1994).

Além do *Virus La Crosse*, o *Virus Jamestown Canyon* também tem sido reconhecido como patógeno humano, principalmente em países da América do Norte, onde infecções são freqüentes incluindo casos de encefalite (Deibel *et al.*, 1983). Este vírus também tem sido relatado como responsável por causar infecção em cavalos na Califórnia (Nelson *et al.*, 2004).

Além desses, o *Virus Snowshoe hare* também tem sido descrito como responsável por encefalite em humanos (Artsob, 1983). Na Europa, o

Virus Tahyna e *Virus Inkoo* têm sido incriminados, respectivamente, como agentes responsáveis por doença semelhante à gripe (*Influenza-like disease*) e doença febril humana (LeDuc, 1987).

1.3.3 Infecção em cultura de células e infecção experimental em hospedeiros vertebrados com vírus do sorogrupo Califórnia

Os vírus do sorogrupo Califórnia causam infecção em muitas linhagens celulares de vertebrados (Bishop, 1979; Danielova, 1975). Eles podem se multiplicar e formar placas em células renais de hamster recém-nascido (BHK-21) e em células provenientes de rim de macaco verde africano, da espécie *Cercopithecus aethiops* (VERO) (Murphy *et al.*, 1968). Estes vírus também se replicam em linhagens celulares de mosquitos, nas quais eles produzem uma infecção persistente não-lítica (Lyons & Heyduk, 1973).

Com relação à infecção experimental em hospedeiros vertebrados, o modelo mais preciso de patogênese do sorogrupo Califórnia parece ser os camundongos, que vêm sendo usados como protótipo experimental (Johnson & Johnson, 1968; Janssen *et al.*, 1984). As principais variáveis que influenciam o curso da infecção são a idade do hospedeiro, a virulência, a dose inoculada de vírus e a rota de inoculação. Se o termo suscetibilidade a um determinado agente viral é definido como resultado letal pós-inoculação do vírus, camundongos lactentes são altamente suscetíveis a pequenas doses administradas por qualquer via, enquanto que para camundongos adultos são necessárias doses moderadas, injetadas intracerebralmente, para que haja um

efeito letal, mas sobrevivem quando administradas grandes doses por via subcutânea ou intraperitoneal (Gonzalez-Scarano & Nathanson, 1996).

O curso da infecção em camundongos recém-nascidos infectados experimentalmente, infectados pela via subcutânea, que simula infecção natural, envolve uma fase inicial extraneural e uma fase secundária de replicação no Sistema Nervoso Central (SNC). Durante a fase extraneural, o principal lugar de replicação são os músculos esqueléticos e músculos cardíacos. Uma viremia ativa carrega o vírus para o SNC. Uma vez dentro do SNC, o vírus se replica nos neurônios e em células gliais, causando necrose de elementos celulares (Janssen *et al.*, 1984).

As principais lesões causadas pelos vírus do sorogrupo Califórnia se encontram no SNC. Em camundongos lactentes, o achado dominante é a necrose neuronal, enquanto que em camundongos adultos, são também vistas alterações inflamatórias, incluindo aglomerados de alteração perivascular, nódulos gliais, e leptomeningite. A necrose é mais severa no hipocampo e no gânglio basal. Outros achados correspondem à degeneração neuronal e edema perineuronal (Gonzalez-Scarano & Nathanson, 1996).

1.4 *Virus Melao* (VMEL)

O VMEL pertence à família *Bunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus*, sorogrupo Califórnia (Karabatsos, 1985). Foi isolado pela primeira vez no *Trinidad Regional Virus Laboratory* (TRVL) em Port-of-Spain, Trinidad (Figura 3), tendo o protótipo o registro, TRVL 9375. O vírus foi obtido a partir de um lote de 371 mosquitos fêmeas, em idade adulta, da espécie *Ochlerotatus*

(*Ochlerotatus*) *scapularis*, tendo sido capturados na Floresta de Melajo, em St. Andrew Count, Trinidad, no ano de 1955 (Spence *et al.*, 1962).



Figura 3 - Mapa mostrando a localização de Port-of-Spain, Trinidad, local onde o VMEL (TRVL 9375) foi isolado pela primeira vez.

Fonte: [http:// www.lib.utexas.edu/maps/americas/latin_america.gif](http://www.lib.utexas.edu/maps/americas/latin_america.gif)

Em 1957, uma cepa do VMEL foi isolada na região Amazônica brasileira, a partir de um lote misto de mosquitos da espécie *Ochlerotatus scapularis* e dos gêneros *Psorophora* sp., *Sabethes* sp., e *Ochlerotatus* sp., capturados na Floresta do Instituto Agrônomo do Norte (IAN), Belém, Brasil. O isolamento deste vírus foi realizado pelo antigo Departamento de Arbovírus do Instituto Evandro Chagas (IEC), Belém-PA, hoje, Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, tendo o registro BE AR 8033 (Karabatsos, 1985).

1.4.1 Evidências de infecção por cepas do VMEL

Hamsters dourados foram testados quanto a sua suscetibilidade à cepa do VMEL BE AR 8033, e houve evidências de infecção, a partir da detecção de anticorpos nesses animais (Karabatsos, 1985).

Em estudos realizados nas províncias de Santa Fé e Santiago del Estero, Argentina, durante um episódio de encefalite eqüina oeste, foi demonstrado alta prevalência de anticorpos neutralizantes para o VMEL em soro de cavalos (Calisher *et al.*, 1987).

1.5 CEPA VIRAL BE AR 633512

A cepa viral BE AR 633512, cedida pelo Instituto Evandro Chagas, foi isolada pela Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, a partir de um lote de mosquitos da espécie *Ochlerotatus scapularis*, capturados em Alta Floresta do Oeste, estado de Rondônia (Figura 4), no ano de 2000.

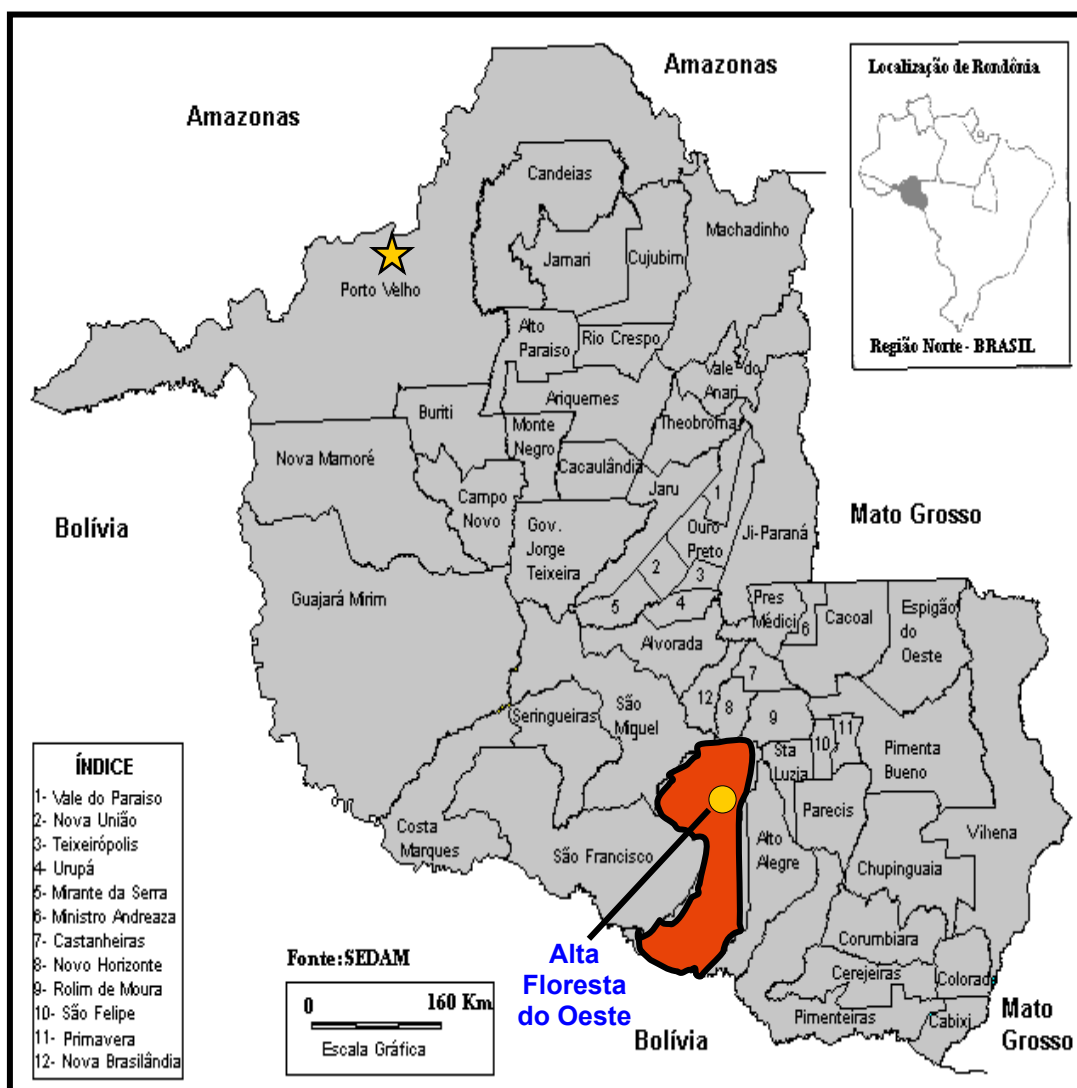


Figura 4 - Mapa do Estado de Rondônia, mostrando a localização do município de Alta Floresta do Oeste.

Fonte: http://www.ronet.com.br/marrococ/link_html/ro-mapa.html

Informações relevantes sobre a taxonomia da cepa viral BE AR 633512 foram obtidas com a realização da caracterização biológica, físico-química e sorológica desta cepa viral. Neste estudo de caracterização realizado por Silva (2003), foi verificada a sensibilidade de culturas celulares de invertebrado (células de *Aedes albopictus*, clone C6/36) e de cultura de células

de vertebrado (células VERO) frente a esta cepa viral. Foi realizada também, a pesquisa de antígeno hemaglutinante, testes de imunofluorescência indireta, FC, teste de sensibilidade ao desoxicolato ácido de sódio, além de estudos de microscopia eletrônica.

De acordo com Silva (2003), quanto a sensibilidade das culturas celulares, a cepa viral BE AR 633512 não causou efeito citopático (ECP), visível à microscopia óptica, em células C6/36. Entretanto, em células VERO, esta cepa causou ECP com aproximadamente dois dpi. Os testes de FC, em que esta cepa viral foi testada contra os soros dos grupos antigênicos de arbovírus de ocorrência no Brasil, revelaram que além de reagir com o seu próprio soro homólogo, ela reagiu com o soro da cepa do VMEL, BE AR 8033; e da mesma forma, a cepa BE AR 8033 reagiu com o soro da cepa viral BE AR 633512.

Com os dados obtidos no estudo relatado acima, o autor concluiu; que a cepa viral BE AR 633512 apresenta relação antigênica com a cepa do VMEL BE AR 8033, portanto, pertence ao sorogrupo Califórnia, gênero *Orthobunyavirus*, família *Bunyaviridae*.

Estudos adicionais como os de biologia molecular associados aos de histopatologia, além dos imunológicos e bioquímicos tornaram-se necessários, com o intuito de fornecer novas informações sobre as cepas do VMEL isoladas na Região Amazônica Brasileira, BE AR 633512 e BE AR 8033.

1.6 *Ochlerotatus (Ochlerotatus) scapularis*

O *Ochlerotatus scapularis* (Reinert, 2000), anteriormente denominado *Aedes scapularis*, é uma importante espécie com considerável potencial de transmissão de arbovírus, pois é comumente encontrada em uma variedade de lugares freqüentados por humanos. Esta espécie é rara em florestas primitivas (Forattini *et al.*, 1986). Habitats modificados, como florestas residuais, parecem favorecer a predominância deste mosquito (Forattini *et al.*, 1978). Tem a habilidade de, nas proximidades do ambiente primitivo, se dispersar em busca de alimento, assim como de permanecer no ambiente domiciliar (Forattini *et al.*, 1990).

É um mosquito de distribuição geográfica essencialmente neotropical. A América do Sul Oriental é a região onde este artrópode é realmente abundante, podendo ser encontrado desde o Norte da Argentina até a Colômbia e em Trinidad e Tobago. Nas demais Américas, ocorre da Costa Rica ao México, bem como nas grandes Antilhas, Bahamas e Sul dos Estados Unidos (Texas) (Arnell, 1976).

A cepa viral BE AR 633512 e o VMEL protótipo (TRVL 9375) foram isolados a partir de lotes de mosquitos da espécie *Ochlerotatus scapularis* (Figura 5); assim também, a cepa do VMEL BE AR 8033 foi obtida a partir de lote misto de mosquitos desta espécie, além de outros dos gêneros *Psorophora* sp. e *Sabethes* sp. Isolamentos de outros arbovírus também já foram obtidos a partir desta espécie de mosquitos, podendo ser citados o *Virus Caraparu*, *Virus Ilhéus*, *Virus Kairi*, *Virus Lukuni*, *Virus Maguari*, *Virus Mayaro*, *Virus St. Louis*,

Virus Encefalomyelite Equina Venezuelana e Virus Wyeomyia (Vasconcelos et al., 1998).



Figura 5 - Mosquito da espécie *Ochlerotatus scapularis*

Fonte: Seção de Arbovirologia e Febres hemorrágicas (IEC).

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo geral

Caracterizar molecularmente as cepas virais BE AR 633512 e BE AR 8033 do VMEL (*Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus*) e realizar estudos histopatológicos, bioquímicos e imunológicos em hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) infectados experimentalmente com esta cepa.

1.7.2 Objetivos específicos

- Realizar exames laboratoriais para verificação das funções hepáticas (Aminotransferase aspartato sérica [AST] e Aminotransferase alanina sérica [ALT]) e renais (uréia e creatinina) dos hamsters infectados com as cepas do VMEL, BE AR 633512 e BE AR 8033 e analisar estatisticamente os dados obtidos nesses exames;
- Realizar estudos histopatológicos e imunohistoquímicos de órgãos (pulmão, rim, fígado, baço, coração e SNC) de hamsters infectados com as cepas do VMEL BE AR 633512 e BE AR 8033, para uma análise comparativa;
- Determinar os níveis de viremia nos hamsters infectados com estas cepas do VMEL;
- Determinar o título de anticorpos neutralizantes nos soros de hamsters infectados com as mesmas cepas;
- Amplificar e seqüenciar os genes N, Gn e Gc destas cepas do VMEL;

- Analisar as seqüências quanto à homologia no que se refere aos nucleotídeos e aminoácidos entre as cepas do VMEL, BE AR 633512 e BE AR 8033;
- Construir árvores filogenéticas para os genes N, Gn e Gc;
- Correlacionar os achados teciduais (patologia e imunohistoquímica) das cepas do VMEL, BE AR 633512 e BE AR 8033, aos achados genéticos obtidos para os genes N, Gn e Gc.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Cepas virais

As cepas virais analisadas no presente trabalho estão listadas no Quadro 2, abaixo:

Quadro 2 – Cepas estudadas evidenciando o hospedeiro, ano e local de isolamento das mesmas.

Cepa viral	Hospedeiro	Ano	Local
BE AR 633512	<i>Ochlerotatus scapularis</i>	2000	Alta Floresta do Oeste- RO
BE AR 8033	Lote misto de mosquitos dos gêneros <i>Ochlerotatus</i> , <i>Psorophora</i> sp., <i>Sabethes</i> sp.	1957	*IAN- Belém- PA

Legenda: *IAN- Instituto Agrônômico do Norte, hoje EMBRAPA.

2.1.2 Animais

Foram utilizados neste estudo 104 hamsters dourados jovens e 252 camundongos albinos suíços (*Mus musculus*), sendo todos os animais cedidos pelo IEC. Após os procedimentos 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 estes animais foram incinerados.

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPAN-IEC) seguindo todas as orientações estabelecidas por este Comitê (Anexo 1).

2.2 MÉTODOS

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

2.2.1 Infecção Experimental

Com relação à etapa da infecção experimental, as cepas virais BE AR 633512 (2ª passagem) e BE AR 8033 (4ª passagem) foram utilizadas nas seguintes etapas: i) Preparação de estoque e titulação viral em camundongos, ii) Infecção experimental nos hamsters, iii) Viremia, iv) Preparação do soro hiperimune, v) Teste de neutralização, vi) Estudo histopatológico, vii) Detecção de antígeno viral pela técnica de imunohistoquímica, viii) Exames laboratoriais para verificação das funções hepáticas e renais, ix) Análise estatística.

2.2.1.1 Preparação de estoque e titulação viral em camundongos

A partir de uma ampola contendo o vírus liofilizado, foi preparada uma suspensão a 10 % em tampão salina fosfato (PBS), contendo albumina bovina a 0,75 % e antibióticos, a qual foi inoculada, no volume de 0,02 mL, por via intracerebral (ic.) em camundongos albinos suíços recém-nascidos (dois a três dias de idade), para a obtenção do estoque viral. Estes animais foram observados diariamente, sendo colhidos quando apresentaram sinais de doença e conservados a - 70 ° C até o momento do uso. A titulação do vírus foi realizada partindo-se de uma suspensão de cérebro de camundongo estoque infectado com os isolados do vírus em estudo, nas diluições de 10^{-1} a 10^{-8} . Cada diluição, no volume de 0,02 mL, foi inoculada por via ic. em camundongos albinos suíços recém-nascidos (2-3 dias de idade). As informações com relação a: doença, morte e coleta foram anotadas em um cartão de inoculação. O título viral foi calculado usando o método de Reed & Muench (1938) e expresso como $DL_{50}/0,02$ mL, ou seja, a dose capaz de matar 50% dos animais infectados.

2.2.1.2 Infecção experimental nos hamsters

Hamsters (*Mesocricetus auratus*), com até 4 semanas de idade foram infectados por via intraperitoneal (ip.) com 0,2 mL de suspensão viral a 10 % contendo $10^{-6,7}$ $DL_{50}/0,02$ mL da cepa BE AR 633512 ou $10^{-6,5}$ $DL_{50}/0,02$ mL da cepa BE AR 8033, preparada a partir de cérebro de camundongo estoque diluído em PBS, como citado no item anterior. Para os estudos

imunológicos (detecção de anticorpos) a suspensão foi preparada em solução de NaCl 0,85 %.

Nesta etapa da metodologia os hamsters foram submetidos à coleta de pulmão, coração, cérebro, rim, baço e fígado, os quais foram utilizados nas análises histopatológicas e imunohistoquímicas. Também foi coletado o sangue destes animais para as análises bioquímicas (verificação das funções hepática e renal) e imunológicas (detecção de anticorpos).

Para a infecção experimental foi utilizado um total de 104 hamsters, sendo 48 destes usados para análises histopatológicas e imunohistoquímicas, verificação das funções hepática e renal e viremia das duas cepas do VMEL, sendo 24 destes animais usados para a cepa BE AR 633512, e 24 para a cepa BE AR 8033, os quais foram infectados com suspensão diluída em PBS, conforme item 2.2.1.1. A coleta dos tecidos foi realizada a cada 24 horas pós-inoculação, sendo três animais anestesiados através de inalação por éter etílico P.A. (Massone, 2003) sendo feita a coleta de sangue e posteriormente foram sacrificados sendo obtido os órgãos. Esse procedimento foi feito do 1º até o 7º dpi. e também com 21 dpi. Dois desses animais foram infectados com suspensão viral e um animal não-infectado foi utilizado como controle, diariamente.

O restante dos hamsters, o equivalente a 56 animais, foi utilizado para estudos sobre a dinâmica da detecção de anticorpos contra as cepas do VMEL, sendo 28 hamsters usados para a cepa viral BE AR 633512, e 28 para a cepa BE AR 8033. Estes animais foram infectados com suspensão viral preparada com diluente NaCl 0,85%, que é o diluente de escolha para a

produção de anticorpos, tendo em vista não apresentar a proteína albumina, que pode interferir na realização dos testes com esta finalidade. Para estas análises, os animais foram submetidos à coleta de sangue do 1º ao 10º dia, bem como com 15, 20, 25 e 30 dpi.

Com relação ao procedimento anestésico, este foi realizado da seguinte maneira: por vez, cada animal foi inserido em um recipiente fechado contendo o anestésico citado, e mantido neste local por aproximadamente 40 segundos. Após a anestesia o animal foi levado para dentro de uma cabine com fluxo laminar, classe II B2, onde foi coletado o sangue do mesmo, por punção intracardíaca. Depois disso, os animais foram inseridos novamente no recipiente fechado contendo éter etílico, e mantidos até que os mesmos chegassem a óbito, sendo então submetido à dissecação para retirada dos órgãos.

Após estes procedimentos, o animal foi submetido aos cuidados descritos acima, no item 2.1.2., até o seu transporte e incineração.

2.2.1.3 Viremia

A partir das amostras de sangue coletadas dos hamsters, foram preparadas diluições (10^{-1} a 10^{-8}) em PBS contendo albumina bovina a 0,75 % e antibióticos, as quais foram inoculadas no volume de 0,02 mL por via ic 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 $DL_{50}/0,02$ mL.

2.2.1.4 Preparação do soro hiperimune

Foi realizada em camundongos albinos suíços jovens. O esquema de imunização consistiu de quatro injeções via ip., as quais foram inoculadas em intervalos de sete dias, na quantidade de 0,2 mL por camundongo. Os antígenos imunizantes foram preparados de acordo com Casals (1967), a partir de cérebros de camundongos infectados, em suspensão a 1:5 em NaCl a 0,85%. A sangria dos animais foi feita, sob anestesia, após intervalo mínimo de sete dias após a última injeção, por punção intracardíaca, e o sangue colhido, aproximadamente 3 mL de cada animal, foi centrifugado a 3.000 rotações por minuto (rpm) durante dez minutos, tendo sido então, o soro separado e conservado a temperatura de - 20 °C (Figura 6).

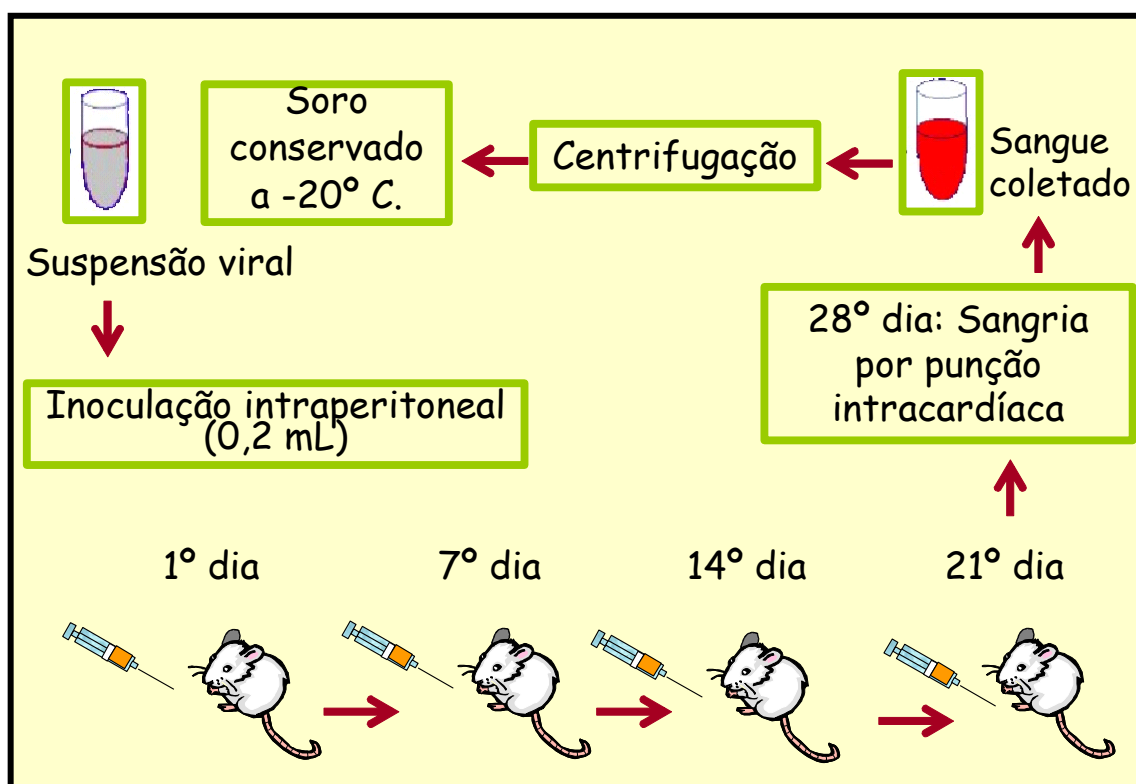


Figura 6 - Representação esquemática para obtenção do soro hiperimune.

2.2.1.5 Teste de neutralização

Este teste foi usado para a detecção de anticorpos neutralizantes nos soros dos hamsters infectados com as cepas virais BE AR 633512 e BE AR 8033, sendo empregada a técnica de diluição constante do soro (diluição final 1:8) com variação de dez vezes para cada diluição do vírus (Casals, 1967).

A partir de cérebros de camundongos infectados foi preparada uma suspensão 1:5 em solução de NaCl a 0,85 %, que foi centrifugada a 8.000 rpm durante dez minutos. Foi feita a diluição dos soros colhidos dos hamsters usando 25 µL do soro mais 75 µL de diluente (PBS, conforme item 2.2.1.1). A partir da suspensão 1:5 do vírus foram preparadas diluições seriadas (dez vezes), sendo misturadas 100 µL das respectivas diluições do vírus aos soros. A titulação do vírus foi feita em duplicata. As misturas foram agitadas e incubadas a 37 °C durante uma hora. Após isto, foram infectados 20 µL de cada mistura por via ic em seis camundongos, de dois a três dias de idade (Figura 7).

Foram considerados positivos os soros com um índice logarítmico de neutralização (ILN) $\geq 1,8$ calculado pelo método de Reed & Muench (1938).

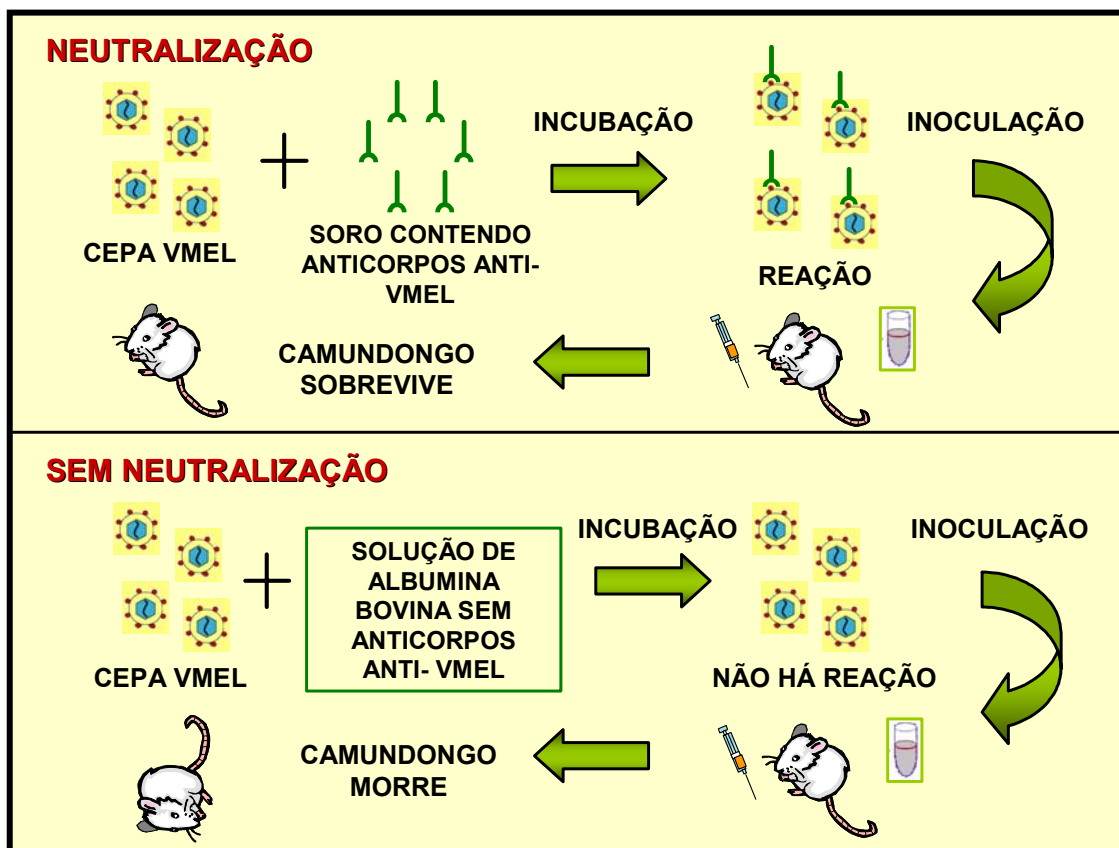


Figura 7 - Representação esquemática do teste de neutralização.

2.2.1.6 Análises histopatológicas

Após coleta dos órgãos, os mesmos foram fixados em formalina tamponada a 10 %. Posteriormente, foram feitas passagens dos órgãos em soluções crescentes de álcool, iniciando-se com o álcool a 70 % até o etanol absoluto (100 %). Foram realizadas também, duas passagens em xilol e três banhos consecutivos de parafina em estufa à temperatura de 60 ° C. Após, seguiu-se à etapa de inclusão e formação de blocos de parafina, sendo estas matrizes teciduais submetidas à microtomia obtendo-se cortes de 4 µm, que foram posteriormente corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) e

examinados em microscópio óptico Nikon Eclipse E200 (Prophet *et al.*, 1992; Michalany, 1998).

2.2.1.7. Detecção de antígeno viral pela técnica de imunohistoquímica

Os cortes histológicos de 4 µm de espessura obtidos a partir das matrizes embebidas em parafina foram colhidos em lâminas previamente preparadas com solução adesiva de 3 amino-propyltriethoxy-silane (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA). A seguir, as lâminas foram desparafinadas em dois banhos de xilol a 56 °C durante 30 minutos e à temperatura ambiente (TA) durante vinte minutos, tendo sido posteriormente 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 monoclonais 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 a espécie animal do anticorpo primário, marcado com biotina, por 30 minutos a 37 °C e em seguida foi

incubado 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. A montagem das lâminas foi feita com resina Permount (Fisher Scientific Co., Fair Lawn, EUA) (Hsu *et al.*, 1981).

2.2.1.8 Exames para verificação das funções hepática e renal

Para a verificação da função hepática foram realizadas dosagens de AST e ALT, enquanto que para avaliar a função renal foram dosadas a uréia e a creatinina no soro dos hamsters infectados com as cepas do VMEL em estudo, sendo as dosagens realizadas no auto-analisador de bioquímica clínica Cobas Mira Plus, utilizando o *Kit* da Roche diagnóstico, seguindo as instruções do fabricante.

2.2.1.9 Análise estatística

Para a Inferência Estatística, a comparação entre os valores das variáveis, grupo infectado e grupo controle, foi analisada no programa BioEstat 4.0 (Ayres *et al.*, 2005), para verificar o grau de significância estatística das

diferenças entre as médias, sendo para isto aplicado o teste *t* de *Student* para amostras independentes com nível de significância α de 5% ($p < 0,05$).

2.2.2 Caracterização Molecular

A caracterização molecular das cepas virais BE AR 633512 e BE AR 8033 foi realizada seguindo as etapas de: i) propagação viral em cultura de células VERO; ii) extração do ácido nucléico (RNA); iii) amplificação do RNA viral pela técnica de RT-PCR; iv) análise dos produtos amplificados pela RT-PCR (DNA complementar; cDNA); v) purificação do cDNA; vi) seqüenciamento nucleotídico; vii) análise filogenética.

2.2.2.1 Propagação viral em cultura de células VERO

Para o isolamento viral foram utilizadas culturas de células VERO, que foram transferidas para garrafas plásticas de 75 cm², sendo posteriormente colocadas em estufa (NAPCO, EUA) à temperatura de 37 °C com atmosfera contendo 5 % de CO₂. O meio de crescimento utilizado para as células VERO, foi o meio 199 suplementado com 2 % de L-glutamina 200 mM, 1 % de HEPES, 10 % de soro bovino fetal (SBF), penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 ug/mL) e 1,5 g/L de bicarbonato de sódio. Antes das células serem infectadas, o meio de crescimento foi trocado pelo meio 199 de manutenção, o qual é semelhante ao de crescimento, exceto na concentração de SBF, que diminui para 2 % (Lennette, 1995). Após a inoculação da suspensão viral, as células foram mantidas como descrito acima, sendo observadas diariamente em microscópio óptico invertido (Olympus modelo CK-2) na tentativa de se

visualizar presença de ECP. Quando a célula apresentou aproximadamente 75 % de ECP, os fluidos celulares contendo partículas virais foram coletados em tubos estéreis e usados para extração do RNA viral. Estes procedimentos foram realizados em cabine de biossegurança classe II B2.

2.2.2.2 Extração do RNA viral

A técnica do TRIZOL LS reagente ® (Invitrogen, Carlsbad, EUA) foi utilizada para obtenção do RNA viral a partir dos fluidos de células VERO infectadas. Em microtubo estéril de 1,5 mL foram misturados 750 µL de TRIZOL LS e 250 µL do fluido de células VERO infectadas. Com a finalidade de lisar as partículas virais em suspensão, o microtubo foi incubado durante cinco minutos à temperatura ambiente (TA). Em seguida 200 µL de clorofórmio foram adicionados ao microtubo, o qual foi incubado por dez minutos a TA, sendo então centrifugado a 12.000 rpm a 8 °C por quinze minutos. Posteriormente, a fase contendo o RNA (fase aquosa) foi removida cuidadosamente e transferida para outro microtubo (estéril). As etapas subseqüentes consistiram na adição de 500 µL de isopropanol absoluto (100 %) para precipitação do RNA, seguida de incubação por dez minutos a TA, e centrifugação a 12.000 rpm por dez minutos a 8 °C, tendo sido realizada em seguida, a retirada cuidadosa do isopropanol. Posteriormente, para remoção do isopropanol foram adicionados 1000 µL de etanol a 75 % no microtubo, sendo centrifugado a 7.500 rpm por cinco minutos a 8 °C para precipitação do RNA viral. Finalmente, o etanol foi desprezado e após total evaporação dos resíduos de etanol, presente no tubo contendo o RNA viral, foram adicionados

20 μ L de água livre de inibidor de RNA para hidratação da amostra. O RNA extraído foi imediatamente utilizado para amplificação do genoma viral ou quando necessário foi armazenado a - 70 °C para uso futuro (Figura 8).

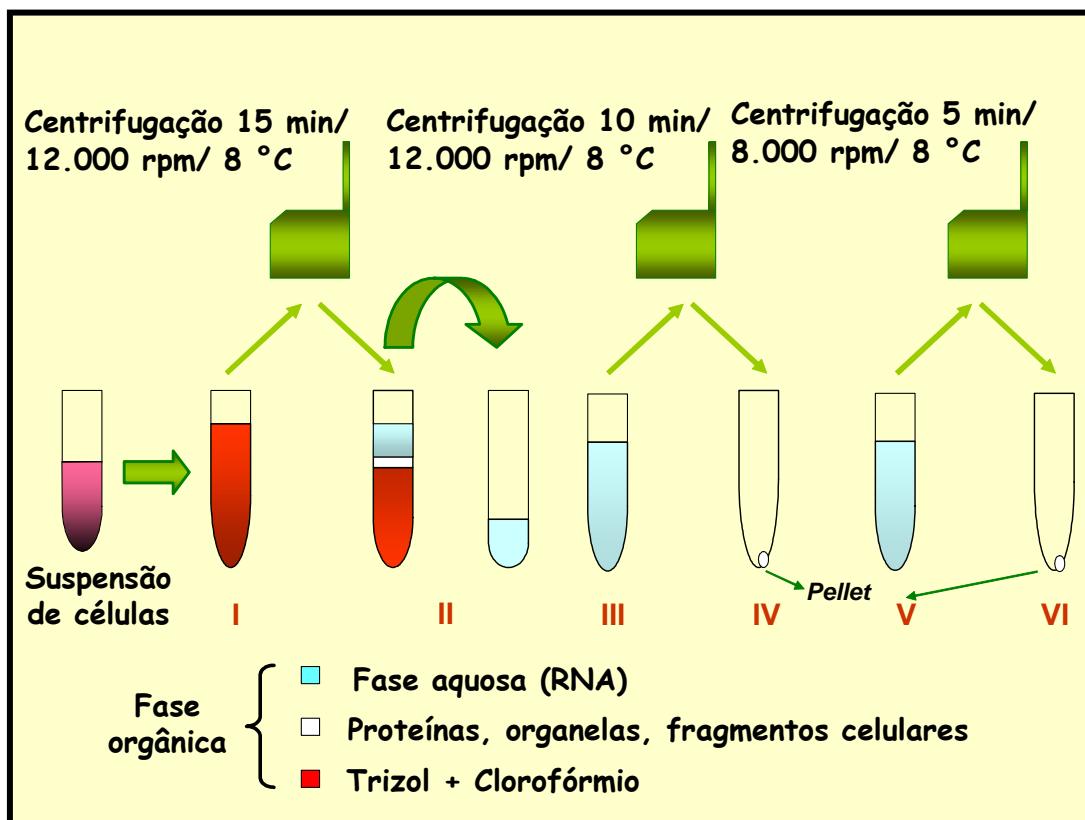


Figura 8 - Representação esquemática da técnica de extração de RNA pelo método do TRIZOL LS ®. Etapas: I - Adição de Trizol LS + Clorofórmio; II - Remoção da fase aquosa, sendo o RNA transferido para outro microtubo; III - Adição de isopropanol absoluto; IV - Remoção do isopropanol; V - Adição de etanol à 75%; VI - Remoção do etanol e reconstituição do *pellet*.

Fonte: Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, IEC.

2.2.2.3 Amplificação dos genes N, Gn e Gc pela técnica de Transcrição Reversa – Reação em Cadeia mediada pela Polimerase (RT-PCR)

A técnica de RT-PCR em um único tubo (Dunn *et al.*, 1994) foi empregada para obtenção dos cDNA correspondentes aos genes N (P-RNA), Gn e Gc (M-RNA), usando iniciadores específicos (Quadro 3) (Figura 9). As reações de RT-PCR foram realizadas para um volume final de 50 µL contendo 10 µM de RNA viral, 10 µM dos iniciadores senso e complementar, 1x tampão do PCR (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3; KCL 75 mM), MgCl₂ 2,5 mM, DTT 2,5 mM, 20 uL de inibidor de ribonuclease (RNase inhibitor; Invitrogen), mistura de DNTP 200 µM (Invitrogen), 1,125 U de DNA polimerase (*Platinum Taq DNA polymerase*, Invitrogen) e 1 U da enzima transcritase reversa (*Superscript II Reverse Transcriptase*; Invitrogen). A RT foi processada inicialmente durante 60 minutos a 42 °C, seguidas por 35 ciclos de PCR, cada um composto por etapas de desnaturação a 94 °C por 40 segundos, hibridização dos iniciadores a 55 °C por 40 segundos, e síntese a 72 °C por um minuto.

Quadro 3 - Iniciadores que serão usados para amplificação dos genes N, Gn e Gc durante a RT-PCR.

Iniciador	Sequência (5'-3')	Produto (nt)	Segmento genômico	Gene
N 36 S N 754 R	ACATTGTGATGGGAGATTTG CGAATTCATTAGAGGACCATC	718	P-ARN	N
Gn 49 S Gn 553 R	GACAGATTAAGGATGATTGC TGGAATTGTATGGACTTTGG	504	M-ARN	Gn
Gn 427 S Gn 861 R	AGGCTACAAACAGACAGCAC ATCTAGCACCCACACACAAA	434	M-ARN	Gn
Gn 616 S Gn 1160 R	AGAACAATATTGCCAGGTTC AGTATTACTAAGCCCCAGGTT	544	M-ARN	Gn
Gc 1401 S Gc 2154 R	AGCAAAGTGGATTTCGAAATA CAGAGATCTCGCTCAATGAT	753	M-ARN	Gc
Gc 1914 S Gc 2623 R	GGGACTTTGCAAGTCAAAT GCAGGTTCCCTGTGTCTTTTA	709	M-RNA	Gc
Gc 2542 S Gc 3196 R	GGCTGGAGAAATTGATGATA CTCCCAGTGCATTTTTCA	654	M-ARN	Gc
Gc 2773 S Gc 3504 R	AGGCATATAAGAACCTGCAA CATGGTTTTTGACAGCAATA	731	M-ARN	Gc
Gc 3508 S Gc 4354 R	GCTGTCAAAAACCATGAAAT TCCTTTTGTATGCATCTTC	846	M-ARN	Gc

Legenda: nt: nucleotídeo; S: senso; R: reverso.

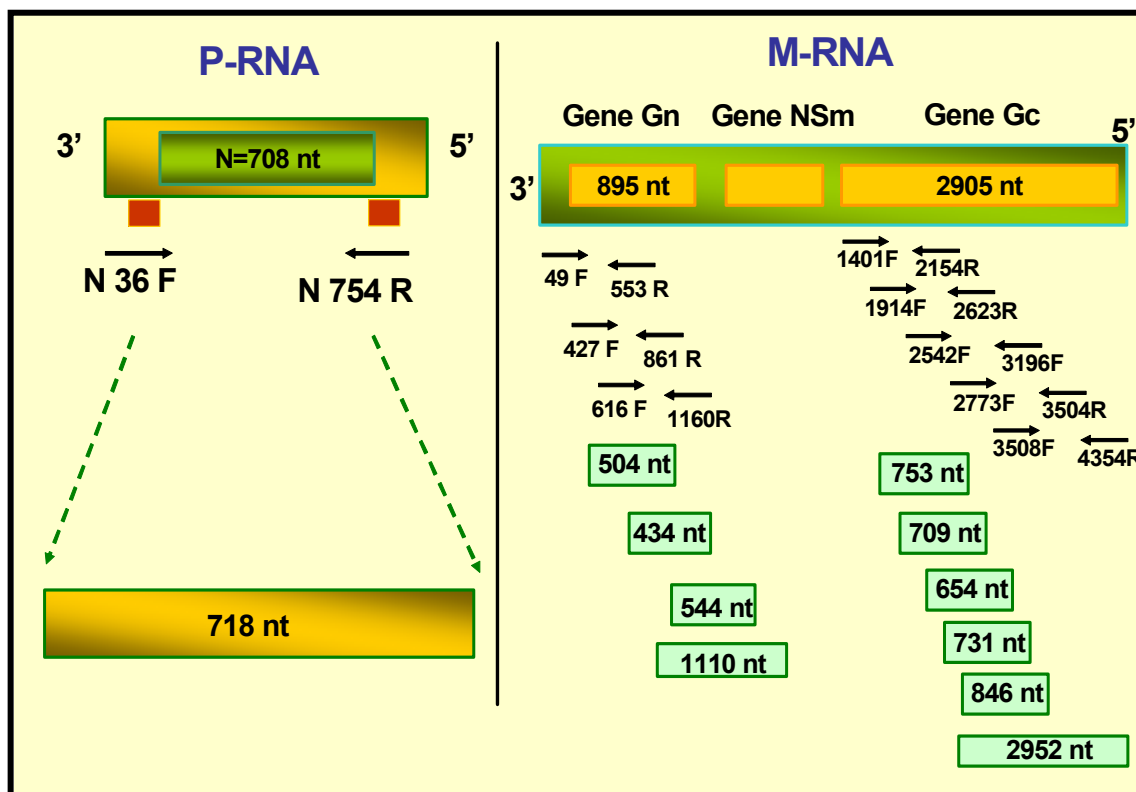


Figura 9 – Representação esquemática dos iniciadores específicos para o VMEL utilizados para a amplificação dos genes N, Gn e Gc pela técnica de RT-PCR.

2.2.2.4 Análise dos produtos da RT-PCR

A análise dos produtos da RT-PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,2 % corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), utilizando aparato de eletroforese convencional e visualizados em transiluminador com emissão de raios ultravioleta (UV). Esta técnica fundamenta-se na propriedade de migração de moléculas de DNA mediante a aplicação de uma diferença de potencial elétrico entre dois pontos. A observação dos produtos amplificados ocorre devido à capacidade do brometo

de etídio se incorporar as moléculas de DNA fragmentadas, bem como pela sua capacidade de liberar fluorescência ao ser excitado por raios ultravioletas. O gel para análise foi preparado pela adição de 0,6 g de agarose (Gibco-BRL, Grand Island, EUA) a 50 mL de tampão TAE 1X (Tris 10 mM; Acetato 0,1 M; EDTA 1 mM pH 7,2).

Após completa dissolução do gel pelo aquecimento em microondas durante aproximadamente dois minutos a uma temperatura de 50° C seguida de resfriamento à temperatura ambiente (20-25°C), o volume de 5 µg/mL de brometo de etídio (Invitrogen) foi adicionado ao gel, aguardando-se em seguida, a completa solidificação do gel em plataforma apropriada. Os produtos amplificados foram migrados durante 30 minutos a uma voltagem e amperagem médias de 80 V e 7 mA, respectivamente, juntamente com um controle negativo (amostra proveniente do fluido de células VERO não infectadas) e um marcador de peso molecular (123 bp DNA *ladder*, Invitrogen).

Para verificar possíveis contaminações durante a realização da técnica de RT-PCR, amostras contendo apenas água livre de inibidor de RNA e os respectivos componentes da mistura de RT-PCR foram também incluídos no gel.

2.2.2.5 Purificação do cDNA

A purificação dos produtos da RT-PCR (cDNA) foi realizada utilizando-se o *kit* comercial *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen, Hilden, EUA), na qual colunas de retenção à base de sílica foram usadas. As bandas específicas visualizadas no gel de agarose foram retiradas com auxílio de

estilete metálico, transferidas para tubos de 1,5 mL estéreis, previamente pesados, e foram pesados novamente após adição da banda. Posteriormente, foram adicionados três volumes de tampão de dissolução (QG) em relação ao peso da banda (ex: 3 μ L de tampão QG para cada 1mg de gel). Os tubos foram então misturados vigorosamente e incubados a 50 °C durante dez minutos ou até que a agarose estivesse completamente dissolvida.

Após a completa dissolução da agarose, as amostras foram transferidas para um tubo coletor contendo coluna de retenção com membrana de sílica, e em seguida centrifugadas à 13.000 rpm por um minuto. O filtrado foi descartado, sendo repetido o passo anterior caso necessário. O volume de 750 μ L de tampão de lavagem (PE) foi adicionado aos tubos, sendo estes em seguida centrifugados a 13.000 rpm por um minuto. O filtrado foi então descartado e a coluna foi centrifugada por um minuto para completa remoção do etanol do tampão PE. Posteriormente as colunas foram transferidas do interior do tubo coletor para um tubo de 1,5 mL estéril, e a cada uma das colunas foi adicionado o volume de 50 μ L de tampão de eluição (EB) (Tris-Cl 10 mM pH 8,5). Finalmente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por um minuto para recuperar o DNA retido na coluna.

2.2.2.6 Seqüenciamento nucleotídico

Os produtos da RT-PCR, previamente purificados, foram seqüenciados utilizando o *kit* ABI PRISM *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, Foster City, EUA), cujas reações foram processadas em seqüenciador automático, modelo ABI PRISM 377 (Applied

Biosystem). Foi adotado o método de terminação de cadeia por didesoxirribonucleotídeos marcados com substâncias fluorescentes (Sanger *et al.*, 1977). Estas substâncias quando em contato com raios laser, emitem fluorescência de diferentes comprimentos de ondas correspondentes a cada um dos nucleotídeos (A, C, T e G) que compõem basicamente a molécula de DNA localizados na extremidade 3'.

O seqüenciamento das amostras pelo método automático seguiu as seguintes etapas: i) Reação de seqüenciamento; ii) Precipitação do cDNA utilizando isopropanol e etanol; iii) Eletroforese em seqüenciador automático.

A reação de seqüenciamento foi composta pela mistura de 0,5 a 5 µL de cDNA viral amplificado, 4 µL de tampão de reação contendo os didesoxirribonucleotídeos fluorescentes ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP (*Terminator ready reaction mix*), 1 uL dos iniciadores específicos senso ou reverso (Quadro 3), água q.s.p. para o volume final de 10 µL, sendo processada em termociclador automático (GeneAmp PCR Systems 9700, *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 a 60 °C por quatro minutos.

Para a precipitação do cDNA foi utilizado isopropanol e etanol, sendo as amostras submetidas a etapas seqüenciais de: a) Adição de 40 µL de isopropanol a 75 % seguida de incubação a TA por 30 minutos; b) precipitação por centrifugação a 14.000 rpm durante 25 minutos a 8 °C; c) lavagem com 125 µL de etanol a 70%; d) centrifugação a 13.000 rpm por cinco minutos a 8 °C seguida de incubação a TA para completa evaporação do etanol; e)

reconstituição do DNA em 5 µL de solução de formamida deionizada pH 7,0 misturada com corante azul dextran EDTA 25 mM pH 8,0 na proporção 5:1, respectivamente.

Posteriormente foi realizada eletroforese em seqüenciador automático durante aproximadamente sete horas, quando então os fragmentos de DNA marcados foram 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 sequenciador.

2.2.2.7 Filogenia

As seqüências nucleotídicas obtidas para os genes N, Gn e Gc das cepas virais BE AR 633512 e BE AR 8033 foram inicialmente comparadas entre si e com as seqüências de outros orthobunyavírus pertencentes ao sorogrupo Califórnia disponíveis no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando o programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997; Altschul & Gish, 1996). A filogenia foi realizada mediante a construção de árvores filogenéticas empregando os métodos de agrupamento de vizinhos (*neighbor joining*, NJ) (Saitou & Nei, 1987), máxima parcimônia (MP) (Swofford, 1999) e máxima verossimilhança (MV) (Goldman *et al.*, 2000), implementados nos programas computacionais PAUP 4.0 (Swofford, 1999) e Mega 3.1 (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 estipulados para avaliação da razão transição/ transversão. O teste de *bootstrap* foi aplicado conjuntamente aos métodos de NJ, MP fixando 1000 réplicas para gerar maior confiabilidade aos valores dos grupamentos (Felsenstein, 1985). O enraizamento da árvore filogenética foi feito incluindo as seqüências homólogas (genes N, Gn e Gc) de outro orthobunyavírus, o *Virus Bunyamwera*, que funcionou como grupo externo proporcionando uma análise mais fidedigna do relacionamento genético dos vírus estudados. Para o método de MV foi utilizado o teste de Kishino-Hasegawa (Goldman *et al.*, 2000). Modelos evolucionários foram otimizados usando os segmentos genômicos, bem como suas respectivas topologias.

2.2.2.8. Estrutura secundária dos genes Gn e Gc.

A estrutura secundária das moléculas do M-RNA das cepas BE AR 633512 e BE AR 8033, e do protótipo TRVL 9375 foram obtidas utilizando o programa MFOLD (http://mfold.burnet.edu.au/dna_form) utilizando as seqüências nucleotídicas completas dos genes Gn (897nt) e Gc (2907 nt).

3 RESULTADOS

3.1 INFECÇÃO EXPERIMENTAL

3.1.1 Suscetibilidade dos camundongos e hamsters às cepas do VMEL

Camundongos albinos suíços recém-nascidos foram suscetíveis à infecção pelas cepas do VMEL, BE AR 633512 e BE AR 8033, apresentando os mesmos, sinais de doença como paralisia, tremores, prostração, sendo levados a óbito com aproximadamente dois a três dpi. Os hamsters dourados também se mostraram suscetíveis à infecção, principalmente pela cepa BE AR 633512, pela qual alguns destes animais, aproximadamente no 6º dpi., apresentaram sinais de doença (Figura 10) como: incoordenação motora, tremores e paralisia de membro posterior. Também, quatro hamsters evoluíram para óbito entre o 6º e o 7º dpi.



Figura 10 - Hamsters doentes após infecção com a cepa BE AR 633512.

3.1.2 Viremia e titulação viral

A viremia da cepa viral BE AR 633512 nos hamsters, foi obtida do 3° ao 6° dpi., revelando um título máximo ao 3° dpi. ($10^{-4,0}$ DL₅₀/0,02 mL) . Na figura 11, estão representados os títulos desta cepa no sangue dos hamsters, que foram pesquisados do 1° ao 7° e no 21° dpi. O título encontrado para esta cepa viral em cérebro de camundongos-estoque foi de $10^{-6,7}$ DL₅₀/0,02mL.

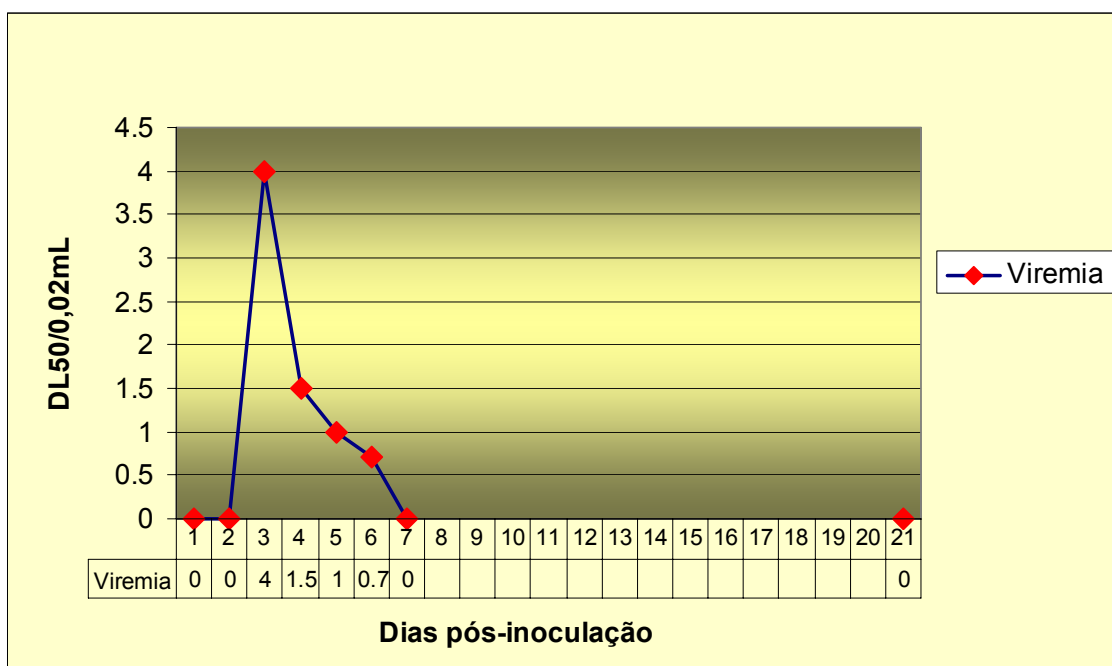


Figura 11 - Viremia da cepa BE AR 633512 do 1° ao 7° dia e com 21 dias pós-inoculação.

A viremia da cepa viral BE AR 8033 nos hamsters, ocorreu no 2º dpi., obtendo-se neste dia um título de $10^{-2,5}$ DL₅₀/0,02 mL. Na figura 12, estão representados os títulos desta cepa, que foram pesquisados do 1º ao 7º e no 21º dpi. no sangue dos hamsters. O título encontrado para esta cepa viral em cérebro de camundongos-estoque foi de $10^{-6,5}$ DL₅₀/0,02mL.

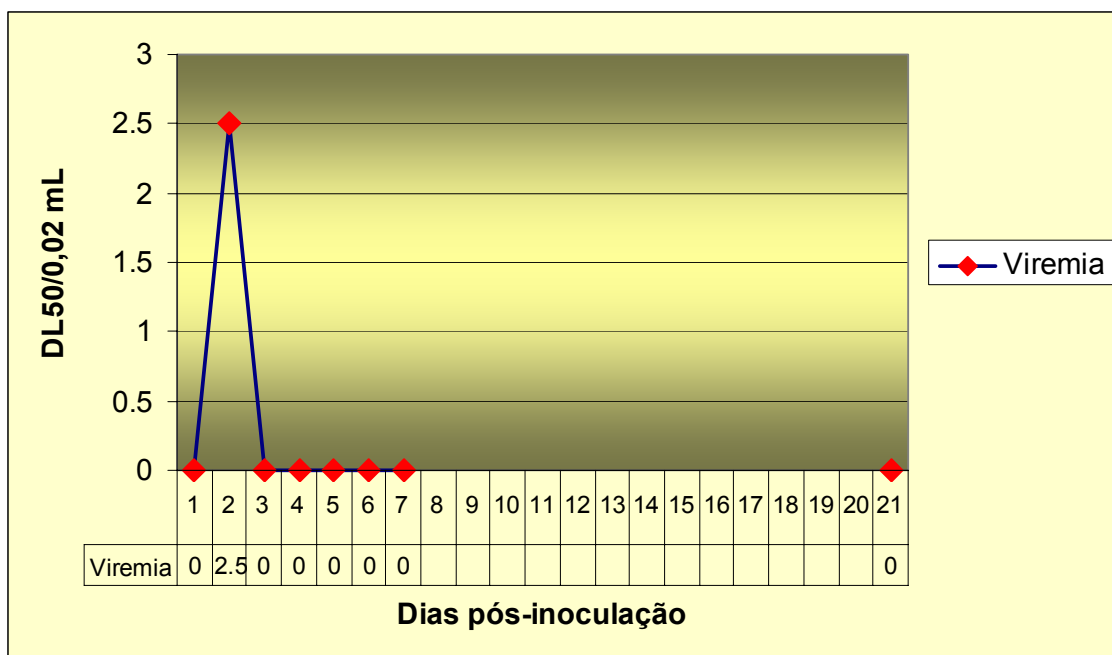


Figura 12 - Viremia da cepa BE AR 8033 do 1º ao 7º e com 21 dias pós-inoculação.

3.1.3 Detecção de anticorpos neutralizantes

Os anticorpos neutralizantes foram considerados positivos quando apresentaram ILN $\geq 1,8$. Estes anticorpos contra a cepa viral BE AR 633512 foram detectados do 5º até o 30º dpi. Os anticorpos neutralizantes contra a cepa viral BE AR 8033 foram também detectados do 5º até o 30º dpi. Os títulos respectivos aos dias de coleta dos soros podem ser visualizados na figura 13.

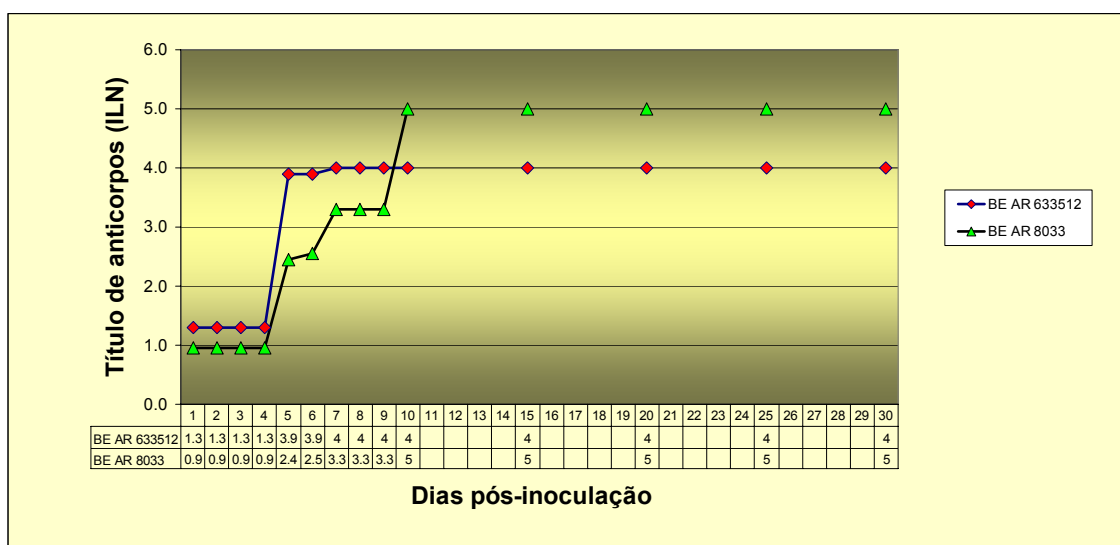


Figura 13 - Título, em ILN, de anticorpos neutralizantes contra as cepas virais BE AR 633512 e BE AR 8033.

3.1.4 Avaliação e análise estatística dos resultados dos testes bioquímicos para verificação das funções hepática e renal

A avaliação dos resultados obtidos revelou alterações dos marcadores bioquímicos de função hepática (AST, ALT) e renal (uréia e creatinina) utilizados no trabalho, comparando os resultados dos animais infectados e dos não-infectados (controles). Houve diferença de resultados também entre as duas cepas do VMEL em estudo, BE AR 8033 e BE AR 633512. Muitos desses resultados de alteração bioquímica mostraram-se estatisticamente significantes.

3.1.4.1 Cepa viral BE AR 633512

Os soros dos hamsters infectados com a cepa BE AR 633512 apresentaram valores bastante elevados de uréia (Figura 14) e creatinina (Figura 15). Também houve elevação considerável nos valores de AST (Figura 16) e ALT (Figura 17) nos animais infectados com esta cepa do VMEL. No que se refere à análise estatística, todos esses marcadores bioquímicos avaliados (uréia, creatinina, ALT e AST) foram estatisticamente significantes, em comparação com o grupo controle (Figuras 14 a 17).

Ao comparar as médias de dosagem de uréia das amostras dos grupos dos infectados (71 mg/ dL) e dos controles (47,25 mg/dL) para esta cepa, observou-se uma diferença que foi estatisticamente significativa, já que $p < 0,05$, sendo considerada então a hipótese alternativa de que há diferença significativa entre as médias dos valores de uréia dos grupos dos infectados e dos controles (Figura 14).

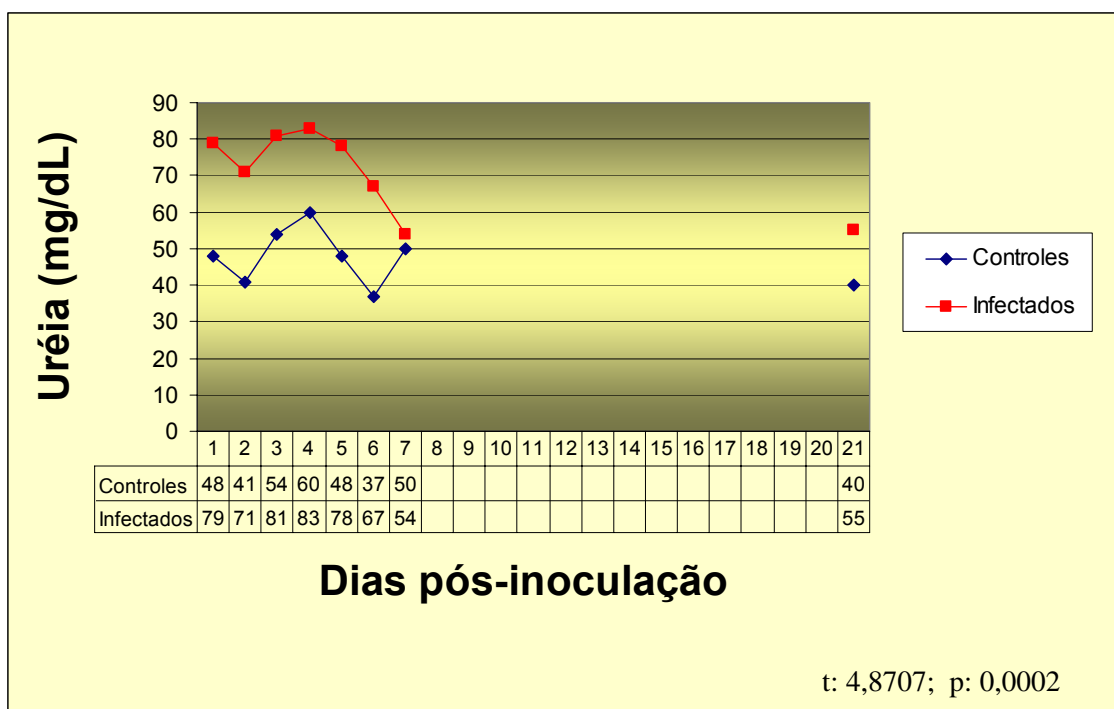


Figura 14 – Uréia dos animais infectados com a cepa BE AR 63512 e dos animais controles.

Com relação à creatinina verificada no soro desses animais, as médias encontradas para o grupo dos infectados e dos controles foram: 0,6988 mg/dL e 0,245 mg/dL, respectivamente, obtendo-se um valor de $p < 0,05$, considerando-se assim a hipótese alternativa de que há diferença significativa entre as médias dos valores de creatinina dos grupos dos animais infectados e de controles (Figura 15).

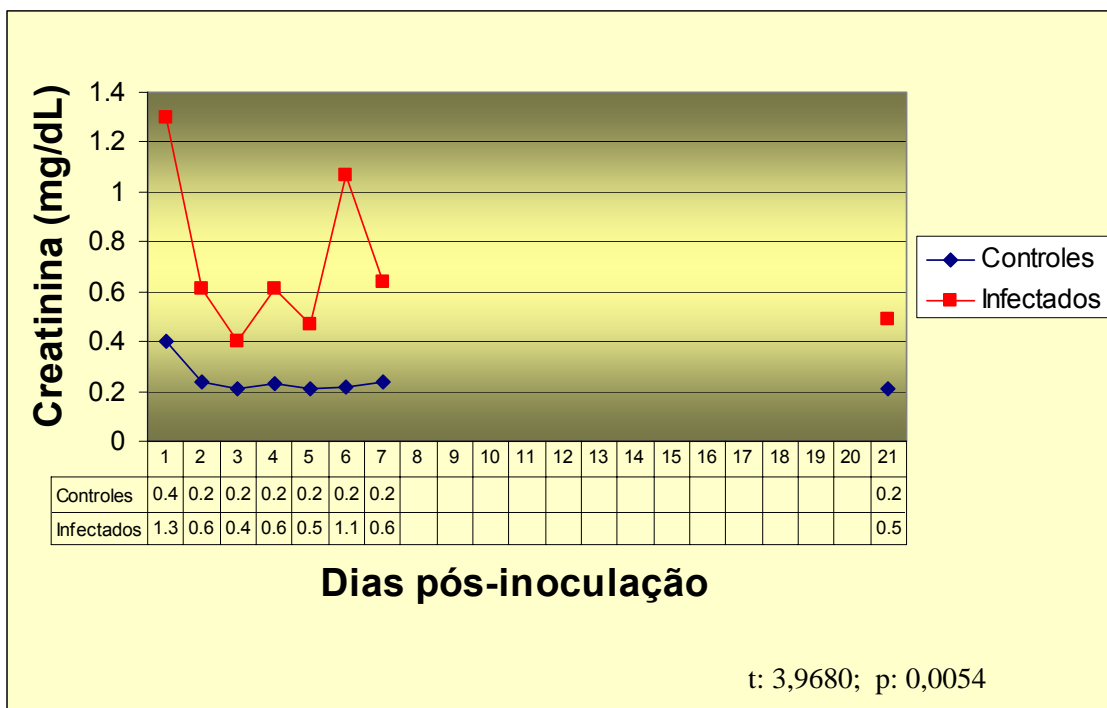


Figura 15 - Creatinina dos animais infectados com a cepa BE AR 633512 e dos animais controles.

No que diz respeito à AST, encontrou-se uma média de 127,12 U/L para o grupo dos infectados e de 72,37 U/L para o grupo dos controles, com $p < 0,05$ sendo a hipótese alternativa considerada, ou seja, a diferença entre as médias dos valores de AST dos dois grupos de animais, infectados e controles, é estatisticamente significativa (Figura 16).

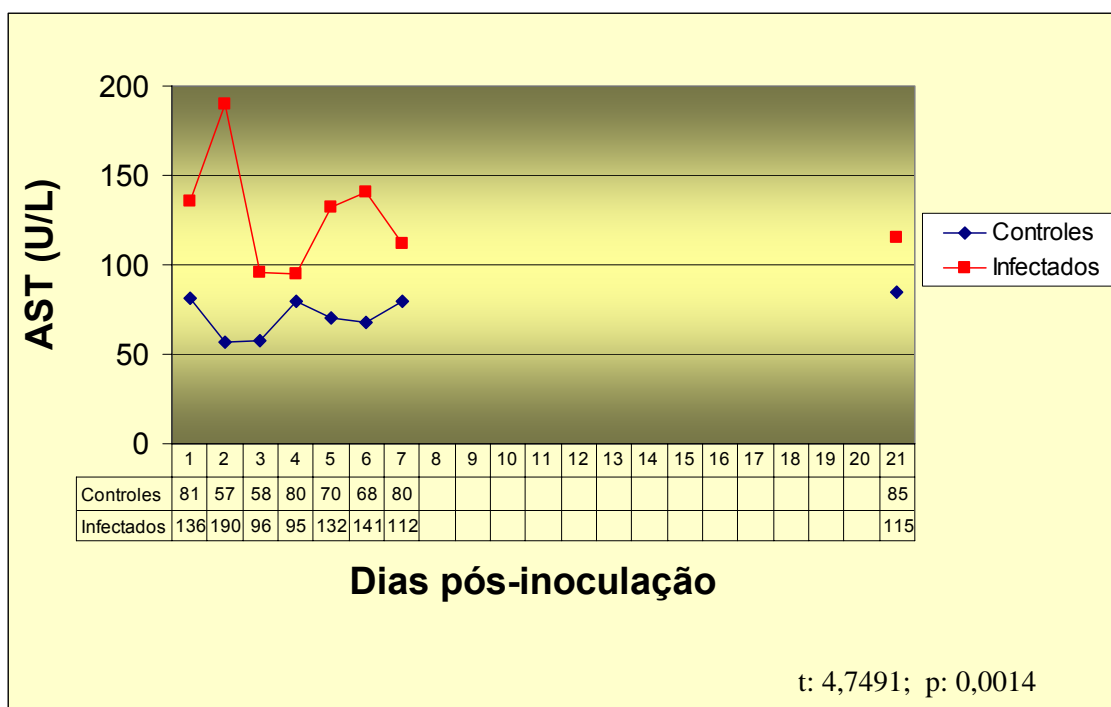


Figura 16 - AST dos animais infectados com a cepa BE AR 633512 e dos animais controles.

Quanto a ALT, a diferença entre as médias do grupo dos infectados (100,5 U/L) e dos controles (61,25 U/L) foi também estatisticamente significativa, tendo-se obtido um $p < 0,05$, levando-se assim em consideração a hipótese alternativa, de que há diferença entre as médias dos valores de ALT entre os dois grupos (Figura 17).

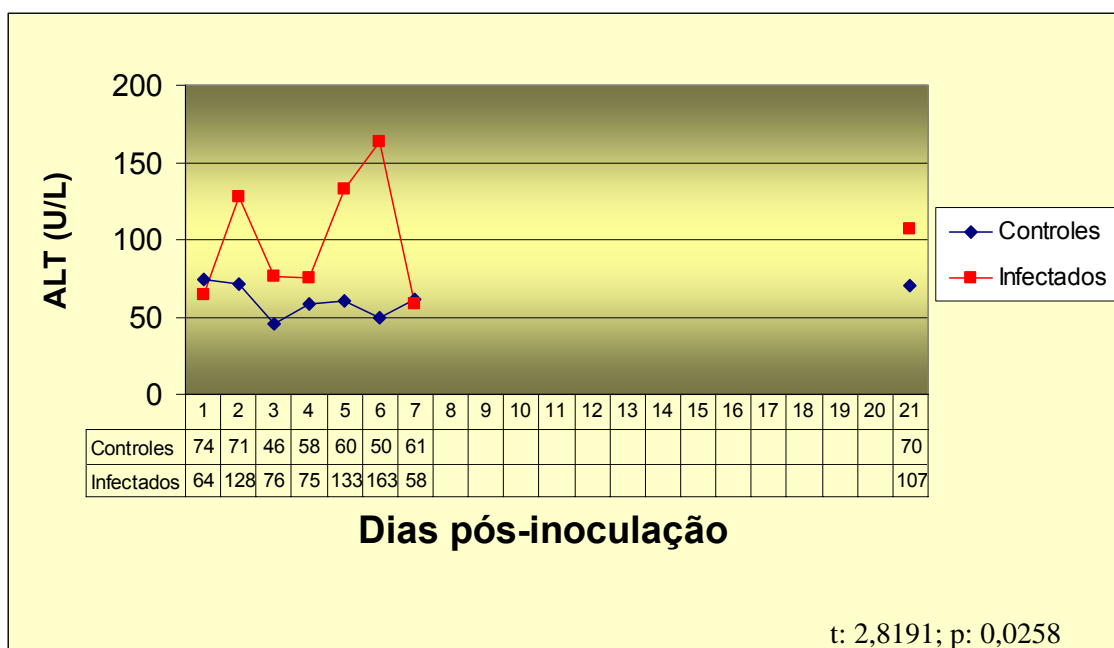


Figura 17 - ALT dos animais infectados com a cepa BE AR 633512 e dos animais controles.

3.1.4.2 Cepa viral BE AR 8033

Os soros dos hamsters infectados com a cepa BE AR 8033 apresentaram valores aumentados de uréia e que quando comparados aos valores dos animais controles foram estatisticamente significantes com $p < 0,05$ (Figura 18). Ressalte-se, no entanto, que as alterações foram mais discretas em comparação com os valores obtidos para a cepa BE AR 633512. Foi observado também um discreto aumento da creatinina para esses animais, o qual não foi estatisticamente significativo, pois o valor de $p > 0,05$ (Figura 19). Houve um aumento nos valores de AST (Figura 20), e a ALT apresentou-se consideravelmente aumentada no soro dos hamsters infectados com esta cepa do VMEL (Figura 21). A análise estatística para os resultados desta cepa viral revelou que os marcadores bioquímicos alterados, com significância estatística

foram: uréia, AST e ALT, quando comparados com o grupo controle. A creatinina não apresentou alteração estatisticamente significativa para esta cepa.

Ao comparar as médias de dosagem de uréia das amostras dos grupos dos infectados (57,37 mg/ dL) e dos controles (47,2 mg/ dL) para esta cepa, observou-se uma diferença que foi estatisticamente significativa, já que $p < 0,05$, sendo considerada então a hipótese alternativa de que há diferença significativa entre as médias dos valores de uréia dos grupos infectados e controles (Figura 18).

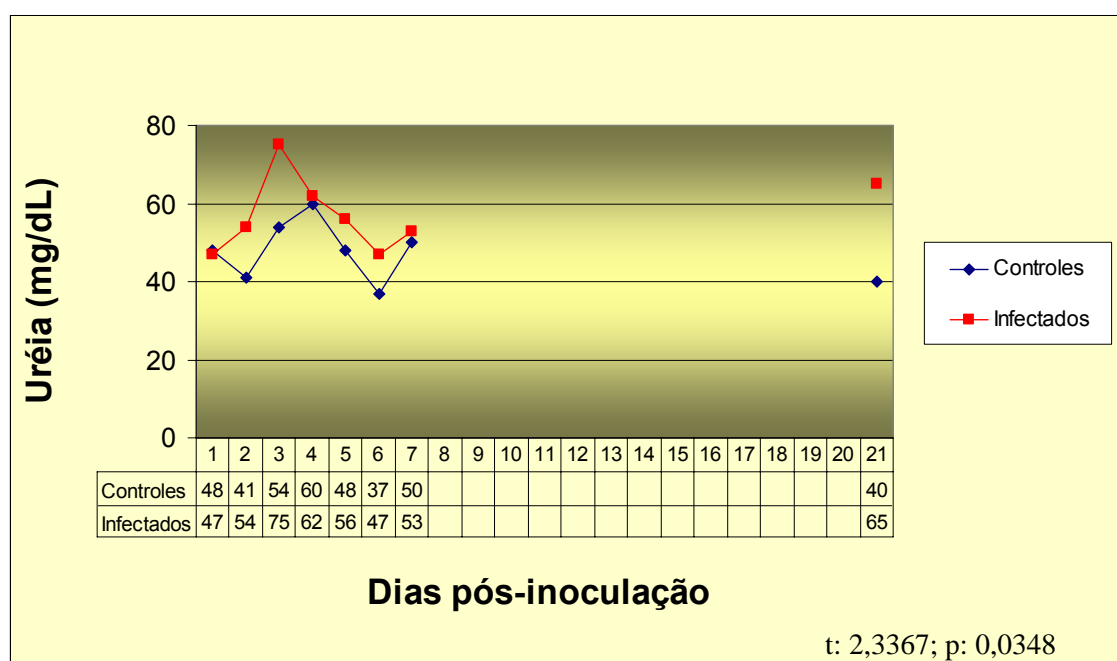


Figura 18 - Uréia dos animais infectados com a cepa BE AR 8033 e dos animais controles.

Com relação à creatinina verificada no soro desses hamsters, as médias encontradas para o grupo dos infectados e dos controles foram: 0,312 mg/ dL e

0,245 mg/dL, respectivamente, obtendo-se um valor de $p > 0,05$, considerando-se assim a hipótese nula de que não há diferença significativa entre as médias dos valores de creatinina dos grupos dos infectados e dos controles (Figura 19).

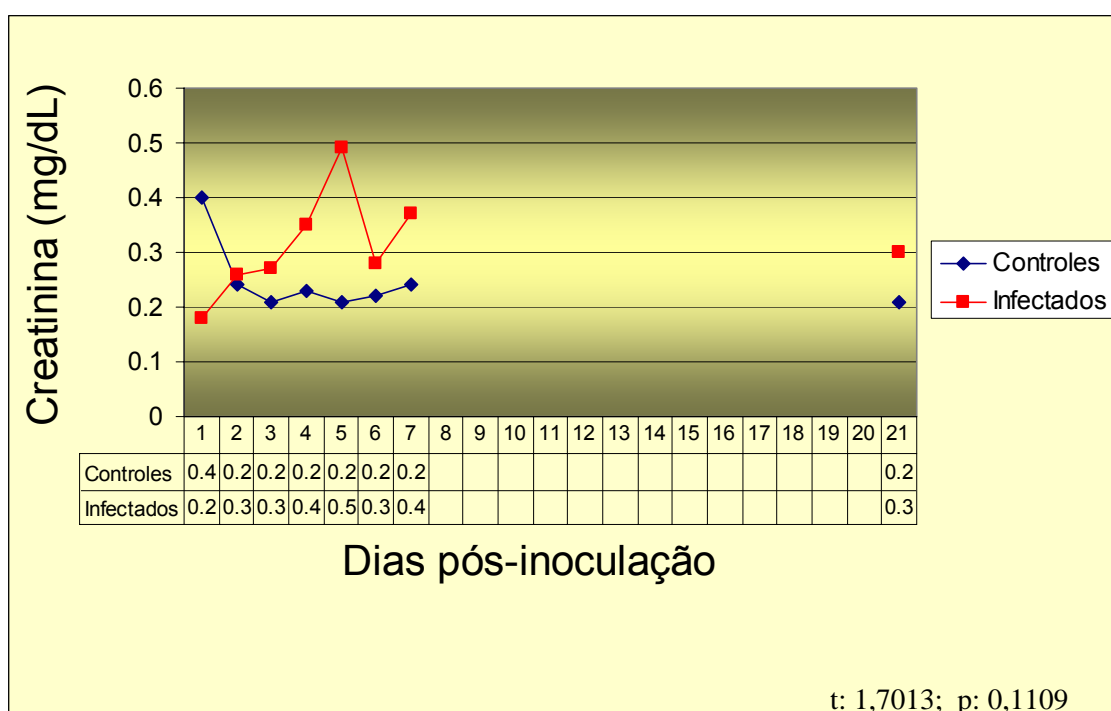


Figura 19 - Creatinina dos animais infectados com a cepa BE AR 8033 e dos animais controles.

No que diz respeito à AST, encontrou-se uma média de 112,75 U/L para o grupo dos infectados e de 72,37 U/L para o grupo dos controles, sendo $p < 0,05$ e a hipótese alternativa é considerada, ou seja, a diferença entre as médias dos valores de AST dos dois grupos é estatisticamente significativa (Figura 20).

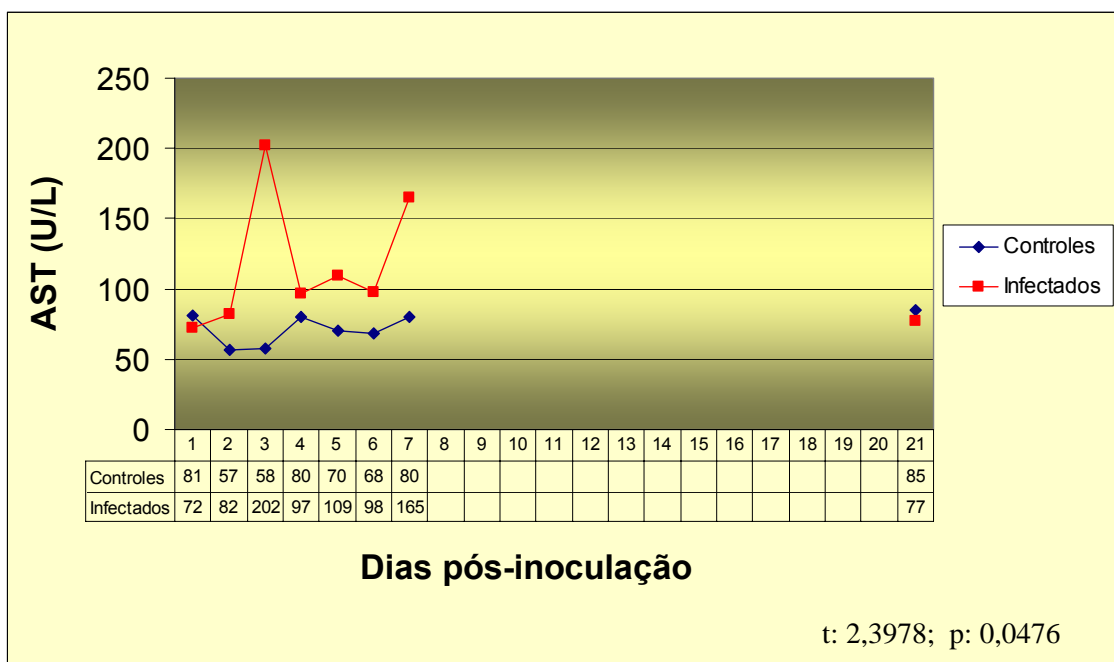


Figura 20 - AST dos animais infectados com a cepa BE AR 8033 e dos animais controles.

Em se tratando da ALT, a diferença entre as médias do grupo dos infectados (147,12 U/L) e dos controles (61,2 U/L) foi significativa, tendo-se obtido um $p < 0,05$, levando-se assim em consideração a hipótese alternativa, de que há diferença entre as médias dos valores de ALT entre os dois grupos (Figura 21).

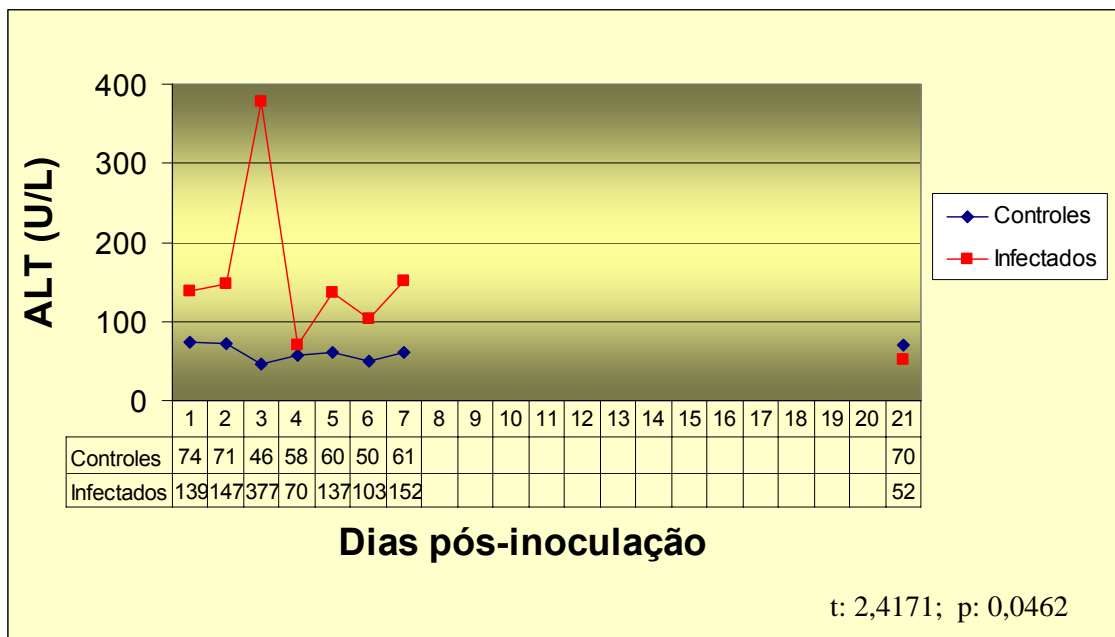


Figura 21 - ALT dos animais infectados com a cepa BE AR 8033 e dos animais controles.

3.1.5 Comparação dos resultados obtidos na verificação das funções hepática e renal da cepa BE AR 633512, da cepa BE AR 8033 e dos animais controles.

Os indicadores bioquímicos analisados neste trabalho (uréia, creatinina, ALT e AST) apresentaram valores bem alterados para os animais infectados em comparação com o grupo de animais controles, observando-se uma variação entre os resultados das duas cepas em estudo, BE AR 633512 e BE AR 8033. Os soros dos animais infectados com a cepa BE AR 633512 sempre se apresentaram com valores mais alterados que os observados para a cepa BE AR 8033, nos marcadores uréia, creatinina e AST (Figuras 22, 23 e 24). A ALT mostrou-se mais alterada nos animais infectados com a cepa BE AR 8033 (Figura 25).

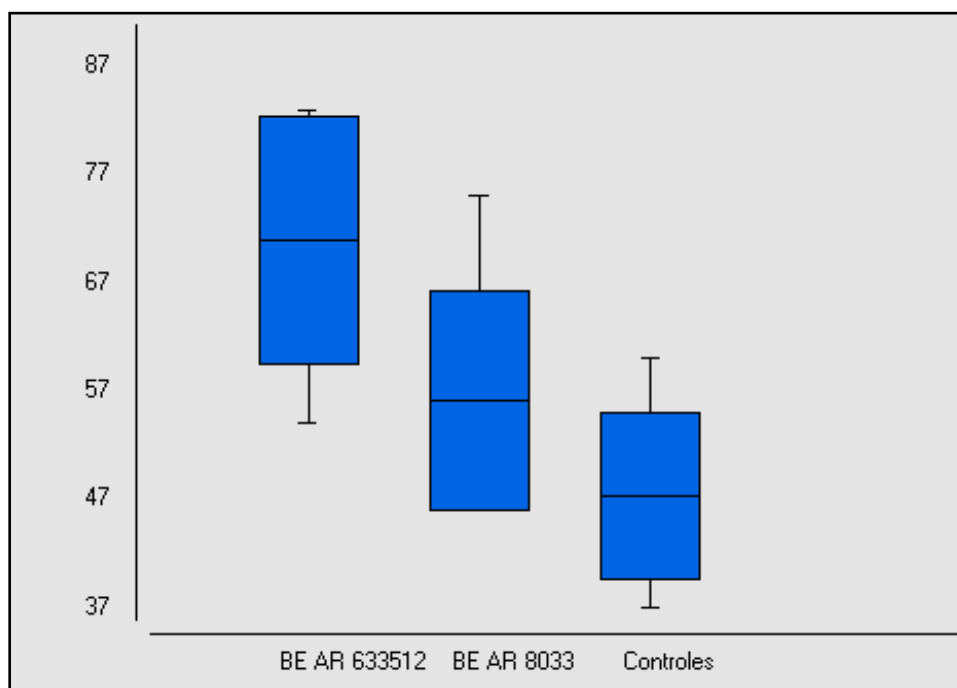


Figura 22 - Comparação dos valores de uréia entre os animais controles e os animais infectados com a cepa BE AR 633512 e com a cepa BE AR 8033.

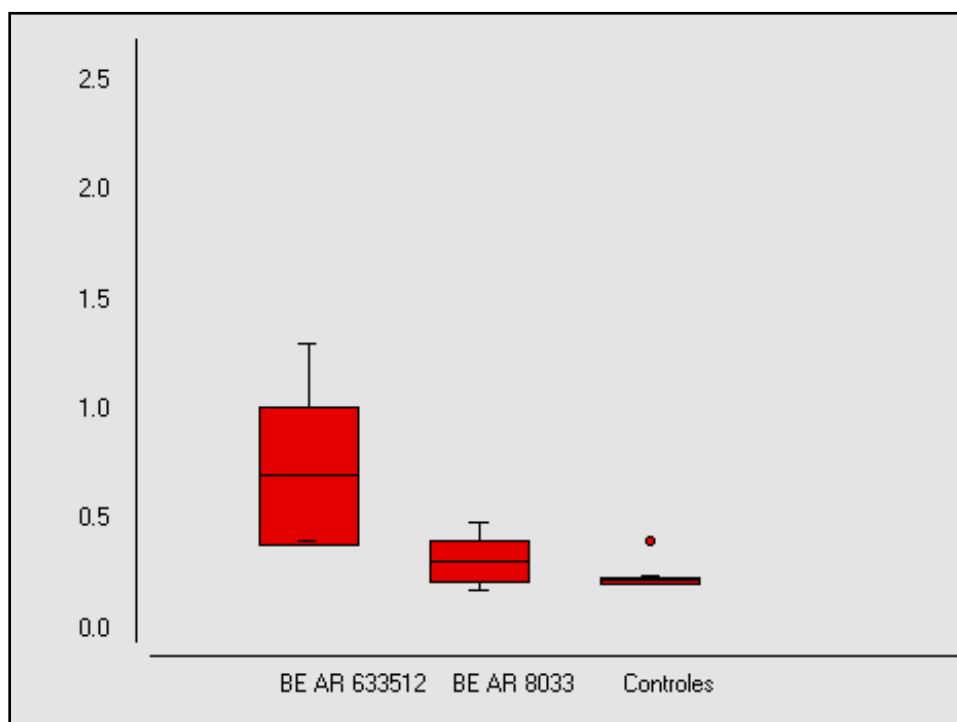


Figura 23 - Comparação dos valores de creatinina entre os animais controles e os animais infectados com as cepas do VMEL BE AR 633512 e BE AR 8033.

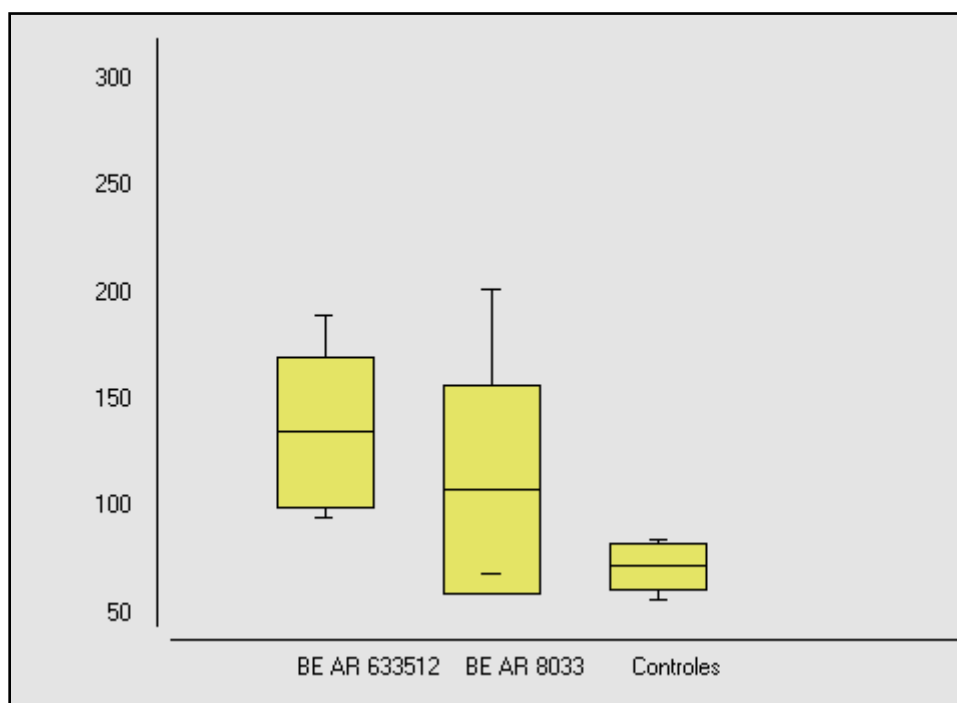


Figura 24 - Comparação dos valores de AST entre os animais controles e os animais infectados com as cepas do VMEL BE AR 633512 e BE AR 8033.

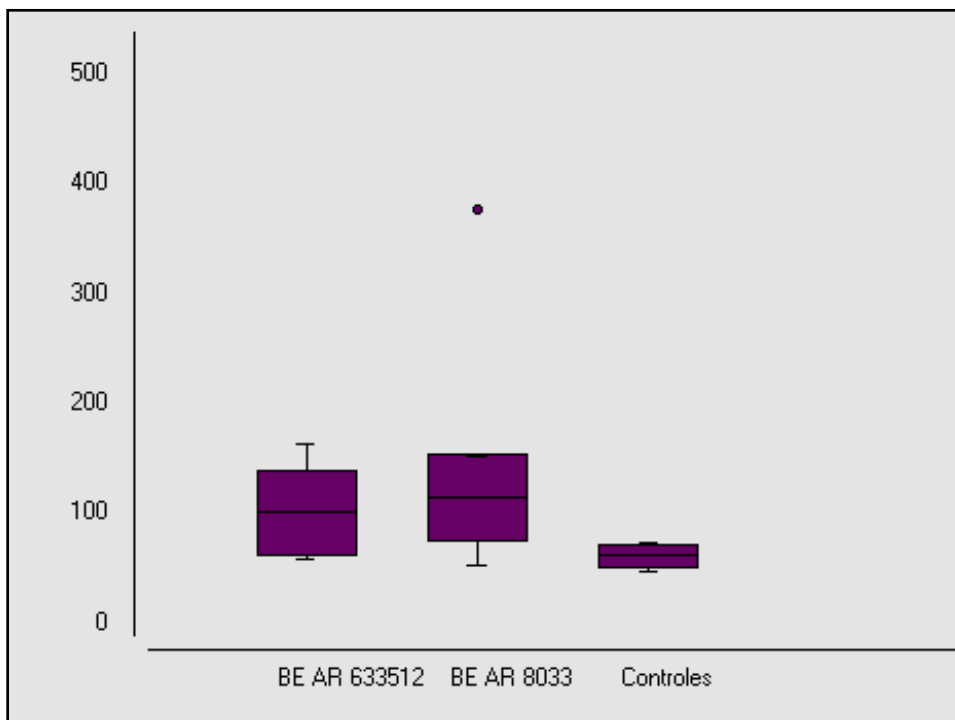


Figura 25 - Comparação dos valores de ALT entre os animais controles e os infectados com as cepas do VMEL BE AR 633512 e BE AR 8033.

3.1.6 Análise Histopatológica

A análise histopatológica das amostras teciduais nos diversos tempos pós-infecção, revelou alterações características de infecção, sobretudo no SNC, fígado, baço e rim. Os outros órgãos estudados, pulmão e coração, apresentaram alterações discretas, observadas, sobretudo no 7º dpi.

O espectro lesional variou em intensidade e amplitude entre os dias analisados (1º ao 7º dpi. e com 21 dias pós-inoculação), apresentando pico de intensidade entre o 6º e 7º dpi. nos diferentes órgãos acometidos e para as duas cepas do VMEL, BE AR 633512 e BE AR 8033, tendo se observado maior intensidade nas alterações histopatológicas nos órgãos dos hamsters

infectados com a cepa BE AR 633512 em comparação com os animais infectados com a cepa BE AR 8033.

3.1.6.1 Cepa BE AR 633512

O SNC dos hamsters infectados com esta cepa do VMEL, durante análise histopatológica, mostrou presença de meninges congestionadas e permeadas por linfomononucleares associados a edema. O parênquima neural, principalmente em áreas do hipocampo, cérebro e cerebelo, mostrou aspecto tecidual congestionado, freqüentemente permeado por infiltrado inflamatório de linfomononucleares associado à vacuolização do parênquima, que por vezes conferia ao tecido, aspecto espongiótico, com freqüentes neurônios de aspecto apoptóides apresentando picnose nuclear característica (Figura 26).

O fígado desses hamsters mostrou alterações patológicas intensas, apresentando ao nível celular tumefação hepatocitária característica com balonização dos hepatócitos, os quais apresentavam freqüentemente citoplasmas pálidos e com aspecto arenoso, por vezes mostrando vacúolos claros distribuídos no citoplasma (esteatose) ao lado de núcleos reativos, que freqüentemente mostram áreas de regeneração do tipo dupla placa (Figura 26). Os espaços-porta mostraram expansão característica à custa de proliferação inflamatória linfomononuclear, edema e congestão de veia e arteríola hepáticas. Não foram observadas lesões de paredes vasculares e de colangiólos, tampouco sinais de congestão e colestase sinusoidais, bem como proliferação fibrosa portal, porto-portal e porto-centro lobular com conseqüente subversão da arquitetura hepática (Figura 26).

As alterações encontradas no baço desses animais foram: proeminência de polpa vermelha e polpa branca, com freqüentes áreas de congestão e hemorragia do parênquima (Figura 26).

Com relação ao rim dos animais infectados com a cepa BE AR 633512, houve também alterações acentuadas, tendo-se observado, durante a análise histopatológica, o referido órgão com aspecto glomerular congesto e mostrando tumefação de células tubulares renais, estas associadas a áreas de necrose lítica e coagulativa com infiltrado de linfomononucleares variando de discreto a moderado, e também se observou congestão do interstício renal (Figura 27).

No tocante ao pulmão, houve apenas leve congestão de paredes alveolares com espessamento dos mesmos. Não se observou aspecto de pneumonite viral em nenhuma fase da infecção (Figura 27).

O coração dos animais infectados mostrou leve infiltração de linfócitos no 7º dpi. por entre as fibras miocárdicas, apesar de os miocardiócitos não mostrarem alterações à microscopia convencional (Figura 27).

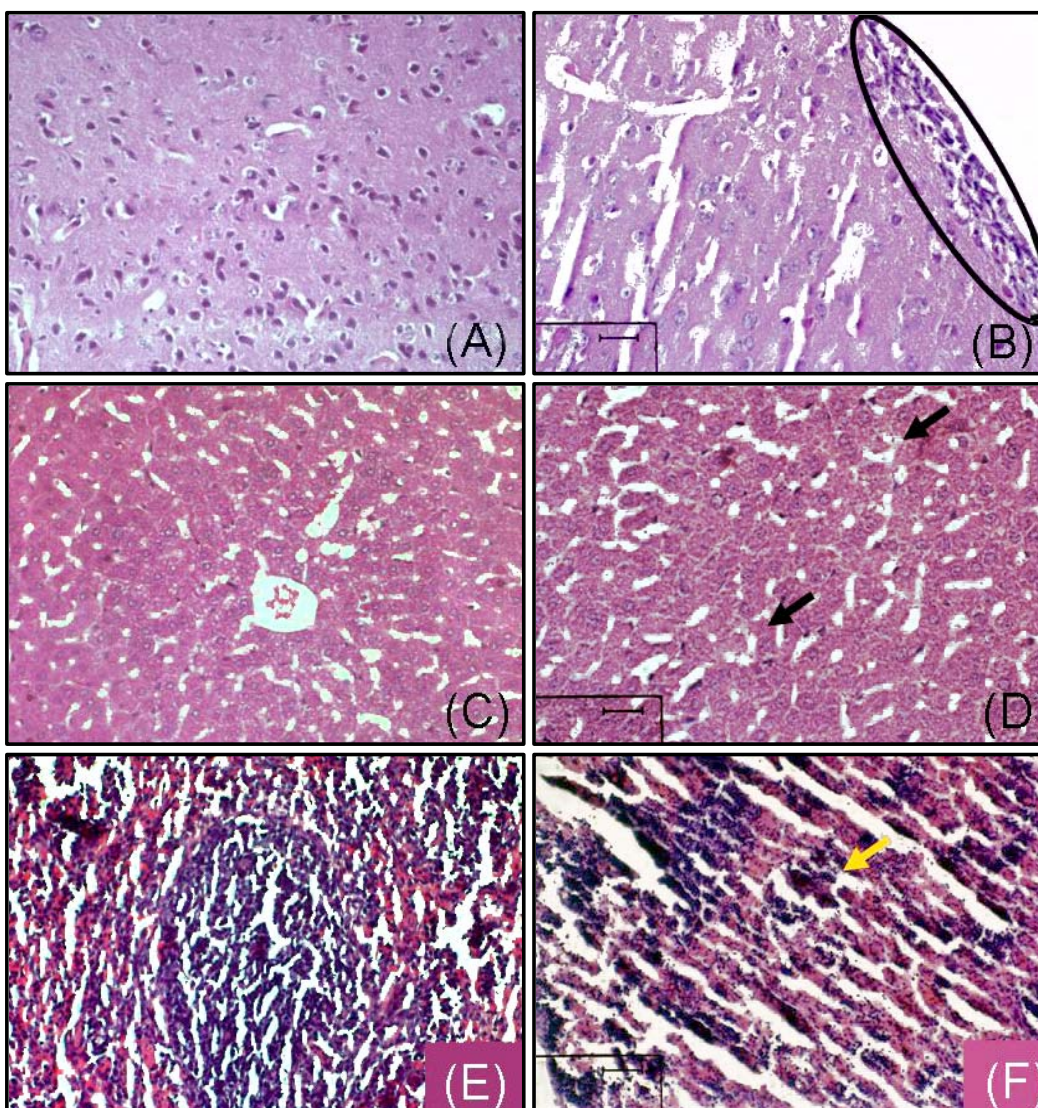


Figura 26 - Histopatologia do SNC, Fígado e Baço dos hamsters controles e infectados com a cepa BE AR 633512. (A) SNC de animal controle (400x). (B) SNC mostrando infiltrado inflamatório linfomononuclear ao nível das meninges (círculo) e edema do tecido neural subjacente (400x). (C) Fígado de animal controle (200x). (D) Fígado mostrando tumefação hepatocitária e esteatose (setas), onde se nota freqüente necrose caracterizada pelo desaparecimento do núcleo (400x). (E) Baço normal (200x). (F) Tecido esplênico mostrando proeminência de polpa vermelha com hiperplasia de polpa branca (seta)(200x).

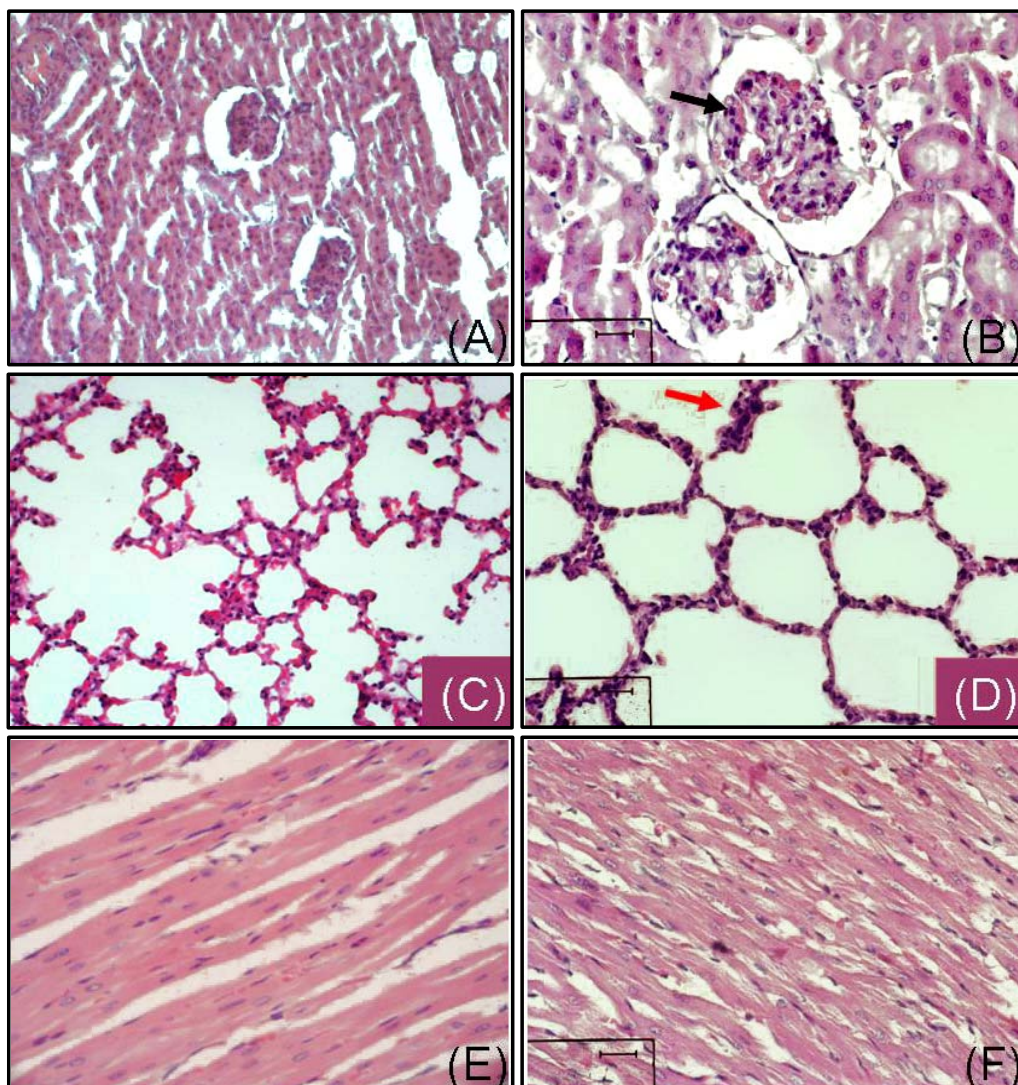


Figura 27 - Histopatologia dos hamsters controles e infectados com a cepa BE AR 633512. Rim. (A) Histologia de rim de animal controle (200x). (B) Tecido renal mostrando alterações caracterizadas pela congestão de glomérulo (seta) (400x). (C) Tecido pulmonar de animal controle (400x). (D) Tecido pulmonar mostrando leve congestão das paredes alveolares (seta) com espessamento dos tabiques (400x). (E) Miocárdio de animal controle (400x). (F) Miocárdio de animal infectado sem alterações (400x).

3.1.6.2 Cepa BE AR 8033

No SNC dos hamsters infectados com a cepa do VMEL, BE AR 8033, pôde-se observar a presença de meninges congestionadas e permeadas por linfomononucleares associados a edema. O parênquima neural, principalmente em áreas do hipocampo, cérebro e cerebelo, mostrou aspecto tecidual congestionado, freqüentemente permeado por infiltrado inflamatório de linfomononucleares associado a freqüentes neurônios de aspectos apoptóides apresentando picnose nuclear característica, ao lado de células com fragmentação dos núcleos (cariorraxis) (Figura 28).

No fígado desses animais, observou-se tumefação característica com hepatócitos que apresentaram freqüentemente citoplasmas pálidos e com aspecto arenoso, por vezes mostrando vacúolos claros distribuídos no citoplasma (esteatose) ao lado de núcleos reativos, e freqüentemente exibindo áreas de regeneração do tipo dupla placa. Não foi observada degeneração balonizante. Os espaços-porta mostraram expansão característica à custa de proliferação inflamatória linfomononuclear, edema e congestão de veia e arteríola hepáticas. Não foram observadas lesões de paredes vasculares e de colangíolos, nem sinais de congestão e colestase sinusoidais, bem como proliferação fibrosa portal, porto-portal e porto-centro lobular (Figura 28).

O rim dos animais infectados com a referida cepa apresentou-se com aspecto glomerular congestionado, e ao nível dos túbulos renais foi observado tumefação de células tubulares renais, estas associadas a áreas de necrose lítica das células tubulares com discreto infiltrado de linfócitos e congestão do interstício (Figura 29). As alterações encontradas no baço (Figura 28), coração

e pulmão (Figura 29) desses hamsters foram as mesmas observadas para a cepa BE AR 633512.

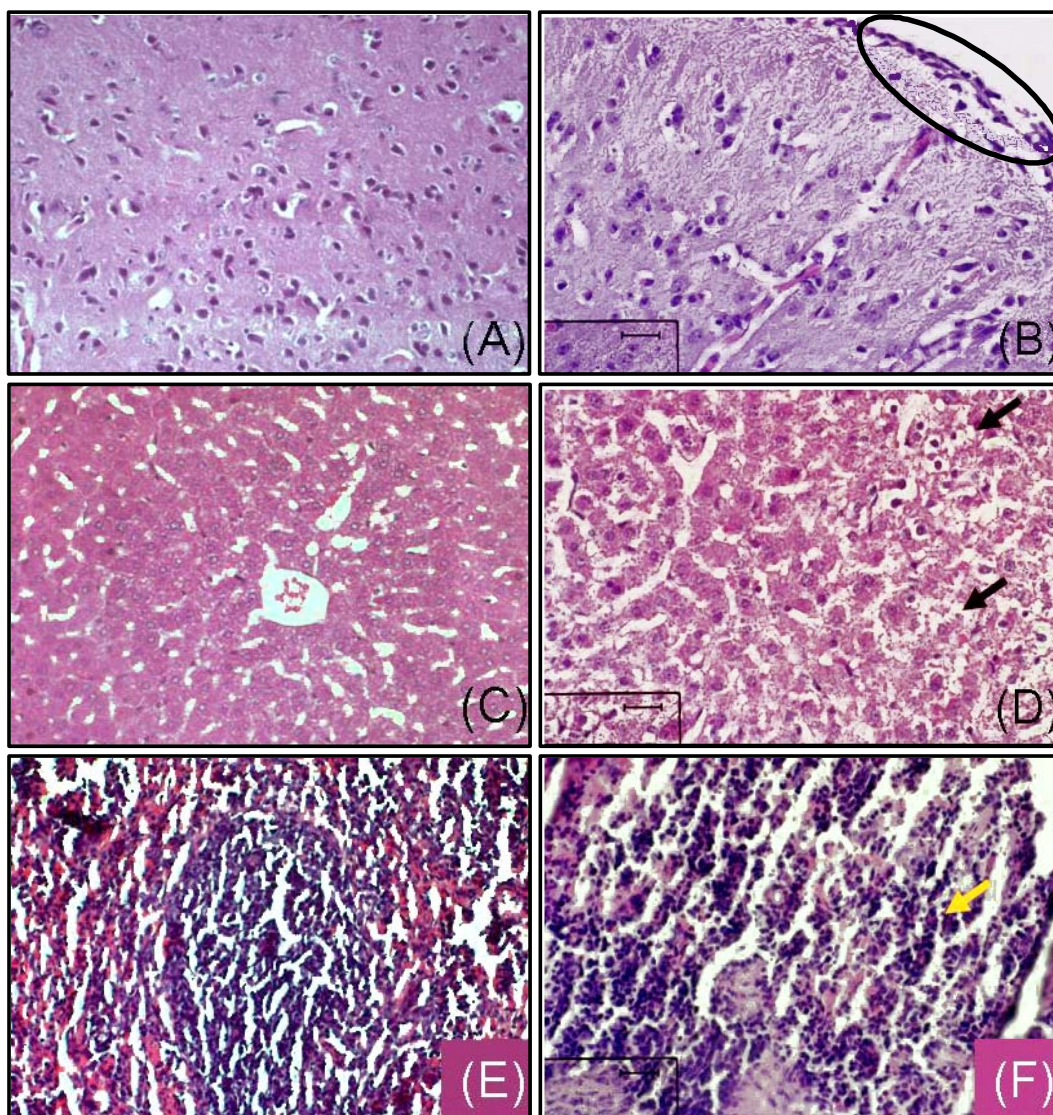


Figura 28 - Histopatologia do SNC, fígado e baço dos hamsters controles e infectados com a cepa BE AR 8033. (A) SNC de animal controle (400x). (B) SNC mostrando infiltrado inflamatório linfomononuclear ao nível das meninges (círculo) com edema do tecido neural subjacente (400x). Notar que a intensidade do infiltrado é menor nestes animais do que nos animais infectados com a cepa BE AR 633512. (C) Fígado de animal controle (200x). (D) Fígado

mostrando tumefação hepatocitária e esteatose. Nessa mesma área se nota freqüente necrose caracterizada pelo desaparecimento do núcleo (setas), porém as lesões são menos intensas que o observado para a cepa BE AR 633512 (400x). (E) Baço de animal normal (200x). (F) Tecido esplênico mostrando proeminência de polpa vermelha com hiperplasia de polpa branca (seta) (400x).

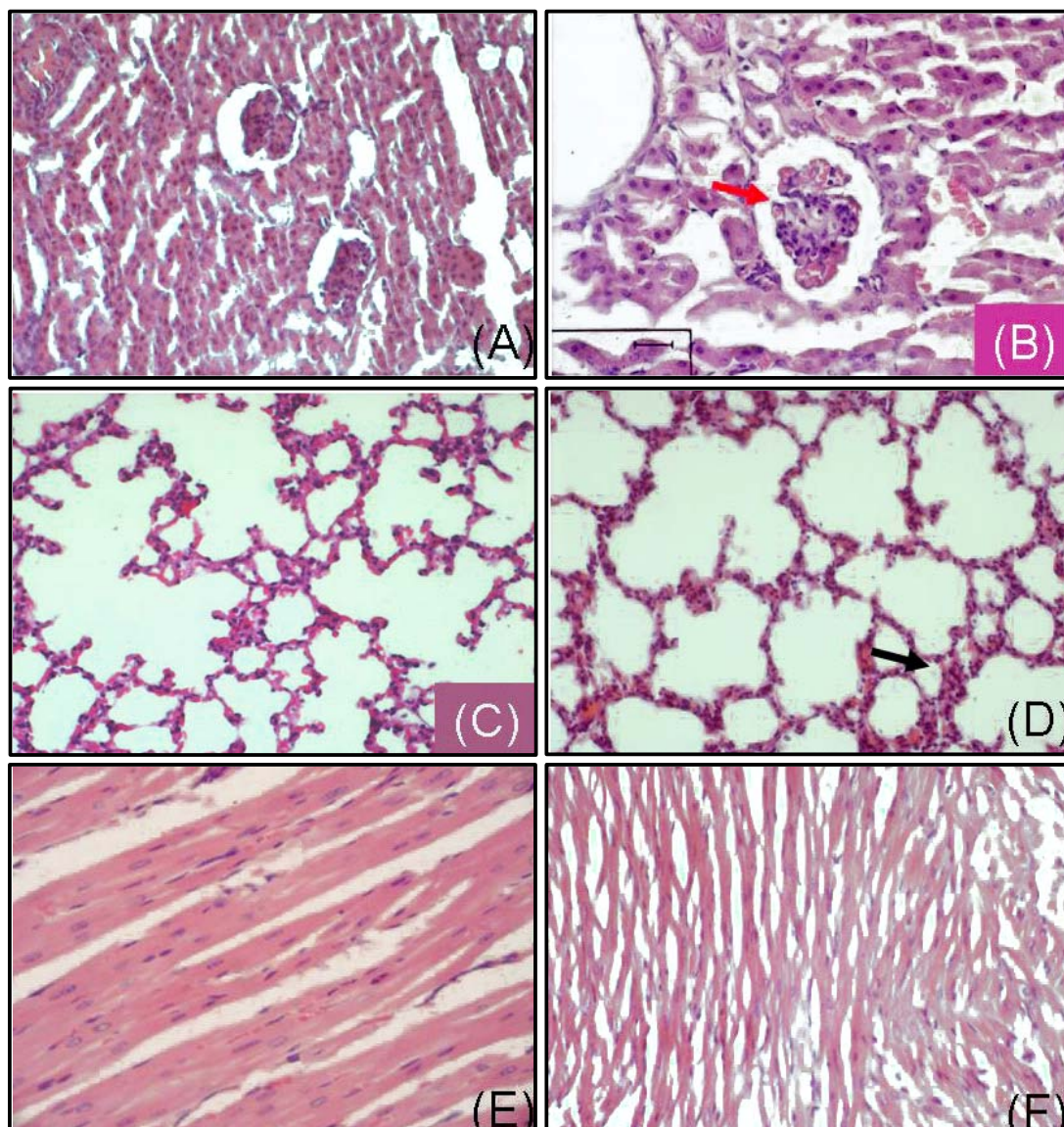


Figura 29 - Histopatologia dos hamsters controles e infectados com a cepa BE AR 8033. Rim. (A) Histologia de rim de animal controle (200x). (B) Tecido renal mostrando alterações caracterizadas pela congestão de glomérulo (seta) (400x). (C) Tecido pulmonar de animal controle (400x). (D) Tecido pulmonar mostrando leve congestão das paredes alveolares (seta) com espessamento dos tabiques (400x). (E) Miocárdio de animal controle (400x). (F) Miocárdio de animal infectado sem alterações (400x).

3.1.7 Imunohistoquímica

Objetivando demonstrar a presença de antígenos virais nos tecidos dos hamsters infectados para a confirmação da infecção, com as cepas virais do VMEL em estudo, foi realizada a técnica de imunohistoquímica nos mesmos tecidos analisados por histopatologia. Como anteriormente mostrado, os tecidos que apresentaram alterações características de infecção foram o SNC, fígado, rim e baço. Além desses órgãos, foram também processadas amostras de coração e pulmão, que apresentaram discreta alteração histológica, tendo também a finalidade de confirmação da infecção.

No aspecto global, o padrão de imunomarcção do antígeno viral não diferiu entre as duas cepas analisadas, em cada um dos órgãos analisados. No SNC e no fígado, a imunorreatividade para o antígeno viral mostrou-se mais intenso com pico de intensidade no 3º dpi. (Figura 30), apresentando decréscimo não muito intenso até o 7º dpi. Interessante, imunomarcção positiva no SNC e no fígado foi observada até o 21º dpi., quando o experimento foi encerrado (Figura 30).

A imunorreatividade para o antígeno viral, no rim (Figura 30), mostrou pico de intensidade no 4º dpi., apresentando decréscimo não muito intenso até o 6º dpi., mantendo-se a partir desse período em diante inalterada até o final do experimento. Imunomarcção positiva foi também observada para as amostras de baço dos animais, embora não tenha se observado variação de intensidade no mesmo entre as cepas analisadas.

Quanto ao coração e pulmão, não se observou reatividade, sendo a análise de antígenos considerada negativa.

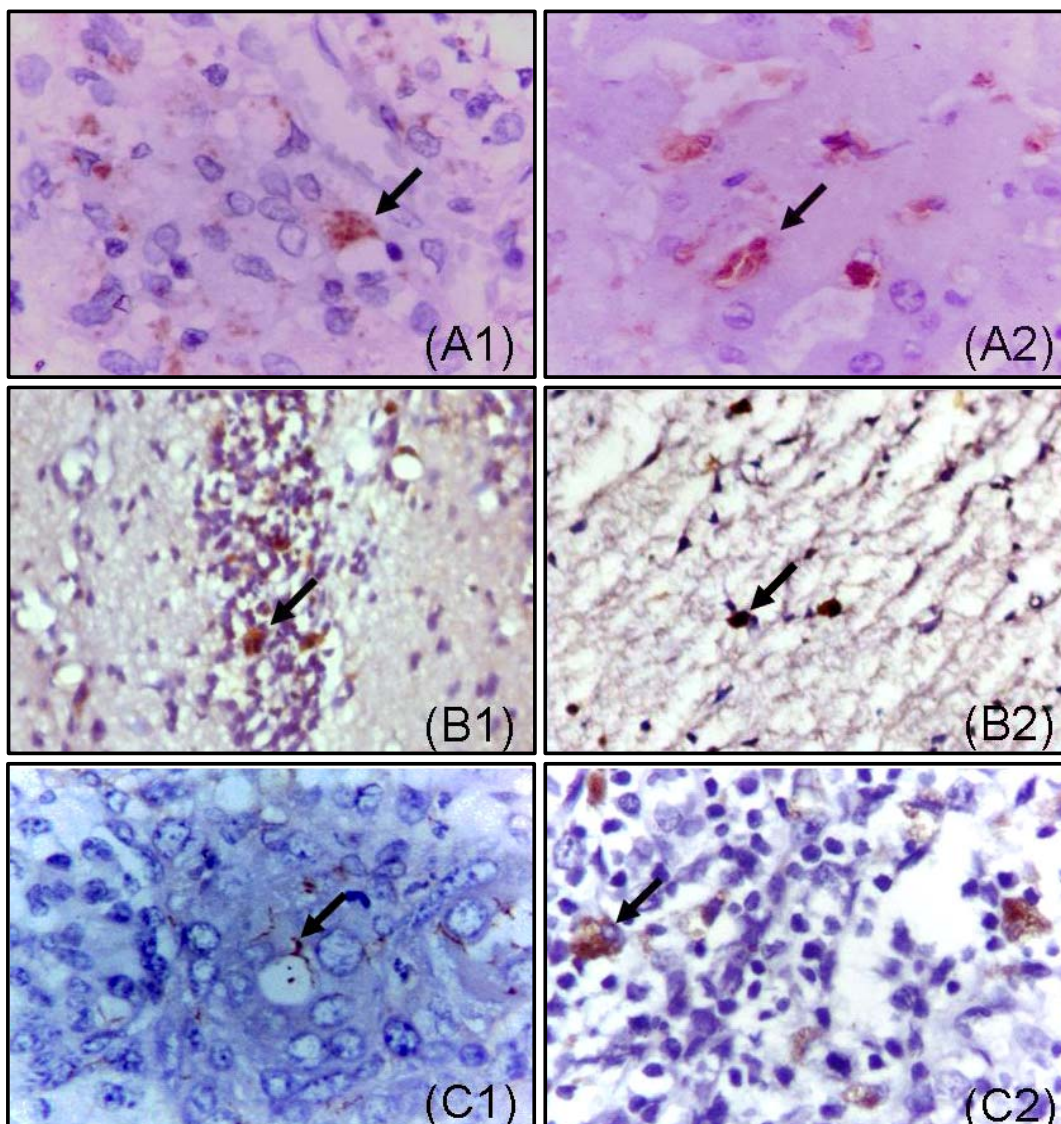


Figura 30 – Imunohistoquímica em cortes de fígado, SNC e rim de hamster infectado com as cepas do VMEV, BE AR 633512 e BE AR 8033. A positividade é caracterizada pela coloração acastanhada no tecido (setas). (A) Imunohistoquímica de tecido hepático. (A1) Padrão de imunomarcção positivo para o tecido hepático de hamster infectado com a cepa BE AR 633512 (400x). (A2) Padrão de imunomarcção positivo para tecido hepático de hamster infectado com a cepa BE AR 8033 (400x). (B) Imunohistoquímica de SNC. (B1) Imunomarcção positiva para SNC de hamster infectado com a cepa BE AR

633512 (400x). (B2) Imunomarcaco positiva para SNC de hamster infectado com a cepa BE AR 8033 (400x). (C) Imunohistoquímica de tecido renal. (C1) Tecido renal mostrando antígeno viral (cepa BE AR 633512) (400x). (C2) Tecido renal mostrando antígeno viral (cepa BE AR 8033) (400x).

3.2 CARACTERIZAO MOLECULAR

3.2.1 Análise genética dos genes N, Gn e Gc

As seqncias obtidas para o gene N (segmento P-RNA) das cepas do VMEL BE AR 8033 e BE AR 633512 foram determinadas em 708 nucleotídeos (nt) contendo duas CAL referentes aos genes N (708 nt) e NSs (294 nt) que codificam uma proteína estrutural de nucleocapsídeo, N com 235 aminoácidos e outra não estrutural NSs com 97 aminoácidos, respectivamente. Os genes Gn e Gc (segmento M-RNA) foram determinados respectivamente em 897nt e 2907nt e que codificam as glicoproteínas Gn e Gc compostas por 299 e 969 aminoácidos, respectivamente.

A análise de similaridade genética evidenciou que as cepas do VMEL BE AR 8033 e BE AR 633512 e o protótipo TRVL 9375 apresentam alto grau de identidade nucleotídica ao nível dos genes N e Gc (identidade nucleotídica > 94%), sendo as cepas BE AR 8033 e TRVL 9375 mais semelhantes entre si pelo gene N e as cepas BE AR 633512 e BE AR 8033 pelo gene Gc. Maior divergência genética foi observada para o gene Gn da cepa BE AR 633512 que apresentou identidade nucleotídica de 86,1% e 87,8% com o protótipo TRVL 9375 e com a cepa BE AR 8033, respectivamente, que entre si, mostraram

percentual de homologia de 97,1% em suas seqüências nucleotídicas (Tabela 1).

Tabela 1 – Relacionamento genético das cepas do VMEL BE AR 8033 e BE AR 633512 com o protótipo (TRVL 9375), de acordo com os genes N, Gn e Gc.

Gene	Cepa	BE AR 633512	BE AR 8033	TRVL 9375
N	BE AR 633512	***	96,6	95,8
	BE AR 8033	3,4	***	98,6
	TRVL 9375	4,2	1,4	***
Gn	BE AR 633512	***	87,8	86,1
	BE AR 8033	12,2	***	97,1
	TRVL 9375	13,9	2,9	***
Gc	BE AR 633512	***	94,8	93,6
	BE AR 8033	5,4	***	96,1
	TRVL 9375	6,7	3,9	***

Legenda: *** : 100% de identidade nucleotídica; números em negrito correspondem à identidade nucleotídica; números não negritados: índice de divergência nucleotídica.

O alinhamento múltiplo das seqüências nucleotídicas dos genes N, Gn e Gc evidenciou a presença de múltiplas substituições nucleotídicas. A maioria destas foi silenciosa com predominância de mutações do tipo transição (si=334) em relação à do tipo transversão (sv=117), cuja razão média (si/sv) foi determinada em 2,8. Em relação ao protótipo do VMEL, TRVL 9375, a cepa BE AR 633512 foi a que mostrou maior número (n) de substituições, que

ocorreram em sua maioria ao nível dos genes Gc (n= 125; si=106 e sv=19) e Gn (n=182; si=130; sv=52). No Quadro 4, encontram-se representadas as principais substituições nucleotídicas ocorridas no genoma das cepas BE AR 8033 e BE AR 633512 em comparação ao protótipo do VMEL TRVL 9573 e que levaram à substituições de aminoácidos.

Quadro 4 - Substituições nucleotídicas e aminoacídicas ao longo dos genes N, Gn e Gc das cepas BE AR 8033 e BE AR 633512 em comparação com o protótipo do VMEL, TRVL 9573.

Gene	Posição no genoma		Cepa			
			BE AR 8033		BE AR 633512	
			Substituição		Substituição	
	Nt	AA	Nt	AA	Nt	AA
N	406	136	-	-	G->A	Ala->Thr*
Gn	13	5	-	-	A->G	Gly->Cys
	16	6	-	-	T->C	Phe->Leu
	22	8	-	-	A->G	ILe->Val
	74	25	-	-	G->C	Gly->Ala
	172	58	-	-	G->A	Asp->Ans**
	389	130	-	-	C->A	Thr->Asn
	648	216	T->A	Phe->Leu	T->A	Phe->Leu
	655	219	-	-	A->G	ILe->Val
	696	232	-	-	G->A	Met->ILe
	715	239	-	-	A->G	ILe->Val

Quadro 4 - Substituições nucleotídicas e aminoacídicas ao longo dos genes N, Gn e Gc das cepas BE AR 8033 e BE AR 633512 em comparação com o protótipo do VMEL, TRVL 9573 (Continuação).

Gc	1592-1593	531	AT->GT	Ans->Ser	AT->GC	Ans->Ser
	1605	535	T->G	Asp->Glu	T->G	Asp->Glu
	1616	539	A->G	Tyr->Cys	A->G	Tyr->Cys
	1622	541	A->G	Lys->Arg	A->G	Lys->Arg
	1626	542	T->G	Ser->Arg***	T->G	Ser->Arg***
	1660	554	A->G	Thr->Ala*	A->G	Thr->Ala*
	2005	669	-	-	T->G	Ser->Ala*
	2022	674	-	-	A->C	Arg->Ser***

Legenda: * aa hidrofóbicos ↔ aa polares; ** aa ácidos ↔ aa polares; *** aa polares ↔ básicos.

3.2.2 Análise filogenética

Para estabelecer o relacionamento genético entre o protótipo do VMEL, TRVL 9375, e as cepas em estudo (BE AR 8033 e BE AR 633512) com outros vírus pertencentes ao sorogrupo Califórnia, árvores filogenéticas foram construídas usando seqüências completas dos genes N (708 nt), Gn (897 nt) e Gc (2907 nt) empregando os métodos de NJ, MP e MV. O *Virus Bunyamwera* foi utilizado como grupo externo para enraizamento das árvores. Ambos os métodos de NJ e MP geraram árvores com topologias semelhantes, no entanto os valores de *bootstrap* foram ligeiramente menores para as árvores

construídas pelo método de MP. Por esta razão, foram utilizadas neste estudo, para a análise final, as árvores construídas pelo método de NJ.

Todas as árvores obtidas para o gene N (segmento P-RNA) evidenciaram a segregação de três clades principais correspondentes aos grupos Melao, Califórnia encephalitis e Trivittatus, sendo estes considerados polifiléticos cujos ancestrais não são comuns. Dentro do grupo Melao, as cepas BE AR 633512 e BE AR 8033 e o protótipo TRVL 9375, constituíram uma clade (A) a parte, sendo mais geneticamente relacionada ao *Virus Keystone* (VKEY, clade B) e diferenciadas da clade C constituída pelos *Virus South River*, *Virus Inkoo* e *Virus Jamestown Canyon* e da clade D, representada pelo *Virus Serra do Navio* (VSDN). O grupo Califórnia encephalitis foi subdividido em quatro clades: E (*Virus San Angelo*) clade F (*Virus Tahyna* e *Virus Lumbo*), clade G (*Virus California encephalitis*) e clade H (*Virus La Crosse* e *Virus Snowshoe hare*) (Figura 31).

As árvores construídas para os genes Gn e Gc (segmento M- RNA) revelaram topologias distintas daquelas evidenciadas pelo gene N. Empregando ambos os métodos de NJ e MP, o protótipo TRVL 9375 e as cepas do VMEL, BE AR 633512 e BE AR 8033, que pelo segmento P (gene N) foram filogeneticamente mais relacionadas ao VKEY, pelo segmento M (genes Gn e Gc) foram mais semelhantes ao VSDN (Figuras 32 e 33). Ressalte-se que em todas as árvores os valores de *bootstrap* para o grupamento referente ao VMEL foram significativamente fortes (99-100%). Em se tratando do gene N e Gn, a cepa BE AR 633512 foi geneticamente mais distante da cepa BE AR 8033 e do protótipo TRVL 9375. Entretanto, a análise filogenética do gene Gc

revelou que, para esse gene, a cepa BE AR 633512 é mais geneticamente relacionada com a cepa BE AR 8033.

A análise de MV foi utilizada para avaliar as topologias obtidas para os segmentos P e M do VMEL empregando o teste de Kishino-Hasegawa. Modelos evolucionários foram otimizados usando os segmentos genômicos, bem como suas respectivas topologias. Independente do modelo selecionado, a topologia gerada para um dado segmento (gene N para o segmento P-RNA e genes Gn e Gc para o segmento M-RNA) utilizando os métodos de NJ e MP foi mais significativamente relacionada ($p < 0,001$) quando comparada com a topologia obtida para o outro segmento. Estes resultados sugerem que as topologias obtidas para os segmentos genômicos do VMEL são significativamente diferentes.

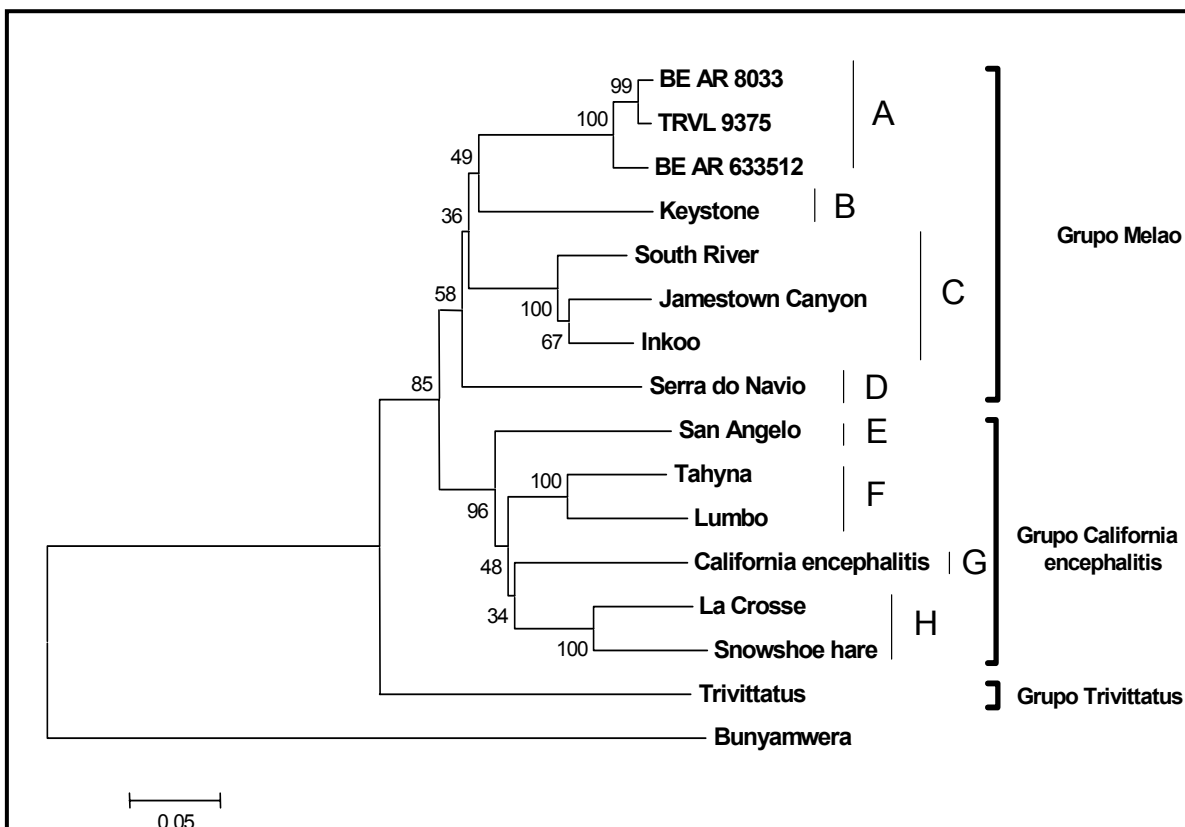


Figura 31 - Análise filogenética do gene N do protótipo do VMEL, TRVL 9375, e cepas BE AR 8033 e BE AR 633512, utilizando o método de NJ. Valores de *bootstrap* encontram-se acima de cada nó principal da árvore. O *Vírus Bunyamwera* foi utilizado como grupo externo. Valor de 0,05 abaixo da barra corresponde a 5% de divergência nucleotídica entre as seqüências genéticas. Clades ou grupos filogenéticos correspondem às letras de A a H.

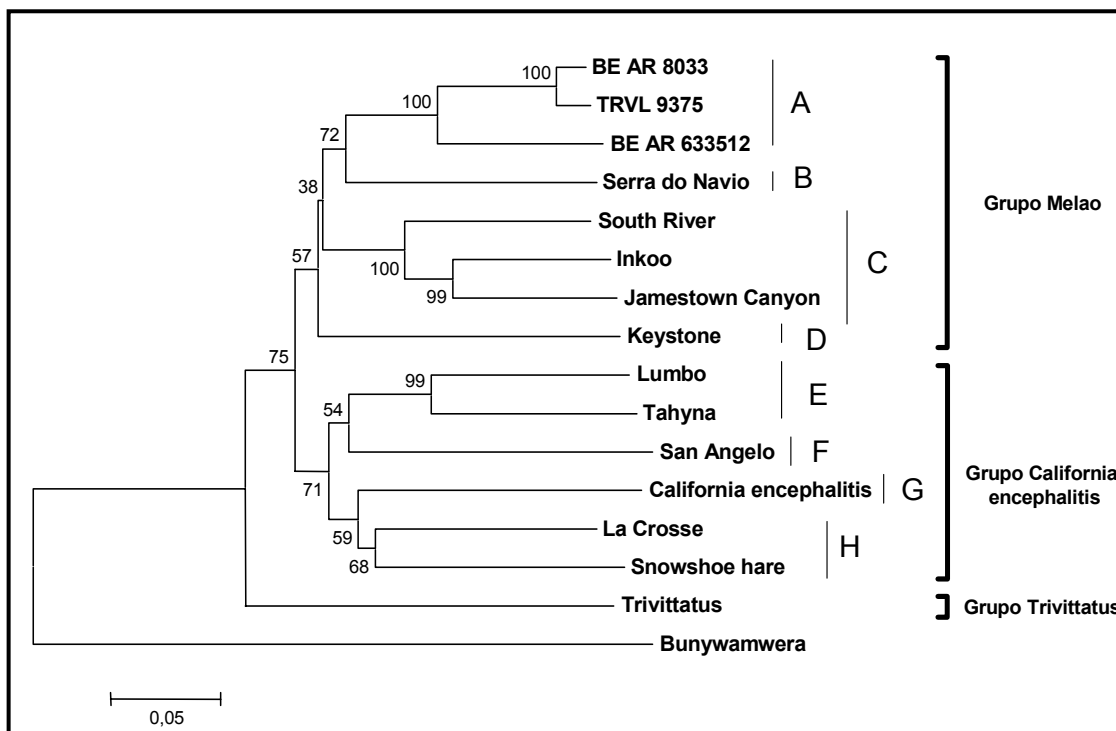


Figura 32 - Análise filogenética do gene Gn do protótipo do VMEL, TRVL 9375, e cepas BE AR 8033 e BE AR 633512, utilizando o método de NJ. Valores de *bootstrap* encontram-se acima de cada nó principal da árvore. O Vírus *Bunyamwera* foi utilizado como grupo externo. Valor de 0,05 abaixo da barra corresponde a 5% de divergência nucleotídica entre as seqüências genéticas. Clades ou grupos filogenéticos correspondem às letras de A a H.

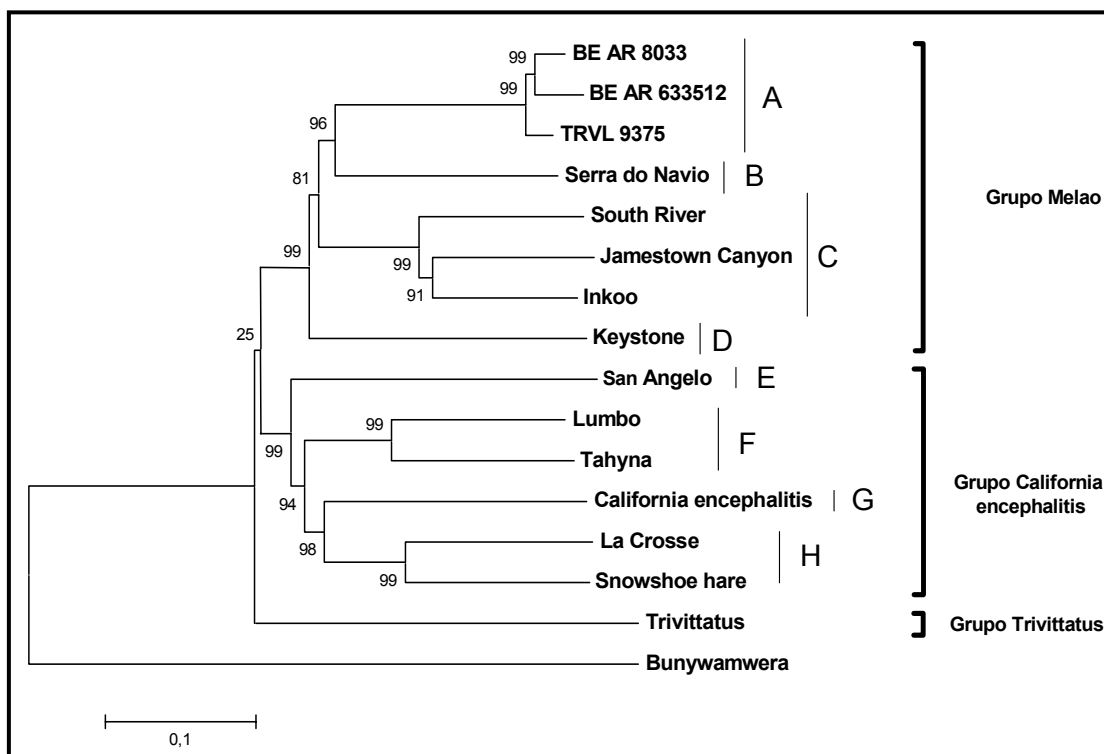


Figura 33 - Análise filogenética do gene Gc do protótipo do VMEL, TRVL 9375, e cepas BE AR 8033 e BE AR 633512, utilizando o método de NJ. Valores de *bootstrap* encontram-se acima de cada nó principal da árvore. O *Virus Bunyamwera* foi utilizado como grupo externo. Valor de 0,1 abaixo da barra corresponde a 10% de divergência nucleotídica entre as seqüências genéticas. Clades ou grupos filogenéticos correspondem às letras de A a H.

3.2.3 Análise estrutural dos genes Gn e Gc

As estruturas secundárias dos genes Gn e Gc mostraram-se diferenciadas entre as três cepas do VMEL estudadas, no entanto, a maior diferença foi observada para a cepa BE AR 633512 provavelmente devido à presença de mutações sinônimas e não sinônimas ao longo do genoma. O gene Gn desta cepa mostrou diversas substituições nucleotídicas silenciosas independentes da região do gene, enquanto que apenas oito mutações

sinônimas foram observadas, quatro no domínio extracelular (DE) e quatro no domínio citoplasmático (DC), sendo a substituição nucleotídica G → A (posição nucleotídica 172) ocorrida no DE considerada importante pois alterou o resíduo N57 do sítio de glicosilação NDTG presente nas cepas TRVL 9573 e BeAR 8033 de N → D (Asp → Ans) e conseqüentemente o caráter bioquímico (aa fortemente ácido → aa polar) (Figura 33; Quadro 4). Em relação ao gene Gc, um número total menor de substituições foi observado em comparação ao gene Gn, sendo de maior importância oito substituições sinônimas, todas concentradas no DE, das quais quatro levaram a mudança no caráter bioquímico do aminoácido (Figura 34; Quadro 4).

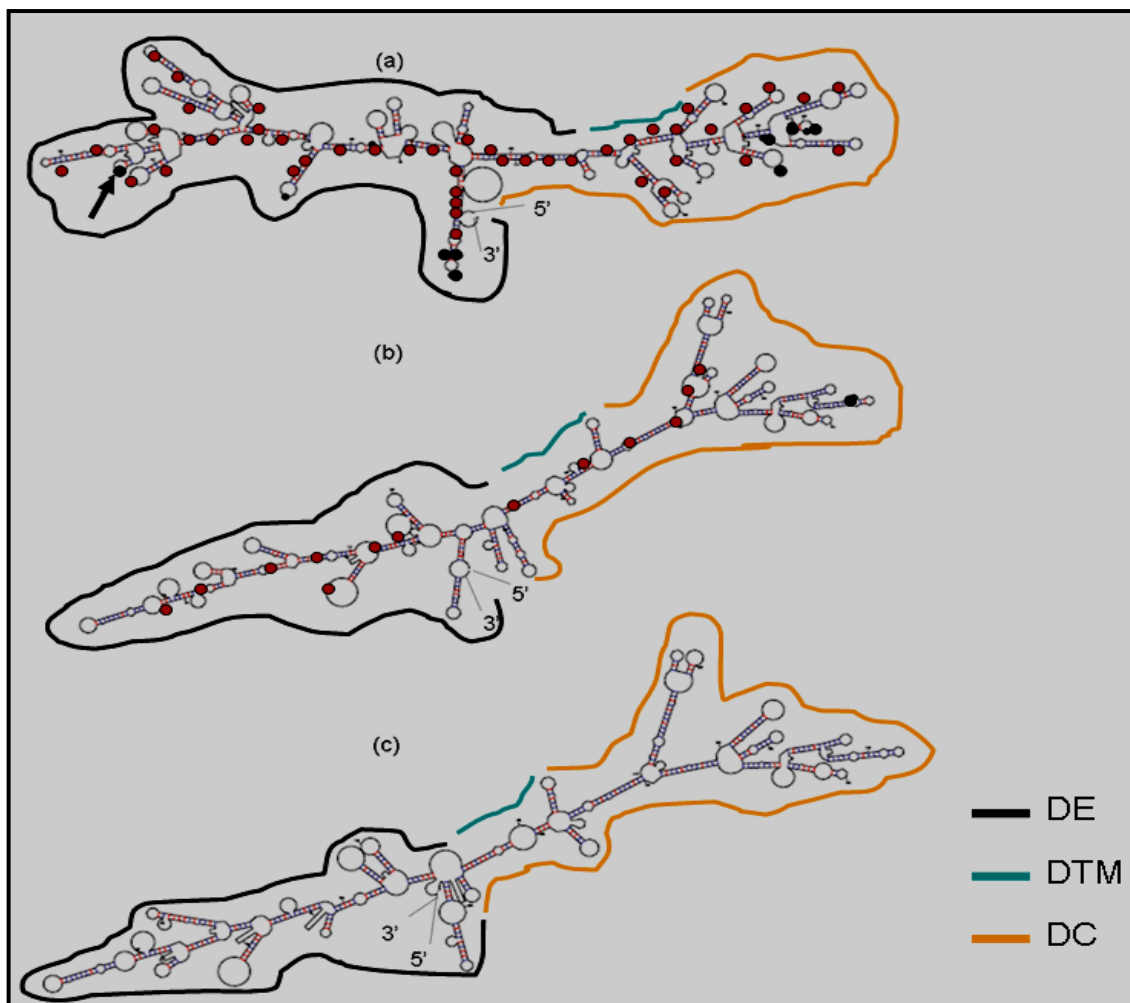


Figura 34 - Representação esquemática da estrutura secundária do RNA (gene Gn) das cepas do VMEL, BE AR 633512 (a), BE AR 8033 (b) e do protótipo TRVL 9375 (c).

Legenda: Pontos vermelhos: mutações silenciosas; pontos pretos: mutações não sinônimas (mudança de aminoácidos); seta indica mudança de aminoácido com alteração no caráter bioquímico; DE: domínio extracelular; DTM: domínio transmembrana; DC: domínio citoplasmático.

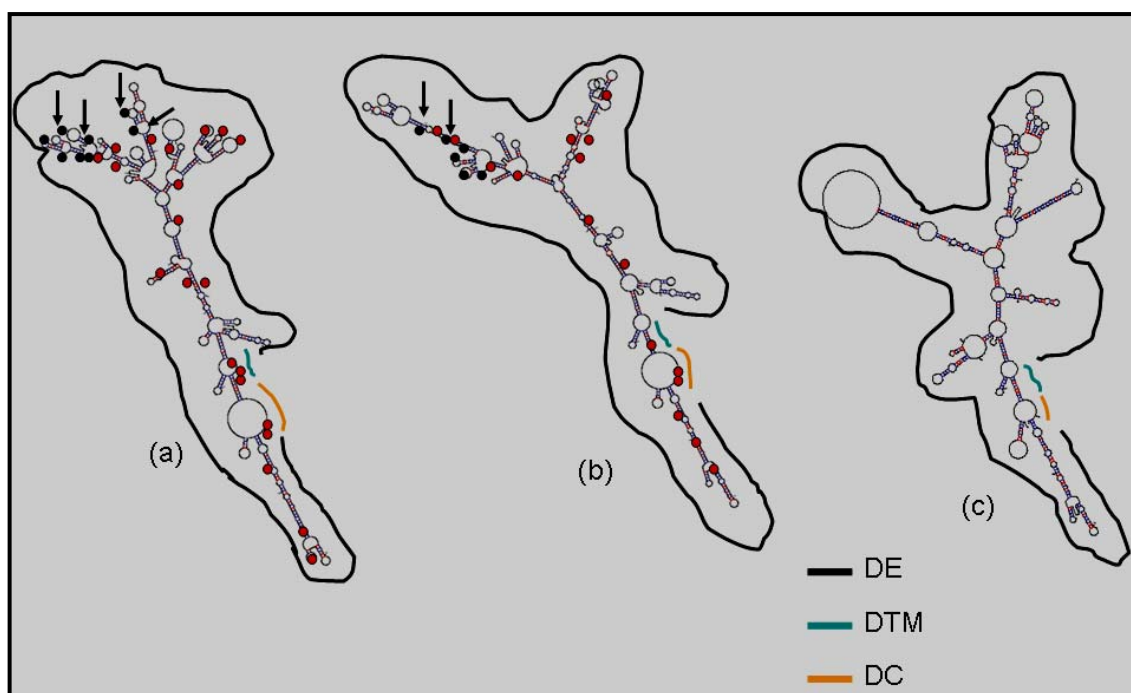


Figura 35 - Representação esquemática da estrutura secundária do RNA (gene Gc) das cepas do VMEL, BE AR 633512 (a), BE AR 8033 (b) e do protótipo TRVL 9375 (c).

Legenda: Pontos vermelhos: mutações silenciosas; pontos pretos: mutações não sinônimas (mudança de aminoácidos); seta indica mudança de aminoácido com alteração no caráter bioquímico; DE: domínio extracelular; DTM: domínio transmembrana; DC: domínio citoplasmático.

4 DISCUSSÃO

O uso de animais de experimentação tem sido muito freqüente para os estudos das lesões teciduais do tropismo viral, da patogenicidade e virulência de arbovírus. Esses animais são de fácil manuseio, custo baixo e comumente são suscetíveis à maioria dos arbovírus registrados no Catálogo Internacional (Karabatsos, 1985). Ademais, para muitos vírus, alguns com grande importância em saúde pública, como por exemplo o VFA e o VORO, estes animais servem de modelo experimental para os estudos acima mencionados (Tesh *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 1981). De posse dessas informações foi que realizamos um estudo experimental com duas cepas do VMEL, em hamsters dourados jovens, que foram infectados via ip. com os isolados BE AR 8033, obtido em 1957 e BE AR 633512 isolado em 2000, portanto 43 anos após o isolamento inicial desse vírus no Brasil. Além disso, realizamos a caracterização molecular dessas cepas do orthobunyavírus Melao, tendo sido completamente seqüenciados os segmentos genômicos P (gene N) e M (genes Gn e Gc), e realizamos ainda, análises da estrutura secundária desses genes das duas cepas, que foram comparadas com o protótipo do VMEL (TRVL 9375), bem como procuramos correlacionar os achados moleculares com as alterações histopatológicas encontradas, principalmente para a cepa BE AR 633512, que parece ter sofrido mutações que aumentaram a patogenicidade e virulência para os hamsters.

Portanto, neste estudo experimental hamsters dourados jovens mostraram-se suscetíveis à infecção pelas cepas do VMEL, principalmente pela cepa BE AR 633512, já que diversos animais infectados com

aproximadamente 6 dpi., apresentaram sinais de doença tais como: incoordenação motora, tremores e paralisia de membro posterior (Figura 11), havendo inclusive quatro hamsters que evoluíram a óbito entre o 6º e o 7º dpi. Interessante, estas manifestações de doença não foram observadas nos hamsters infectados com a cepa BE AR 8033, sinalizando que a cepa BE AR 633512 provavelmente é mais virulenta e/ou mais patogênica que a cepa BE AR 8033 para esses animais. Por outro lado, embora os hamsters infectados com a cepa BE AR 8033 não tenham apresentado sinais de doença, a suscetibilidade desses animais a esta cepa pôde ser confirmada através dos resultados obtidos por sorologia (detecção de viremia e de anticorpos específicos), bem como pelos resultados das análises de histopatologia e imunohistoquímica, com a presença de marcantes lesões teciduais e detecção de antígenos virais nos tecidos estudados, respectivamente.

Travassos da Rosa *et al.* (1997), bem como Karabatsos (1985) fazem referência ao fato dos orthobunyavírus serem patogênicos para camundongos, inclusive o VMEL, e alguns deles também o serem para hamsters. Os resultados deste estudo corroboram esses achados e acrescentam o VMEL, como mais um orthobunyavírus que mostrou ser patogênico para hamsters.

Experimentos realizados por diversos autores com hamsters dourados demonstraram que esses animais são sensíveis a infecções experimentais por diversos arbovírus. De fato, Fisher *et al.* (2003) observaram que hamsters infectados com oito arbovírus dos grupos Punta Toro e Gabek Forest (*Phlebovirus*, *Bunyaviridae*) desenvolveram doença fatal caracterizada por necrose do fígado e do baço e pneumonia intersticial. O exame histológico nos

órgãos desses hamsters revelou alterações patológicas envolvendo múltiplos órgãos semelhantes às descritas para o *Virus Rift Valley*, também um phlebovirus. Por outro lado, L'vov *et al.* (1992) observaram a persistência viral em órgãos de hamsters infectados com diferentes cepas virais do sorogrupo Califórnia (*Orthobunyavirus*), sugerindo que os animais vertebrados possam ter, para esses vírus, também uma função de reservatório da infecção em natureza, além da clássica atuação como hospedeiro.

A viremia da cepa viral BE AR 633512 nos hamsters ocorreu entre o 3º e o 6º dpi. O título mais alto foi alcançado no 3º dpi. ($10^{-4,0}$ DL₅₀/0,02 mL), demonstrando maior concentração do vírus no sangue neste dia. Após o 3º dpi., o título viral decresceu até o 6º dpi., e a partir do 7º dia não foi mais detectada viremia. Já para a cepa BE AR 8033, a viremia nos hamsters só foi detectada no 2º dpi. ($10^{-2,5}$ DL₅₀/0,02 mL).

Esta diferença na intensidade e duração da viremia entre as cepas do VMEL analisadas, pode ser devida, em parte, ao número de passagens prévias em camundongos. De fato, a cepa BE AR 633512 tinha duas passagens prévias em camundongos, enquanto que a cepa BE AR 8033 tinha quatro. É possível, embora pouco provável, que duas passagens a mais expliquem porque a viremia causada por BE AR 8033 foi menor e mais fugaz. Entretanto, é mais provável que a diferença no título viral seja devido à maior virulência da cepa BE AR 633512; isto em parte é verdade, considerando que diversos animais infectados com esta cepa adoeceram, dentre os quais quatro morreram entre o 6º e o 7º dpi., enquanto que a cepa BE AR 8033 não causou morte e nem mesmo sinais de doença foram observados nos animais

infectados. Tais achados sugerem que a cepa BE AR 633512 é mais patogênica e mais virulenta para hamsters infectados via ip. do que a cepa BE AR 8033.

Tesh *et al.* (2001) demonstraram diferenças na patogenicidade de cepas do VFA para hamsters jovens, que apresentaram diferenças nos títulos da viremia e na capacidade de causar doença e morte nos animais infectados. Esses autores observaram que a cepa “Jimenez” do VFA apresentou maior virulência e patogenicidade para esses animais que as outras cepas testadas. Este achado é interessante pois, assim como foi observado para o VFA, também se observou para o VMEL, em que a cepa BE AR 633512 foi mais virulenta e mais patogênica para hamsters.

O título viral obtido em camundongos recém-nascidos (2-3 dias) infectados via ic com a cepa BE AR 633512 foi maior ($10^{-6,7}$ DL₅₀/0,02 mL) que o título viral mais alto obtido a partir de sangue de hamsters infectados com esta mesma cepa ($10^{-4,0}$ DL₅₀/0,02 mL). Isto também foi observado para a cepa BE AR 8033, em que o título viral obtido em camundongos recém-nascidos correspondeu a $10^{-6,5}$ DL₅₀/0,02 mL, enquanto que o título obtido a partir de sangue de hamsters equivaleu a $10^{-2,5}$ DL₅₀/0,02 mL.

Para explicar esta diferença nos títulos virais obtidos nos diferentes animais, camundongo recém-nascido e hamster, deve-se considerar algumas variáveis que influenciam o curso da infecção como a idade do hospedeiro, a virulência, a dose inoculada de vírus e a via de inoculação (Gonzalez-Scarano & Nathanson, 1996), e para tal, essa diferença nos títulos virais nessas duas espécies de animais pode ser explicada pela maior suscetibilidade dos

camundongos recém-nascidos à infecção viral em comparação aos hamsters dourados jovens, baseando-se na diferença na idade desses animais, sendo que camundongos recém-nascidos ainda não apresentam o sistema imunológico bem desenvolvido, e é também por este fato que, juntamente com os cultivos celulares, os camundongos recém-nascidos constituem um dos métodos mais sensíveis para o isolamento da maioria dos arbovírus (Vieira, 1995).

Neste estudo, os camundongos recém-nascidos foram utilizados para a preparação do estoque viral das cepas do VMEL, BE AR 633512 e BE AR 8033. Esses animais apresentaram sinais de doença e morreram com aproximadamente 2 a 3 dpi. Além disso, deve ser levada em consideração a questão da via de inoculação utilizada para as duas espécies de animais, pois os camundongos foram infectados por via intracerebral e os hamsters por via intraperitoneal, o que comumente resulta em diferenças no título, sendo geralmente maior quando o vírus é infectado pela via central (ic) do que pelas vias periféricas (ip., sc., entre outras).

O teste de neutralização é um dos métodos mais eficazes para a pesquisa de anticorpos em virologia, inclusive para o estudo dos vírus do sorogrupo Califórnia. O princípio desse teste consiste no bloqueio das partículas virais por anticorpos específicos resultando na neutralização viral por anticorpos específicos produzidos contra a glicoproteína Gc, que é a glicoproteína responsável pela fusão do vírus com receptores celulares ao nível da membrana (Gonzalez-Scarano *et al.*, 1982).

Neste estudo, testes de neutralização foram realizados com o intuito de detectar anticorpos neutralizantes em soros de hamsters e verificar a dinâmica dos mesmos durante a infecção. Interessante, os anticorpos neutralizantes contra as duas cepas do VMEL, BE AR 633512 e BE AR 8033 foram detectados a partir do 5° até o 30° dpi., indicando assim que esses anticorpos aparecem em títulos detectáveis no soro, com aproximadamente 5 dpi. e se mantêm com elevados títulos pelo menos até um mês após a inoculação, que nesse experimento correspondeu ao maior período utilizado para obtenção e análise sorológica por neutralização. O título de anticorpos neutralizantes contra a cepa BE AR 633512 no 5° dpi. foi maior que o alcançado pela cepa BE AR 8033, embora esta última cepa tenha alcançado um título que aparentemente superou o título da primeira a partir do 10° até o 30° dpi.

A imunogenicidade pode ser definida como a propriedade que um agente infeccioso ou substância tem de induzir uma resposta imunológica detectável, podendo ser avaliada pela detecção de anticorpos específicos contra o mesmo. Além disso, esta propriedade é específica de cada agente ou substância. Oliveira *et al.* (2004) referiram sobre o Vírus da Poliomielite, que dentre os três sorotipos do poliovírus, o sorotipo I é o mais patogênico e o sorotipo II é o que apresenta menor patogenicidade. Entretanto, esse quadro muda quando se trata da imunogenicidade dos sorotipos, tendo sido observado que o sorotipo II apresenta maior imunogenicidade, seguido pelos sorotipos I e III. Assim, como observado no caso dos sorotipos do poliovírus, pode-se também explicar a diferença nos títulos de anticorpos neutralizantes contra as cepas do VMEL, BE AR 633512 e BE AR 8033, inferindo que a cepa BE AR

8033 provavelmente é mais imunogênica para hamsters dourados jovens que a cepa BE AR 633512, mesmo sendo esta última mais patogênica e virulenta para esses animais que a primeira. Esta mudança de imunogenicidade pode ser devida às mutações ocorridas ao nível das glicoproteínas virais, Gn e Gc, da cepa BE AR 633512, já que o teste de neutralização detecta anticorpos produzidos contra as glicoproteínas virais.

As cepas do VMEL BE AR 633512 e BE AR 8033 promoveram infecções pantrópicas, causando lesões histológicas no SNC (meninges, cérebro, entre outros), fígado, rim e baço dos hamsters infectados via ip. O espectro lesional variou em intensidade e amplitude entre o 1º e o 7º dpi. e no 21 dpi., com pico de intensidade entre o 6º e o 7º dpi. nos diferentes órgãos acometidos e para as duas cepas. Interessante, L'vov *et al.* (1991) referem que o arbovírus Issyk-kul (vírus não grupado da Família *Bunyaviridae*), foi capaz de provocar alterações histológicas de caráter inflamatório no SNC, pulmão, fígado e rim, do mesmo modo que foi observado para as cepas do VMEL deste estudo.

Por outro lado, de acordo com Dias (1986), o neurotropismo dos arbovírus em camundongos recém-nascidos e em adultos, é evidenciado pela ocorrência de encefalite. Ressalte-se que diversos arbovírus da família *Bunyaviridae* causam doença neurológica em humanos, dentre os quais, podem ser citados os vírus do sorogrupo Califórnia, em especial o *Virus La Crosse*, que tem sido associado como agente causal de encefalite em indivíduos naturalmente infectados (Gonzalez-Scarano & Nathanson, 1996). Assim, o neurotropismo típico dos arbovírus, e em particular dos vírus do sorogrupo Califórnia, também pôde ser observado em hamsters jovens para as

cepas do VMEL, BE AR 633512 e BE AR 8033. Curiosamente, a virulência e a patogenicidade foram mais intensas nos animais infectados com a cepa BE AR 633512.

Dias (1986) ainda analisando as alterações causadas por arbovírus, referiu que estes vírus causam mais comumente no SNC de camundongos, lesões como respostas proliferativas gliais, fenômenos inflamatórios, em que predominam células mononucleares, em especial os linfócitos, assim como, infiltração meníngea pelas mesmas células, além de células nervosas que se mostram com núcleo picnótico, podendo ainda as mesmas apresentarem cariorrexis. L'vov *et al.* (1992) em trabalho experimental comparativo entre novas cepas do sorogrupo Califórnia, utilizando camundongos, hamsters e macacos verdes africanos observaram que todas as cepas analisadas apresentaram um marcante tropismo para o SNC em todos os animais estudados. Já os estudos desenvolvidos por Pekosk *et al.* (1996) com o *Virus La Crosse*, mostraram que este orthobunyavirus promove destruição neuronal no SNC de camundongos, além de poder causar também apoptose ou morte celular programada.

No estudo em pauta, os hamsters infectados apresentaram lesões intensas no SNC, seja na meninge, onde causaram meningite com grande infiltrado inflamatório, seja no parênquima cerebral, com lesões neuronais intensas causadas pelas duas cepas virais. Como foi utilizada uma via periférica (ip.) para inoculação, e o vírus atingiu o SNC, fica claro que o VMEL consegue penetrar no SNC pela via hematogênica, sendo introduzido, possivelmente, pelas meninges.

Considerando-se os resultados obtidos neste estudo, pode-se confirmar que as cepas do VMEL, BE AR 633512 e BE AR 8033, se incluem no grupo de arbovírus capazes de causar encefalite em hamsters (Travassos da Rosa *et al.*, 1998; Dias, 1986; Gonzalez- Scarano & Nathanson, 1996).

O fígado, depois do SNC, parece ser o órgão alvo mais freqüente de agressão pelos arbovírus nos camundongos albinos suíços recém-nascidos (Dias, 1986). Sabe-se também que, hamsters infectados experimentalmente com diversos arbovírus desenvolvem lesões hepáticas importantes, que podem resultar na morte desses animais (Tesh *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2003). Neste estudo, desenvolvido com cepas do VMEL, isto pôde ser confirmado em hamsters, pois observou-se neurotropismo e viscerotropismo, sendo o fígado, a víscera que apresentou maior comprometimento tecidual, exibindo lesões mais intensas. Dias (1986) referiu ainda que alguns vírus do grupo C, mesma família e gênero das cepas do VMEL, exibem um padrão semelhante àquele de hepatite viral causado pelo VFA. Este padrão de hepatite semelhante à amarílica apresentado pelos orthobunyavírus do grupo C, também foi observado na infecção via ip. de hamsters com as cepas BE AR 633512 e BE AR 8033, sendo que o viscerotropismo da primeira cepa foi aparentemente mais intenso para o fígado.

Os achados no fígado dos hamsters infectados com as cepas do VMEL apontam para um acometimento agudo do parênquima hepático, o que não levaria a um processo fibrosante, como observado em infecções hepáticas crônicas persistentes do tipo hepatite C (*Hepacivirus*, *Flaviviridae*) e, ao contrário lembram as lesões causadas pelo VFA (Xiao *et al.*, 2001).

De acordo com Dias (1986), as principais lesões causadas por arbovírus no fígado são: a presença de infiltrados celulares inflamatórios e necrose. Por outro lado, Xiao *et al.* (2001) em um estudo experimental com o VFA em hamsters jovens observaram diversas alterações, entre as quais, presença de infiltrado de células inflamatórias mononucleares e degeneração de hepatócitos, esteatose, entre outras lesões muito semelhantes às observadas em casos humanos de Febre Amarela, como descrito em diversos trabalhos (Quaresma *et al.*, 2005; 2007). Neste estudo experimental com cepas do VMEL foram observados resultados semelhantes para esta víscera nos hamsters dourados jovens.

Dias (1986) observou também que alguns arbovírus são capazes de promover lesões em rim de camundongos, tais como glomerulite hemorrágica, gigantismo das células tubulares, além de lesões no interstício renal. Por outro lado, Martins *et al.* (2007) estudando as alterações patológicas provocadas pelo arbovírus Minaçu pertencente ao gênero *Orbivirus* da família *Reoviridae*, mencionaram que no rim de camundongos recém-nascidos infectados ocorre a tumefação das células tubulares e congestão do interstício. Já L'vov *et al.* (1991) observaram alterações inflamatórias nos rins de macacos verdes africanos, hamsters dourados e camundongos em estudos experimentais com o *Virus Issyk-Kul*; enquanto que Fisher *et al.* (2003) mencionaram que alguns phlebovírus, como o *Virus Gabek Forest* promovem alterações teciduais no rim de hamsters tais como necrose glomerular.

Quanto ao baço de camundongos infectados pelo orbivírus Minaçu, Martins *et al.* (2007) detectaram congestão da polpa branca e da polpa

vermelha. Já Xiao *et al.* (2001) citaram a respeito de lesões esplênicas causadas pelo VFA, a expansão da polpa branca em hamsters jovens.

Esses achados sobre rim e baço, dos estudos anteriormente mencionados, com outros arbovírus, são muito semelhantes aos resultados obtidos para esses mesmos órgãos, nos hamsters infectados com as cepas do VMEL, sendo interessante citar que alguns dos hamsters infectados com as cepas do VMEL, BE AR 633512 e BE AR 8033 apresentaram esplenomegalia entre o 6º e o 7º dpi. (dado não mostrado).

O pulmão e o coração apresentaram alterações teciduais discretas observadas sobretudo no 7º dpi. e que se caracterizaram mais como alterações decorrentes de distúrbios sistêmicos conseqüentes à infecção, que propriamente devido à lesão tecidual decorrente do tropismo viral, sendo este aspecto confirmado pelo teste de imunohistoquímica, que não mostrou reatividade para o antígeno do VMEL nesses órgãos.

Os resultados obtidos na histopatologia e imunohistoquímica do fígado e do rim dos hamsters infectados via ip. com as cepas do VMEL, BE AR 633512 e BE AR 8033, podem ser corroborados, respectivamente, pelos resultados obtidos na análise das funções hepática (ALT e AST) e renal (uréia e creatinina) deste trabalho, já que em caso de lesão tecidual nesses órgãos, os marcadores bioquímicos costumam se alterar. Desta forma, a cepa BE AR 633512, que na análise histopatológica, promoveu lesões mais acentuadas no fígado e rim quando comparada com a cepa BE AR 8033, apresentou todos os marcadores bioquímicos analisados (AST, ALT, uréia e creatinina) com alteração estatisticamente significativa, em comparação com o grupo controle, o

que não foi observado para a cepa BE AR 8033, em que os marcadores alterados significativamente foram: AST, ALT e uréia. Além disso, os indicadores bioquímicos uréia, creatinina e AST nos animais infectados com a cepa BE AR 633512 apresentaram-se com valores mais alterados que os observados para a cepa BE AR 8033 (Figuras 22, 23 e 24). Apenas a ALT apresentou-se mais alterada nos animais infectados com a cepa BE AR 8033, sendo que as razões dessa maior elevação permanecem desconhecidas (Figura 25).

Tesh *et al.* (2001) trabalhando com VFA também observaram elevação da ALT, que segundo esses autores é uma das medidas mais específicas de necrose hepática. Vasconcelos *et al.* (2003) e Tuboi *et al.* (2007) em trabalhos com o VFA em humanos verificaram que os níveis plasmáticos das aminotransferases encontraram-se aumentados, e esses níveis começaram a subir no 2º dpi. e encontraram-se muitas vezes acima dos valores normais a partir do 6º dpi., sendo relatado ainda por esses mesmos autores, que em nível renal, as principais alterações ocasionadas pelo VFA em humanos e hamsters são decorrentes da necrose tubular aguda e, como conseqüências, são observadas elevações dos níveis plasmáticos de uréia e creatinina.

Xiao *et al.* (2001), Tesh *et al.* (2001) e Vasconcelos (2003) consideraram que os hamsters têm sido usados como excelente modelo alternativo para o estudo do viscerotropismo do VFA. Esses autores, encontraram inclusive necrose médio-zonal no fígado semelhante à encontrada no homem. Em conformidade aos resultados deste trabalho, anteriormente citados, pode-se também considerar os hamsters como um excelente modelo experimental

animal para as cepas do VMEL em estudo. De fato, os resultados obtidos a partir dos estudos histopatológicos, bioquímicos e imunológicos indicam que o hamster deva ser considerado como modelo animal para infecção experimental das cepas do VMEL, BE AR 633512 e BE AR 8033.

Estudos moleculares envolvendo os orthobunyavírus, no que tange o sequenciamento nucleotídico parcial ou completo dos segmentos genômicos, possibilidade de rearranjo genético em natureza (Guerrard *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2005) vêm contribuindo substancialmente para o melhor entendimento do relacionamento genético entre estes vírus, desenvolvimento de métodos rápidos para diagnóstico, bem como para elucidar o mecanismo pelo qual estes agentes virais evoluem.

A análise genética dos genes N (P-RNA), Gn e Gc (M-RNA) para as cepas do VMEL neste estudo revelaram que, no caso dos genes N e Gn, a cepa do VMEL BE AR 8033 e o protótipo TRVL 9375 se mostraram geneticamente mais relacionados entre si do que com a cepa BE AR 633512, sendo que maior variabilidade genética foi observada principalmente ao nível do gene Gn (Quadro 4; Figuras 31 e 32). Interessante, no que tange ao gene Gc, observou-se uma mudança no relacionamento genético das cepas estudadas com o protótipo, estando a cepa BE AR 633512 mais geneticamente relacionada com a cepa BE AR 8033 (Quadro 4; Figura 33).

Mudanças aminoacídicas e nucleotídicas ao nível do gene Gc de diferentes cepas do *Virus La Crosse* foram observadas após diversas passagens em cultura de células BHK-21 (células renais de hamsters recém-

nascidos) evidenciando a constituição de linhagens virais adaptadas ao tipo celular (Borucki *et al.*, 2001).

A variabilidade genética, no que se refere à presença de mutações em um dado segmento genômico pode acarretar ou não mudanças no comportamento biológico dos vírus. Especificamente para os orthobunyavírus, estudos realizados com o *Virus Bunyamwera* indicam que mutações ocorridas no sítio de glicosilação N60 (N→Q) ao nível do gene Gn resultam no empacotamento inapropriado da proteína, bem como inviabilizam o transporte das proteínas Gn e Gc para o complexo de Golgi aonde ocorre a montagem do vírus e sua posterior liberação (Shi *et al.*, 2005; Salanueva *et al.*, 2003)

Para o VMEL, a análise dos genes N, Gn e Gc evidenciou que as glicoproteínas de superfície do envelope viral codificadas pelos genes Gn e Gc foram mais variáveis geneticamente apresentando um grande número de mutações silenciosas e algumas mutações do tipo sinônimas. A cepa BE AR 633512 foi a que mostrou maior divergência genética, sendo que tais mutações, independente do gene analisado (Gn ou Gc) ocorreram em maior número ao nível do domínio extracelular destes genes, domínio este que parece exercer um papel crítico no processo de ligação do vírus às células suscetíveis, bem como exercem uma função no processo de fusão do envelope viral à membrana celular (Pekosz & Gonzales-Scarano, 1996).

Observaram-se também importantes mutações ocorridas na cepa BE AR 633512, em dois sítios de glicosilação, um no gene Gn (resíduo N 57; NDTG) e outro no gene Gc (resíduo N 667; NSSL) sendo a primeira considerada uma mutação do tipo sinônima e a segunda do tipo silenciosa. A correlação dos

dados genéticos aos obtidos no estudo experimental (lesões histopatológicas) são concordantes pois foi possível observar que a cepa BE AR 633512 mostrou-se mais virulenta para hamsters quando comparada com a cepa BE AR 8033, sugerindo que as alterações genéticas e estruturais ocorridas no segmento M possam estar relacionadas à maior severidade na patogenicidade para hamsters expressa pela cepa BE AR 633512. No entanto, estudos complementares sobre mutagênese e genética reversa tornam-se necessários para avaliar de forma efetiva o papel destas alterações na exacerbação da virulência do VMEL, cepa BE AR 633512.

A glicoproteína Gc, provavelmente tem função na fusão peptídica, sendo muito importante para a neuropatogênese do *Virus La Crosse* (Plassmeyer *et al.* 2007). Isto também pôde ser evidenciado neste trabalho, em que as mutações ocorridas ao nível do gene Gc da cepa BE AR 633512 podem ter sido responsáveis pela maior patogenicidade e virulência nos animais infectados via ip. com esta cepa em comparação à cepa BE AR 8033.

Em termos filogenéticos, a análise realizada para os segmentos P (gene N) e M (genes Gn e Gc) corroboram os resultados previamente obtidos por Bowen *et al.*(1995) e Campbell & Huang (1999), bem como os dados sorológicos (Bishop, 1985; Calisher & Karabatsos, 1988), que incluem o VMEL no complexo Melao do sorogrupo Califórnia, separadamente dos membros pertencentes aos demais complexos denominados California encephalitis, Trivittatus e Guaroa, sendo que este último complexo só tem sido incluído no sorogrupo Califórnia, com base nos estudos sorológicos, não tendo sido incluído nos estudos moleculares (Bowen *et al.*, 1995; Campbell & Huang,

1999), assim como também não foi incluído neste trabalho. Segundo Fauquet et al. (2005) o *Virus Guaroa* se encontra classificado em um grupo separado.

As árvores filogenéticas construídas para os segmentos P e M do VMEL evidenciaram topologias distintas, sendo que pelo segmento P, o mesmo se relacionou com o orthobunyavírus norte americano Keystone (VKEY), enquanto que pelo segmento M, maior similaridade foi observada com o orthobunyavírus brasileiro Serra do Navio (VSDN). As razões dessas diferenças permanecem pouco esclarecidas, mas é possível especular que tais mudanças possam representar passos evolutivos do VMEL. De fato, é possível que a cepa BE AR 633512 seja um mutante que esteja evoluindo, e que tal evolução possa, ao longo de mais de quatro décadas, ter tornado o VMEL mais virulento do que na década de 1950, quando foi isolado pela primeira vez.

As topologias das árvores filogenéticas obtidas pelos métodos de MP e NJ para os segmentos P e M do VMEL foram testadas uma contra a outra empregando o método de MV. Os resultados foram significativos ($p < 0,0001$) e sugerem que as topologias obtidas para os segmentos genômicos P e M-RNA em relação aos VKEY e VSDN são significativamente diferentes, sugerindo que cada segmento de RNA apresenta diferente origem evolutiva, e provavelmente diferem em seus ancestrais, como anteriormente descrito para outros orthobunyavírus (Nunes *et al.*, 2005).

Por outro lado, os resultados obtidos no estudo experimental com as cepas do VMEL são corroborados pelos resultados da biologia molecular deste trabalho. De fato, os resultados de seqüenciamento nucleotídico e análise filogenética, bem como àqueles obtidos pela análise da estrutura secundária

mostram que, para os genes N e Gn, a cepa BE AR 633512 apresentou-se mais distante filogeneticamente da cepa brasileira inicialmente isolada, BE AR 8033 e do protótipo TRVL 9375, obtido em Trinidad e que foram isoladas 43 e 45 anos antes, respectivamente (Spence *et al.*, 1962; Karabatsos, 1985). Quanto ao gene Gc, a cepa BE AR 633512 mostrou-se mais geneticamente relacionada com a cepa BE AR 8033.

Embora ao nível do gene Gc, que codifica a glicoproteína Gc, possível responsável pela adsorção viral em células do hospedeiro vertebrado, como as de hamsters, a cepa BE AR 633512 tenha apresentado um relacionamento mais próximo da cepa BE AR 8033, as alterações histopatológicas mais intensas em hamsters infectados com a cepa BE AR 633512 em comparação com a cepa BE AR 8033, podem possivelmente ser explicadas pelas mutações observadas ao longo do gene Gc, que embora tenham ocorrido em número menor que as observadas para o gene Gn, são mutações muito importantes, significantes, haja vista que muitas dessas alterações são do tipo não sinônimas, as quais resultaram em troca de aminoácidos (Dunn *et al.*, 1994; Gonzalez-Scarano *et al.*, 1989; Kingsford & Boucquey, 1991; Plassmeyer *et al.* 2005).

É possível que tais mutações possam ter promovido o aumento da patogenicidade e virulência da cepa BE AR 633512 para hamsters dourados jovens, já que muitos aminoácidos substituídos foram acompanhados de mudança na função bioquímica dos mesmos (Plassmeyer *et al.*, 2005), tornando plausível supor que estão associadas às mudanças na patogenicidade da cepa BE AR 633512 para os hamsters. Novos experimentos

devem ser feitos para confirmar essa hipótese. A produção de anticorpos específicos para a região mutante deve ajudar no entendimento dessa situação (Gonzalez-Scarano *et al.*, 1982; Plassmeyer *et al.*, 2007), bem como experimentos com outros animais, como cobaias, coelhos, entre outros podem ajudar a entender a maior severidade dessa cepa isolada em 2000.

Os achados deste trabalho são pioneiros no que diz respeito à correlação realizada entre a patologia e biologia molecular do VMEL, principalmente no que se trata da cepa BE AR 633512. Espera-se que os resultados obtidos neste trabalho possam contribuir no sentido de levar ao conhecimento da comunidade científica que uma nova variante do VMEL, cepa BE AR 633512, aparentemente, mais virulenta estava circulando na Região Amazônica, no ano 2000.

5 CONCLUSÕES

- As cepas do VMEL, BE AR 633512 e BE AR 8033, causaram viremia em hamsters, que foi detectada entre o 3º e o 6º dpi. para a primeira cepa, e no 2º dpi. para a segunda; sendo capazes, estas duas cepas do VMEL, de induzir a produção de anticorpos neutralizantes, os quais foram detectados nos soros dos hamsters a partir do 5º e persistem pelo menos até o 30º dpi;
- Os marcadores bioquímicos de função hepática (AST e ALT) e de função renal (uréia e creatinina) apresentaram-se com alteração significativa estatisticamente nos soros dos hamsters infectados com a cepa BE AR 633512 em comparação com os animais controle, bem como nos dos animais infectados pela cepa BE AR 8033, a qual só não alterou a creatinina;
- As cepas do VMEL BE AR 633512 e BE AR 8033 causam alterações em diversos órgãos de hamsters, sendo que no SNC, fígado, rim e baço houve detecção de antígenos virais por imunohistoquímica;
- As cepas BE AR 633512 e BE AR 8033, apresentam neurotropismo e viscerotropismo para hamsters dourados, sendo que primeira é mais patogênica que a segunda, sendo inclusive capaz de causar a morte de hamsters jovens infectados por via ip., podendo estes animais serem usados como modelo experimental para estudo do VMEL;
- Os genes N (segmento P-RNA) e Gc (segmento M-RNA) das cepas do VMEL são altamente conservados entre si (identidade nucleotídica entre 93,6% e 98,6%). No entanto, em relação ao gene Gn (segmento M- RNA), a cepa BE AR 633512 mostrou divergência genética que variou de 12,4% a 13,9% em relação ao protótipo e à cepa BE AR 8033, e essa variabilidade genética

encontrada foi decorrente de mutações, em sua maioria silenciosas, ocorridas ao longo do gene;

- A estrutura secundária do RNA dos genes Gn e Gc da cepa BE AR 633512 mostrou maior diferença genética em comparação a cepa BE AR 8033 e ao protótipo TRVL 9375;

- A análise filogenética realizada pelos métodos de NJ e MP evidenciou que o segmento P- RNA (gene N) do VMEL é geneticamente mais relacionado ao orthobunyavírus Norte Americano Keystone, enquanto que os genes Gn e Gc (M- RNA) são mais relacionados ao orthobunyavírus Sul Americano Serra do Navio;

- Os resultados obtidos pela análise de MV para os segmentos de RNA do VMEL seqüenciados mostraram que as topologias obtidas para os segmentos genômicos P e M- RNA são significativamente diferentes, sugerindo que cada segmento de RNA apresenta diferente origem evolutiva;

- Considerando os resultados de todas as análises realizadas neste trabalho conclui-se que a variante genética do VMEL, BE AR 633512 é mais virulenta e patogênica para hamsters que a cepa BE AR 8033, e que possivelmente isto se deve às mutações encontradas ao longo do gene Gc.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S. F., GISH, W. Local alignment statistics. **Methods on Enzymology**, **266**: 460-480, 1996.
- ARAUJO, R., DIAS, L. B., HUTH, F. Veränderungen von y Mausenieren nach experimenteller Infektion mit Mucambo Vírus. **Virchows Archiv Abteilung A Pathologische Anatomie**, **354**: 312-323, 1971.
- ARAUJO, R, DIAS, L. B., ARAUJO, M. T. F., PINHEIRO, F. P., OLIVA, O. F. P. Alterações ultra-estruturais no fígado de hamster pós-inoculação experimental com arbovírus Oropouche (Tipo Be An 19991). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **20**: 45-54, 1977.
- ARNELL, J. H. A revision of scapularis group of *Aedes* (*Ochlerotatus*). **Contribution American Entomology Institute Mosquito Studies. XXXIII**, **13**: 1-144, 1976.
- ARTSOB, H. Distribution of California serogroup viruses and virus infection in Canada. In: **California Serogroup Viruses**. Calisher, C.H., Thompson, W.H. (eds.). New York, AR Liss, 1983.p. 277-292.
- AYRES, M., JUNIOR-AYRES, M., AYRES, D. L., SANTOS, A. S. **BioEstat 4.0**. Aplicações estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas. Sociedade Civil Mamirauá/ MCT-CNPQ/ Conservation International. 2005. 324p.
- 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. (eds.). Boca Raton, CRC Press, 1988. p.127-152.

- BEATY, B., CALISHER, C. H., SHOPE, R. E. Arbovirus In: **Diagnostic Procedure for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections**. Schmidt, N. I., Emmons, R. W. (eds.). 6th Edition. Washington, American Public Health Association, 1989. p.795-855.
- BISHOP, D. H., Genetic potential of bunyaviruses. **Current Topics in Microbiology and Immunology, 86**: 1-33, 1979.
- BISHOP, D. H., CALISHER, C. H., CASALS, J., CHUMAKOV, M. P., GAIDAMOVICH, S. Y., HANNOUN, C., LVOC, D. K., MARSHALL, I. D., OKER-BLOM, N., PETTERSSON, R. F., PORTERFIELD, J. S., RUSSELL, P. K., SHOPE, R. E., WESTAWAY, E. G. *Bunyaviridae*. **Intervirology, 14**: 125-143, 1980.
- BISHOP, D. H. L. The genetic basis for describing viruses as species. **Intervirology, 24**: 79-93, 1985.
- BORUCKI, M. K., KEMPF, B. J., BLAIR, C. D., BEATY, B. J. The effect of mosquito passage on the La Crosse virus genotype. **Journal of General Virology, 82 (12)**: 2919-26, 2001.
- BOWEN, M. D., JACKSON, A. O., BRUNS, T. D., HACKER, D. L., HARDY, J. L. Determination and comparative analysis of the small RNA genomic sequences of California encephalitis, Jamestown Canyon, Jerry Slough, Melao, Keystone and Trivittatus viruses (*Bunyaviridae*, genus *Bunyavirus*, California serogroup). **Journal of General Virology, 76**: 559-72, 1995.
- 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. Taxonomy, classification, and geographic distribution of California serogroup bunyaviruses. In: **California Serogroup Viruses**. Calisher, C.H., Thompson, W.H. (eds.). New York, AR Liss, 1983. p. 1-18.
- CALISHER, C. H., MONATH, T. P., SABATTINI, M. S., MITCHELL, C. J., LAZUICK, J.S., TESH, R.B., CROPP, C.B. A newly recognized vesiculovirus, Calchaqui virus, and subtypes of Melao and Maguari viruses from Argentina, with serologic evidence for infections of humans and horses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 36(1)**: 114-9, 1987.
- CALISHER, C. H., KARABATSOS, N. Arbovirus serogroup: definition and geographic distribution. In: **The Arbovirus: Epidemiology and Ecology**. Monath, T. P. (eds.). CRC Press. 1: 1988. p. 19-57.
- CAMPBELL, W. P., HUANG, C. Sequence comparisons of medium RNA segment among 15 California serogroup viruses. **Virus Research, 61(2)**: 137-44, 1999.
- CASALS, J. Immunological Techniques for animais viruses. In: **Methods in Virology**. Maramorosh, K., Koprowski, H. (eds.). New York, Academic Press. 3: 1967. p. 75-81.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Summary of notifiable diseases, United States, 1998**. MMWR. Morbidity and mortality weekly report, 1998.p.303-309.

- CHU, Y., ROSSI, C., LEDUC, J. W., LEE, H. W., SCHMALJOHN, C. S., DALYRIMPLE, J.M. Serological relationships among viruses in the *Hantavirus* genus, family *Bunyaviridae*. **Virology**, **198**: 196-204, 1994.
- CONSOLI, R. A. G. B., OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 20.ed. Rio de Janeiro, Fiocruz, 1994. 103p., 120p.
- DANIELOVA, V. Growth of Tahyna virus at low temperatures. **Acta Virologica**, **19**: 327-332, 1975.
- DÈGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., HERVÉ, J. P., VASCONCELOS, P.F.C., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S., SÁ-FILHO, G.C., PINHEIRO, F.P. Modifications of arbovirus eco-epidemiology in Tucuruí, Pará, Brazil, related to the construction of a hydroelectric dam. In: **Proceedings, V Symposium on Arbovirus Research in Australia**. Uren, M.F., Blok, J., Manderson, K.H. (eds.). Brisbane, 1989. p. 124-135.
- DEIBEL, R., SRIHONGSE, S., GRAYSON, M. A., GRIMSTAD, P. R., MAHDY, M.S., ARTSOB, H., CALISHER, C.H. Jamestown Canyon virus: the etiologic agent of an emerging human disease? In: **California Serogroup Viruses**. Calisher, C. H., Thompson, W. H. (eds.). New York, AR Liss, 1983. p. 313-325.
- DE PAOLA, D. **Contribuição ao estudo da Patologia das Arboviroses**. Tese, Rio de Janeiro, 1972.
- DIAS, L. B., DUARTE, F., DE PAOLA, D. Lesões pouco usuais na histopatologia experimental de arbovírus amazônicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **6**: 135-145, 1972.

- DIAS, L. B. Patologia natural e experimental de arbovírus vírus correlatos isolados na Amazônia. In: **Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical**. vol. 1. Belém: Fundação de Serviços de Saúde Pública, 1986. p.439-450.
- DUNN, E.F., PRITLOVE, D.C., ELLIOTT, R.M. The SRNA genome segments of Batai, Cache Valley, Guaroa, Kairi, Lumbo, Main, Drain and Northway Bunyaviruses: sequence determination and analyses. **Journal of General Virology**, **70**: 597-608, 1994.
- ELDRIDGE, B. F., GLASER, C., PEDRIN, R. E., CHILES, E. E. The first reported case of California encephalitis in more than 50 years. **Emerging Infectious Diseases**, **7(3)**: 451-2, 2001.
- ELLIOT, R. M. Molecular biology of *Bunyaviridae*. **Journal of General Virology**, **71**: 501-522, 1990.
- 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. (eds.). 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.
- 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.
- FONSECA, B. A. L., FIGUEIREDO, L. T. M. Febre Amarela. In: **Tratado de Infectologia**. Veronesi, R., Focaccia, R. (eds.). São Paulo, Editora Atheneu, 1996. p. 251-257.
- FORATTINI, O. P., GOMES, A. C., GALATI, E. A. B., RABELLO E. X., IVERSSON, L. B. Estudos ecológicos sobre mosquitos *Culicidae* no Sistema da Serra do Mar, Brasil. 1- Observações no ambiente extradomiciliar. **Revista de Saúde Pública**, **12**: 297-325, 1978.
- FORATTINI, O. P., GOMES, A. C., NATAL, D., SANTOS, J. L. F. Observações sobre atividade de mosquitos *Culicidae* em matas primitivas da planície e perfis epidemiológicos de vários ambientes no Vale da Ribeira, São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, **20**: 178-203, 1986.
- FORATTINI, O. P., GOMES, A. C., SANTOS, J. L. F., KAKITANI, I., MARUCCI, D. Frequência ao ambiente humano e dispersão de mosquitos *Culicidae* em área adjacente à mata atlântica primitiva da planície. **Revista de Saúde Pública**, **24 (2)**: 101-7, 1990.
- GERRARD, S. R., LI, L., BARRETT, A. D., NICHOL, S. T. Ngari virus is a Bunyamwera virus reassortant that can be associated with large outbreaks of hemorrhagic fever in Africa. **Journal of Virology**, **16**: 8922-6, 2004.
- GOLDMAN, N., ANDERSON, J. P., RODRIGO, A. G. Likelihood-Based test of Topologies in Phylogenetics. **Systematic Biology**, **49(4)**: 652-670, 2000.
- GONZALEZ-SCARANO, F., SHOPE, R. E., CALISHER, C. H., NATHANSON, N. Characterization of monoclonal antibodies against the G1 and N proteins

- of La Crosse and Tahyna, two California serogroup bunyaviruses. **Virology**, **120**: 42-53, 1982.
- GONZALEZ-SCARANO, F. La Crosse virus G1 glycoprotein undergoes a conformational change at the PH of fusion. **Virology**, **140**: 209-216, 1985.
- GONZALEZ-SCARANO, F., POBJECKY, N., NATHANSON, N. The fusion function of La Crosse bunyavirus is associated with the G1 glycoprotein. In: **The biology of negative strand viruses**. Maby, D.B., Kolakofsky, D. (eds.) Amsterdam, Elsevier, 1987. p. 33-39.
- GONZALEZ-SCARANO, F., BEATY, B., SUNDIN, D., JANSSEN, R., ENDRES, M. J., NATHANSON, N. Genetic determinants of the virulence and infectivity of the La Crosse virus. **Microbial Pathogenesis**, **4**: 1-7, 1989.
- GONZALEZ- SCARANO, F., NATHANSON, N. *Bunyaviridae*. In: **Fundamental virology**. Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., Chanock, R. M., Melnick, J. L., Monath, T. P., Roizman, B., Straus, S. E. (eds.). Philadelphia, New York, Lippincott- Raven. 3th, 1996. p.1473-1504.
- GRIOT, C., PEKOSZ, A., LUKAC, D., SCHERER, S. S., STILLMOCK, K., SCHMEIDLER, D., ENDRES, M. J., GONZALEZ-SCARANO, F., NATHANSON, N. Polygenic control of neuroinvasiveness in California serogroup bunyaviruses. **Journal of Virology**, **67**: 3861-3867, 1993.
- HAMMON, W. M., REEVES, W. C., SATHER, G. California encephalitis virus, a newly described agent. II. Isolations and attempts to identify and characterize the agent. **Journal of Immunology**, **69**: 493-510, 1952.

- HESS, W. R. African Swine Fever. In: **The Arboviruses: Epidemiology and Ecology**. Monath, T. P. (eds.). Boca Raton, USA, CRC Press, 1988. p.45-70.
- 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.
- HUANG, C., SHOPE, R. E., SPARGO, B., CAMPBELL, W. P. The S RNA genomic sequences of Inkoo, San Angelo, Serra do Navio, South River and Tahyna bunyaviruses. **Journal of General Virology**, **77**: 1761-1768, 1996.
- JANSSEN, R., GONZALEZ-SCARANO, F., NATHANSON, N. Mechanisms of bunyavirus virulence. Comparative pathogenesis of a virulent strain of La Crosse and an avirulent strain of Tahyna virus. **Laboratory Investigation**, **50**: 447-455, 1984.
- JOHNSON, K., JOHNSON, R. T. California encephalitis II. Studies of experimental infection in the mouse. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, **27**: 390-400, 1968.
- KAPPUS, K. D., MONATH, T. P., KAMINSKI, R. M., CALISHER, C. H. Reported encephalitis associated with California serogroup virus infections in the United States, 1963-1981. **California Serogroup Viruses**. 31-41, 1983.
- KARABATSOS, N. **International Catalogue of Arboviruses, Including Certain Other Viruses of Vertebrates**, 3rd Ed. San Antonio, USA: The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1985. 1141p.

- 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.
- KINGSFORD, L., BOUCQUEY, K. H. Monoclonal antibodies specific for the G1 glycoprotein of La Crosse virus that react with other California serogroup viruses. **Journal of General Virology**, **71**: 523-530, 1991.
- KOHL, A., CLAYTON, R. F., WEBER, F., BRIDGEN, A., RANDALL, R. E., ELLIOTT, R. M. Bunyamwera virus nonstructural protein NSs counteracts interferon regulatory factor 3-mediated induction of early cell death. **Journal of Virology**, **77(14)**: 7999-8008, 2003.
- KORMELINK, R., DE HAAN, P., MEURS, C., PETERS, D., GOLDBACH, R. The nucleotide sequence of the M RNA segment of tomato spotted wilt virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. **Journal of General Virology**, **73**: 2795-2804, 1992.
- KUMAR S, TAMURA K; NEI M. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. **Briefings in Bioinformatics**, **5**: 150-163, 2004.
- LEDUC, J. W. Epidemiology and ecology of the California serogroup viruses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **37**: 60-68, 1987.
- LENETTE, D. A. General principles of laboratory diagnostic methods for viral, rickettsial and chlamydial infections. In: **Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections**. Lennette, E. H., Lennette, D. A., Lennette, E. T. (eds.). Seventh edition, American Public Health Association, Washington, USA. 1995.p. 3-25.

- LUDWIG, G., ISRAEL, B. A., CHRISTENSEN, B. M., YUILL, T. M., SCHULTZ, K. T. Monoclonal antibodies directed against the envelope glycoproteins of La Crosse virus. **Microbial Pathogen**, **11**: 411-421, 1991a.
- LUDWIG, G., ISRAEL, B. A., CHRISTENSEN, B. M., YUILL, T. M., SCHULTZ, K. T. Role of La Crosse virus glycoproteins in attachment of virus to host cells. **Virology**, **181**: 564-571, 1991b.
- L'VOV, D. K., TERSKIKH I. I., ABRAMOVA, L. N., SAVOSINA, N. S., GROMASHEVSKII, V. L. Experimental infection caused by Issyk-Kul' arbovirus. **Biulleten' Eksperimental'noi Biologii I Meditsiny**, **111(6)**: 639-41, 1991.
- L'VOV, D. K., TERSKIKH, I. I., ABRAMOVA, L. N., SAVOSINA, N. S., L'VOV, S. D., GROMASHEVSKII, V. L., KELLI, E. I. A comparative experimental study of pathogenic properties of new strains of California encephalitis virus serogroups. **Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk**, **3**: 44-50, 1992.
- LYONS, M., HEYDUK, J. Aspects of the developmental morphology of California encephalitis virus in cultures vertebrate and arthropod cells and in mouse brain. **Virology**, **54**: 37-52, 1973.
- MARCONDES, C. B. **Entomologia médica e veterinária**. São Paulo, Atheneu, 2001. 78 p.
- 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^a ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003. 105 p.; 237 p.
- MCJUNKIN, J. E., KHAN, R. R., TSAI, T. California - La Crosse encephalitis. **Infectious Disease Clinics of North America**, **47**: 83-93, 1998.
- MERTZ, G. J. *Bunyaviridae*: bunyaviruses, phleboviruses, nairoviruses, and hantaviruses. In: **Clinical Virology**. Richman, D. D., Whitley, R. J., Hayden, F. G. (eds.). New York, Churchill-Livingstone, 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., WHITFIELD, S. G., COLEMAN, P. H., CALISHER, C. H. California group arboviruses: electron microscopic studies. **Experimental and Molecular Pathology**, **9**: 44-56, 1968.
- 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. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of viruses. In: **Archives of Virology**. Supplement 10, Wien -New York: Springer verlag, 1995. p. 586.
- NAKITARE, G. W., ELLIOT, R. M. Expression of the Bunyamwera virus M genome segment and the intracellular localization of the NSm. **Virology**, **195**: 511-520, 1993.

- NELSON, D. M., GARDNER, I. A., CHILES, R. F., BALASURIYA, U. B., ELDRIDGE, B. F., SCOTT, T. W., REISEN, W. K., JAMES, M. N. Prevalence of antibodies against Saint Louis encephalitis and Jamestown Canyon viruses in California horses. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, **27(3)**: 209-15, 2004.
- 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.
- OLIVEIRA, A. S. B., QUADROS, A. A. J., CONDE, M. T. R. P. **Documento Técnico da Síndrome Pós-Polio**. São Paulo, Escola Paulista de Medicina/ Associação Brasileira de Síndrome Pós-Pólio, 2004. 31p.
- PEKOSZ, A., GONZALEZ-SCARANO, F. The extracellular domain of La Crosse virus G1 forms oligomers and undergoes pH-dependent conformational changes. **Virology**, **225(1)**: 243-7, 1996.
- PEKOSZ, A., PHILLIPS, J., PLEASURE, D., MERRY, D., GONZALEZ-SCARANO, F. Induction of apoptosis by La Crosse virus infection and role of neuronal differentiation and human bcl-2 expression in its prevention. **Journal of Virology**, **70(8)**: 5329-35, 1996.
- PETERS, D., DE AVILA, A. C., KITAJIMA, E. W., RESENDE, R., DE HAAN, P., GOLDBACH, R. An overview of tomato spotted wilt virus. In: **Virus-thrips-plant interactions of TSWV. Proceedings of USDA**. Hsu, H-T., Lawson, R.H. (eds.). Workshop. Beltsville, MD, National Technology Information Service, 1991. p.1-14.

- PINHEIRO, F. P., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., TRAVASSOS DA ROSA, J. F., ISHAK, R., FREITAS, R. B., GOMES, M. L., LEDUC, J. M., OLIVA, O. F. Oropouche virus I. A review of clinical, epidemiological, and ecological findings. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **30**: 149-160, 1981.
- PLASSMEYER, M. L., SOLDAN, S. S., STACHELEK, K. M., MARTIN-GARCIA, J., GONZALEZ-SCARANO, F. California serogroup Gc (G1) glycoprotein is the principal determinant of pH-dependent cell fusion and entry. **Virology**, **338 (1)**: 121-32, 2005.
- PLASSMEYER, M. L., SOLDAN, S. S., STACHELEK, K. M., ROTH, S.M., MARTIN-GARCIA, J., GONZALEZ-SCARANO, F. Mutagenesis of the La Crosse Virus glycoprotein supports a role for Gc (1066-1087) as fusion peptide. **Virology**, **358 (2)**: 273-82, 2007.
- PORTERFIELD, J. S., CASALS, J., CHUMAKOV, M. P. Bunyaviruses and *Bunyaviridae*. **Intervirology**, **6**: 13-24, 1975.
- PROPHET, E. B., MILLIS, B., ARRINGTON, I. B., SOBIN, L. M. **Laboratory methods in histotechnology**. Washington, American Resgistry 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. J. 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.
- REINERT, J. F. New classification for the composite genus *Aedes* (Diptera: *Culicidae*: Aedini), elevation of subgenus *Ochlerotatus* to generic rank. Reclassification of the other subgenera, and notes on certain subgenera and species. **Journal of American Mosquito Control Association**, **16(3)**: 175-88, 2000.
- SAITOU, N., NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, **4**: 406-425, 1987.
- SALANUEVA, I. J., NOVOA, R. R., CABEZAS, P., LOPEZ-IGLESIAS, C., CARRAS-COSA, J. L., ELLIOTT, R. M., RISCO, C. Polymorphism and structural maturation of bunyamwera virus in Golgi and post-Golgi compartments. **Journal of Virology**, **77**: 1368-81, 2003.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **74**: 5463-7, 1977.
- SCHMALJOHN, S., JENNINGS, G. B., HAY, J., DALRYMPLE, J. M., Coding strategy of the S genome segment of Hantaan virus. **Virology**, **155**: 633-643, 1986.

- SCHMALJOHN, C., SCHMALJOHN, A.L., DALRYMPLE, J.M. Hantaan virus M RNA: coding strategy, nucleotide sequence, and gene order. **Virology**, **157**: 31-39, 1987.
- SHI, X., BRAUBURGER, K., ELLIOTT, R. M. Role of N-linked glycans on Bunyamwera virus glycoproteins in intracellular trafficking, protein folding, and virus infectivity. **Journal of Virology**, **79 (21)**: 13725-743, 2005.
- SHOPE, R. E., CAUSEY, O. R. Further studies on the serological relationships of group C arthropod-borne viruses and the application of these relationships to rapid identification of types. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **11**: 886-887, 1962.
- SILVA, P. R. F. **Caracterização da amostra viral AR 633512**. TCC (Trabalho de Conclusão do Curso de Medicina) - Belém, Universidade do Estado do Pará, 2003. 19-23 p.
- SPENCE, L., ANDERSON, C. R., AITKEN, T. H., DOWNS, W. G. Melao virus, a new agent isolated from Trinidadian mosquitoes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **11**: 687-690, 1962.
- SWOFFORD, D. L. **PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods), version 4**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1999.
- 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. F., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, **25**: 4876-4882, 1997.
- 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. (eds.). São Paulo, Editora Atheneu, 1998. p.358-367.
- TUBOI, S. H., COSTA, Z. G., VASCONCELOS, P. F. C., HATCH, D. Clinical and epidemiological characteristics of yellow fever in Brazil: analysis of reported cases 1998-2002. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **101 (2)**: 169-75, 2007.
- 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. S., RODRIGUES, S. G., DÉGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, E. S. Arboviruses pathogenic for

- man in Brazil. In: **An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries**. Travassos da Rosa, A. P. A, Vasconcelos, P. F. C., Travassos da Rosa, J. F. S. (eds.). Belém, Instituto Evandro Chagas, 1998. p. 72-99.
- VASCONCELOS, P. F. C. Febre Amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **36 (2)**: 275-293, 2003.
- VASCONCELOS, P. F. C., TRAVASSOS DA ROSA, A. P., PINHEIRO, F. P., RODRIGUES, S. G., TRAVASSOS DA ROSA, E. S. Arboviroses. In: **Medicina Tropical**. Cimerman, S., Cimerman, B. (eds.). São Paulo, Editora Atheneu, 2003. p.363-386.
- VIEIRA, C. M. A. **Caracterização de novos vírus do sorogrupo Changuinola (*Reoviridae: Orbivirus*) da Amazônia brasileira**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Belém, Universidade Federal do Pará, Museu Paraense Emílio Goeldi e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1995. 70 p.
- 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.
- WHITE, D. O., FENNER, F. J. *Bunyaviridae*. In: **Medical Virology**. White, D.O., Fenner, F. J. (eds.). San Diego, California, Academic Press, 4 ed., 1994.p. 509-521.
- WHITMAN, L.; SHOPE, R. E. The Californian complex of arthropod-borne viruses and its relationship to the Bunyamwera group through Guaroa virus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **11**: 691-696, 1962.

- WHO. World Health Organization. Scientific Group. Arthropod-Borne and Rodent-Borne Viral Diseases. **Technical Report Series**, n° 719. Geneva. 1985. 116 p.
- XIAO, S-Y., ZHIN, H., GUZMAN, H., TESH, R. B. Experimental Yellow Fever infection in the golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). II Pathology. **Journal Infectious Diseases**, **183**: 1437-1444, 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.

ANEXO 1