



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOTECNOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA, FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DO VÍRUS
BE AR 701405, OBTIDO A PARTIR DE MOSQUITOS DA ESPÉCIE *Psorophora*
(*Jan*) *ferox*, CAPTURADOS EM ALTAMIRA – PARÁ**

JOÃO BATISTA DOS SANTOS ARAÚJO

Belém - Pará
2014

JOÃO BATISTA DOS SANTOS ARAÚJO

**CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA, FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DO VÍRUS
BE AR 701405, OBTIDO A PARTIR DE MOSQUITOS DA ESPÉCIE *Psorophora*
(*Jan*) *ferox*, CAPTURADOS EM ALTAMIRA – PARÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à
Saúde Humana

Orientador: Profº. Dr. Élcio de Souza Leal

Belém - Pará
2014

JOÃO BATISTA DOS SANTOS ARAÚJO

**CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA, FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DO VÍRUS
BE AR 701405, OBTIDO A PARTIR DE MOSQUITOS DA ESPÉCIE *Psorophora*
(*Jan*) *ferox*, CAPTURADOS EM ALTAMIRA – PARÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Élcio de Souza Leal
Universidade Federal do Pará/UFPA

Banca examinadora: Prof^a. Dra. Fabíola Vilanova
Universidade Federal do Pará

Prof^a. Dra. Edna Franco
Instituto Evandro Chagas

Prof. Dr. Agenor Valadares
Universidade Federal do Pará

Prof^a. Dra. Luciana Xavier (suplente)
Universidade Federal do Pará

Belém, 13 de fevereiro de 2014

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, Benedita, por estar sempre ao meu lado me incentivando, me encorajando e apoiando. Obrigado pelos anos de sua vida dedicados a mim e aos meus irmãos; por fazer o possível e o impossível pela nossa educação.

Aos meus irmãos pelo apoio incondicional e à minha irmã de coração Rosemary, pelas palavras de conforto nas horas em que mais precisei; por sempre me ajudar e por ser esse anjo da guarda que Deus enviou para mim.

EPÍGRAFE

“Se um dia tudo lhe parecer perdido, lembre-se de que você nasceu sem nada, e que tudo que conseguiu foi através de esforços e os esforços nunca se perdem, somente dignificam as pessoas”

(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela Sua presença constante iluminando sempre meus caminhos.

À minha família pelo amor, carinho, apoio, incentivo e compreensão que sempre me dedicaram.

Ao Dr. Élcio Leal, pela orientação, paciência, amizade, dedicação e transmissão de seus conhecimentos que muito contribuíram para a realização conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos, pela infra-estrutura e recursos orçamentários cedidos para a realização deste trabalho.

Aos funcionários, contratados, estagiários da seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas, Denise, Keyller, Mary, Raimundo, Daniele Henriques, Janniffer, Lívia Martins, Rose, Alcione, pelo carinho, apoio e convívio profissional.

À Creuza Lima Carvalho, Dra. Eliana Pinto da Silva, Dra. Valéria Lima Carvalho e Antonio Gregório Dias Júnior, pelo carinho, amizade e auxílio nos preparos de cultivos celulares.

Ao Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes, pelo apoio, amizade e conhecimento repassados.

À minha turma da pós-graduação, pela união e amizade ao longo dos vários meses de disciplinas.

Aos professores do programa de pós-graduação em Biotecnologia, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos membros da banca examinadora Professores Doutores: Patrícia Scneider, Ana Cecília (qualificação), Édna Franco, Fabíola Vilanova e Júlio Pieczarca que aceitaram o convite para participarem da banca de avaliação que com certeza engrandeceram esse trabalho.

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

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| LISTA DE FIGURAS | 9 |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | 11 |
| RESUMO | 14 |
| ABSTRACT | 15 |
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 Arboviroses..... | 16 |
| 1.2 Características dos Arbovírus..... | 17 |
| 1.3 Classificação dos Arbovírus..... | 19 |
| 1.4 Epidemiologia dos Arbovírus..... | 25 |
| 1.5 Ciclo de Transmissão..... | 27 |
| 1.6 Patogênese dos Arbovírus..... | 28 |
| 1.7 Arbovírus Isolados na Amazônia Brasileira..... | 29 |
| 1.8 Imunidade aos Arbovírus..... | 30 |
| 1.9 Métodos de Diagnóstico dos Arbovírus..... | 30 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 33 |
| 3. OBJETIVOS | 34 |
| 3.1 GERAL | 34 |
| 3.2 ESPECÍFICOS | 34 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 35 |
| 4.1 Vírus..... | 35 |
| 4.2 Animais..... | 35 |
| 4.3 Infecção, preparação de estoque e titulação viral em camundongos | 35 |
| 4.4 Cultivos celulares..... | 36 |
| 4.5 Infecção dos cultivos celulares..... | 38 |
| 4.6 Imunofluorescência indireta | 38 |
| 4.7 Preparação do soro homólogo..... | 39 |
| 4.8 Sensibilidade ao Desoxicolato ácido de Sódio (DCA)..... | 40 |
| 4.9 Teste de fixação do complemento (FC)..... | 41 |
| 5. RESULTADOS | 42 |
| 5.1 Suscetibilidade dos camundongos para o vírus BE AR 701405..... | 42 |
| 5.2 Suscetibilidade das culturas celulares para o vírus BE AR 701405..... | 42 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 5.3 | Título do estoque viral em camundongos..... | 43 |
| 5.4 | Soro homólogo | 43 |
| 5.5 | Imunofluorescência indireta | 44 |
| 5.6 | Fixação do complemento..... | 45 |
| 5.7 | Desoxicolato ácido de sódio (DCA)..... | 45 |
| 6. | DISCUSSÃO..... | 47 |
| 7. | CONCLUSÕES..... | 52 |
| 8. | REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO | 53 |
| 9. | ANEXO..... | 58 |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A figura mostra o esquema de um Alphavirus, onde estão representadas as glicoproteínas E1 e E2, o Nucleocapsídeo representado pela proteína N e a camada bilipídica formando o envelope. Os virions medem aproximadamente de 60 a 70 nm.

Figura 2 - Desenho mostrando a morfologia do virion de um Flavivirus e suas principais proteínas estruturais. Em C: proteína do nucleocapsídeo; M, proteína de membrana e E, proteína do envelope.

Figura 3 - Desenho mostrando a morfologia do vírus da família *Bunyaviridae*. Possuem três segmentos helicoidais no nucleocapsídeo (L, M e S). Possuem no envelope uma camada bilipídica. Têm dimensões que variam entre 80 a 120nm de diâmetro.

Figura 4 - Esquema de manutenção e transmissão de arbovírus em natureza

Figura 5 - Esquema demonstrando a disseminação de infecção por arbovírus no hospedeiro.

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

Figura 7 - Representação esquemática para obtenção do soro homólogo

Figura 8 - Representação esquemática do teste sensibilidade ao DCA. A) amostra viral; B amostra viral e PBS (controle)

Figura 9 - Fotomicrografias de cultivos de células C6/36. A) Células C6/36 não-infectadas; B) Células C6/36 infectadas com o vírus BE AR 701405 (96 horas p.i.) (200X).

Figura 10 - Fotomicrografias de cultivos de células Vero. A) Células Vero não-infectadas; B) Células Vero infectadas com o vírus BE AR 701405 (48 horas p.i.) (200X).

Figura 11 - Resultados do teste de IFI em cultivos de células C6/36. A) Fotomicrografia de células C6/36 não-infectadas; B) Fotomicrografia de células C6/36 infectadas com o vírus BE AR 701405 (96 horas p.i.) (400X).

Figura 12 - Resultados do teste de IFI em cultivos de células Vero. A) Fotomicrografia de células Vero não-infectadas; B) Fotomicrografia de células Vero infectadas com o vírus BE AR 701405 (48 horas p.i.) (400X).

Figura 13 - Resultado do teste de FC realizado entre o vírus BE AR 701405 e o seu soro hiperimune e dos vírus do grupo A (*Alphavirus*, *Togaviridae*).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR – Artrópode
BE – Belém
DCA - Desoxicolato Ácido de Sódio
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
ECP – Efeito Citopático
ELISA – Imunoenzimático Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FC – Fixação do Complemento
G – Grande
i.p. - Injeções Intraperitoniais
IEC –
IEC – Instituto Evandro Chagas
IFI - imunofluorescência indireta
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
IH – Inibição da Hemaglutinação
JAN – Janthinomys
M – Médio
N – Neutralização
NaCl – Cloreto de Sódio
NM – Nanômetro
P – Pequeno
pH – Potencial Hidrogeniônico
RNA – Ácido Ribonucléico
RT-PCR - Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SN – Soroneutralização
VBSQ - Vírus Bussuquara
VCHIL - Vírus Chikunguya
VCPC - vírus Cacipacoré
VDEN – Vírus Dengue
VEEL - Vírus da Encefalomielite Equina Leste
VEEO - Vírus da Encefalomielite Equina Oeste
VESL - Vírus da Encefalite Saint Louis

VFA – Vírus da Febre Amarela

VMAY – Vírus Mayaro

VNO - Vírus do Nilo Ocidental

VORO – Virus Oropouche

VPIRY vírus Piry

VPIX – Vírus Pixuna

VROC – Vírus Rocio

**CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA, FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DO VÍRUS
BE AR 701405, ÓBTIDO A PARTIR DE MOSQUITOS DA ESPÉCIE *Psorophora*
(*Jan*) *ferox*, CAPTURADOS EM ALTAMIRA – PARÁ**

**PHYSICOCHEMICAL, BIOLOGICAL, AND ANTIGENIC
CHARACTERIZATION OF THE BE AR 701405 VIRUS ISOLATED FROM
MOSQUITOES *Psorophora (Jan.) ferox* CAPTURED IN ALTAMIRA, PARÁ**

**João BS Araújo², Élcio S Leal¹, Márcio RT Nunes², Valéria L Carvalho,
Pedro FC Vasconcelos²**

- 1. Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal do
Pará.**
- 2. Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas - Instituto
Evandro Chagas.**

**Correspondência para: João Batista dos Santos Araújo,
Pesquisador/bolsista. Rodovia BR-316 km 7 s/n – Levilandia- 67030-000 –
Ananindeua / Pará / Brasil. e-mail: joaobatista@iec.pa.gov.br**

RESUMO

O vírus BE AR 701405 foi obtido de um lote de mosquitos da espécie *Psorophora (Jan.) ferox*, capturados em Altamira, estado do Pará, no ano de 2006. O objetivo deste estudo foi caracterizar físico-química, biológica e antígenicamente o vírus BE AR 701405, com o objetivo de obter dados que auxiliassem sua classificação taxonômica. Camundongos recém-nascidos manifestaram alterações neurológicas, como tremores e ausência de coordenação motora, após a infecção pelo vírus BE AR 701405. O vírus praticamente não determinou efeito citopático (ECP) nas células de *Aedes albopictus*, clone C6/36, entretanto, causou ECP em células Vero com aproximadamente 48 horas pós- infecção. O título do vírus obtido foi de $10^{-4,1}$ DL₅₀/ 0,02 mL e o título após a ação do DCA foi de $10^{-2,6}$ DL₅₀/0,02 mL. O vírus BE AR 701405 reagiu antígenicamente com o soro hiperimune do *Virus Pixuna*. Portanto, o vírus BE AR 701405 é sensível ao DCA o que indica que é um vírus envelopado. Ele é um membro do grupo antigênico A, do gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae*, relacionado ao *Virus Pixuna*. Camundongos recém-nascidos e células Vero e C6/36 são suscetíveis à infecção pelo vírus BE AR 701405. Estudos posteriores são necessários para esclarecer o relacionamento antigênico do vírus BE AR 701405 com o *Virus Pixuna*.

ABSTRACT

The BE AR 701405 virus was isolated from a pool of *Psorophora (Jan.) ferox* mosquitoes captured in the municipality of Altamira, Para state, Northern Brazil, in 2006. The objective of this study was the physicochemical, biological and antigenic characterization of the BE AR 701405 virus in order to provide data for its taxonomic classification. Newborn mice inoculated by intracerebral route showed evidences of neurological manifestations, such as chill and motor disorders after the infection with the virus BE AR 701405. Cytopathic effect (CPE) was in infected *Aedes albopictus* C6/36 cells was not clearly observed, however in VERO cells CPE was observed after 48 hours post infection. The virus load was determined in $10^{-4,1}$ LD₅₀/ 0.02 mL and the titer after DCE analysis was calculated in $10^{-2,6}$ LD₅₀/0,02 mL. The BE AR 701405 virus reacted antigenically with *Pixuna virus* hiperimmune serum. In conclusion, the studied virus was sensible to the DCA solvent suggesting that it is an enveloped virus. Furthermore, by serology this virus was identified as a member of the group A, genus *Alphavirus*, family *Togaviridae*, more closely related to *Pixuna virus*. In addition, newborn mice, as well as C6/36 and VERO cells demonstrated to be sensible to the infection by the BE AR 701405 virus. Further studies are needed to better understand the antigenic relationship between the BE AR 701405 virus and *Pixuna virus*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 ARBOVIROSES

As arboviroses são doenças causadas pelos arbovírus, grupo de vírus ecologicamente bem definido, cuja principal característica biológica é a transmissão desses vírus mediada por artrópodes hematófagos. Constituem problema de importância em saúde pública em todos os continentes, exceto Antártica, onde se apresentam sob forma endêmica ou epidêmica. A natureza da doença produzida no homem varia conforme o tipo de arbovírus responsável pela infecção. A maioria provoca uma síndrome febril autolimitada com ou sem exantema, enquanto outros determinam quadros mais severos de febre hemorrágica, usualmente acompanhados de significativa letalidade, ou de encefalite (AZEVEDO *et al.*, 2007). Em quase sua totalidade, os arbovírus são vírus zoonóticos mantidos em ambiente silvestre. A infecção humana ocorre acidentalmente, em especial são atingidas com maior frequência as pessoas que mantêm contato mais estreito com o ambiente silvestre, no qual se situam os nichos ecológicos dos arbovirus. No entanto, ressalte-se que certos arbovirus têm surgido periodicamente em áreas urbanas, onde chegam a causar epidemias, tais como o *Vírus Dengue* (VDEN) e o *Vírus Oropouche* (VORO), ou mesmo persistir endemicamente, como é o caso do VDEN (AZEVEDO *et al.*, 2007).

No Brasil, em particular na Amazônia brasileira, devido à diversidade de espécies de dípteros hematófagos (mosquitos, flebotomíneos, maruins) e vertebrados silvestres, bem como ao número elevado de espécimes de arbovírus isolados, que constitui achado único no mundo coabitando o mesmo espaço, há condições ambientais mais favoráveis à manutenção dos arbovírus na natureza, o que faz da Amazônia o maior reservatório de arbovírus no mundo. Por outro lado, embora a região Amazônica represente a maior fonte de infecção por vários arbovirus endêmicos, as outras regiões do Brasil não são desprovidas desses vírus e epidemias em zonas urbanas ou rurais, especialmente causadas pelos VDEN, vírus da Febre Amarela (VFA), VORO, vírus Mayaro (VMAY) e vírus Rocio (VROC), constituem um risco de saúde para uma parcela significativa da população brasileira (LEÃO *et al.*, 2013).

O termo arbovírus origina-se das duas palavras primeiras letras das palavras que compõem a expressão inglesa *arthropod-borne*, acrescidas da palavra vírus. Em

1942 a expressão *arthropod-borne virus* foi introduzida para descrição do grupo de vírus de animais que se propagavam em artrópodes e eram transmitidos biologicamente a hospedeiros vertebrados. Duas décadas depois, o Subcomitê Internacional para Nomenclatura Viral recomendou a adoção oficial do termo *arbovirus* (arbovírus) para designação dos vírus que são mantidos em natureza em ciclos envolvendo vetores artrópodes hematófagos e hospedeiros vertebrados (LEÃO *et al.*, 2013).

Os arbovirus são mantidos em natureza, mediante transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados suscetíveis e artrópodes hematófagos. Transmissão de hospedeiro artrópode a hospedeiro artrópode, por via transovariana e possivelmente pela via venérea, também é observada. Esses vírus se replicam e produzem viremia nos vertebrados, multiplicam-se nos tecidos de artrópodes e são transmitidos a novos vertebrados suscetíveis pela picada do inseto, após um período de incubação extrínseca. Esse período dura de 5 a 6 dias até algumas semanas, durante o qual o vírus se replica nos tecidos do inseto até atingir as glândulas salivares e, a partir desse momento, poderá ocorrer transmissão. Ressalte-se que apenas nas fêmeas dos mosquitos são hematófagas e, portanto, somente elas transmitem os arbovirus para humanos e outros vertebrados (LEÃO *et al.*, 2013).

Os arbovirus constituem o maior grupo conhecido de vírus com cerca de 535 membros registrados no Catalogue of Arthropod-borne and Selected Vertebrate Viruses of the World. Aproximadamente 100 são conhecidos por infectar seres humanos, 40 infectam animais domésticos e mais de 20 têm sido designados como causadores de epidemias (LEÃO *et al.*, 2013).

1.2 CARACTERÍSTICAS DOS ARBOVÍRUS

Os arbovírus possuem genoma constituído por Ácido Ribonucleico (RNA), com uma única exceção – o Vírus da febre Suína africana – que possui Ácido Desoxirribonucleico (DNA) e, inequivocadamente, é comprovado ser um arbovírus (FAUQUET *et al.*, 2005). O RNA dos arbovírus pode ser segmentado ou não e apresentar-se com uma ou duas fitas, com polaridade positiva, negativa ou *ambisense*. Arbovírus com genomas não segmentados incluem os *Alphavirus* (*Togaviridae*), *Flavivirus* (*Flaviviridae*) e *Rhabdovirus* (*Rhabdoviridae*), enquanto aqueles com genomas segmentados incluem os *Orthobunyavirus* / *Phlebovirus*

(*Bunyaviridae*) e os *Orbivirus* (*Reoviridae*). No quadro abaixo estão relacionadas às características dos arbovírus (Adaptado de VAN REGENMORTEL, 2000).

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

| Família | Envelope | Simetria Viral | Genoma | Tamanho da Partícula |
|----------------|-----------------|-----------------------|---|-----------------------------|
| Bunyaviridae | Sim | Helicoidal | RNA de fita simples, polaridade negativa, segmentado. | 80-120 nm |
| Flaviviridae | Sim | Icosaédrica | RNA de fita simples, polaridade positiva, não segmentado | 45-60 nm |
| Reoviridae | Não | Icosaédrica | RNA de fita dupla, polaridade positiva/negativa, segmentado | 60-80 nm |
| Rhabdoviridae | Sim | Helicoidal | RNA de fita simples, polaridade negativa, não segmentado. | 180 nm/75nm |
| Togaviridae | Sim | Icosaédrica | RNA de fita simples, polaridade positiva, não segmentado. | 60-70nm |

Fonte: Adaptado de Van Regenmortel, 2000.

1.3 CLASSIFICAÇÃO DOS ARBOVÍRUS

Os arbovírus são classificados de acordo com suas propriedades antigênicas ou segundo suas características físico-químicas.

A classificação antigênica dos arbovírus decorre de observações pioneiras de diversos cientistas que foram reunidas e interpretadas definitivamente por CASALS (1957). Tais observações são baseadas principalmente nos resultados dos testes de inibição da hemaglutinação (IH), Fixação do Complemento (FC) e neutralização (N), hoje genericamente rotulados de testes convencionais ou de primeira geração. De acordo com esse critério, quando dois ou mais vírus mostram cruzamento sorológico, passam a constituir um grupo antigênico. Os três primeiros grupos foram designados pelas letras A, B e C e os demais receberam os nomes do primeiro vírus isolado no respectivo grupo. Dentro de cada grupo antigênico existem membros que exibem relacionamento mais íntimo, formando subgrupos ou complexos (LEÃO *et al.*, 2013).

Os 535 vírus registrados estão distribuídos em 63 grupos antigênicos, salvo 83 que permanecem na categoria dos vírus não grupados.

Com base nas propriedades físico-químicas, a maioria dos arbovírus está registrada em cinco famílias: *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae* e *Reoviridae*. Ressalte-se, no entanto, que nem todos os vírus dessas famílias são necessariamente arbovírus (LEÃO *et al.*, 2013).

A família *Togaviridae* compreende dois gêneros: *Alphavirus* e *Rubivirus* (FAUQUET *et al.*, 2005). Não se conhecem hospedeiros invertebrados para os vírus do gênero *Rubivirus*, não constituindo, portanto, arbovírus. O gênero *Alphavirus* corresponde ao grupo A dos arbovirus da classificação sorológica e possui 29 membros, distribuídos em 8 grupos ou complexos (Encefalite Equina Leste, Encefalite Equina Oeste, Encefalite Equina Venezuelana, Trocara, Middelburg, Ndumu, Semliki Forest e Barmah Forest) e um não grupado, que têm sido isolados em todos os continentes, excetuando a Antártida. As partículas virais são esféricas ou pleomórficas, possuem 70 nm de diâmetro e constituídas de um envoltório ou membrana de natureza lipoproteica e um nucleocapsídeo (Figura 1). No envelope viral se localizam as projeções que correspondem à hemaglutinina, que é ativa contra hemácias de ganso, de pintos recém-nascidos e de outros animais, cuja atividade é estritamente dependente de pH. No nucleocapsídeo encontra-se o

genoma viral constituído de segmento simples de RNA de polaridade positiva (FAUQUET *et al.*, 2005).

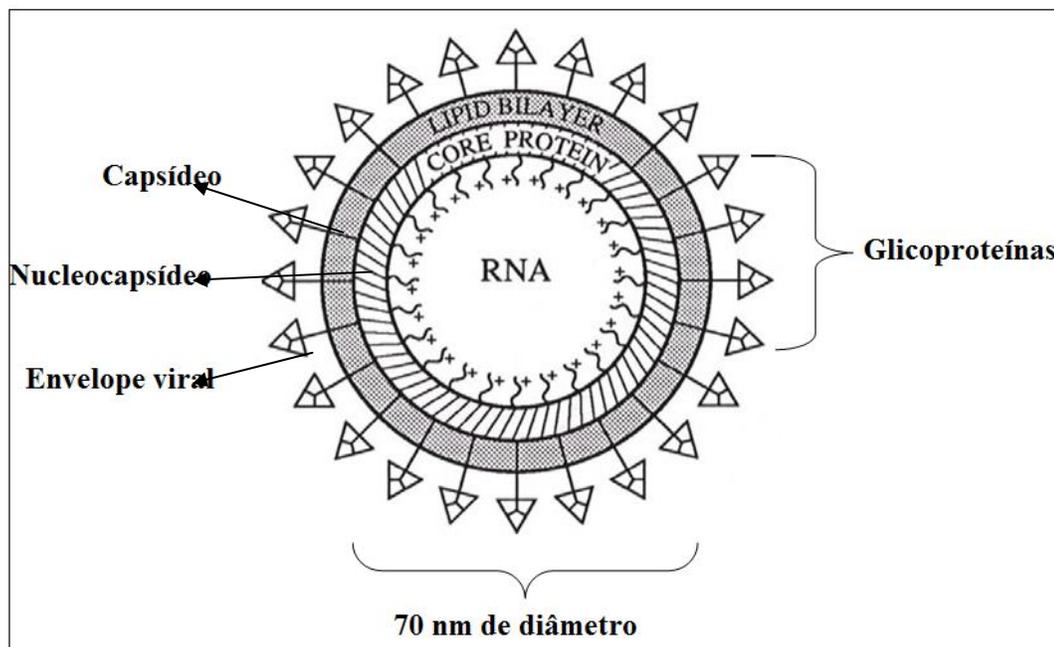


Figura 1 - A figura mostra o esquema de um Alfavírus, onde estão representadas as glicoproteínas E1 e E2, o Nucleocapsídeo representado pela proteína N e a camada bilipídica formando o envelope. Os virions medem aproximadamente de 60 a 70 nm.

Fonte: PFEFFER, 1997

Todos os alfavírus são sensíveis ao éter e ao desoxicolato ácido de sódio (DCA). Multiplicam-se em uma variedade de cultivos celulares, tais como embrião de galinha e de pato, Vero (rim de macaco *Cercopithecus aethiops*), BHK 21 (rim de hamster recém-nascido), LLC-MK2, HeLa e outros mais, determinando, na maioria das vezes necrose celular sob meio líquido e formação de placas sob Agar. Provocam encefalite fatal em camundongos recém-nascidos inoculados pela via intracerebral. Foi demonstrada a presença de 3 antígenos nos vírions dos alfavírus, um deles corresponde ao nucleocapsídeo e parece ser comum a todos os membros do grupo, sendo responsável pela reação no teste de FC. Os outros dois são glicoproteínas que se encontram situadas no envoltório (envelope) da partícula viral, sendo denominados E₁ e E₂, responsáveis pelas respostas aos testes IH e N (LEÃO *et al.*, 2013).

Os alfavírus infectam uma variedade de vertebrados, inclusive o homem. Onze tipos já foram associados com doença humana e pelo menos 7 têm sido responsáveis por epidemias: *vírus Chikunguya* (VCHIL), vírus da encefalomielite equina leste (VEEL), vírus da encefalomielite equina oeste (VEEO), VMAY, dentre outros (GRIFFIN *et al.*, 2007). No Brasil 10 membros da família *Togaviridae* já foram isolados, sendo 9 pertencentes ao gênero *Alphavirus* (vírus Aurá, VEEL, VMAY, vírus Mucambo (VMUC), vírus Pixuna (VPIX), vírus Trocara, dentre outros. Dentre os 9 alfavírus, 2 deles (VMAY e VMUC), têm sido associados, inclusive com isolamento de vírus, em casos de doença humana naturalmente adquirida e o MAY inclusive tem causado epidemias, enquanto o VPIX e VEEV tem sido associados com infecções humanas acidentais. Já para os vírus VEEL e VEEO, associados em outros países com doença humana encefálica fatal endêmica ou epidêmica, no Brasil, e em particular na Amazônia, têm sido encontrados apenas anticorpos em nativos da região, sugerindo sua circulação sem associação até o momento de quadro nosológico. No entanto, na literatura, existe a descrição de um único caso humano fatal de encefalite atribuída ao VEEL no Brasil, ocorrido no Estado da Bahia. (LEÃO *et al.*, 2013).

A família *Flaviviridae* é constituída por três gêneros virais: *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*. Para os vírus do gênero *Pestivirus* que infectam porcos e ruminantes e os do *Hepacivirus*, representado pelo vírus da hepatite C, não se conhece vetor artrópode e, portanto, não se constituem arbovírus. O gênero *Flavivirus* corresponde ao grupo sorológico B dos arbovírus, possui 53 espécies virais sendo 27 transmitidas por mosquitos, 12 por carrapatos e 14 agentes zoonóticos sem vetor artrópode conhecido (FAUQUET *et al.*, 2005)

Os flavivirus possuem algumas características físico-químicas similares às dos alfavírus, todavia o diâmetros dos vírions é menor, oscilando entre 40 a 60nm (Figura 2). Exibem também, algumas das propriedades biológicas dos alfavírus, tais como patogenicidade para camundongos e capacidade de aglutinar hemácias de ganso e de pinto, sendo a hemaglutinina a principal proteína desses vírus, estando localizada no envelope (LEÃO *et al.*, 2013).

Algumas espécies são capazes de formar placas em culturas de pato e de galinha, sem produzir, no entanto, efeitos citopático quando essas culturas são mantidas em meio líquido. Vários membros do grupo determinam o aparecimento de

efeito citopático e de placas nas linhagens celulares Vero, BHK 21 e em outras mais (AZEVEDO *et al.*, 2007).

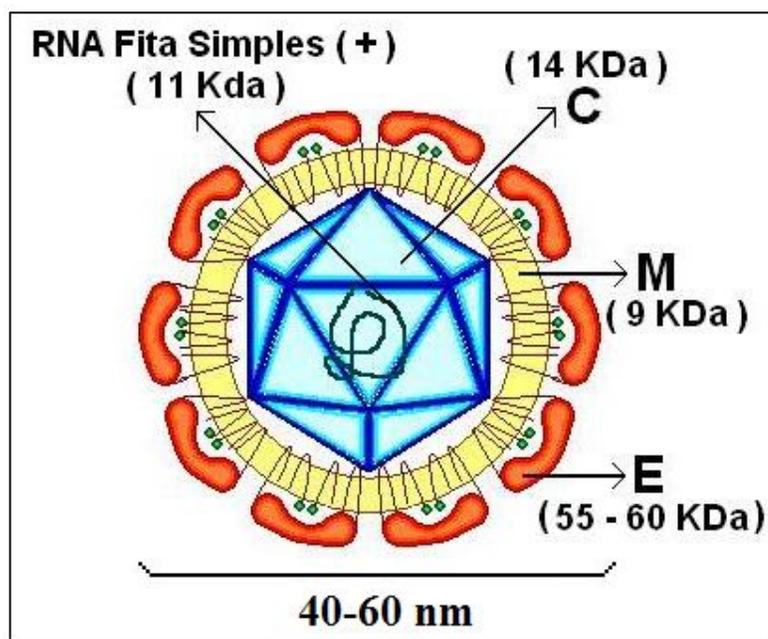


Figura 2 - Desenho mostrando a morfologia do virion de um Flavivirus e suas principais proteínas estruturais. Em C: proteína do nucleocapídeo; M, proteína de membrana e E, proteína do envelope.

Fonte: PROUTSKI *et al.*, 1997

Os *Flavivirus* transmitidos por mosquitos incluem alguns de grande importância clínicoepidemiológica, como o VDEN, VFA vírus da encefalite Saint Louis (VESL), VROC e vírus do Nilo Ocidental (VNO), dentre outros, todos capazes de determinar epidemias explosivas de febre hemorrágica ou encefalite. No Brasil, 12 *Flavivirus* já foram isolados: vírus Bussuquara (VBSQ), vírus Cacipacoré (VCPC), os quatro sorotipos do VDEN, VFA, dentre outros (LEÃO *et al.*, 2013).

A família *Bunyaviridae* constitui a maior família dos vírus de RNA, possuindo mais de 200 espécies, de acordo com suas propriedades antigênicas. No entanto, segundo suas características físico-químicas encontram-se registrados e distribuídos em cinco gêneros, quais sejam *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Plebovirus* e *Tospovirus*, 19 vírus grupados (7 grupos) e 21 vírus não grupados (FAUQUET *et al.*, 2005). As partículas são esféricas, medindo 80 a 120 nm de diâmetro, sendo dotados de um envoltório formado por lipoproteínas, que apresentam projeções (glicoproteínas) que formam o envelope e, portanto, são sensíveis aos solventes

lipídicos (éster e DCA) (Figura 3). Todos os Orthobunyavirus estudados até o presente possuem RNA, constituído por três segmentos designados grande (L), médio (M) e pequeno (S), que codificam uma polimerase, as glicoproteínas do envelope e a nucleoproteína, respectivamente. A simetria é helicoidal e a polaridade do RNA é negativa o que significa que os vírus precisam produzir uma cópia positiva para iniciar a replicação viral (LEÃO *et al.*, 2013).

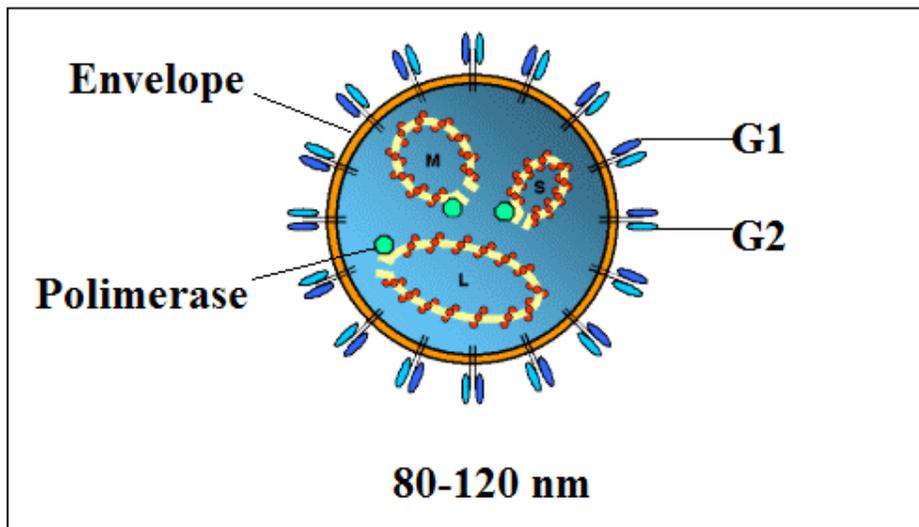


Figura 3 - Desenho mostrando a morfologia do vírus da família *Bunyviridae*. Possuem três segmentos helicoidais no nucleocapsídeo (L, M e S). Possuem no envelope uma camada bilipídica. Têm dimensões que variam entre 80 a 120nm de diâmetro.

Fonte: OBJESKI *et al.*, 1977

O nucleocapsídeo das partículas virais contém três partes internas constituídas pela nucleoproteína viral, RNA e uma enzima dotada de atividade transcriptase. A nível molecular, o genoma apresenta os segmentos G, M e P variando de tamanho de acordo com o gênero viral (LEÃO *et al.*, 2013).

Inúmeras espécies virais possuem uma hemaglutinina, que é ativa principalmente contra hemácias de ganso e cuja atividade é influenciada de forma marcante pelo pH. São patogênicos para camundongos, hamsters e multiplicam-se em uma variedade de cultivos celulares (LEÃO *et al.*, 2013).

Taxonomicamente, o gênero *Orthobunyavirus* é formado por 48 espécies virais, existindo ainda 3 vírus como prováveis novas espécies de inclusão no gênero e que não estão incluídas nos 18 grupos antigênicos conhecidos. No Brasil ocorrem

73 tipos, 70 dos quais na Amazônia brasileira, isolados pelo Instituto Evandro Chagas (IEC). Existem 18 tipos associados com doença humana (LEÃO *et al.*, 2013).

Uma grande variedade de vertebrados, incluindo roedores, primatas, aves, quirópteros, marsupiais e outros é reconhecidamente suscetível a esses vírus. A maioria deles tem sido isolada de mosquitos culicíneos ou anofelinos.

O gênero *Phlebovirus* inclui 52 distintos sorotipos que mostram variados graus de relacionamento antigênico por testes sorológicos convencionais.

As espécies do gênero *Hantavirus* têm distribuição universal e aparentemente são a exceção da família, uma vez que não precisam de artrópodes para sua manutenção. Até o presente, são conhecidos cerca de 30 membros e pelo menos 12 têm sido associados sistematicamente com doenças em seres humanos (LEÃO *et al.*, 2013).

A família *Reoviridae* inclui 12 diferentes gêneros de vírus com RNA segmentado de fita dupla e entre eles, *Coltivirus*, *Orthoreovirus*, *Orbivirus* e *Rotavirus* que infectam vertebrados. Os vírus dessa família possuem simetria icosaédrica ou esférica, 60 a 80 nm de diâmetro e um duplo capsídeo cuja camada interna é composta de 32 capsômeros. Os gêneros *Orbivirus*, com 21 sorogrupos, e *Coltivirus*, com um sorogrupo, são os de interesse em arbovirologia (SCHIFF *et al.*, 2007). Contêm RNA dupla fita, constituído de 10 segmentos (*Orbivirus*) e 12 segmentos (*Coltivirus*). São resistentes ao éter e DCA porque não possuem envelope viral, porém são sensíveis ao pH ácido. Em geral, não possuem hemaglutinina, salvo alguns como o vírus Bluetongue, que contém uma hemaglutinina em preparações purificadas, que é ativa contra hemácias de várias espécies animais (SCHIFF *et al.*, 2007).

No Brasil, foram identificadas, até o presente, 69 tipos incluídos no gênero *Orbivirus*, sendo 60 pertencentes ao grupo antigênico Changuinola, 2 ao Corriparta e 7 não grupados (MARTINS *et al.*, 2007). Vale ressaltar que a maioria desses vírus incluídos no grupo Changuinola ainda não foi registrada. Nenhum desses vírus foi até o presente associado com doença humana na Amazônia brasileira, porém não se pode excluir essa possibilidade no futuro.

A família *Rhabdoviridae* é constituída de cerca de 185 diferentes vírus que infectam plantas e animais (vertebrados e invertebrados), distribuídos em 7 gêneros, dos quais 3 afetam mamíferos: *Lyssavirus*, que comporta 3 grupos antigênicos

(raiva, febre bovina ephemeral e tibrogargan), *Vesiculovirus*, com um grupo antigênico (estomatite vesicular) e o recentemente proposto *Bracorhabdovirus*. Os demais gêneros são constituídos de vírus que infectam plantas ou peixes (DINIZ *et al.*, 2006; LYLES; RUPPRECHT, 2007). Os rhabdovírus apresentam a morfologia de uma bala de revólver, medindo 45 a 100 nm de diâmetro e 100 a 430 nm de comprimento. Apresentam um envoltório (envelope) dotado de pequenas projeções, em cujo interior se situa o nucleocapsídeo formado de RNA e proteínas. Não há presença de hemaglutinina neles, são envelopados, sensíveis ao éter e DCA, bem como aos solventes lipídicos. Diversos rhabdovírus são capazes de replicar em células Vero, BHK e outros mais, causando efeito citopático ou aparecimento de placas (LYLES; RUPPRECHT, 2007). No Brasil, são registrados 17 tipos, dos quais 5 pertencem ao gênero *Vesiculovirus* (vírus Carajás, vírus Cocal, vírus Jurona, vírus Marabá e vírus Piry-VPIRY) e 2 ao gênero *Bracorhabdovirus*, estabelecido a partir de estudos realizados com o vírus Curionópolis e o vírus Itacaiunas, isolados de culicídeos na região da Serra dos Carajás, Pará (DINIZ *et al.*, 2006). Os demais rhabdovírus isolados no Brasil não são classificados em gênero, sendo que um pertence ao grupo Hart Park (vírus Mosqueiro), um do grupo Kwatta (vírus *Kwatta like*), 3 ao grupo Timbó (vírus Chaco, vírus Sena Madureira e vírus Timbó), dois do grupo Mossoril (vírus Cuiabá e vírus Marco) e os três restantes não estão grupados (vírus Aruac, vírus Inhangapi e vírus Xiburema). No gênero *Vesiculovirus*, o único vírus associado com doença humana no Brasil é o VPIRY, apesar de que o vírus Jurona foi isolado uma vez de paciente febril. A maioria das pessoas que trabalham com o VPIRY no laboratório, cedo ou tarde, torna-se infectada e a doença causada é branda, caracterizando-se por uma síndrome febril (LEÃO *et al.*, 2013).

Os vírus pertencentes às famílias *Arenaviridae*, *Coronaviridae*, *Nodaviridae*, *Poxviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Iridoviridae*, *Herpesviridae* e *Paramyxoviridae*, embora registrados no catálogo internacional dos arbovírus, são vírus procedentes de diversas espécies de vertebrados que necessitam ser melhor estudados, muitos deles, inclusive, não são considerados ou classificados como arbovírus (LEÃO *et al.*, 2013).

1.4 EPIDEMIOLOGIA DOS ARBOVÍRUS

A distribuição geográfica dos arbovírus é ampla, abrangendo todos os continentes, tanto nas regiões tropicais como nas temperadas. Porém observa-se

predominância dos arbovírus nas regiões tropicais, certamente por apresentarem condições ecológicas favoráveis. Nos trópicos, os vetores coexistem com os hospedeiros vertebrados em todas as épocas do ano, ao passo que, nos países de clima temperado, o ciclo é interrompido durante o inverno, reiniciando-se na primavera ou verão (LEÃO *et al.*, 2013).

A transmissão de arbovírus por insetos hematófagos, tanto em ciclos silvestres endêmicos ou epizooticos, como em ciclos urbanos epidêmicos, depende de numerosos fatores, ligados às condições ambientais e aos diferentes participantes desses ciclos. Embora todos devam ser analisados conjuntamente numa determinada situação, os mais importantes são os fatores ligados aos vetores e aos hospedeiros vertebrados. Assim algumas peculiaridades do vetor combinados com estudos sorológicos dos vertebrados, fornecem informações essenciais sobre a dinâmica de transmissão das arboviroses (LEÃO *et al.*, 2013).

Os vertebrados que participam desses ciclos são considerados como hospedeiros de amplificação e dispersão e, usualmente, sobrevivem à infecção sem tornarem-se infectantes uma segunda vez, já que os anticorpos protetores impediriam nova infecção pelo mesmo vírus. Estão eles representados pelas aves silvestres, roedores, marsupiais, primatas, edentados morcegos, répteis e, possivelmente outros, ao passo que os hospedeiros invertebrados podem ser culicídeos, anofelinos, flebotomíneos, culicoides (maruins) e carrapatos. (LEÃO *et al.*, 2013).

A associação de vertebrados e vetores suscetíveis em densidades críticas em um hábitat favorável constitui fator fundamental para a persistência ou não de um determinado arbovírus. Mudanças nos níveis dessas populações serão determinantes: se ela diminuir, quebrar-se-á o ciclo de manutenção com tendência do vírus desaparecer, ou ao contrário, se aumentar a população, poderá ocorrer uma explosão de multiplicação viral com conseqüente disseminação do vírus (LEÃO *et al.*, 2013). Certos vertebrados ou vetores podem ser infectados ocasionalmente sem contribuir, no entanto, para a manutenção do ciclo básico, daí serem chamados hospedeiros incidentais. O ser humano comporta-se como hospedeiro incidental para a grande maioria dos arbovírus e, para alguns, como hospedeiro final. Os VDEN e da VORO são exceções a essa regra, pois são mantidos em ambiente urbano, ocorrendo transmissão de pessoa a pessoa, pela picada do *Aedes aegypti* e *Culicoides paraenseis*, respectivamente.

1.5 CICLO DE TRANSMISSÃO

No Brasil, em particular na Amazônia brasileira, coabitam em número bastante elevado várias espécies de dípteros hematófagos (mosquito, flebotomíneo, maruim) e vertebrados silvestres. Esta diversidade de espécies e seu número elevado constituem um achado único no mundo e propiciam condições ambientais bastante favoráveis à manutenção de vírus, em particular dos arbovírus em natureza (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1997).

Os ciclos de transmissão varia em complexidade do relativamente simples, envolvendo um único vetor e vertebrado, aos altamente complexos, envolvendo numerosos vertebrados e artrópodes. Com poucas exceções, os arbovírus são zoonoses, pois são mantidos em natureza em um ciclo de vertebrados não humanos e artrópodes (FIGURA 4); esses artrópodes são mosquitos, flebotomíneos, maruins, ou carrapatos.

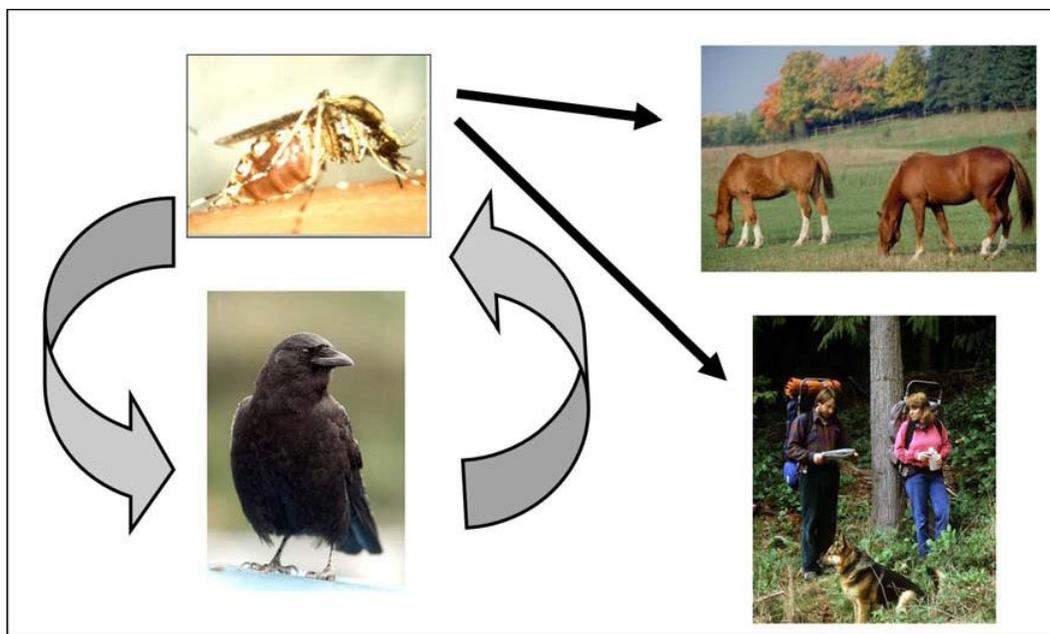


Figura 4- Esquema de manutenção e transmissão de arbovírus em natureza

Fonte: Adaptado de California Departamento of Food and Agriculture, 2010. <http://www.cmmcp.org/arbovirus%20cycle2a.JPG>.

Vale ressaltar que a maioria dos arbovírus, incluindo numerosos tipos de novos para o mundo, tem sido isolada a partir de um único hospedeiro, permanecendo seus ciclos de manutenção desconhecidos.

Esses ciclos podem ocorrer em dois diferentes contextos: silvestres e urbano. O VFA e o VORO constituem bons exemplos desses dois modos de transmissão.

A transmissão transovariana em artrópodes constitui outro mecanismo importante para manutenção de certos arbovírus. A ocorrência desse fenômeno tem sido documentada em condições naturais e laboratoriais com inúmeros arbovírus. Admiti-se, entretanto, que esse mecanismo, mesmo em condições naturais, pode não ser capaz de manter o ciclo do vírus por período prolongado (LEÃO *et al.*, 2013).

Alguns arbovírus podem ser transmitidos pela mesma espécie de mosquito e também podem infectar diferentes espécies de vertebrados, incluindo humanos (VASCONCELOS *et al.*, 2001). Também, um único arbovírus pode infectar e ser transmitido por diversas espécies de artrópodes hematófagos de diferentes gêneros (LEÃO *et al.*, 2013).

1.6 PATOGÊNESE DOS ARBOVÍRUS

Os arbovírus após a transmissão pelo inseto ao hospedeiro se multiplicam no local da porta de entrada e, por via linfática, alcançam o linfonodo regional, onde sofrem nova replicação. Pelos vasos linfáticos eferentes chegam ao ducto torácico e à corrente circulatória. Na corrente circulatória realizam viremia (primária), e a partir desta se localizam nos tecidos, infectando preferencialmente as células endoteliais e as dos músculos estriados, que servem de fonte para um fluxo contínuo de vírus para a corrente circulatória (viremia secundária), e daí, dependendo do tropismo viral se distribuem pelo organismo podendo alcançar, inclusive o sistema nervoso central (CORREA & CORREA, 1992). A FIGURA 5 sintetiza esse mecanismo.

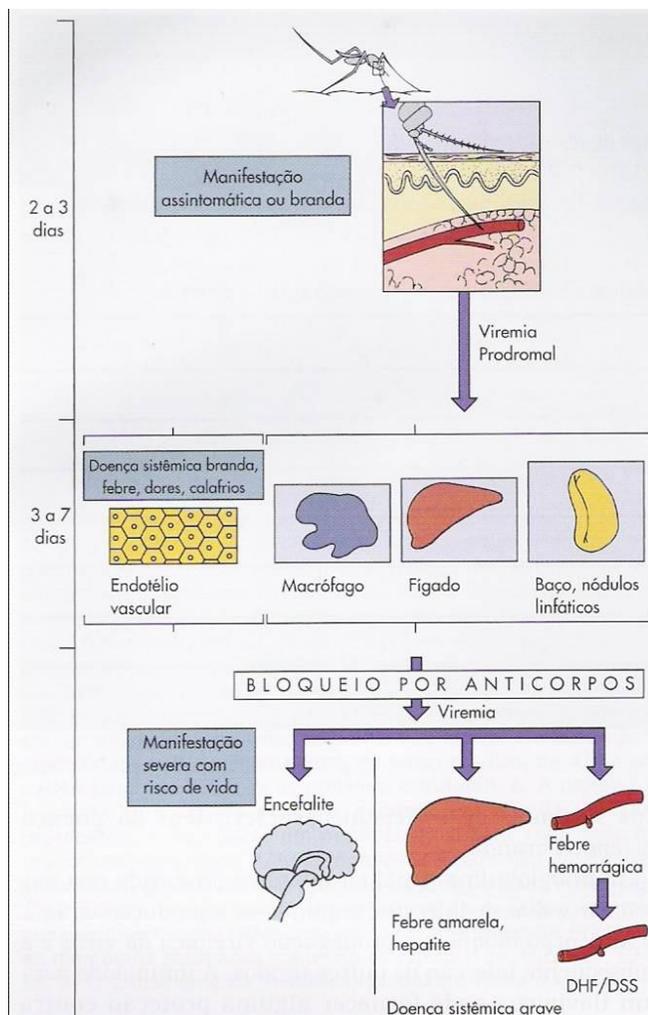


Figura 5- Esquema demonstrando a disseminação de infecção por arbovírus no hospedeiro.

Fonte: Adaptado de MURRAY *et al.*, 2006

1.7 ARBOVÍRUS ISOLADOS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

No Brasil, exceto por alguns esporádicos e limitados inquéritos sorológicos, não houve nenhum estudo sistemático até 1954, quando um programa centrado sobre a coleção de dados virológicos e sorológicos, a partir do estabelecimento de um convênio entre a Fundação Rockefeller e o Serviço Especial de Saúde Pública, da qual o Instituto Evandro Chaga (IEC) pertencia. Foram iniciadas, no IEC Belém/PA, pesquisas para demonstrar a circulação dos arbovírus e determinar seu possível papel como agentes de doença humana. Os resultados dessas investigações levaram ao isolamento de aproximadamente 19 mil amostras pertencentes a pelo menos 198 diferentes tipos de arbovírus e certos vírus isolados de vertebrados. Até o ano de 2010. Desse total, 168 foram isolados pela primeira vez no Brasil, dos

quais 104 já foram comprovados como novos para o mundo e 34 infectam o homem (MARTINS *et al.*, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2001). Torna-se assim evidente que a Amazônia constitui uma das maiores reservas de arbovírus do mundo, provavelmente a maior de todas. A identificação e a caracterização dessas amostras constituem uma parte essencial das investigações sobre a ecologia dos arbovírus. Paralelamente, inquéritos sorológicos em populações humanas e de animais silvestres em diferentes áreas da Amazônia têm fornecido elementos importantes referentes à dispersão desses agentes.

1.8 IMUNIDADE AO ARBOVÍRUS

A infecção primária ocasionada pelos arbovírus ativa o sistema imunológico que produz IgM, essas podem ser detectáveis a partir do quarto dia, após o início dos sintomas, atingindo o pico máximo em torno do sétimo ao oitavo dia e declinam lentamente, até não serem mais detectáveis, depois de dois a três meses (INNIS, 1997). As imunoglobulinas da classe G (IgG) são detectáveis em níveis baixos, mas a partir do quarto dia após início dos sintomas, aumentam o título gradualmente, atingindo valores elevados em duas semanas e mantêm-se por vários anos, o que confere imunidade contra o sorotipo infectante provavelmente por toda a vida, apresentando títulos menores ou iguais a 640 pelo teste de IH (GUBLER, 1997). A resposta secundária apresenta baixos títulos de IgM e elevados títulos de IgG (MURRAY *et al.*, 2006).

1.9 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DOS ARBOVÍRUS

Os métodos de diagnóstico específicos são baseados principalmente nos resultados dos testes de inibição da hemaglutinação (IH), fixação do complemento (FC), e soroneutralização em camundongos (SN) (DE PAULA & FONSECA, 2004). Esses testes conhecidos como de primeira geração ou testes convencionais têm grande utilidade na classificação de novos arbovírus.

Amostras de sangue e vísceras de humanos, de animais silvestres e *pool* de artrópodes são inoculados por via intracerebral em camundongos (*Mus musculus*) albinos suíços de 2 a 3 dias que ainda constituem o mais sensível método para isolamento da maioria dos arbovírus. Cérebro ou fígado, ou ambos, de animais doentes são usados para a identificação do agente e/ou quando necessário, para novas passagens (LEÃO *et al.*, 2013).

Todos os arbovírus isolados pelo Instituto Evandro Chagas (IEC) são patogênicos para camundongos albinos suíços recém-nascidos, causando principalmente quadros de encefalites. O fígado, depois do sistema nervoso central é o órgão alvo mais frequente de agressão desses vírus nos referidos animais (LEÃO *et al.*, 2013).

Outros métodos têm sido aplicados para a identificação de novos arbovírus, entre os quais se destacam o teste imunoenzimático *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) para detecção de antígenos virais e os métodos de biologia molecular, em especial os métodos de *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR), seguido de sequenciamento nucleotídico e o de microscopia eletrônica (PHILIP SAMUEL & TYAGI, 2006).

A identificação viral pelo RT-PCR é um ensaio rápido e sensível que potencialmente minimiza diversos problemas frequentemente associados com o isolamento do vírus, incluindo a perda da viabilidade do mesmo devido à presença de anticorpos neutralizantes, pois a identificação por esta técnica em soros contendo imunoglobulinas da classe M (IgM) podem ser até três vezes maiores do que por isolamento viral, mas tem o inconveniente de não ter o vírus íntegro para estudos posteriores de patogenicidade (VORNDAM & KUNO, 1997).

Durante mais de duas décadas, estudo sorológico das arboviroses restringiu-se ao emprego de técnicas clássicas como IH, FC e SN. Desses, o teste de IH em microplacas é recomendado para sorologia de rotina. Trata-se um teste sensível, de fácil execução e que requer equipamento muito simples, pois muitos arbovírus podem aglutinar hemácias de gansos; o teste IH se baseia na propriedade dos anticorpos contra um arbovírus específico inibirem a hemaglutinação. A técnica foi descrita por CLARKE & CASALS (1958) e adaptada para um procedimento de microtitulação por SHOPE (1963), sendo utilizada até os dias atuais em laboratórios especializados para detecção de anticorpos contra diversos arbovírus (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1997).

O teste de FC embora menos sensível que o teste IH é mais específico e pode ser usado seletivamente, assim como, o teste de SN que é também altamente específico (SHOPE & SATHER, 1979). O método de ELISA é amplamente utilizado no diagnóstico sorológico por ser bastante sensível, de fácil manipulação e padronização, podendo assim reforçar algumas técnicas clássicas. A técnica de

MAC ELISA, que permite o diagnóstico por detectar IgM, representa a técnica mais aceita para diagnosticar infecções recentes (KUNO *et al.*, 1987).

2. JUSTIFICATIVA

No Brasil, em particular na Amazônia brasileira, coabitam em número bastante elevado de inúmeras espécies de dípteos hematófagos (mosquitos, flebotomíneos, maruins) e vertebrados silvestres. Esta diversidade de espécies constitui um achado único no mundo e propiciam condições ambientais favoráveis à manutenção dos arbovírus na natureza. Embora a região Amazônica represente a maior fonte de infecção por vários arbovírus endêmicos, as outras regiões do Brasil não são indenes, e epidemias em zonas urbanas ou rurais, especialmente causadas pelos vírus *Dengue*, *Febre amarela*, *Oropouche*, *Mayaro* e *Rocio*, constituem um risco de saúde para uma parcela significativa da população (PINHEIRO *et al.*, 1986).

Alguns arbovírus, como por exemplo, *Virus Oropouche* (VORO), *Virus Dengue* (VDEN), *Virus da Febre Amarela* (VFA), *Virus Rocio* (VROC) e *Virus Mayaro* (VMAY) constituem sérios problemas de saúde pública e são responsáveis por elevada morbidade e/ou letalidade em seres humanos, na Amazônia e em outras regiões do Brasil e do exterior (LEÃO *et al.*, 2013).

As análises moleculares, combinadas com comparações sorológicas, indicarão mais claramente as características do vírus BE AR 701405, sugerindo, deste modo, os possíveis mecanismos para a sua manutenção na natureza.

Ademais, a caracterização molecular do vírus BE AR 701405, possibilitará o desenvolvimento de insumos biotecnológicos de diagnóstico de controle.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Caracterizar antigênica, físico-química, biológica e molecularmente o vírus BE AR 701405, obtido a partir de mosquitos da espécie *Psorophora (Jan) ferox*, capturados em Altamira – Pará.

3.2 ESPECÍFICOS

3.2.1 Verificar a suscetibilidade de camundongos recém-nascidos à infecção pelo vírus BE AR 701405;

3.2.2 Observar se as culturas de células Vero e de *Aedes albopictus*, clone C6/36 são sensíveis à infecção pelo vírus BE AR 701405;

3.2.3 Estabelecer o relacionamento antigênico do vírus, com grupos sorológicos de arbovírus já existentes.

3.2.4 Analisar a sensibilidade do vírus frente ao desoxicolato de sódio (DCA) para investigação de presença de envelope viral;

4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram desenvolvidos observando-se as normas e os critérios pré-estabelecidos e exigidos pelo Comitê Internacional de Biossegurança. Os animais foram manipulados em laboratório de biossegurança nível 2, e processados em cabine de segurança classe II B2. Os experimentos com animais foram realizados após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPAN) do IEC conforme parecer em anexo (Anexo 1).

4.1 VIRUS

O vírus BE AR 701405 foi gentilmente cedido pelo Centro de Referência para Arbovírus, sediado na SAARB/IEC, Belém, Pará, Brasil, correspondendo ao vírus liofilizado após isolamento em camundongos recém-nascidos.

4.2 ANIMAIS

Para o experimento, foram utilizados camundongos albinos suíços (*Mus musculus*) recém-nascidos (dois a três dias de idade), usados para infecção, estoque, titulação e teste de DCA e camundongos albinos suíços jovens (três a quatro semanas de idade), usados para a imunização.

4.3 INFECÇÃO, PREPARAÇÃO DE ESTOQUE E TITULAÇÃO VIRAL EM CAMUNDONGOS

A infecção e o preparo do estoque viral foram feitas a partir de uma ampola contendo o vírus liofilizado. Foi preparada uma suspensão a 10 % em tampão de salina-fosfato (PBS), com albumina bovina a 0,75 % e antibióticos penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) para inoculação intracerebral (IC) na quantidade de 0,02 mL em camundongos suíços albinos recém-nascidos (FIGURA 3). Para a titulação do vírus foram realizadas diluições de 10^{-1} a 10^{-8} , sendo cada diluição inoculada por via IC no volume de 0,02 mL em camundongos albinos suíços recém-nascidos. O título viral foi calculado usando o método de REED & MÜENCH (1938) e expresso como $DL_{50}/0,02$ mL.



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

4.4 CULTIVOS CELULARES

Foram utilizadas células de linhagem contínua de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), Vero, e de invertebrados: Células de linhagem contínua de *Aedes albopictus* (clone C6/36). O vírus foi inoculado nos cultivos quando esses apresentaram a monocamada totalmente formada.

As células Vero, provenientes de linhagem contínua de células renais de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), foram mantidas de acordo com LENNETTE (1995). Para manutenção das células Vero, foram feitas passagens semanais trocando-se o meio nessa ocasião ou quando o pH tornava-se ácido (amarelo). Quando as células formavam uma monocamada eram consideradas prontas para serem utilizadas nos experimentos ou passadas para manutenção. Para as células em manutenção, utilizavam-se garrafas plásticas de 25 cm². A técnica utilizada na preparação de garrafas e tubos para os experimentos, foi a da tripsinização. No início dos trabalhos foi feita uma assepsia rigorosa na sala de cultura, passando-se álcool a 70 % em todos os materiais a serem utilizados no fluxo laminar.

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

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

As células foram colocadas em estufa (NAPCO) com 5 % de CO₂ a 37 °C. O meio de crescimento utilizado para as células VERO, foi o meio 199 suplementado com 2 % de L-glutamina 2 mM , 1 % de HEPES , 10 % de soro bovino fetal (SBF), penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 mg/mL) e 1,5 g/L de bicarbonato de sódio (LENNETTE, 1995). Antes das células serem infectadas, o meio de crescimento foi trocado pelo meio de manutenção, o qual é semelhante ao de crescimento, exceto na concentração de SBF que diminui para 2 % (LENNETTE, 1995). Após o meio de manutenção ser adicionado à garrafa (4 mL), a mesma foi inoculada com 1 mL de suspensão viral. Após a inoculação, as células foram mantidas em estufa a 37 °C.

A manutenção da linhagem de células de invertebrados (clone C6/36), foi feita segundo BEATY *et al* (1989). Células de linhagem contínua de *Aedes albopictus* (clone C6/36), foram mantidas através de passagens seriadas semanalmente em garrafas plásticas de 25 cm² e armazenadas à temperatura ambiente (TA). O meio utilizado foi o de Leibowit'z modificado acrescido de glutamina (L-15), acrescido de tryptose fosfato, aminoácidos não essenciais, penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 mg/mL), 5 % de SBF para o meio de crescimento e 2 % para o meio de manutenção. As células foram observadas em microscópio óptico invertido (Axiovert S100) até a formação da monocamada, quando era trocado o meio de crescimento pelo de manutenção (4 mL), estando prontas para serem infectadas pelo vírus.

4.5 INFECÇÃO DOS CULTIVOS CELULARES

Em ambas as linhagens (VERO e C6/36), foi usado 1 mL do sobrenadante das suspensões virais provenientes do macerado de cérebro de camundongo recém-nascido na diluição 10%, preparadas como no item 4.3, sendo previamente filtradas em membranas de filtros Millipore de 0,22 μm , e inoculadas após formação da monocamada celular, as mesmas foram observadas diariamente em microscópio óptico invertido na tentativa de se visualizar o efeito citopático (ECP). Quando a monocamada celular apresentou aproximadamente 75 % de ECP após dez dpi, as monocamadas foram fotografadas (máquina fotográfica Cânon power short G6 acoplada em microscópio óptico invertido Axiovert S100) e depois as garrafas foram levadas à cabine de fluxo laminar para o material ser alicotado, parte destas foi utilizada no teste de imunofluorescência indireta (IFI) e o restante armazenado a -70°C .

4.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Para essa técnica foi utilizado o método descrito por GUBLER *et al* (1984). Foram usadas células infectadas com o vírus BE AR 701405, bem como, células não-infectadas (controle negativo). O soro hiperimune foi utilizado na diluição de 1:20 em PBS pH 7,4.

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

Axioskop 40 com câmara fotográfica Axiocam HCr acoplada, ambos fabricados pela ZEISS.

4.7 PREPARAÇÃO DO SORO HOMÓLOGO

O soro homólogo foi obtido a partir da imunização de camundongos suíços jovens (FIGURA 7). O esquema de imunização consistiu de quatro injeções intraperitoneais (i.p.), administradas em intervalos de sete dias, na quantidade de 0,2 mL por animal. O antígeno imunizante foi preparado a partir de cérebro de camundongos infectados com o vírus, em uma suspensão a 10 % em solução de NaCl a 0,85 % (CASALS, 1957). A coleta do sangue foi feita após intervalo mínimo de sete dias da última injeção, por punção intracardíaca estando os animais anestesiados com éter (MASSONE, 2003); o sangue colhido foi centrifugado a 3.000 rpm durante dez minutos, sendo o soro separado e conservado a -20°C , para ser utilizado em testes de IFI.

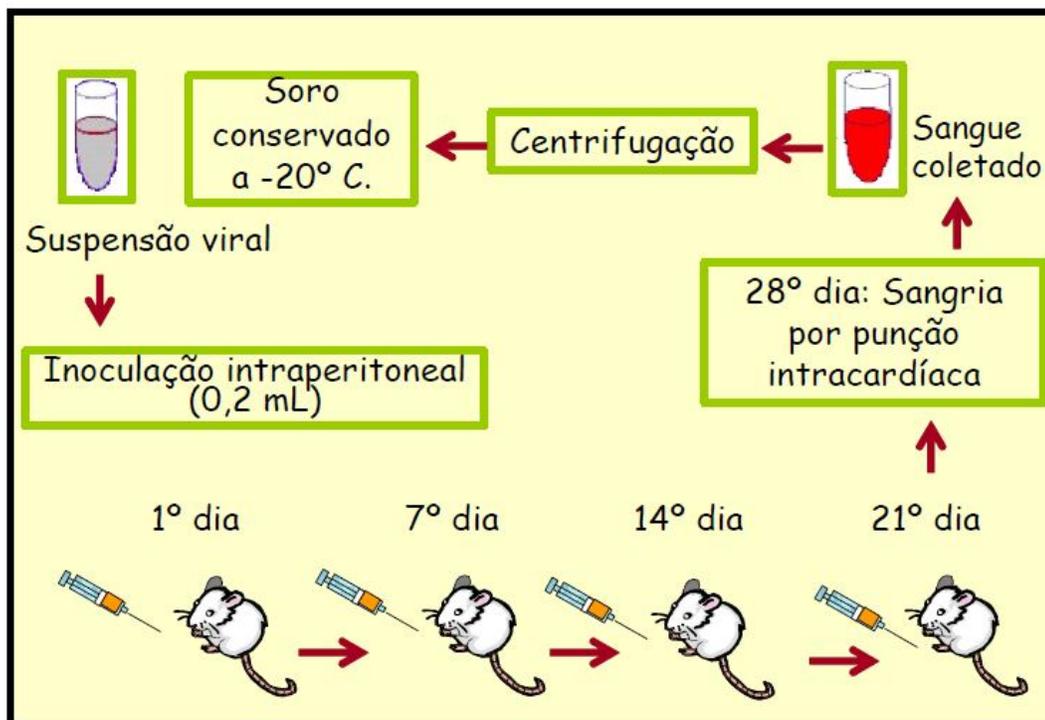


Figura 7 – Representação esquemática para obtenção do soro homólogo

4.8 SENSIBILIDADE AO DESOXICOLATO ÁCIDO DE SÓDIO (DCA)

Este teste foi realizado pelo método de THEILER (1957). Foi utilizada uma suspensão do vírus diluída a 1:5, em PBS pH 7,4, contendo albumina bovina a 0,75 %, e antibióticos. Volumes iguais dessa suspensão e DCA (1:500) foram misturados (Figura 8 A), bem como, volumes iguais da suspensão e PBS contendo albumina bovina a 0,75 %, e antibióticos (Figura 5B), que atuou como controle do vírus. Essas misturas foram incubadas durante uma hora em banho-Maria a 37 °C, e em seguida foram feitas diluições seriadas (variação de dez vezes) que foram inoculadas via IC na quantidade de 0,02 mL em camundongos suíços de dois a três dias de idade. Os títulos foram calculados pelo método de REED & MUENCH (1938) e expressos como $DL_{50}/0,02$ mL.

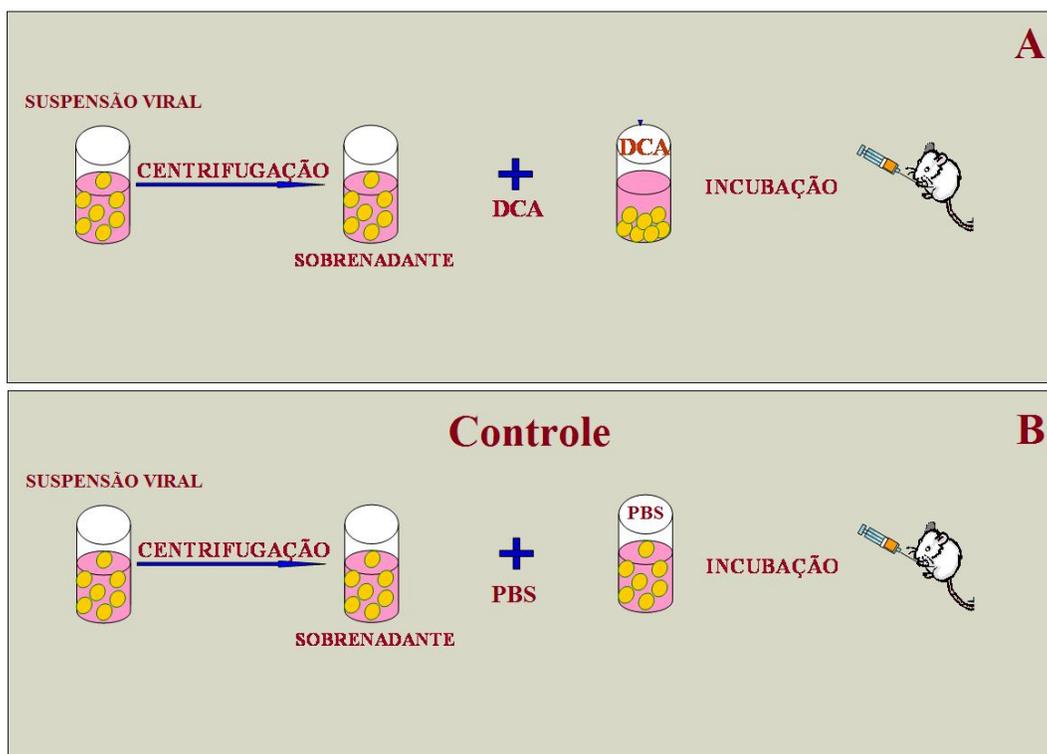


Figura 8 – Representação esquemática do teste sensibilidade ao DCA. A) amostra viral; B amostra viral e PBS (controle)

4.9 TESTE DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO (FC)

Este teste foi desenvolvido de acordo com FULTON & DUMBELL (1946) descrito por SHOPE & SATHER (1979), usando-se duas unidades de complemento de cobaio e, hemácias de carneiro sensibilizadas (BEATY *et al.*, 1989). Cérebro de camundongo infectado foi macerado e suspenso em 1 mL de veronal diluído (1:5), sendo centrifugado a 2.500 rpm durante cinco minutos e o sobrenadante utilizado como antígeno. Os soros hiperimunes foram diluídos em veronal diluído (1:5) e, em seguida inativados a 60°C durante 20 minutos, sendo utilizados em três diluições (variação de duas vezes), a partir de 1:4 e, o antígeno nas diluições 1:8 e 1:16.

5. RESULTADOS

5.1 SUSCETIBILIDADE DOS CAMUNDONGOS PARA O VIRUS BE AR 701405

Os camundongos recém-nascidos se mostraram suscetíveis à infecção pelo vírus BE AR 701405 a partir de inoculação IC. Essa suposição foi baseada no aparecimento de sinais de doença, uma vez que, em geral eles apresentaram manifestações neurológicas, tais como: tremores e ausência de coordenação motora (não conseguiam levantar-se e muito menos manter-se em pé). Durante o acompanhamento do quadro da enfermidade, constatou-se que a doença evoluía ao óbito geralmente em torno do 5º dia pós-infecção (d.p.i.).

5.2 SUSCETIBILIDADE DAS CULTURAS CELULARES PARA O VIRUS BE AR 701405

O vírus BE AR 701405 praticamente não determinou ECP visível à microscopia óptica nas células de *Aedes albopictus*, clone C6/36, já que a alteração mais significativa ficou por conta de alguns grumos de células observados a mais, em relação às células não-infectadas (Figura 9). Entretanto, o vírus BE AR 701405 causou ECP em células Vero (Figura 10) com aproximadamente 48 horas pós-infecção (p.i.) ocasionando alteração na monocamada celular representada por espaços na mesma.

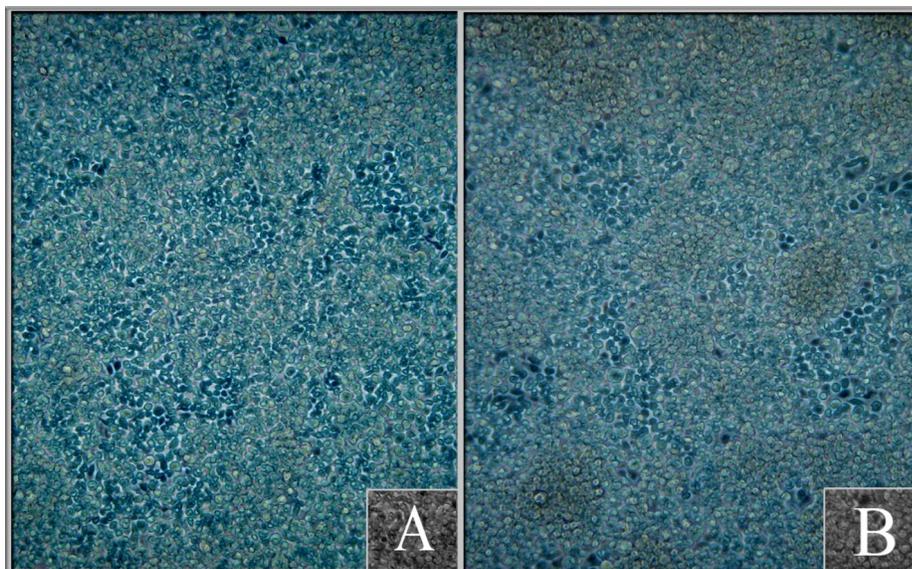
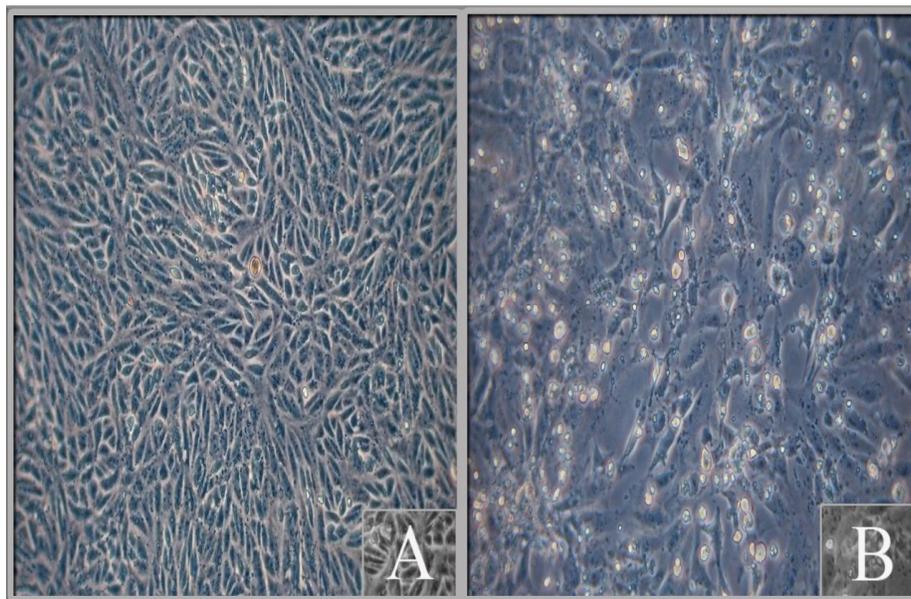


Figura 9 – Fotomicrografias de cultivos de células C6/36. A) Células C6/36 não-infectadas; B) Células C6/36 infectadas com o vírus BE AR 701405 (96 horas p.i.) (200X).



Figura

10 – Fotomicrografias de cultivos de células Vero. A) Células Vero não-infectadas; B) Células Vero infectadas com o vírus BE AR 701405 (48 horas p.i.) (200X).

5.3 TÍTULO DO ESTOQUE VIRAL EM CAMUNDONGOS

O título do estoque obtido para o vírus BE AR 701405 em camundongos albinos suíços recém-nascidos foi de $10^{-4,1}$ $DL_{50}/0,02$ mL.

5.4 SORO HOMÓLOGO

O vírus BE AR 701405 foi capaz de induzir uma boa resposta imunogênica em camundongos jovens por inoculação i.p. a qual foi verificada a partir do seu respectivo soro homólogo em teste de FC e IFI.

5.5 IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA

Os testes de IFI mostraram resultados positivos tanto para as células C6/36 infectadas com o vírus BE AR 701405 (Figura 11), como para as células Vero infectadas com o respectivo vírus (Figura 12) sendo observada fluorescência praticamente em 100 % das células.

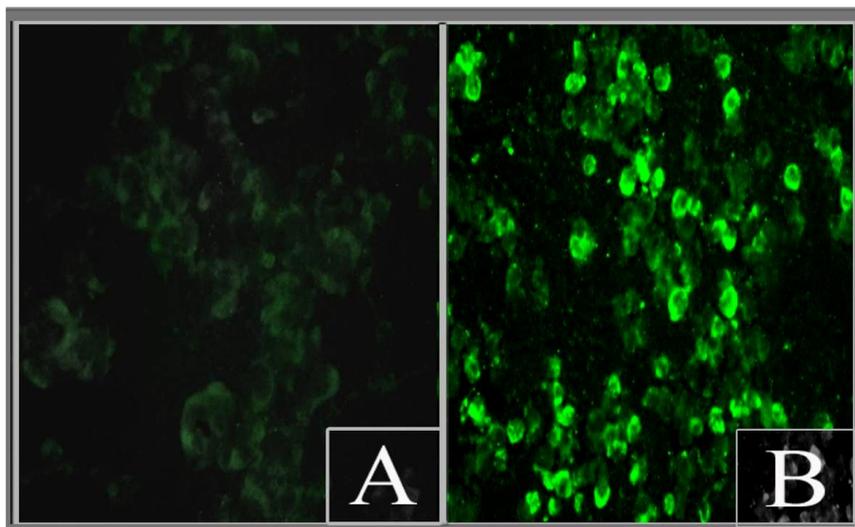


Figura 11 - Resultados do teste de IFI em cultivos de células C6/36. A) Fotomicrografia de células C6/36 não-infectadas; B) Fotomicrografia de células C6/36 infectadas com o vírus BE AR 701405 (96 horas p.i.) (400X).

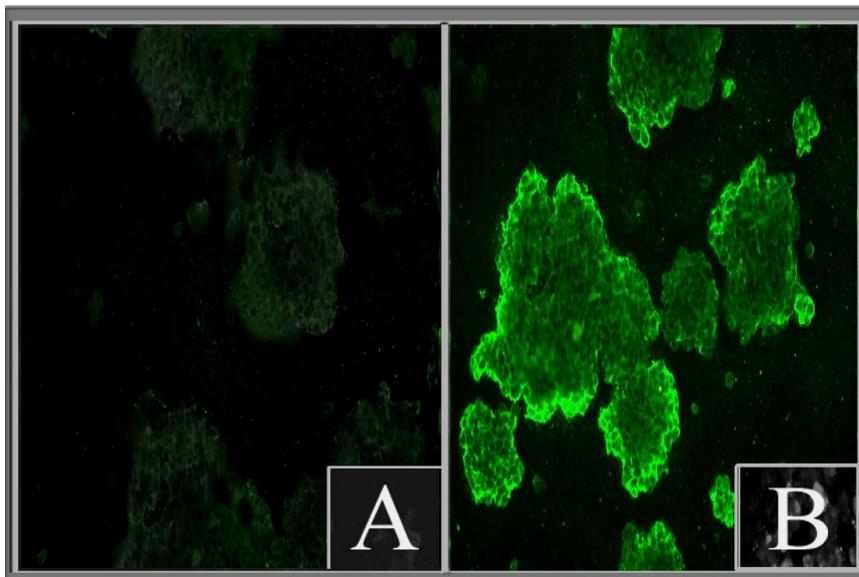


Figura 12 - Resultados do teste de IFI em cultivos de células Vero. A) Fotomicrografia de células Vero não-infectadas; B) Fotomicrografia de células Vero infectadas com o vírus BE AR 701405 (48 horas p.i.) (400X).

5.6 FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO

Dentre os soros hiperimunes de arbovírus já estabelecidos e de ocorrência no País que foram usados, os resultados dos testes de FC realizados com o antígeno preparado a partir de cérebro de camundongo infectado com o vírus BE AR 701405 mostraram reação com soros hiperimunes de vírus do grupo antigênico A, do gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae*. Entretanto, a reação foi mais acentuada com o soro hiperimune do VPIX. Além desta reação, ocorreu reatividade com seu soro homólogo. O título fixador do complemento foi ≥ 32 para os respectivos soros hiperimunes (Figura 13).

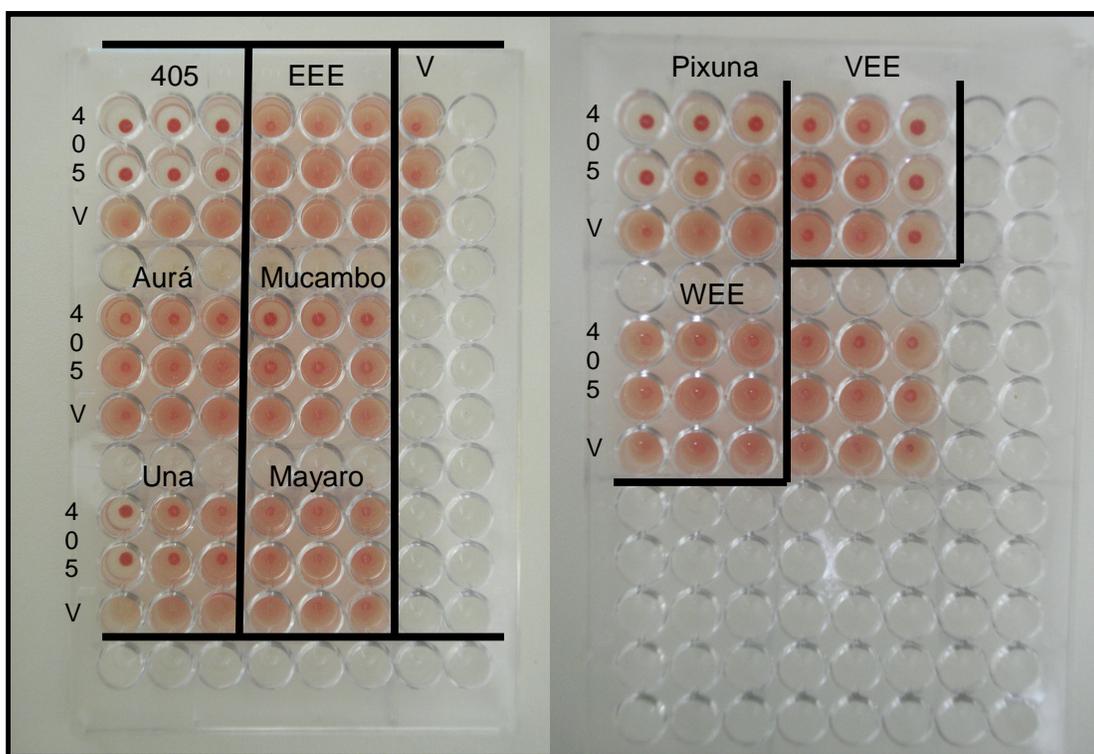


Figura 13 – Resultado do teste de FC realizado entre o vírus BE AR 701405 e o seu soro hiperimune e dos vírus do grupo A (*Alphavirus*, *Togaviridae*).

5.7 DESOXICOLATO ÁCIDO DE SÓDIO (DCA)

O título do vírus BE AR 701405 sem DCA em cérebro de camundongo infectado foi de $10^{-4,1}$ DL₅₀/0,02 mL e da cepa viral BE AR 633512 do vírus Melao (*Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus*, grupo Califórnia) também sem DCA e em cérebro de camundongo foi de $10^{-6,8}$ DL₅₀/0,02 mL. A cepa viral BE AR 633512 foi usada como controle positivo de sensibilidade ao DCA. Quanto aos títulos do vírus BE AR

701405 e da cepa viral BE AR 633512 após o tratamento com o DCA foram $10^{-2,6}$ DL₅₀/0,02 mL e $10^{-3,7}$ DL₅₀/0,02 mL, respectivamente. Os dados obtidos no teste de DCA realizado com o vírus BE AR 701405 e com a cepa viral BE AR 633512 evidenciam que ambos são sensíveis a essa substância.

6. DISCUSSÃO

O vírus BE AR 701405 até então, era considerado um vírus não-classificado e não-grupado por falta de elementos que possibilitassem sua inclusão em um gênero e família de vírus. Diante disto, foi objetivo deste trabalho desenvolver pesquisas expandidas, de maneira que fosse possível uma ampla caracterização do mesmo para a obtenção de dados que auxiliassem na sua classificação taxonômica.

Os resultados obtidos nos testes de FC que mostraram reação com o VPIX do grupo antigênico A (*Alphavirus, Togaviridae*) demonstra uma afinidade antigênica entre eles. Este relacionamento antigênico pode expressar que eles sejam apenas similares, ou que sejam idênticos.

Sobre este assunto, HAMMON & SATHER (1969) referem à soroneutralização com uma prova bastante específica para os vírus do complexo VEE. Deve-se enfatizar que o VPIX é um componente deste complexo viral e que o vírus BE AR 701405 mostrou relação antigênica com ele. Portanto, é oportuna a aplicação do teste de neutralização entre os dois vírus para a elucidação desta natureza antigênica.

Desta forma, pretende-se posteriormente desenvolver testes de neutralização entre o vírus BE AR 701405 e o soro hiperimune do VPIX, bem como, no sentido inverso, ou seja, entre o VPIX e o soro hiperimune do vírus BE AR 701405. Este teste devido ser específico conforme já mencionado, permitirá saber se o vírus BE AR 701405 é uma cepa ou não do VPIX. Devido ao relato de isolamento do VPIX desde 1961, é possível que decorrido este tempo, possam ter ocorrido alterações em natureza de maneira que o vírus BE AR 701405 venha a ser caracterizado antigenicamente como um vírus diferente do VPIX.

O *Virus Pixuna* (VPIX) pertence à família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*, sorogrupo A (FAUQUET *et al.*, 2005) e foi isolado pela primeira vez no ano de 1961 a partir de um lote de mosquitos do gênero *Anopheles* capturados na rodovia Belém-Brasília, km 14, PA (BR 14). Decorridos 47 anos, um novo isolado, o vírus BE AR 701405, relacionado antigenicamente ao VPIX foi obtido de um lote de mosquitos da espécie *Psorophora (Jan.) ferox*, capturados em Altamira, estado do Pará, no ano de 2006.

A família *Togaviridae*, inclui os gêneros *Alphavirus* e *Rubivirus*, sendo que o primeiro é o de interesse em Arbovirologia. Portanto, muitos alfavírus são

transmitidos biologicamente entre vertebrados e mosquitos ou outros artrópodes hematófagos (FAUQUET *et al.*, 2005).

Os representantes desta família são vírus com 70 nm de diâmetro, esféricos, apresentam envelope lipídico, nucleocapsídeo icosaédrico, e genoma constituído de fita simples de RNA (FAUQUET *et al.*, 2005).

Três vírus pertencentes ao gênero *Alphavirus*, que têm grande importância epidemiológica com ampla distribuição nas Américas têm sido isolados ou detectados sorologicamente que são: o vírus da encefalomielite eqüina do leste (EEE), o da encefalomielite eqüina do oeste (WEE) e o vírus da encefalomielite eqüina venezuelana (VEE) (FIELDS *et al.*, 1996).

Os vírus do gênero *Alphavirus* são definidos com base nas reações sorológicas cruzadas. Contém oito complexos antigênicos baseados na reatividade sorológica cruzada: VEE, WEE, EEE, Trocara, Middelburg, Ndumu, Semilike Forest e Barmah Forest. Este gênero contempla 21 espécies virais das quais o VPIX é uma delas (FAUQUET *et al.*, 2005).

A infecção que estes vírus determinam em células de vertebrados geralmente tem origem citolítica, e em células de mosquitos, muitos alfavírus frequentemente estabelecem uma infecção não-citolítica (FAUQUET *et al.*, 2005).

Os vírus EEE (BE AN 7526), WEE (BE AN 70100), VEE (BE AN 50783), Aurá [(AUR) BE AN 10315], Mucambo [(MUC) BE AN 10967], Una [(UNA) BE AR 13136], Mayaro [(MAY) BE AR 20290], PIX (BE AR 35645) e Trocará (TRO) são os vírus pertencentes ao sorogrupo A utilizados na rotina da Seção de Arbovirologia do Instituto Evandro Chagas (SAARB/IEC) para caracterização antigênica de novos isolamentos virais.

Os camundongos mostraram-se suscetíveis à infecção pelo vírus BE AR 701405. Deve-se enfatizar que eles apresentaram sinais de desordens neurológicas como tremores e ausência de coordenação motora, após a inoculação com este vírus. Esses dados são confirmados por DIAS (1986) ao citar que entre as características biológicas dos arbovírus, a sua patogenicidade para os camundongos albinos está presente, com evidente capacidade de determinar encefalite nos animais recém-nascidos.

Portanto, os dados clínicos constatados nos camundongos assinalam uma suscetibilidade, por parte destes animais frente à infecção pelo vírus BE AR 701405, apesar de seus órgãos não terem sido submetidos a análises microscópicas.

Camundongos inoculados com a cepa viral Pixuna de moderada virulência, do VEE, mostraram sinais de encefalite que foi observada em 50-60% dos animais infectados (LIMA *et al.*, 1990). Esta informação vem ao encontro do resultado verificado nos camundongos infectados com o vírus BE AR 701405 que mostraram quadros sugestivos de encefalite, já que apresentaram alterações neurológicas. LIMA *et al.* (1987), do mesmo modo, já tinham demonstrado a suscetibilidade destes animais à infecção pelo VPIX por inoculação IC.

SAMPIERI *et al.*, (1984) constataram a sensibilidade de cultivos celulares preparados com células de embrião (onze dias de idade) de camundongos suíços albinos infectados com o VPIX. Eles verificaram que as culturas mostraram ser um sistema permissivo a este vírus com uma infecção produtiva com citólise. Como estas células são provenientes de camundongos, estes dados apoiam a indicação de sensibilidade destes animais à infecção pelo vírus BE AR 701405 uma vez que este é relacionado ao VPIX.

Por outro lado, o que realmente evidenciou que esses animais foram suscetíveis à infecção pelo vírus BE AR 701405 foi o fato de que a partir de inoculação IC neles é que se obteve o estoque viral usado para todos os experimentos. Assim, para todos os ensaios realizados, foram usados cérebros de camundongos infectados com o vírus BE AR 701405, demonstrando deste modo, a sua replicação neste órgão.

Para investigar a interação vírus-célula foram realizadas infecções nas culturas de linhagens contínuas de células Vero e C6/36, que rotineiramente são utilizadas para o isolamento de arbovírus. As alterações verificadas nos cultivos de células Vero infectadas com o vírus BE AR 701405 tiveram a responsabilidade viral confirmada pelos testes de IFI. Por outro lado, mesmo não tendo sido observadas modificações significativas nas células C6/36 infectadas com o vírus BE AR 701405, a replicação deste também foi confirmada por IFI. Estes dados de positividade denotam que essas células têm sensibilidade para este vírus, portanto, elas devem possuir receptores que permitem a ligação e posterior penetração do mesmo.

Fazendo uma relação com as células Vero (células de mamíferos), cita-se que PAGLINI *et al.*, (2006), demonstraram a penetração do VPIX em células de mamíferos evidenciando desta forma, a presença de receptor celular para o mesmo.

A constatação do ECP (48 horas p.i.) ocasionado pelo vírus BE AR 701405 nas células Vero em um tempo curto, sugere que ele causa morte rápida das células de mamíferos em cultura; isto contrasta com o que foi observado em células de insetos (C6/36) aonde ele mostrou pouco ou nenhum ECP como resposta à infecção viral, a despeito da sua bem-sucedida replicação nestas células, confirmada por IFI conforme já referenciado.

Algumas citações sobre replicação viral em culturas de células são feitas a seguir, apesar de serem referentes a vírus de famílias diferentes da família do vírus BE AR 701405, porém, que são arbovírus.

O vírus BE AR 701405 replicou-se em células Vero à semelhança do *Virus Minaçu* que é um orbivírus (MARTINS *et al.*, 2007). Outros arbovírus com replicação nessas células são: o *Virus Akabane* e *Virus Aino* (*Orthobunyavirus*, *Bunyaviridae*) e *Virus Chuzan* (*Orbivirus*, *Reoviridae*) que também levaram à manifestação de ECP (LIM *et al.*, 2005). Mais recentemente, VIEIRA (2007) caracterizando o vírus Breu Branco (*Orbivirus*, *Reoviridae*) observou que ele foi capaz de replicar-se tanto em células Vero quanto em células C6/36 e nestas últimas, o vírus Breu Branco ocasionou ECP. O *Virus bluetongue* (VBT), que também pertence ao gênero *Orbivirus*, família *Reoviridae*, do mesmo modo tem habilidade em replicar-se tanto em hospedeiros vertebrados como em invertebrados (ROY, 2001).

O soro hiperimune do vírus BE AR 701405 foi testado inicialmente por FC antes de ser empregado no teste de IFI e foi verificado que ele induziu reatividade imunológica. Ou seja, ele demonstrou ser excelente imunógeno, o que foi comprovado nos referidos testes sorológicos. O soro hiperimune deste vírus proporcionou título fixador do complemento $\geq 1/32$, portanto, título relativamente alto uma vez que o título de 1/8 já é considerado positivo.

Os resultados dos testes de IFI feitos em células C6/36 e Vero infectadas com o vírus BE AR 701405 mostraram uma intensa marcação citoplasmática dos antígenos virais, praticamente com 100 % de células fluorescentes conforme pode se visto nas figuras 3 e 4 respectivamente. Isto reflete a capacidade do vírus BE AR 701405 em replicar-se nestas células.

Os dados obtidos a partir dos testes de FC possibilitaram a classificação taxonômica do vírus BE AR 701405 no gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae*, mais especificamente, no grupo antigênico A. Esta constatação está baseada no fato de que foi detectada reatividade antigênica entre o VPIX que pertence a este sorogrupo, com o antígeno preparado a partir de cérebro de camundongo infectado com o vírus BE AR 701405.

O DCA é uma substância com propriedade lipossolúvel, e por isso age na bicamada lipídica, danificando o envelope viral o que ocasiona interferência na capacidade infecciosa dos vírus que apresentam essa estrutura, quando são submetidos à ação dessa substância implicando, por conseguinte, na diminuição significativa do seu título (THEILER, 1957).

Os resultados dos testes de DCA comprovaram que o vírus BE AR 701405 é sensível à ação dessa substância, já que o título viral com o DCA apresentou uma redução igual a 1,5 log DL₅₀ em relação ao título dele sem DCA demonstrando, deste modo, que o vírus BE AR 701405 é sensível a esse solvente lipídico, sendo altamente indicativo da presença de envelope viral (THEILER, 1957) o que é uma característica dos vírus que fazem parte da família *Togaviridae* (FAUQUET *et al.*, 2005). Uma redução de $\geq 1,5$ log DL₅₀ no título de um vírus quando submetido à ação do DCA, confirma que ele é sensível a essa substância (SHOPE & SATHER, 1979).

Para efeito de comparação aos resultados dos testes de DCA com o vírus BE AR 701405, foi também submetida à ação deste detergente, a cepa viral BE AR 633512 do *Virus Melao* (VMEL) da família *Bunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus*, grupo Califórnia, sobre a qual o DCA induziu como efeito, uma redução significativa em seu título; o que era esperado, pois, o VMEL como todos os representantes da família *Bunyaviridae* apresentam envelope (FAUQUET *et al.*, 2005), de maneira que, eles são sensíveis aos solventes orgânicos.

7. CONCLUSÕES

- Camundongos suíços recém-nascidos inoculados por via IC são suscetíveis à infecção pelo vírus BE AR 701405.

- As linhagens celulares contínuas Vero e C6/36 são suscetíveis à infecção pelo vírus BE AR 701405.

- O vírus BE AR 701405 é um bom imunógeno.

- O vírus BE AR 701405 é sensível ao DCA, sendo portanto, um vírus envelopado.

- O vírus BE AR 701405 está relacionado antigenicamente ao VPIX e pertence ao grupo antigênico A, do gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae*.

Como perspectivas futuras deste trabalho será realizada a soroneutralização para esclarecimento da relação antigênica entre o vírus BE AR 701405 e o vírus *Pixuna*.

Será realizada a caracterização molecular do vírus BE AR 701405, bem como, análise das seqüências, obtidas por sequenciamento de nova geração, quanto à homologia no que se refere aos nucleotídeos entre a cepa do Vírus BE AR 701405 e o vírus *Pixuna*. Esses estudos possibilitarão o desenvolvimento de insumos biotecnológicos de diagnóstico para o referido vírus.

8. REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

AZEVEDO RSS, et al. **Characterization of Minaçu virus (Reoviridae: Orbivirus) and pathological changes in experimentally infected newborn mice.** *International Journal Experimental Pathology*. 2007; 88 (1): 63-73.

BEATY B.J, CALISHER C.H., SHOPE RE. Arboviruses. In: Schmidt NJ, Emmons RW. (eds.). **Diagnostic Procedure for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections.** 6th. Edition. American Public Health Association, Washington, 1989. p. 795-855.

California Departamento of Food and Agriculture, Disponível em: <<http://www.cmmcp.org/arbovirus%20cycle2a.JPG>>. Acesso em: 22/10/2010

CLARKE, D.H., CASALS, J. Technique for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod-borne viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 7: 561-573, 1958.

CORREA, W.M., CORREA, C.N.M. Encefalomielite Equina. In: **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos.** Correa, W.M. & Correa, C.N.M. (eds). Rio de Janeiro, Medsi, 1992. p. 635-642.

CASALS J. **Immunological Techniques for animals viruses.** In: Maramorosh K, Koprowski H. (eds.). *Methods in Virology*. New York, Academic Press. v. 3; 1957. p. 75-81.

DE PAULA, S.O, FONSECA, B.A. *Dengue*: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 8: 390-8, 2004.

DIAS LB. **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.

DINIZ, J. A. P. et al.; Characterization of two new rhabdoviruses isolated from midges (*Culicoides* SPP) in the Brazilian Amazon: proposed members of a new genus, Bracorhabdovirus. *Archives of Virology*, v. 151, n. 12, p. 2519-2527, dec. 2006

FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U., BALL, L.A. Family *Bunyaviridae*. In: **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses**. FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U., BALL, L.A (eds). San Diego, Elsevier Academic Press, 2005. p. 695-716.

FIELDS BN, KNIPE DM, HOWLEY PM. *Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996.

FULTON F, DUMBELL KR. **The serological comparison of strains of influenza virus**. *Journal of General Microbiology*. 1946; 3: 97-111.

GRIFFIN, D.E. Alphaviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.), *Fields virology*. 5 th ed. Philadelphia: Lippincot Williams and Wildins, 2007. P. 1023-1067

GUBLER DJ, KUNO G, SATHER GE, VELEZ M, OLIVER A.. **Mosquito Cell Cultures and Specific Monoclonal Antibodies in Surveillance for Dengue Viruses**. *American Journal of Tropical Medicine and hygiene*. 1984; 33 (1): 158-165.

HAMMON WM, SATHER GE. Arboviruses. In: Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET (eds.). **Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections**. 5th ed., American Public Health Association, 1969. p. 237-80.

INNIS, B.L. Antibody responses to dengue virus infection. In: **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. Gubler, D.J & Kuno, G (eds). Cambridge/UK, University Press, 1997. p. 221-243.

KUNO, G., GOMEZ, I., GUBLER, D.J. - Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme linked immunosorbent assay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 36: 153-159, 1987

LEÃO, R.N.Q. et al. **Medicina Tropical e Infectologia na Amazônia**. Volume 1, Belém-PA: Samauma Editorial, 2013. P. 482-500

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

LIMA L., WALDER R, OBREGÓN F, DRUJAN B. **Serotonin turnover rate in raphe and cortex of mice infected with Venezuelan equine encephalomyelitis virus.** *Journal of Neuroscience Research.* 1987; 17(4): 428-34.

LIMA L., DRUJAN B, WALDER R. **Cerebral serotonin in viral encephalitis.** *Journal of Neural Transmission. Supplementum.* 1990; 29: 141-51.

LIM SI, KWEON CH, YANG DK, TARK DS, KWEON JH. **Apoptosis in Vero cells infected with Akabane, Aino and Chuzan virus.** *Journal Veterinary Science.* 2005; 6 (3): 251-254.

LYLES, D. S.; RUPPRECHT, C. E. Rhabdoviridae. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.) *Fields virology.* 5th ed. Philadelphia: Lippincot Williams and Wilkins, 2007. P. 1363-1408.

MARTINS, L.C., RODRIGUES, S.G., CHIANG, J.O., VASCONCELOS, P.F.C., MUNIZ, P.T., FERREIRA, M.U. The acre project: the epidemiology of malaria and arthropod-borne virus infections in a rural Amazonian population. **Caderno de Saude Pública, 22:** 1325-34, 2007.

MASSONE F. **Anestesiologia Veterinária: Farmacologia e Técnicas,** 4 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003.

MURRAY, P.R., DREW, ROSENTHAL, K.S., PFALLER, M.A. **Togavírus e Flavivírus. Microbiologia Médica.** Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2006. 623-634p.

OBIJESKI JF, BISHOP DH, PALMER EL, MURPHY FA. 1976. **Segmented genome and nucleocapsid of La Crosse virus.** *J Virol.* 20:664-75. OBIJESKI JF, MURPHY FA. 1977. *Bunyaviridae: recent biochemical*

PAGLINI G, PEREYRA E, DEL C, PAGLINI S. **Cellular receptor for pixuna virus in chicken embryonic fibroblasts.** *Medical Microbiology and Immunology.* 2006; 195 (2): 85-92.

PFEFFER M, PROETZEL G, KINNEY RM. 1997. Genus-specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*;57:709–718.

PINHEIRO, F.P., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., FREITAS, R.B., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S., VASCONCELOS, P.F.C. Arboviroses: Aspectos clínico-epidemiológicos. In: **Instituto Evandro Chagas, 50 anos de Contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical**. Belém: Fundação Serviços de Saúde Pública, Vol. 1, 1986. p.375-408.

PHILIP SAMUEL, P., TYAGI, B.K. Diagnostic methods for detection and isolation of *Dengue* viruses from vector mosquitoes. **Indian Journal of Medical Research**, **123**: 615-28, 2006.

PROUTSKI, V.; GOULD, E. A.; HOLMES, E. C. Secondary structure of the 3' untranslated region of flaviviruses: similarities and differences. *Nucl. Acids Res.*, v. 25, n. 6.,p. 1194-1202, 1997.

REED LS, MÜENCH H. **Simple method of estimating fifty per cent endpoints**. *American Journal of Hygiene*. 1938; 27: 493-497.

ROY P. **Orbiviruses and their replication**. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (ed.). 4th ed. *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia; 2001. p. 1835-1869.

SAMPIERI L, SARTORI T, PAGLINI S. **Propagacion del virus Pixuna en cultivos de embrion de raton**. *Revista Argentina de Microbiologia*. 1984; 16(1): 45-8.

SCHIF, L. A.; NIBERT, M. L.; TYLER, K. L. Orthoreoviruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; (Ed.). *Fields virology*. 5 th. Ed. Philadelphia: Lippincot Williams and Wilkins, 2007. P. 1853-1915.

SHOPE, R.E. The use of micro-hemagglutination-inhibition test to follow antibody response after arthropod-borne virus infection in a community of forest animals. **Anais de Microbiologia**, **11**: 167-171, 1963.

SHOPE RE, SATHER GE. Arboviruses. In: Lennette EH, Schmidt NJ. (eds.). **Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections**. 5^a ed. Amer. Publ. Health Assoc., Washington, 1979. p. 767-841.

THEILER M. **Action of sodium desoxycholate on arthropod-borne viruses**. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1957; 96: 3 80-382.

TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., RODRIGUES, S.G., TAVARES-NETO, J. Evidências sorológicas da circulação do arbovírus Rocio (*Flaviviridae*) na Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 30: 511- 515, 1997.

VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. (Ed.). Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 17. 155-164, 2001.

VAN REGENMORTEL, M. H. V. Introduction to the species conception virus taxonomy In: **Virus taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses**. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of viruses Van Regenmortel, M. H. V.; Fauquet, C. M.; Bishop, D.H. L.; Cartens, E. B.; Estes, M.K.; Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A.; Mcgeoch, D. J.; Pringle, C.R.; Wickner, R.B. (eds). p, 03-16, Academic Express: San Diego, 2000.

VIEIRA CMA. **Caracterização Antigênica, Morfológica e Molecular do Vírus Breu Branco, um Novo Membro da Família Reoviridae, Gênero Orbivirus**. Tese (Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários)- Belém, Universidade Federal do Pará, 2007. 227 p.

VORNDAM, V., KUNO, G. Laboratory diagnosis of dengue virus infection. In: **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. Gubler, D.J & Kuno, G. (eds). Cambridge/UK, University Press, 1997. p. 313-333.

9. ANEXO

MS - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE

**INSTITUTO
EVANDRO
CHAGAS**

Parecer 0002/2011/CEPAN/IEC/SVS/MS
Registro CEPAN - 018/2011

Ananindeua/PA, 03 de março de 2011

Projeto: "Caracterização Antigênica, Físico-química, Biológica, Molecular e Morfológica do Vírus BE AR 701405, obtido a partir de mosquitos da espécie *Psorophora (jan) ferox*, capturados em Altamira-PA"

Pesquisador Responsável: CONCEIÇÃO DE MARIA ALMEIDA VIEIRA

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais-CEPAN do Instituto Evandro Chagas, em sua reunião realizada no dia 28/02/2011, cientificamos que o projeto acima **foi aprovado**.

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

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

Atenciosamente,

PAULO HENRIQUE GOMES DE CASTRO
Coordenador do CEPAN/IEC