

TAIS PINHEIRO DE ARAUJO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ANTIGÊNICA DO VÍRUS JURUAÇÁ,
ISOLADO DE MORCEGO NO ESTADO DO PARÁ.**

Belém – Pará

2006

TAIS PINHEIRO DE ARAUJO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ANTIGÊNICA DO VÍRUS JURUAÇÁ,
ISOLADO DE MORCEGO NO ESTADO DO PARÁ.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia das Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Patologia das Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos

Belém – Pará

2006

TAIS PINHEIRO DE ARAUJO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ANTIGÊNICA DO VÍRUS JURUAÇÁ,
ISOLADO DE MORCEGO NO ESTADO DO PARÁ.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia das Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Patologia das Doenças Tropicais, pela comissão formada pelos professores:

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

Prof. Dr. Alexandre da Costa Linhares
Seção de Virologia Geral
Instituto Evandro Chagas

Prof. Dra. Rita Catarina Medeiros de Souza
Núcleo de Medicina Tropical, UFPA
Hospital Universitário João de Barros Barreto

Prof. Dr. Juarez Antonio Simões Quaresma
Laboratório de Imunopatologia
Núcleo de Medicina Tropical, UFPA

Suplente:

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

Belém – Pará

2006

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação de mestrado à minha família, que sempre está presente nos momentos mais especiais e decisivos, e em especial à minha mãe (*in memoriam*), a quem devo tudo o que sou.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, pelo infinito amor tão fiel, amigo e misericordioso que faz Sua luz brilhar no meu caminho; porque nos momentos mais difíceis de minha vida me sustentou com Seus braços santos, fortes e poderosos.

Aos meus pais, pelo carinho, amor e dedicação, que acompanharam cada etapa de minha vida, apoiando e fortificando sempre; pela brilhante educação que me deram, fazendo com que cada vez mais eu busque o sucesso profissional e pessoal. Em especial à minha mãe, que mesmo em outro plano continua a me iluminar e orientar em todos os momentos da minha vida.

A minha tia Stella, que toma conta do meu bem-estar e sempre torce por mim.

Aos meus irmãos Daniel e Igor, pelo carinho e convivência durante as várias fases das nossas vidas.

Ao meu orientador, Dr. Pedro Vasconcelos, agradeço pelo apoio e atenção, por dar-me a oportunidade de ampliar meus conhecimentos, contribuindo sobremaneira na minha formação e caráter profissional.

À Dra. Amélia Travassos da Rosa, pela amizade, apoio, pelos primeiros ensinamentos em arbovírus e sorologia, além das lições e experiência de vida.

Ao José Antonio Diniz, pela amizade, dedicação e paciência ao transmitir os ensinamentos técnicos do laboratório, bem como pelo incentivo nos momentos difíceis do desenvolvimento do trabalho, buscando sempre a melhoria profissional e pessoal.

À Dra. Ana Cecília Cruz e ao Dr. Juarez Quaresma, pela amizade, apoio e contribuição para a realização deste trabalho.

Aos amigos da seção de microscopia eletrônica: Ádila Dias, Ana Lúcia Wanzeler, Crislaine Pinheiro, Daisy Silva, Francinete Alves, Ilce Moreira, Márcio, Patrícia Ramos, Sueli Kataoka e Zaire, por todo o apoio prestado nas horas de aflição e pelas alegrias nos momentos de descontração.

Aos amigos da seção de arbovirologia e febres hemorrágicas, por toda a ajuda prestada, e em especial ao Basílio Buna, Geraldo Mendes, Luiz Roberto, Livia Carício, Eliana Pinto e Helena Vasconcelos.

À Dra. Lourdes Gomes e Ceyla Castro da Seção de Virologia Geral/IEC pela contribuição para a realização deste trabalho.

À Profa. Maria Irene Weyl pela amizade e contribuição na revisão desta dissertação.

À Celiane Tapety pela amizade e apoio na finalização deste trabalho.

À Secretaria de Pós-Graduação do NMT/UFGA.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Instituto Evandro Chagas, onde descobri uma paixão de trabalho que é a pesquisa científica no campo da virologia.

Aos demais funcionários do IEC e a todos que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal, o meu eterno agradecimento.

EPÍGRAFE

“Há aqueles que lutam um dia, e por isso são bons...
Há aqueles que lutam muitos dias e por isso são muito
bons...
Há aqueles que lutam anos, e são melhores ainda...
Porém, há aqueles que lutam toda a vida...
Esses são imprescindíveis...”

Bertold Brecht

SUMARIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
RESUMO	xx
ABSTRACT	xxi
1 INTRODUÇÃO	1
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	3
2.1 GENERALIDADES SOBRE VÍRUS E CLASSIFICAÇÃO VIRAL	3
2.2 VÍRUS NÃO CLASSIFICADOS	15
2.3 A ORDEM <i>CHIROPTERA</i>	16
2.4 VÍRUS ISOLADOS DE MORCEGOS	20
2.5 FAMÍLIA <i>PICORNAVIRIDAE</i>	26
2.6 O SISTEMA NERVOSO CENTRAL	35
3 OBJETIVOS	38
3.1 GERAL	38
3.2 ESPECÍFICOS	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 AMOSTRA	39
4.1.1 Isolamento do vírus em camundongo albino suíço recém-nascido	40
4.1.2 Título Viral	41
4.1.3 Preparo do Soro Homólogo	42
4.1.4 Preparo de Antígeno (Sucrose-Acetona)	42
4.2 ISOLAMENTO EM CULTIVOS CELULARES	43

4.2.1	Cultivos de Linhagens Permanentes	43
4.2.2	Cultivo Primário de Astrócito	44
4.2.3	Cultivo Primário de Microglias	45
4.2.4	Cultivo Primário de Neurônios	45
4.2.5	Infecção dos Cultivos Celulares	46
4.3	TESTES FÍSICO-QUÍMICOS	46
4.3.1	Sensibilidade ao Desoxicolato de Sódio (DCA)	46
4.3.2	Teste de Hemaglutinação (HÁ)	47
4.4	TESTES SOROLÓGICOS	49
4.4.1	Fixação do Complemento (FC)	49
4.4.2	Inibição da Hemaglutinação (IH)	51
4.4.3	Imunofluorescência Indireta (IFI)	52
4.4.4	Imunofluorescência Indireta com dupla marcação	53
4.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	55
4.5.1	Cortes ultrafinos	55
4.5.1.1	Cérebro de camundongo albino suíço recém-nascido	55
4.5.1.2	Cultivos Celulares	57
4.5.2	Contrastação Negativa	58
4.5.3	Imunomicroscopia Eletrônica	59
4.6	HISTOPATOLOGIA	60
4.6.1	Exame Histopatológico	60
4.6.2	Imunohistoquímica	62
4.7	BIOLOGIA MOLECULAR	63
4.7.1	Precipitação e Semi-Purificação viral	63
4.7.2	Extração do Ácido Nucleico viral	64

4.7.3	Reação de Transcrição Reversa (RT) com oligonucleotídeo Random Hexâmero	65
4.7.4	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	65
5	RESULTADOS	67
5.1	CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS	67
5.1.1	Suscetibilidade dos camundongos albinos suíços	67
5.1.2	Suscetibilidade dos cultivos celulares	67
5.2	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	73
5.2.1	Presença de hemaglutinina	73
5.2.2	Sensibilidade ao desoxicolato de sódio	73
5.3	CARACTERÍSTICAS SOROLÓGICAS	73
5.4	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	76
5.4.1	Contrastação negativa	76
5.4.2	Imunomicroscopia eletrônica	77
5.4.3	Cortes ultrafinos	77
5.5	CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS	78
5.5.1	Exame histopatológico	78
5.5.2	Imunohistoquímica	84
5.6	CARACTERÍSTICAS MOLECULARES	86
6	DISCUSSÃO	88
7	CONCLUSÕES	96
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Simetria viral. (a) Diagrama de um vírus em forma de bastão com simetria helicoidal; (b) Vírus com simetria icosaédrica, apresentando nucleocapsídeo circundado pelo envelope lipoprotéico; (c) Nucleocapsídeo com simetria icosaédrica, mostrando ácido nucléico e capsômeros 4
- Figura 2** O caminho das descobertas iniciais de novos agentes infecciosos em humanos 6
- Figura 3** Classificação esquemática para vírus de animais. Sumário das principais características de 21 famílias representativas de vírus que infectam vertebrados e uma que infecta inseto. Nem todas as famílias virais são mostradas na figura 9
- Figura 4** Classificação de Baltimore. Todos os vírus devem produzir ARNm que pode ser traduzido por ribossomos celulares. Neste sistema de classificação, a única via de vários genomas virais para ARNm define classes específicas de vírus com base na natureza e polaridade de seus genomas 11
- Figura 5** Representação esquemática de 5 membros de uma classe politética caracterizada por 5 propriedades, 1-5. Cada membro apresenta diversas dessas propriedades, mas nenhuma propriedade em comum está presente em todos os membros da classe. A propriedade que falta em cada caso é representada pela área cinza 13

Figura 6	(a) Morcego fitófago <i>Artibeus jamaicensis</i> . (b) Morcego insetívoro <i>Molossus molossus</i>	17
Figura 7	Morcegos hematófagos. (a) <i>Desmodus rotundus</i> . (b) <i>Diphylla ecaudata</i>	19
Figura 8	Morcego hematófago <i>Diaemus youngi</i>	19
Figura 9	Estrutura e organização genômica do poliovírus	30
Figura 10	Representação esquemática do vírion de poliovírus	32
Figura 11	Estratégia de replicação do poliovírus, membro da família <i>Picornaviridae</i>	33
Figura 12	Localização geográfica da região de Porto Trombetas, município de Oriximiná, na qual se isolou o vírus Juruaçá	39
Figura 13	Camundongos albinos suíços recém-nascidos utilizados para as tentativas de isolamento viral no IEC. (a) Manutenção dos camundongos em gaiolas. (b) Inoculação da suspensão viral via i.c	41
Figura 14	Representação esquemática do teste de sensibilidade ao DCA. (a) Vírus envelopado submetido ao DCA, resultando na perda da infectividade viral e na sobrevivência dos camundongos; (b) vírus não envelopado submetido ao DCA, resultando na manutenção da infectividade viral e morte dos animais	47
Figura 15	Representação esquemática da técnica de Hemaglutinação (HA)..	48
Figura 16	Representação esquemática do teste de Fixação do Complemento (FC)	50

Figura 17	Representação esquemática da técnica de Inibição da Hemaglutinação (IH)	52
Figura 18	Representação esquemática do teste de Imunofluorescência Indireta (IFI) utilizado para a detecção de antígeno viral em cultivo celular	53
Figura 19	Representação esquemática do processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão	57
Figura 20	Representação esquemática da técnica de Contrastação Negativa	59
Figura 21	Representação esquemática da técnica de Imunomicroscopia Eletrônica	60
Figura 22	Representação esquemática do exame histopatológico para a técnica de Hematoxilina-Eosina (HE)	61
Figura 23	Representação esquemática da técnica de Imunohistoquímica	63
Figura 24	Marcadores celulares. (A) Micrografia mostrando imunomarcção de GFAP em cultivo de astrócitos. (B) Micrografia de microglias marcadas com isolectina B ₄ conjugada com ITCF. (C) Micrografia de fluorescência mostrando imunomarcção de neurofilamentos em cultivo de neurônios	68
Figura 25	Micrografia de fluorescência mostrando ausência de marcação em cultivo de microglias não infectadas com o vírus Juruáçá	69

- Figura 26** Dupla marcação. (A) Marcação de microglias com isolectina B₄ conjugada com ITCF. (B) Micrografia de fluorescência com marcação para antígenos do vírus Juruaçá usando segundo anticorpo conjugado com rodamina. (C) Sobreposição das imagens A e B confirmando a infecção de microglias com o vírus Juruaçá (5 dias p.i.). 70
- Figura 27** Micrografia de fluorescência mostrando ausência de marcação em cultivo de astrócitos não infectados com o vírus Juruaçá 71
- Figura 28** Imunofluorescência indireta com dupla marcação em cultivo de astrócitos. (A) Micrografia de fluorescência com marcação para GFAP usando segundo anticorpo marcado com rodamina. (B) Micrografia de fluorescência com marcação para antígenos do vírus Juruaçá usando segundo anticorpo conjugado com ITCF. (C) Sobreposição das imagens A e B em maior aumento confirmando infecção de cultivo de astrócitos com o vírus Juruaçá (5 dias p.i.) 72
- Figura 29** Contrastação negativa do vírus Juruaçá obtida de fluido de cultivo de astrócitos (6 dias p.i.) 76
- Figura 30** Imunomicroscopia eletrônica do vírus Juruaçá com seu soro homólogo, mostrando partículas virais circundadas por um halo denso de anticorpos (setas). 77
- Figura 31** Micrografia eletrônica do vírus Juruaçá em cortes ultrafinos de cérebro de camundongo albino suíço (8 dias p.i.). Notar partículas virais desprovidas de envelope no citoplasma 78

celular (seta)

- Figura 32** Aspectos histológicos dos animais controles e infectados. (A) 80
 Histologia do sistema nervoso central de camundongo controle. (B) Histopatologia mostrando reação glial constituindo área algo nodular em cérebro de camundongo infectado (7 dias p.i.). (C) Histopatologia mostrando núcleos de aspecto picnótico (apoptóides) (a) e cariorrexe (necrose) (c) (6 dias p.i.). (D) Histopatologia mostrando hipertrofia de células endoteliais e congestão vascular (6 dias p.i.). (E) Histopatologia mostrando marginação leucocitária característica (6 dias p.i.). (F) Histopatologia mostrando proeminente hipertrofia de endotélio (6 dias p.i.)
- Figura 33** Aspectos histológicos dos animais controles e infectados. 82
 (A) Histologia do miocárdio de camundongo controle. (B) Histopatologia mostrando miocárdio com leve alteração histológica representada, sobretudo por discreto infiltrado linfomononuclear (6 dias p.i.). (C) Histologia do fígado de camundongo controle. (D) Histopatologia do fígado mostrando congestão em espaços porta e áreas acinares com rarefação celular conseqüentes à necrose lítica (retângulo) (6 dias p.i.). (E) Histologia do baço de camundongo controle. (F) Histopatologia mostrando baço com congestão e hiperplasia linfóide moderada (6 dias p.i.)
- Figura 34** Aspectos histológicos dos pulmões e rins dos animais 84
 controles e infectados. (A) Histologia do pulmão de

camundongo controle. (B) Histopatologia mostrando pulmão com congestão e relativo colapso e espessamento de tabiques alveolares (5 dias p.i.). (C) Histologia do rim de camundongo controle. (D) Histopatologia mostrando rim com congestão glomerular e leve edema de células de revestimento dos túbulos (6 dias p.i.)

Figura 35 Imunohistoquímica em cortes de cérebro de camundongo infectado com o vírus Juruaçá 7º dia p.i. (A) Padrão de imunomarcção em tecido, mostrando múltiplas células gliais e neurônios com imunomarcção citoplasmática positiva. (B) Padrão granular de depósito do antígeno viral mostrando evidente localização citoplasmática, notar ausência de marcação característica nuclear. (C) Área de extenso edema onde se observa nítida predominância de células positivas quando comparadas às áreas com menor intensidade de lesões. (D) Neurônios com marcação citoplasmática positiva para o vírus Juruaçá, notar imunoreação em prolongamentos proximais do dendrito apical (setas) 86

Figura 36 Produto de PCR em gel de agarose a 1,5% corado por brometo de etidium. Identificação das amostras: Faixa 1: Controle negativo, Faixa 2: Padrão de peso molecular (123 bp DNA Ladder), Faixa 3: Amostra viral com primers HK2 e HK3, Faixa 4: Amostra viral com primers HK2 e HK10 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Vírus não grupados, não classificados isolados na Amazônia Brasileira pela Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do IEC	16
Tabela 2	Distribuição das famílias de morcegos no mundo	18
Tabela 3	Vírus isolados de morcegos	25
Tabela 4	A família <i>Picornaviridae</i> : gêneros, espécies representativas e doenças que causam	26
Tabela 5	Interpretação dos resultados do teste de FC	50
Tabela 6	Oligonucleotídeo correspondente a região não traduzida 5' do genoma de <i>Poliovirus</i>	66
Tabela 7	Resultados negativos pelo teste de IH para diversos vírus das famílias <i>Togaviridae</i> , <i>Flaviviridae</i> e <i>Bunyaviridae</i> para o vírus Juruacá	74
Tabela 8	Soros imunes de diversos vírus de diferentes famílias com resultados negativos pelo teste de FC para o vírus Juruacá	75

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxiribonucléico

ARN: Ácido Ribonucléico

ARNm: ARN mensageiro

BSA: Albumina bovina

C6/36: Linhagem celular contínua de clone de células de *Aedes albopictus*

Ca²⁺: Íons cálcio

CaCl₂: Cloreto de cálcio

CBS: Solução salina tamponada com cacodilato de sódio

CEPAN: Comitê de Ética para Pesquisas com Animais

CITV: Comitê Internacional de Taxonomia Viral

cm²: Centímetro quadrado

CO₂: Gás carbônico

CsCl: Cloreto de céσιο

DAB: Sistema revelador composto por 3,3'diaminobenzidina

DCA: Desoxicolato de sódio

DGV: Dextrose Gelatina Veronal

DL₅₀/0,02 mL: Dose letal capaz de matar 50% dos camundongos infectados

EUA: Estados Unidos da América

ECP: Efeito citopático

EEE: Vírus da *encefalite eqüina leste*

EMC: Vírus da *encefalomiocardite*

FC: Fixação do complemento

FUNASA: Fundação Nacional de Saúde

g: Grama

GFAP: *Glial fibrillary acidic protein* (Proteína acídica fibrilar glial)

HA: Teste de hemaglutinação

HE: Hematoxilina-Eosina

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

i.c.: Intracerebral

i.p.: Intraperitoneal

IEC: Instituto Evandro Chagas

IFI: Imunofluorescência indireta

IH: Inibição da hemaglutinação

IL: Interleucina

ITCF: Isotiocianato de fluoresceína

M: Molar

Meio 199: Meio nutriente 199

Meio D-MEM/F12: Meio Mínimo Essencial modificado por Dulbecco e suplementado
com a mistura de nutriente F-12

Meio L-15: Meio Leibowitz

MET: Microscópio eletrônico de transmissão

mg: Miligrama

Mg²⁺: Íons magnésio

MgCl₂: Cloreto de magnésio

mL: Mililitro

mM: Milimolar

mm³: Milímetro cúbico

MML: *Vírus Montana myotis leukoencephalitis*

N: Neutralização

NaCl: Cloreto de sódio

nm: Nanômetro

NMT: Núcleo de Medicina Tropical

NTR: *Nontranslated region* (Região não traduzida)

O₂: Oxigênio

ORFs: *Open Read Frames* (Cadeias abertas para leitura)

PBS: Solução salina fosfatada tamponada

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PEG-8000: Polietileno glicol 8000

p.i.: Pós-inoculação

pH: Potencial hidrogeniônico

PTA: Ácido fosfotúngstico

r.p.m.: Rotação por minuto

RT: Reação de Transcrição Reversa

SBF: Soro bovino fetal

SESP: Serviço Especial de Saúde Pública

SN: Sistema nervoso

SNC: Sistema nervoso central

SNP: Sistema nervoso periférico

SVS: Secretaria de Vigilância em Saúde

TA: Temperatura ambiente

TBE: Tris-ácido bórico-EDTA

TNF α : Fator alfa de necrose tumoral

UI: Unidade internacional

UFPA: Universidade Federal do Pará

UTMB: University of Texas Medical Branch

Vero: Linhagem celular contínua de rim de macaco *Cercopithecus aethiops*

VEE: Vírus da *encefalite eqüina venezuelana*

°C: Grau Celsius

µg: Micrograma

µL: Microlitro

µm: Micrômetro

%: Percentagem

RESUMO

O vírus Juruaçá (AN 401933) foi isolado a partir de um lote de vísceras de um morcego capturado na região de Porto Trombetas, município de Oriximiná, Estado do Pará, em 1982, sendo considerado um vírus não grupado/ não classificado. O objetivo deste trabalho foi classificar o vírus Juruaçá em um táxon viral, baseando-se nas suas propriedades morfológicas, físico-químicas, antigênicas e moleculares, bem como descrever as alterações anatomo-patológicas associadas à infecção experimental. Camundongos recém-nascidos mostraram suscetibilidade à infecção pelo vírus Juruaçá por inoculação i.c., iniciando os sintomas com quatro dias p.i. e culminando com morte dos animais oito dias p.i.. O vírus não é sensível à ação do DCA e consegue aglutinar hemácias de ganso em pH 5,75. Pelos testes de IH e FC, o vírus não se relaciona com nenhum arbovírus ou outros vírus de vertebrados conhecidos testados, reagindo apenas com o seu soro homólogo. O vírus não causa ECP em linhagens de células Vero e C6/36, e IFI destas células também foi negativa. Entretanto, o vírus Juruaçá replica em cultivo primário de células do SNC de camundongo (astrócitos e microglias), confirmada por IFI com dupla marcação. Cultivos de neurônios não se mostraram susceptíveis à infecção pelo vírus Juruaçá, porém a presença do antígeno viral nestas células foi confirmada por imunohistoquímica. A microscopia eletrônica de transmissão revelou a presença de partículas esféricas, com um diâmetro médio de 23-30nm. Alterações anatomo-patológicas foram observadas principalmente no SNC de camundongos infectados experimentalmente com o vírus Juruaçá. O resultado do RT-PCR sugere que o vírus Juruaçá pode ser um novo vírus pertencente à família *Picornaviridae*, gênero *Enterovirus*,

ABSTRACT

Juruaça virus (BE AN 401933) was isolated from pooled organs of an unidentified bat captured during field work in Porto Trombetas, Oriximiná, Pará State, in 1982, and remains unclassified/ungrouped. The aims of this work were to classify Juruaça virus in a viral taxon taking in account its morphological, physicochemical, antigenic and molecular properties, as well as, to describe the pathological alterations. This agent is pathogenic only for infant mice, and the animal's death occurs with eight days post-inoculation. It's not related to any of the arthropod borne viruses with which it has been tested by serological tests, such as complement fixation (CF) and hemagglutination inhibition (HI). Positive reactions were only observed with its homologous serum. Juruaça virus is not sensitive to sodium desoxicolate and can hemagglutinate goose cells at pH 5.75. The virus didn't show any cytophatic effect and immunofluorescence was negative in Vero and C6/36 cell lines, but it replicates in brain tissue primary culture cell line (astrocytes and microglia), confirmed by immunofluorescent assay (IFA). Culture of neuronal cells appears not to be infected by Juruaça virus; however, infection of these cells was confirmed by immunohistochemistry. By transmission electron microscopy and negative stain, the virus is a spherical particle, with mean diameter of 23-30nm. Pathological alterations were observed mainly in the central nervous system of newborn mice experimentally infected with Juruaça virus. The molecular results of RT-PCR suggest that Juruaça virus is a possible new virus belonging to the family *Picornaviridae*, genus *Enterovirus*.

1 INTRODUÇÃO

Com a intensificação das descobertas de novos vírus no mundo, tornou-se necessário a criação do Comitê Internacional de Taxonomia Viral (CITV) para regulamentar os critérios utilizados na classificação e normatização viral. Este comitê registra as características do maior número de possíveis novos vírus isolados nas diversas regiões do mundo, visto que vírus não classificados podem ser verdadeiros patógenos, reconhecidos ou não para homens e animais, ou também podem representar famílias virais desconhecidas, registros duplicados ou até mesmo contaminantes microbianos (Zeller et al., 1989a).

Várias técnicas têm sido utilizadas para a caracterização viral, que vão desde as clássicas como os testes físico-químicos e sorológicos até às mais modernas de biologia molecular. Dentre as técnicas clássicas, a microscopia eletrônica desempenhou um grande papel na classificação taxonômica viral, pela contribuição no detalhamento da morfologia das partículas virais.

A Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas (IEC) tem acompanhado o desenvolvimento da virologia ao longo dos últimos 50 anos. Estes estudos foram iniciados em 1954, a partir de convênio firmado entre o então Serviço Especial de Saúde Pública (SESP), hoje Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde, e a Fundação Rockefeller (Shope, 1998), objetivando a investigação dos arbovírus na Amazônia e avaliação da sua importância como problema de saúde pública, fornecendo suporte laboratorial à vigilância epidemiológica desses vírus. O IEC tem contribuído para a caracterização de arbovírus e outros vírus de vertebrados na Amazônia Brasileira, sendo que alguns destes agentes ainda permanecem sem classificação definida,

como é o caso do vírus Juruaçá, isolado de morcego, que é o objeto de nosso estudo.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 GENERALIDADES SOBRE VÍRUS E CLASSIFICAÇÃO VIRAL

Um vírus é um biosistema elementar que possui algumas propriedades de sistemas vivos, tais como um genoma e capacidade de adaptação às mudanças ambientais (Van Regenmortel, 2000), sendo considerados partículas passíveis de subexistirem extracelularmente, capazes de adentrar e alterar os processos metabólicos normais das células, objetivando recodificá-los para a sua própria replicação. São compostos por um capsídeo proteico que protege o genoma viral, o qual é constituído por ácido ribonucleico (ARN) ou ácido desoxirribonucleico (ADN), sendo que muitos tipos virais podem ainda apresentar um envelope lipoprotéico como um terceiro componente, o qual ainda possui glicoproteínas na forma de projeções (Falke, 1979). A simetria do vírus é estabelecida pela forma e a composição das subunidades protéicas que compõe o capsídeo, podendo ser de forma helicoidal, icosaédrica ou estruturas complexas (Harrison et al., 1996; Pelczar Jr et al., 1997) (Figura 1).

Apesar de todas estas características, isso não significa que os vírus deveriam ser considerados como organismos, visto não possuírem atributos essenciais de organismos vivos, tais como a habilidade de capturar e armazenar energia livre, e não possuírem autonomia característica que resulta da presença de um conjunto de atividades metabólicas integradas (Van Regenmortel, 2003).

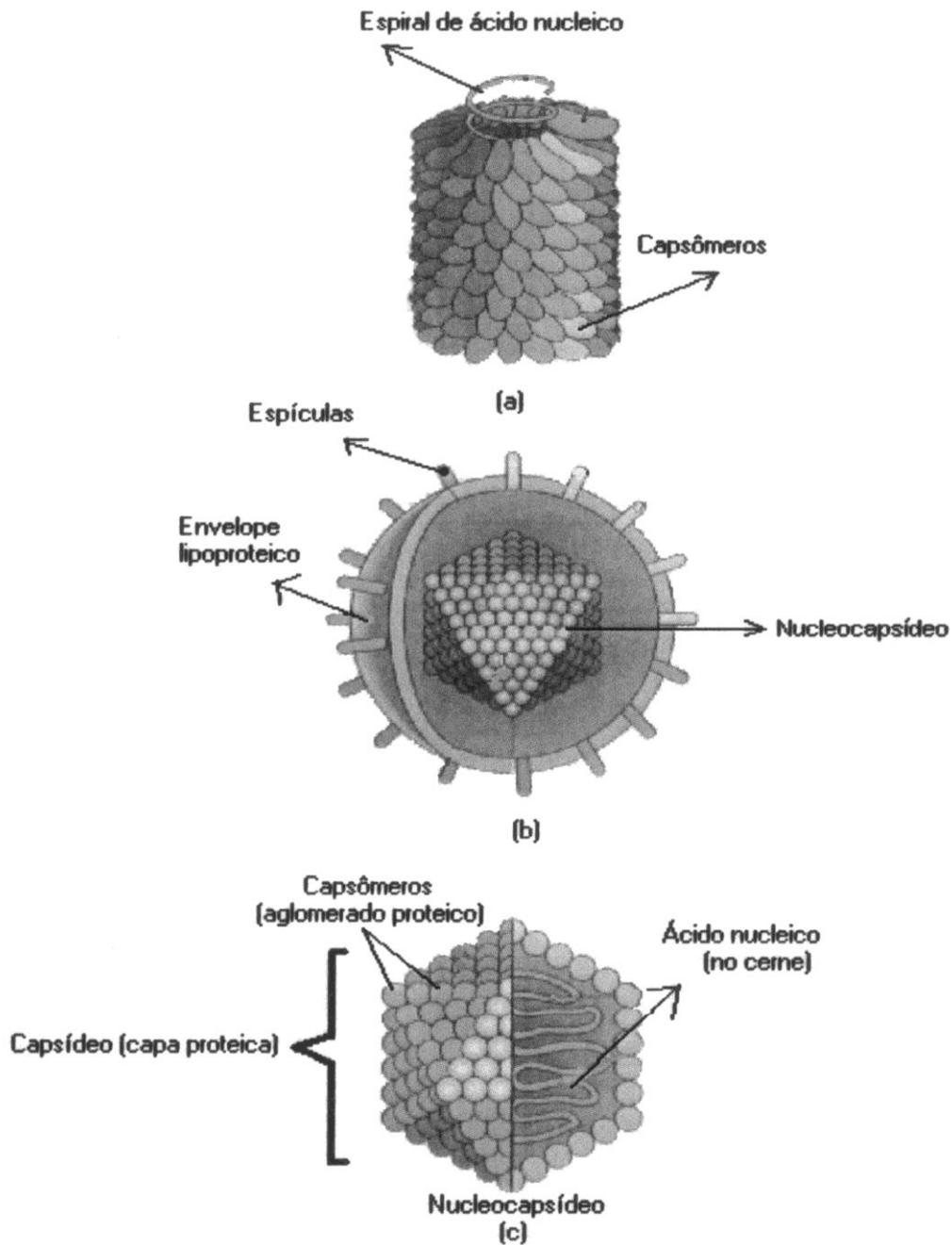


Figura 1 - Simetria viral. (a) Diagrama de um vírus em forma de bastão com simetria helicoidal; (b) Vírus com simetria icosaédrica, apresentando nucleocapsídeo circundado pelo envelope lipoprotéico; (c) Nucleocapsídeo com simetria icosaédrica, mostrando ácido nucléico e capsômeros.

Fonte: Pelczar Jr et al., 1997

Os vírus foram reconhecidos como entidades biológicas distintas há pouco mais de um século, entretanto, evidências de infecções virais têm sido encontradas dentre os relatos primordiais das atividades humanas. No final do século XIX, a existência de um mundo microbiano diverso de bactérias, fungos e protozoários já era bem estabelecido.

O primeiro relato de um agente patogênico menor que qualquer bactéria conhecida foi feito em 1892, através de experimentos realizados pelos cientistas Adolf Mayer (1843-1942), Dimitrii Ivanowsky (1864-1920) e Martinus Beijerinck (1851-1931) com a doença do Mosaico do Tabaco (um vírus de planta). Estes cientistas contribuíram para o desenvolvimento de um novo conceito: um agente filtrável e muito pequeno para ser observado à microscopia óptica, mas capaz de causar doença por se multiplicar em células vivas, que na época foi chamando por Beijerinck de *contagium vivum fluidum*, para enfatizar sua natureza infecciosa e propriedades reprodutivas e físicas distintas. Posteriormente, os agentes que passavam através de filtros que retêm bactérias foram chamados de vírus ultrafiltráveis, mais tarde simplificado apenas para vírus, que em latim significa veneno (Levine, 1996; Flint et al., 2000).

Walter Reed identificou o primeiro vírus humano em 1901, o vírus da febre amarela, em Cuba, e nesta mesma ocasião foi comprovada a transmissão da doença através de mosquitos (Flint et al., 2000). Outros vírus humanos foram identificados neste século (Figura 2), apesar da dificuldade do processo, como pelo perigo na manipulação experimental.

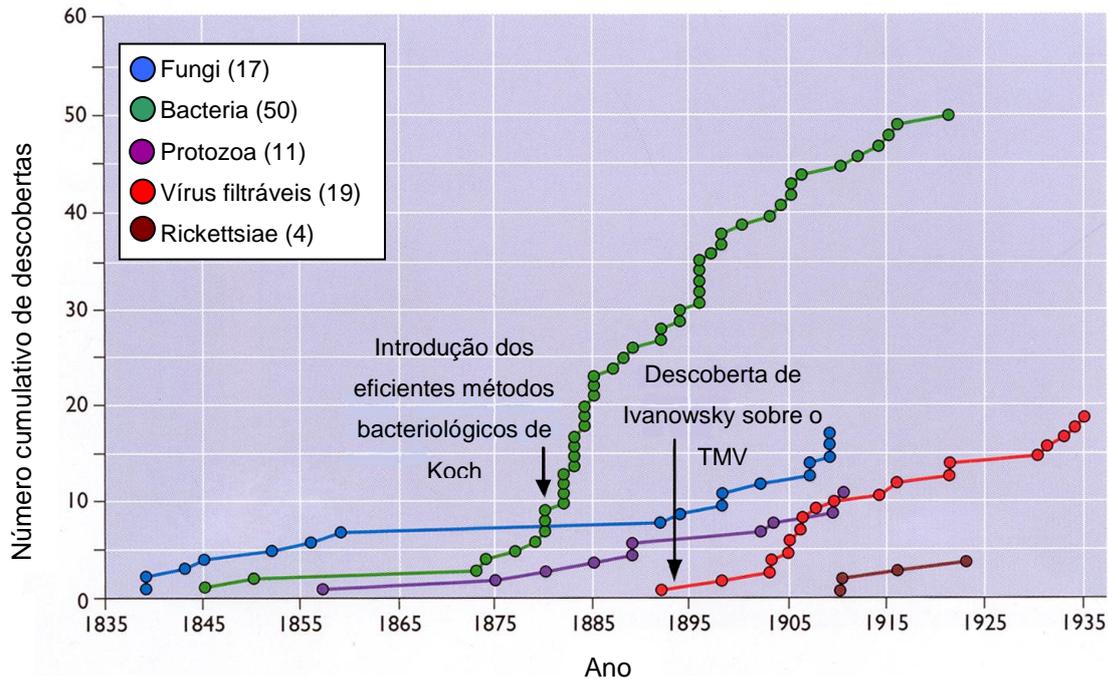


Figura 2 - O caminho das descobertas iniciais de novos agentes infecciosos em humanos.

Fonte: Flint et al., 2000

Com a crescente descoberta de novos vírus houve a necessidade da criação de um sistema unificado de taxonomia viral. Em 1966, durante um congresso de microbiologia realizado em Moscou, foi estabelecido o Comitê Internacional de Nomenclatura Viral, posteriormente chamado de Comitê Internacional de Taxonomia Viral (CITV). Desde 1971, o CITV, operando em nome da comunidade de virologistas tem produzido seus relatórios descrevendo a situação corrente da taxonomia viral, criando o Código Internacional de Nomenclatura Viral (Matthews, 1982). De acordo com Murphy (1996) e Pringle (1999), a classificação é baseada em critérios primários e secundários.

Os critérios primários são:

- 1) A natureza do genoma viral (ADN ou ARN);
- 2) O tipo de fita do genoma viral (dupla ou simples, circular ou linear);

- 3) A facilidade na transcrição reversa;
- 4) A polaridade do genoma (positiva, negativa ou “*ambisense*”).

Os critérios secundários são caracterizados por:

1) **Morfologia:** Tamanho e forma do vírus; presença ou ausência de envelope viral e espículas; simetria e estrutura do capsídeo.

2) **Propriedades físicas e físico-químicas:** Massa molecular do vírus; densidade de flutuação do vírus (em CsCl e sacarose, entre outros); coeficiente de sedimentação; estabilidade a variações de pH, calor, íons divalentes, detergentes, solventes e radiação.

3) **Propriedades secundárias do genoma:** número e tamanho de segmentos; tamanho do genoma ou dos segmentos; seqüência nucleotídica; presença de elementos repetidos no genoma; taxa de Guanina + Citosina do genoma; presença ou ausência e tipo de cap 5´ terminal; presença ou ausência de proteínas ligadas covalentemente ao terminal 5´; presença ou ausência de cauda poli A no terminal 3´; presença de isomerização (retrovírus).

4) **Proteínas:** Número, tamanho e atividade funcional de proteínas estruturais e não estruturais; seqüências completa ou parcial de aminoácidos; detalhe das atividades funcionais de proteínas especiais, em particular, transcriptase, transcriptase reversa, hemaglutinina, neuraminidase e as de atividade de fusão; tipo de propriedade de glicosilação, fosforilação e metilação das proteínas; estrutura tridimensional da proteína.

5) **Lipídios e carboidratos:** Composição e teor dos lipídeos e açúcares existentes.

6) **Replicação viral e organização genômica:** Organização do genoma; estratégia de replicação; número e posição das seqüências de leitura aberta (*open read frames* – ORFs); característica de transcrição e tradução; sítio de acúmulo de proteínas virais; sítio de montagem, maturação e liberação da partícula viral.

7) **Propriedades antigênicas:** relações sorológicas obtidas através de testes sorológicos.

8) **Propriedades biológicas:** hospedeiro natural, modo de transmissão em natureza, relação entre vetores, distribuição geográfica, patogenicidade, tropismo tecidual, patologia e histopatologia.

Um sumário das principais características de algumas famílias virais pode ser observado na figura 3.

Existem ainda outros modos de classificação dos vírus. Pelo primeiro, baseado no tropismo do vírus e modo de transmissão, estão os vírus entéricos (transmitidos pelo trato fecal-oral), os vírus respiratórios (transmitidos por via aérea), os vírus oncogênicos (transmitidos através de contato direto, seja sexual, inoculação, ou ainda por meios desconhecidos) e os arbovírus (transmitidos por picada de artrópodes) (Murphy, 1996), e pelo segundo, o Sistema de Classificação de Baltimore que é baseado no sistema genético de cada vírus e descreve a relação obrigatória entre o genoma viral e seu ARNm (Figura 4).

Este tipo de classificação é raramente utilizado em vírus de animais, pois apenas fornece características adicionais de definição. Entretanto, os princípios incluídos nesta classificação são importantes, especialmente as designações de polaridades positivas e negativas, amplamente utilizadas na descrição dos genomas. A classificação de Baltimore é sobreposta na nomenclatura do CITV, havendo complementação da classificação (Flint et al., 2000).

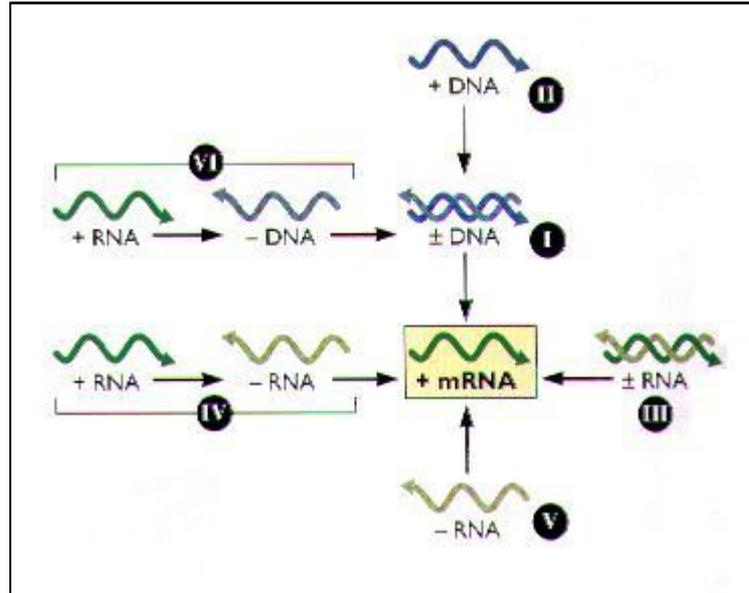


Figura 4 - Classificação de Baltimore. Todos os vírus devem produzir ARNm que pode ser traduzido por ribossomos celulares. Neste sistema de classificação, a única via de vários genomas virais para ARNm define classes específicas de vírus com base na natureza e polaridade de seus genomas.

Fonte: Flint et al., 2000

O oitavo relato do CITV, publicado em 2005, apresenta um esquema de taxonomia viral compreendendo 3 ordens, 73 famílias, 9 subfamílias, 287 gêneros e 1938 espécies virais (Fauquet et al., 2005). Através deste relato, três categorias de vírus de diversas taxonomias têm sido definidas: **espécies tipos**, as quais se referem à espécie tipo usada na definição do táxon; **outras espécies**, inclui aqueles vírus que na base da evidência presente definitivamente pertencem ao táxon, e **tentativas de espécies** que, referem-se aos vírus para os quais há uma evidência presuntiva mas não conclusiva de pertencerem ao táxon.

Um grupo de famílias com características em comum constitui uma ordem, e para a sua designação utiliza-se o sufixo *-virales*. Até o presente, existem três ordens aprovadas pelo CITV: a *Caudovirales*, que compreende as famílias *Myoviridae*, *Siphoviridae* e *Podoviridae*; *Mononegavirales*, a qual pertencem as

famílias *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae* e *Rhabdoviridae*; e *Nidovirales*, que engloba as famílias *Coronaviridae* e *Arteriviridae* (Van Regenmortel et al., 2000).

Uma família é constituída por um grupo de gêneros (organizados ou não em subfamílias), os quais compartilham diversas propriedades em comum e distintas dos membros das outras famílias. Para a sua designação utiliza-se o sufixo *-viridae* para a sua designação (Mayo, 1996). Certas famílias como *Poxviridae*, *Herpesviridae*, *Parvoviridae*, *Paramyxoviridae* e *Retroviridae* possuem subfamílias, cujos nomes apresentam-se agregados ao sufixo *-virinae*, e permitem uma hierarquia taxonômica mais complexa através da complexidade intrínseca das relações entre seus membros (Murphy, 1996).

Um gênero é um grupo de espécies que apresentam características em comum, porém distintas dos membros de outros gêneros, e emprega-se o sufixo *-virus* para a sua designação (Mayo, 1996). O critério usado para a criação de gêneros difere entre as famílias, mas a base para a sua definição é a evidência filogenética comum entre os seus membros (Murphy, 1996).

Uma espécie viral é definida como uma classe politética de vírus que possuem uma linhagem de replicação e ocupam um nicho ecológico particular (Van Regenmortel, 1989). Conceitua-se uma classe politética como aquela cujos membros possuem diversas propriedades em comum, mas não há uma propriedade que seja necessariamente compartilhada por todos os membros e que, por estarem ausentes em outras espécies, pode ser usada como uma propriedade peculiar de uma dada espécie (Van Regenmortel, 1989; Van Regenmortel et al., 1997) (Figura 5). Para o reconhecimento de uma espécie viral como uma classe politética consideram-se as propriedades antigênicas como a reatividade sorológica entre vírus individuais, e as propriedades biológicas como o espectro de hospedeiros, o

tropismo tecidual, os tipos de vetores e a via de transmissão (Van Regenmortel, 1990). A categoria de espécie tem sido aceita como o nível taxonômico mais baixo e fundamental na classificação viral (Van Regenmortel & Fauquet, 2002).

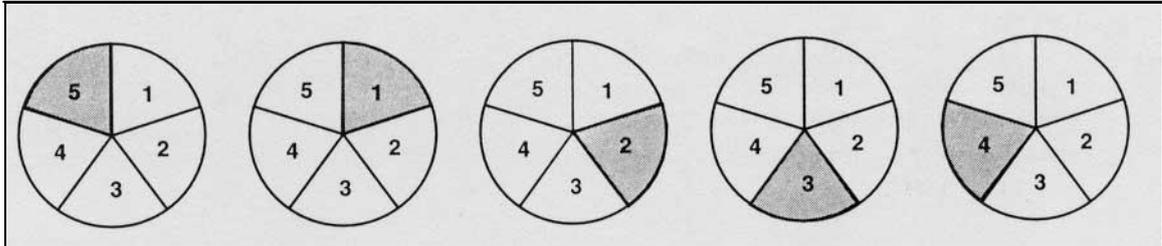


Figura 5 - Representação esquemática de 5 membros de uma classe politética caracterizada por 5 propriedades, 1-5. Cada membro apresenta diversas dessas propriedades, mas nenhuma propriedade em comum está presente em todos os membros da classe. A propriedade que falta em cada caso é representada pela área cinza.

Fonte: Van Regenmortel, 2000

Na taxonomia viral formal, os nomes das ordens, famílias, subfamílias e gêneros são sempre escritos em itálico e a primeira letra dos nomes é capitalizada. Mayo & Horzinek (1998) ampliam esta convenção tipográfica aos nomes das espécies objetivando melhor sinalização visual de que espécies são táxons virais reconhecidos, assim como são gêneros e famílias. De acordo com a regra 3.40 do Código Internacional de Classificação e Nomenclatura Viral (1998):

“Nomes de espécies são escritos em itálico e tem a primeira letra da primeira palavra capitalizada. Outras palavras não são capitalizadas ao menos que sejam nomes próprios, ou partes de nomes próprios.”

A identificação viral é um processo comparativo dos isolamentos individuais com os membros das espécies virais estabelecidas, logo mutantes ou variantes patogênicas que são claramente distintas do vírus tipo selvagem serão geralmente reconhecidas e consideradas em termos de taxonomia, como sendo a mesma espécie viral (Van Regenmortel & Mahy, 2004).

O CITV tem publicado ao longo dos anos diversas listas de abreviações recomendadas de nomes de vírus. Inicialmente, estas abreviações se referiam aos nomes de vírus comuns, mas posteriormente as listas publicavam as abreviações para os nomes das espécies virais. Embora os nomes dos vírus e das espécies virais correspondentes sejam usualmente os mesmos, não necessariamente pode ser desta maneira, podendo gerar questionamentos de que nomes de espécies não deveriam ser abreviados. Por este motivo o CITV recomenda que as abreviações sejam aplicadas somente aos nomes dos vírus (Van Regenmortel & Mahy, 2004).

A substituição da palavra vírus pelo nome do gênero, no qual a espécie está classificada é uma tentativa de padronização do sistema binominal de nomenclatura viral (Van Regenmortel, 2001), principalmente em relação às espécies virais. Este sistema, no entanto, gera muitas divergências e críticas entre alguns virologistas (Bos, 1999; 2000), pois apesar de ser aplicável à maior parte dos gêneros de vírus reconhecidos pelo CITV, algumas mudanças devem ser introduzidas em alguns gêneros a fim de se evitar nomes questionáveis ou redundantes (Van Regenmortel & Fauquet, 2002).

Alguns vírus, como os arbovírus, são classificados de acordo com suas propriedades antigênicas ou segundo suas características físico-químicas. A classificação antigênica é baseada principalmente nos testes de inibição da hemaglutinação (IH), fixação do complemento (FC) e neutralização (N),

genericamente rotulados de testes convencionais ou de primeira geração (Casals, 1957). De acordo com os resultados, quando dois ou mais vírus mostram cruzamento sorológico passam a constituir um grupo antigênico e, dentro de cada grupo antigênico existem membros que exibem relacionamento mais próximo, formando subgrupos ou complexos (Calisher & Karabatsos, 1988).

2.2 VÍRUS NÃO CLASSIFICADOS

Muitos vírus ainda não foram caracterizados apesar dos vários estudos já realizados. A Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do IEC reúne um acervo de cerca de 11.000 isolamentos de arbovírus e outros vírus de vertebrados, obtidos de pelo menos 196 tipos diferentes de vírus. Destes, 100 são novos para a Ciência e 34 são associados com infecções humanas (Travassos da Rosa et al., 1997). Entretanto existem vírus que permanecem sem classificação taxonômica definida, a saber: Codajás, Galibi, Marajó, Tracambé, Uruará, Mucura, Iriri, Papura, Cajazeiras e o vírus Juruaça (Be AN 401933) (Travassos da Rosa et al., 1998) que é o objeto de nosso estudo (Tabela 1).

Tabela 1 - Vírus não grupados e não classificados isolados na Amazônia Brasileira pela Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do IEC.

Vírus	Artrópodes		Vertebrado silvestre <i>Chiroptera</i>
	Mosquito	Flebotomíneo	
Codajás			
Galibi			
Marajó			
Tracambé			
Uruará			
Mucura			
Iriri			
Papura			
Cajazeiras			
Juruáçá			

Fonte: Adaptado de Travassos da Rosa et al., 1998.

2.3 A ORDEM *CHIROPTERA*

A palavra *Chiroptera* significa mão (chiro) transformada em asa (ptera) e têm como representantes os morcegos, únicos mamíferos com capacidade de vôo, graças à transformação de seus braços em asas. Os morcegos habitam a maioria das regiões temperadas e tropicais dos hemisférios, e são encontrados em quase todos os continentes, exceto na Antártica (Eisenberg & Redford, 1999). Dentre os mamíferos, apenas os roedores (ordem *Rodentia*) se sobrepõem aos morcegos em

número de espécies, com 1.800 representantes (Nowak & Paradiso, 1983; Hill & Smith, 1984; Nowak, 1994; FUNASA, 1998).

A ordem *Chiroptera* é subdividida em duas subordens, a *Megachiroptera* (encontrada no Velho Mundo), é representada por uma única família, a *Pteropodidae* com 170 espécies, todas frugívoras (Figura 6); e a *Microchiroptera*, que compreende todas as outras 17 famílias, englobando mais de 800 espécies, encontradas no Velho Mundo, no Novo Mundo, ou em ambos (Tabela 2) (FUNASA, 1998; Eisenberg & Redford, 1999). Dentre as quase 1000 espécies de morcegos existentes no mundo, aproximadamente 140 são encontradas no Brasil, distribuídas entre nove famílias, sendo apenas três hematófagas (FUNASA, 1998).

Devido a sua variedade alimentar, os morcegos são classificados em frugívoros, nectarívoros, insetívoros, carnívoros, hematófagos e piscívoros (Sulkin, 1962), ressaltando que não se trata de uma classificação sistemática, pois algumas famílias de morcegos podem incluir diversas espécies das diferentes classes mencionadas.

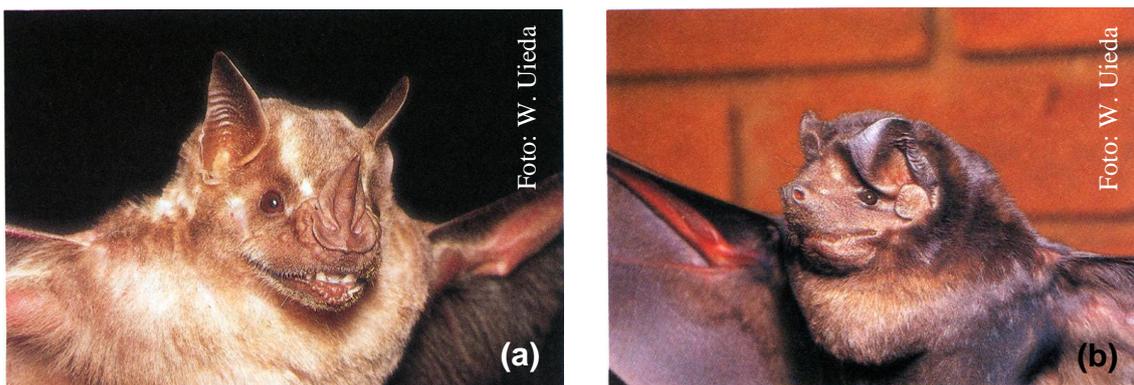


Figura 6 – (a) Morcego fitófago *Artibeus jamaicensis*. (b) Morcego insetívoro *Molossus molossus*.

Fonte: FUNASA, 1998.

Tabela 2 - Distribuição das famílias de morcegos no mundo.

Velho Mundo	Novo Mundo	Mundial
<i>Pteropodidae</i>	<i>Thyropteridae</i>	<i>Emballonuridae</i>
<i>Rhinopomatidae</i>	<i>Natalidae</i>	<i>Vespertilionidae</i>
<i>Nycteridae</i>	<i>Furipteridae</i>	<i>Molossidae</i>
<i>Megadermatidae</i>	<i>Mormoopidae</i>	
<i>Rhinolophidae</i>	<i>Phyllostomidae</i>	
<i>Hipposideridae</i>	<i>Noctilionidae</i>	
<i>Craseonycteridae</i>		
<i>Mystacinidae</i>		
<i>Myzopodidae</i>		

Fonte: Eisenberg & Redford, 1999.

A maioria dos morcegos é do tipo insetívoro e estão presentes em todo o mundo, auxiliando o controle das populações de diversos tipos de insetos, como besouros, mariposas, percevejos e pernilongos (FUNASA, 1998). Os morcegos ditos fitófagos (nectarívoros e frugívoros) são encontrados nas regiões tropicais e subtropicais do mundo e promovem a polinização das flores e a dispersão das sementes de plantas (Reis & Guillaumet, 1983; FUNASA, 1998).

Os morcegos hematófagos compreendem apenas três espécies: *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngii* (Figuras 7 e 8), são restritas à América Latina e atacam vertebrados endotérmicos (aves e mamíferos silvestres ou rurais). Estes morcegos desempenham papel importante nos ecossistemas naturais, através do auxílio no controle das populações de vertebrados herbívoros, evitando

que superpopulações dessas presas destroam a vegetação e, conseqüentemente, o ecossistema (FUNASA, 1998).

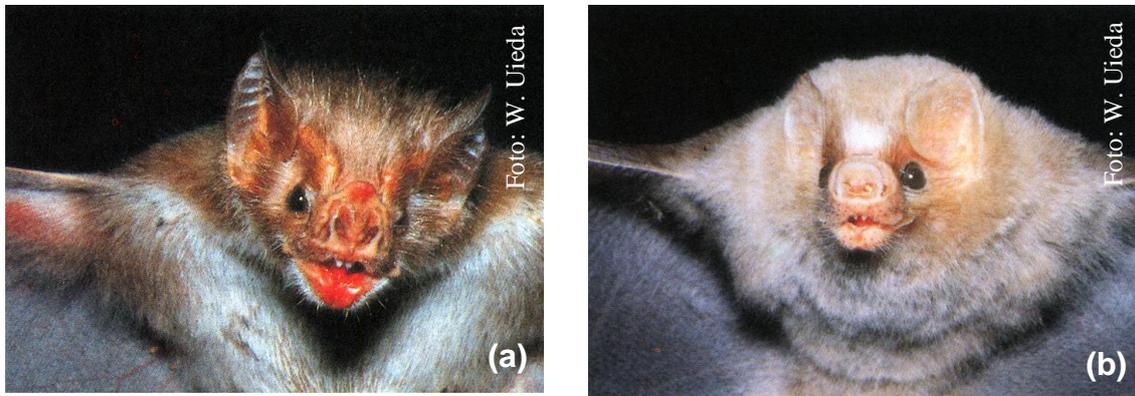


Figura 7 – Morcegos hematófagos. (a) *Desmodus rotundus*. (b) *Diphylla ecaudata*.

Fonte: FUNASA, 1998.



Figura 8 – Morcego hematófago *Diaemus youngi*

Fonte: FUNASA, 1998.

Os morcegos podem transmitir diversos agentes infecciosos ao homem como: vírus, leptospiras, rickettsias, e criptococos (Tamsitt & Valdivieso, 1970), histoplasmas, tripanossomos, brucelas, cândidas e salmonelas (Constantine, 1988). Entretanto, a doença mais grave transmitida pelos morcegos é a raiva humana, e os

morcegos ocupam o segundo lugar na transmissão da doença humana na América Latina, superados apenas pela transmissão pelos cães.

2.4 VÍRUS ISOLADOS DE MORCEGOS

De 1906 a 1908, em Santa Catarina, região sul do Brasil, bovinos e eqüinos morreram de raiva paralítica e morcegos foram observados se aproximando dos animais à luz do dia para tentar mordê-los. Carini (1911) suspeitou que os morcegos pudessem estar envolvidos na transmissão, porém, o vírus da raiva só foi isolado a partir de amostras do cérebro do morcego *Phyllostoma superciliatum* por Haupt & Rehaag em 1925. A primeira epidemia de raiva humana transmitida por morcegos hematófagos foi registrada em Trinidad na década de 1930, com registro de 55 óbitos (Verteuil & Urich, 1935).

O vírus da raiva tem sido isolado de morcegos hematófagos, frugívoros e insetívoros em diversas regiões do mundo (Brass, 1994). No Brasil, recentemente foi registrado um surto de raiva humana nos municípios de Portel e Viseu, Estado do Pará, totalizando 22 mortes, das quais 10 foram confirmadas laboratorialmente como infecção pelo vírus da raiva causada pela variante 3 (compatível com morcego hematófago *Desmodus rotundus*), caracterizando assim, o maior surto de raiva humana transmitida por morcego registrado no país e o maior no mundo em um período curto de um mês. Registrou-se também o isolamento viral em morcego não hematófago (*Platyrrhinus* sp.) (Wada et al., 2004; Travassos da Rosa et al., 2004).

Mais de 50 vírus diferentes têm sido isolados de morcegos sendo a maioria vírus de ARN pertencentes a famílias distintas (Tabela 3).

Dentre a família *Flaviviridae*, o vírus *Rio Bravo* foi obtido de morcego insetívoro (*Tadarida brasiliensis*) nos Estados Unidos da América (EUA) e em Trinidad (Burns & Farinacci, 1956; Price, 1978). O vírus *Entebbe bat* foi isolado de *Tadarida limbata* na Uganda, local onde também foram isolados o vírus *Dakar bat* (de morcego *Scotophilus nigrita*) e o vírus *Bukalasa bat* (de morcego *Tadarida pumila*) (Williams et al., 1964). O vírus *Montana myotis leukoencephalitis* (MML) foi isolado de *Myotis lucifugus* nos EUA (Bell & Thomas, 1964). Há isolamento de uma cepa do vírus da febre amarela em morcego *Epomophorus* na Etiópia (Andral et al. 1968). Sulkin et al. (1966) e Allen et al., (1970) isolaram o vírus da encefalite de St. Louis em *Tadarida b. mexicana* nos EUA e o vírus da encefalite japonesa de *Miniopterus schreibersi* e *Rhinolophus c. cornutus* no Japão (Sulkin et al., 1970). O vírus do Nilo ocidental foi isolado de morcego *Rousettus leschenaulti* (Paul et al., 1970) e o vírus Doença da floresta de Kyasanur foi obtido de morcegos frugívoros e insetívoros (Pavri & Singh, 1968; Rajagopalan et al., 1969). No Cambodia isolou-se de morcego frugívoro *Cynopterus brachyotis angulatus* o vírus *Phnom-Penh bat* (Salaun et al., 1974). O vírus *Ilhéus* também possui um isolamento de morcego (Vasconcelos et al., 1998), bem como os vírus Sokuluk (Lvov et al., 1973a), *Jugra*, *Hypr*, *Carey Island* (Karabatsos, 1985). O vírus *Yokose* também já foi isolado de morcego no Japão (Tajima et al., 2005). Dentre as tentativas de espécies da família o vírus *Tamana bat* também foi isolado de morcego insetívoro (*Pteronotus parnellii*) em Trinidad (Price, 1978).

O *Arenavirus Tacaribe* já foi isolado de morcego em diversas ocasiões de morcegos *Artibeus lituratus* e *Artibeus jamaicensis* em Trinidad (Downs et al., 1963; Theiler & Downs, 1973).

Os vírus *Lagos bat*, Kern Canyon e a tentativa de espécie do *Vesiculovirus* Mount Elgon (*Rhabdoviridae*) foram isolados de *Eidolon helvum* (Nigéria), *Myotis* (EUA) e *Rhinolophus* (Quênia), respectivamente (Boulger & Porterfield, 1958; Theiler & Downs, 1973). O *Lyssavirus Australian bat* foi isolado de *Pteropus alecto* na Austrália (Fraser et al., 1996). Há ainda o relato de isolamento em morcego do vírus Gossas (Karabatsos, 1985), sendo que este vírus ainda não foi assinalado dentro de um gênero da família *Rhabdoviridae*, assim como o vírus Kern Canyon. O também *Lyssavirus Duvenhage* tem sido isolado de morcegos insetívoros africanos (Meredith et al., 1971; Van der Merwe, 1982; Amengual et al., 1997) e o vírus *European bat* possui diversos isolamentos em morcegos em vários países da Europa (Amengual et al., 1997).

Da família *Herpesviridae* foram isolados o vírus Água Preta de morcego *Carollia subrufa* (Huth & Araújo, 1971) em Belém, Pará e o vírus Parixá de *Lonchophylla thomasi* na região de Altamira, Pará (Machado, 1998). Tandler (1996) identificou um *Citomegalovirus* em *Myotis lucifugus*.

Na família *Bunyaviridae*, os vírus *Catú*, *Guamá* (Theiler & Downs, 1973; Karabatsos, 1985; Travassos da Rosa et al., 1998) e *Mojuí dos Campos* (Karabatsos, 1985; Zeller et al., 1989b; Wanzeller et al., 2002) foram isolados de morcegos no Pará. Calisher et al. (1971) isolaram o vírus Nepuyo de morcegos *Artibeus* em Honduras. O vírus *Kaeng Khoi* foi isolado de *Chaerephon plicata* e *Taphozus theobaldi* na Tailândia em 1969, e novamente na mesma região em 1970-71 por Williams et al. (1976) e mais recentemente no Cambódia por Osborne et al. (2003). Kalunda et al. (1986) isolaram o vírus Kasokero de *Rousettus aegyptiacus* em Uganda. Há o registro de isolamento do *Phlebovirus* da febre do Vale do Rift em morcegos na Guiné, África em 1981-83 (Boiro et al., 1987; Fontenille et al., 1998). O

Hantavirus Hantaan foi isolado do pulmão de morcegos insetívoros *Eptesicus serotinus* e *Rhinolophus ferrum-equinum* (Kim et al., 1994). Existe isolamento em morcegos dos vírus Issyk-Kul (Lvov et al., 1973b), Keterah e Yogue (Karabatsos, 1985), que ainda não possuem classificação dentro da família.

Na família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*, o vírus *Chikungunya* foi obtido de *Scotophilus sp.* no Senegal, sendo o primeiro arbovírus conhecidamente patogênico ao homem isolado em morcego (Theiler & Downs, 1973). Depois deste registro, diversos arbovírus também já foram isolados de morcegos. O vírus da encefalite eqüina venezuelana (VEE) já foi isolado de *Artibeus* e *Desmodus* durante epizootias (Correa-Giron et al., 1972; Sanmartin et al., 1967) e em enzootias no México e Guatemala também foram registradas infecções naturais em morcegos por vírus VEE (Scherer et al., 1971; Seymour et al., 1978). No Brasil, a variante IF do complexo VEE foi isolada de *Carollia perspicillata* (Calisher et al., 1982). O vírus da encefalite eqüina leste (EEE) também já foi isolado de morcego, bem como os vírus *Sindbis* (Blackburn et al., 1982), *Cabassou*, e *Highlands J* (Karabatsos, 1985).

O vírus Ife foi isolado de morcegos *Eidolon helvum* na África Central e caracterizado como tentativa de espécie do gênero *Orbivirus*, na família *Reoviridae* (Kemp et al., 1988), bem como o vírus Fomede, isolado de *Nycteris nana*, na Guiné (Boiro et al., 1986; Zeller et al., 1989c) e o vírus Japanaut (Karabatos, 1985).

Na família *Coronaviridae* o vírus Bocas foi isolado de *Myotis lucifugus* (Karabatsos, 1985).

Pavri et al. (1971) isolaram uma cepa de parainfluenza em lote de vísceras de morcego frugívoro *Rosettus leschenaulti*, na Índia. O vírus *Mapuera*, isolado de *Sturnira liliun* no Pará, também foi caracterizado como pertencente à família *Paramyxoviridae* (Karabatsos, 1985; Zeller et al., 1989a; Henderson et al., 1995). Os

morcegos *Pteropus* estão implicados como prováveis hospedeiros naturais do vírus *Nipah* (Field et al., 2001; Yob et al., 2001; Wong et al., 2002), bem como do vírus *Menangle* (Philbey et al., 1998; Halpin et al., 1999), visto a detecção de anticorpos neutralizantes para esses vírus em morcegos. Mais recentemente, Chua et al. (2002) conseguiram isolar o vírus *Nipah* da urina deste mamífero. Há o registro de isolamentos de outros dois *Paramyxovirus*, o vírus *Hendra*, o qual também somente se detectava anticorpos neutralizantes em morcegos (Young et al., 1996), mas foi isolado de *Pteropus* por Halpin et al. (2000); e o *Tioman*, isolado da urina do morcego frugívoro *Pteropus hypomelanus* (Chua et al., 2001).

Tabela 3 - Vírus isolados de morcegos.

Família	Vírus	Referência
<i>Togaviridae</i>	<i>Chikungunya</i>	Theiler & Downs, 1973
	<i>VEE</i>	Correa-Giron et al., 1972; Sanmartin et al., 1967; Scherer et al., 1971; Calisher et al., 1982
<i>Flaviviridae</i>	<i>Sindbis</i>	Blackburn et al., 1982
	<i>EEE, Cabassou e Highlands J</i>	Karabatsos, 1985
	<i>Rio Bravo</i>	Burns & Farinacci, 1956; Price, 1978
	<i>Entebbe bat, Dakar bat e Bukalasa bat</i>	Williams et al., 1964
	<i>MML</i>	Bell & Thomas, 1964
	Febre amarela	Andral et al. 1968
	Encefalite de St. Louis	Sulkin et al., 1966; Allen et al., 1970
	Encefalite japonesa	Sulkin et al., 1970
	Nilo ocidental	Paul et al., 1970
	Doença da floresta de Kyasanur	Pavri & Singh, 1968; Rajagopalan et al., 1969
	<i>Phnom-Penh bat</i>	Salaun et al., 1974
	<i>Ilhéus</i> ¹	Vasconcelos et al., 1998
	Sokuluk	Lvov et al., 1973a
<i>Jugra, Hypr e Carey Island</i>	Karabatsos, 1985	
<i>Yokose</i>	Tajima et al., 2005	
<i>Tamana bat</i>	Price, 1978	
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Catú</i> ¹ e <i>Guamá</i> ¹	Theiler & Downs, 1973; Karabatsos, 1985; Travassos da Rosa et al., 1998
	<i>Mojú dos Campos</i> ¹	Karabatsos, 1985; Zeller et al., 1989b; Wanzeller et al., 2002
	<i>Nepuyo</i>	Calisher et al., 1971
	<i>Kaeng Khoi</i>	Williams et al., 1976; Osborne et al., 2003
	<i>Kasokero</i>	Kalunda et al., 1986
	Febre do Vale do Rift	Boiro et al., 1987; Fontenille et al., 1998
	<i>Hantaan</i>	Kim et al., 1994
	<i>Issyk-Kul</i>	Lvov et al., 1973b
	<i>Keterah e Yogue</i>	Karabatsos, 1985
	<i>Raiva</i> ¹	Carini, 1911; Haupt & Rehaag, 1925; Verteuil & Urich, 1935; Brass, 1994
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Lagos bat, Kern Canyon e Mt. Elgon</i>	Boulger & Porterfield, 1958; Theiler & Downs, 1973
	<i>Australian bat</i>	Fraser et al., 1996
	<i>Gossas</i>	Karabatsos, 1985
	<i>Duvenhage</i>	Meredith et al., 1971; Amengual et al., 1997
	<i>European bat</i>	Amengual et al., 1997
<i>Herpesviridae</i>	<i>Água Preta</i> ¹	Huth & Araújo, 1971
	<i>Parixá</i> ¹	Machado, 1998
<i>Arenaviridae</i>	<i>Citomegalovirus</i>	Tandler, 1996
<i>Reoviridae</i>	<i>Tacaribe</i>	Downs et al., 1963; Theiler & Downs, 1973
	<i>Ife</i>	Kemp et al., 1988
<i>Coronaviridae</i>	<i>Fomede</i>	Boiro et al., 1986; Zeller et al., 1989c
	<i>Japanaut</i>	Karabatsos, 1985
<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Bocas</i>	Karabatsos, 1985
	<i>Mapuera</i> ¹	Karabatsos, 1985; Zeller et al., 1989a; Henderson et al., 1995
	<i>Tioman</i>	Chua et al., 2001
	<i>Nipah</i> ²	Field et al., 2001; Yob et al., 2001; Chua et al., 2002
	<i>Hendra</i>	Young et al., 1996; Halpin et al., 2000
	<i>Menangle</i> ²	Philbey et al., 1998; Halpin et al., 1999

¹ Vírus isolados de morcegos na região Amazônica Brasileira² Vírus que aparentam ser de morcegos frugívoros

2.5 FAMÍLIA PICORNAVIRIDAE

A família *Picornaviridae* compreende os menores vírus de ARN conhecidos e é uma das maiores e mais importantes famílias de patógenos humanos e agrícolas (Rueckert, 1996) (Tabela 4). O prefixo pico designa uma unidade muito pequena de mensuração, equivalente a 10^{-12} . Atualmente a família é dividida em nove gêneros: *Aphthovirus*, *Cardiovirus*, *Rhinovirus*, *Enterovirus*, *Hepatovirus*, *Parechovirus*, *Erbovirus*, *Kobuvirus* e *Teschovirus* (Fauquet et al., 2005).

Tabela 4 – A família *Picornaviridae*: gêneros, espécies representativas e doenças que causam.

Gênero	Espécie representativa	Doença (s)	Hospedeiro natural
<i>Enterovirus</i>	<i>Poliovirus</i>	Poliomielite	Humano
	<i>Coxsackievirus</i>	Miocardite, pancreatite, meningite	Humano
<i>Rhinovirus</i>	<i>Rhinovirus</i>	Resfriado comum	Humano
<i>Cardiovirus</i>	Vírus da encefalomielite de Theiler	Encefalomielite	Camundongo
<i>Aphthovirus</i>	Vírus da febre aftosa	Febre aftosa	Ungulados de cascos fendidos
<i>Erbovirus</i>	Vírus da rinite eqüina B	Doença respiratória aguda	Cavalos
<i>Kobuvirus</i>	<i>Vírus Aichi</i>	Gastroenterite	Humano
<i>Teschovirus</i>	<i>Porcine teschovirus</i>	Encefalomielite	Porcos
<i>Hepatovirus</i>	Vírus da hepatite A	Hepatite	Humano
<i>Parechovirus</i>	<i>Parechovirus humano</i>	Gastroenterite, doença respiratória	Humano

Fonte: Adaptado de Whitton, J.L.; Cornell, T.; Feuer, R., 2005.

No gênero *Aphthovirus* destaca-se o vírus da febre aftosa, que infecta principalmente biungulados (bovinos, suínos e caprinos), mas tem sido isolado de pelo menos 70 espécies de mamíferos, ocasionando lesões vesiculares, às vezes

associadas com miocardite aguda fatal em animais jovens. Raramente infecta humanos.

Dentre os *Cardiovirus*, o vírus da encefalomiocardite (EMC) tem sido isolado de mais de 30 espécies, incluindo mamíferos, pássaros e insetos, ocorrendo miocardite e encefalite em camundongos e outros animais. Este vírus possui dois subgrupos biológicos e ambos infectam camundongos, sendo que um causa uma polioencefalomielite aguda e fatal e o outro causa uma desmielinização persistente crônica na substância branca. O vírus de Theiler também tem cepas que se diferenciam de acordo com a doença que causam em camundongos. Um grupo (cepas GDVII e FA) causa uma encefalomielite rápida e fatal (Theiler & Gard, 1940; Jarousse et al., 1998). Cepas do segundo grupo (DA, BeAn, TO4 e WW) são atenuadas e causam uma doença bifásica (Lipton, 1975; Jarousse, et al., 1998; Jnaoui et al., 2002). O vírus da encefalomielite humana de Vilyuisk, divergente do vírus Theiler, tem sido implicado como causa de doença neurológica degenerativa em humanos na Sibéria.

Os *Rhinovirus* causam um resfriado comum e outras doenças do trato respiratório humano.

Nos *Hepatovirus*, o protótipo, representado pelo vírus da hepatite A, infecta células epiteliais do intestino e hepatócitos de primatas, promovendo febre, icterícia, dor abdominal, e ocasiona uma infecção persistente *in vitro* mas não *in vivo*.

Os *Parechovirus* se multiplicam primariamente no trato gastrointestinal causando diarreia, frequentemente com complicações respiratórias, sendo particularmente prevalente em crianças jovens.

Entre os *Enterovirus* destacam-se os enterovirus de origem humana, os vírus da poliomielite (3 sorotipos), os coxsackievirus A (23 sorotipos) e B (6 sorotipos), os

echovirus (31 sorotipos) e os *enterovirus* 68 a 72 (Melnick, 1983; Rueckert, 1996; Gomes et al., 1997). Estes agentes tem distribuição mundial e são transmitidos principalmente pela via fecal-oral, comprometendo vários órgãos e ocasionando diferentes quadros clínicos, como por exemplo poliomielite (formas inaparentes e subclínicas até paralisias), meningite, febre exantemática, miocardite, entre outros. Os coxsackievirus são extremamente infecciosos para camundongos recém-nascidos; geralmente o tipo A causa miosite generalizada e o tipo B uma miosite local. Os poliovírus infectam certos tipos de células nervosas, causando sérios danos ou completa destruição das mesmas. No cérebro, a formação reticular, os núcleos vestibular e cerebelar profundo são os mais frequentemente afetados. Quase não se observa alteração no córtex, com exceção do córtex motor (Gomes & Vasconcelos, 1997).

O gênero *Erbovirus* é representado pelo vírus da rinite eqüina B, o gênero *Kobuvirus* pelo vírus *Aichi*, e o gênero *Teschovirus* pelo vírus *Porcine teschovirus* (13 sorotipos).

Os picornavírus possuem ARN de fita simples, esféricos, simetria icosaédrica, diâmetro de 22-30 nm, são estáveis em pH ácido, não envelopados, ou seja, resistentes à solventes, tais como éter e desoxicolato de sódio, são rapidamente inativados pela luz ultravioleta, infectam uma variedade de tipos celulares de origem humana e animal e podem ou não possuir hemaglutininas. Receptores de eritrócitos têm sido parcialmente caracterizados para Coxsackievirus B3 e Echovirus 7, assim como para o vírus EMC. Este último se liga à eritrócitos humanos via glicoforina A, a principal sialoglicoproteína distribuída na membrana que é primariamente responsável pelos antígenos do grupo sanguíneo MN (Rueckert, 1996). A presença de receptores de eritrócitos não demonstra um papel conhecido na patogênese viral.

O genoma dos picornavírus é uma molécula de ARN, única, contínua, linear e de polaridade positiva, constituindo diretamente um ARNm para a síntese de proteínas virais. Compreende uma faixa de aproximadamente 7.209 à 8.450 nucleotídeos, e são compostos por 30% de adenina, 24% de citosina, 22,5% de guanina e 23,5% de uracila. Sua extremidade 3' é poliadenilada e 5' tem um oligopeptídeo codificado pelo vírus ligado covalentemente denominado VPg (*Virion protein genome*) (Rueckert, 1996). O genoma é monocistrônico e apresenta em ambas as extremidades da cadeia zonas não codificadoras chamadas NTR (*Nontranslated region* – região não traduzida). No centro encontra-se uma zona codificadora que possui um total de 11 genes que dão lugar a uma poliproteína de 247 kdaltons e, após um processo proteolítico originará três proteases virais (2A, 3C e 3CD) e 11 proteínas finais com diversas funções. Cerca de 71% dos nucleotídeos são comuns entre os três sorotipos de poliovírus, e os aminoácidos que os codificam são comuns em 88%. Esta zona possui três domínios maiores denominados P1, P2 e P3 que darão lugar a três produtos primários: o P1 codifica a síntese de proteínas do capsídeo e agrupa os genes 1A, 1B, 1C e 1D; o P2 codifica a síntese de proteínas da morfogênese e agrupa os genes 2A, 2B e 2C; e o P3 codifica a síntese de VPg, proteases e replicases, agrupando os genes 3A, 3B, 3C e 3D (Figura 9)

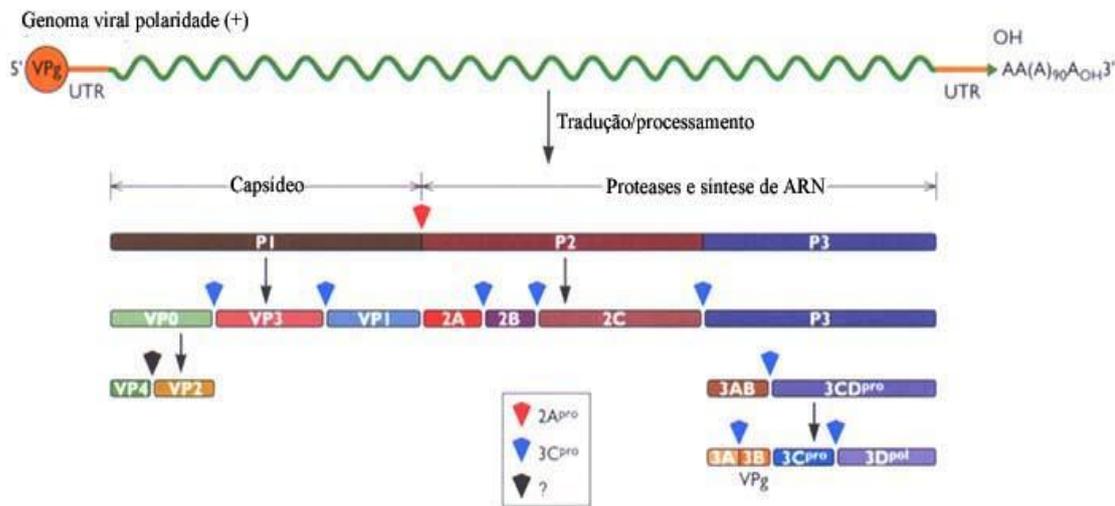


Figura 9 – Estrutura e organização genômica do poliovírus.

Fonte: Flint et al., 2000

Exceto os poliovírus, que requerem pH entre 4,5 e 8,5 e a presença de íons monovalentes no meio, inicialmente ocorre a adsorção do vírus aos sítios receptores da membrana plasmática, influenciados pelo baixo pH e dependentes de íons de cálcio e magnésio. Depois da adsorção, os picornavírus entram na célula através de diversas rotas, incluindo endocitose mediada por clatrina e caveolae (DeTulleo & Kirchhausen, 1998; Bayer et al., 2001; Joki-Korpela et al., 2001; Marjomäki et al., 2002; Stuart et al., 2002; Pietiäinen et al., 2004; O' Donnell et al., 2005), seguindo do desnudamento do mesmo e liberação do ARN viral dentro do citoplasma, onde irá ocorrer o processo de replicação, utilizando diversas moléculas de superfície celular como receptores (Rossmann et al., 2002).

Através do uso de ribossomos e outras proteínas da maquinaria celular do hospedeiro, o ARN viral (que é o próprio ARNm), direciona para a síntese de uma poliproteína que é proteoliticamente clivada. A tradução da mensagem viral não é restrita à um único ribossomo, pois polissomos com até 40 ribossomos têm sido

descritos em células infectadas com poliovírus. Esta poliproteína origina os precursores protéicos P1, P2 e P3. A clivagem de P3 é autocatalítica e forma mais três proteínas menores que são: proteinase, 3C ou 3CD (necessária para a clivagem de proteínas virais), proteína, 3AB (precursora de VPg e provavelmente necessária para a síntese de ARN) e uma RNA polimerase, 3D (requerida para a cópia do ARN (-) poli U em 5' a partir do seu complementar (ARN (+) 3' poli A)). Este ARN é chamado de intermediário replicativo (IR) e no retículo endoplasmático liso servirá de molde para a formação simultânea de ARN (+) para a tradução, e alguns para a síntese adicional de ARN (-).

Para a organização do capsídeo viral, o precursor da proteína P1 clivado por proteínas virais para formar uma subunidade 5s (protômero imaturo) composta por três agregados protéicos (VP0, VP3 e VP1). Esta clivagem é lenta devido as concentrações de P1 e da proteinase necessária (3C ou 3CD) serem baixas. Após o aumento da atividade da proteinase, a concentração de protômeros imaturos 5s se eleva e forma pentâmeros, requeridos no empacotamento de VPg-ARN para a formação de provirions. A formação das partículas virais infecciosas é acompanhada de clivagem de maturação de VP0 (em VP4, 3, 2 e 1), que originam as quatro subunidades características dos picornavírus (Figura 10). Partículas virais completas, que freqüentemente formam cristais no citoplasma das células infectadas, são finalmente liberadas para o exterior através de lise celular (Figura 11).

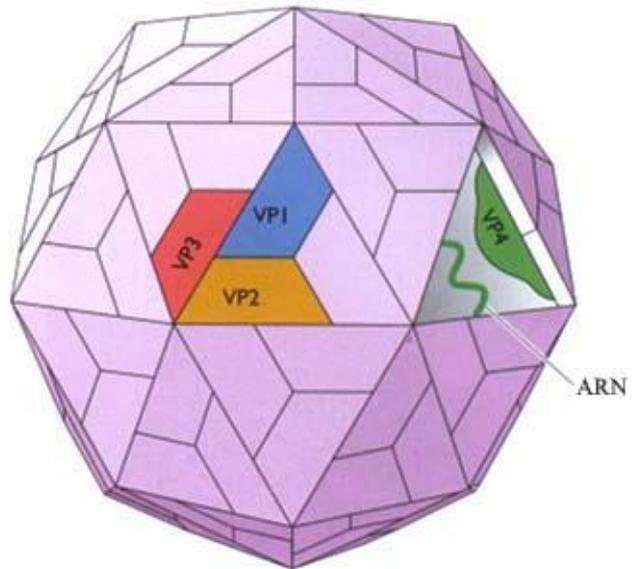


Figura 10 – Representação esquemática do vírion de *Poliovirus*.

Fonte: Flint et al., 2000.

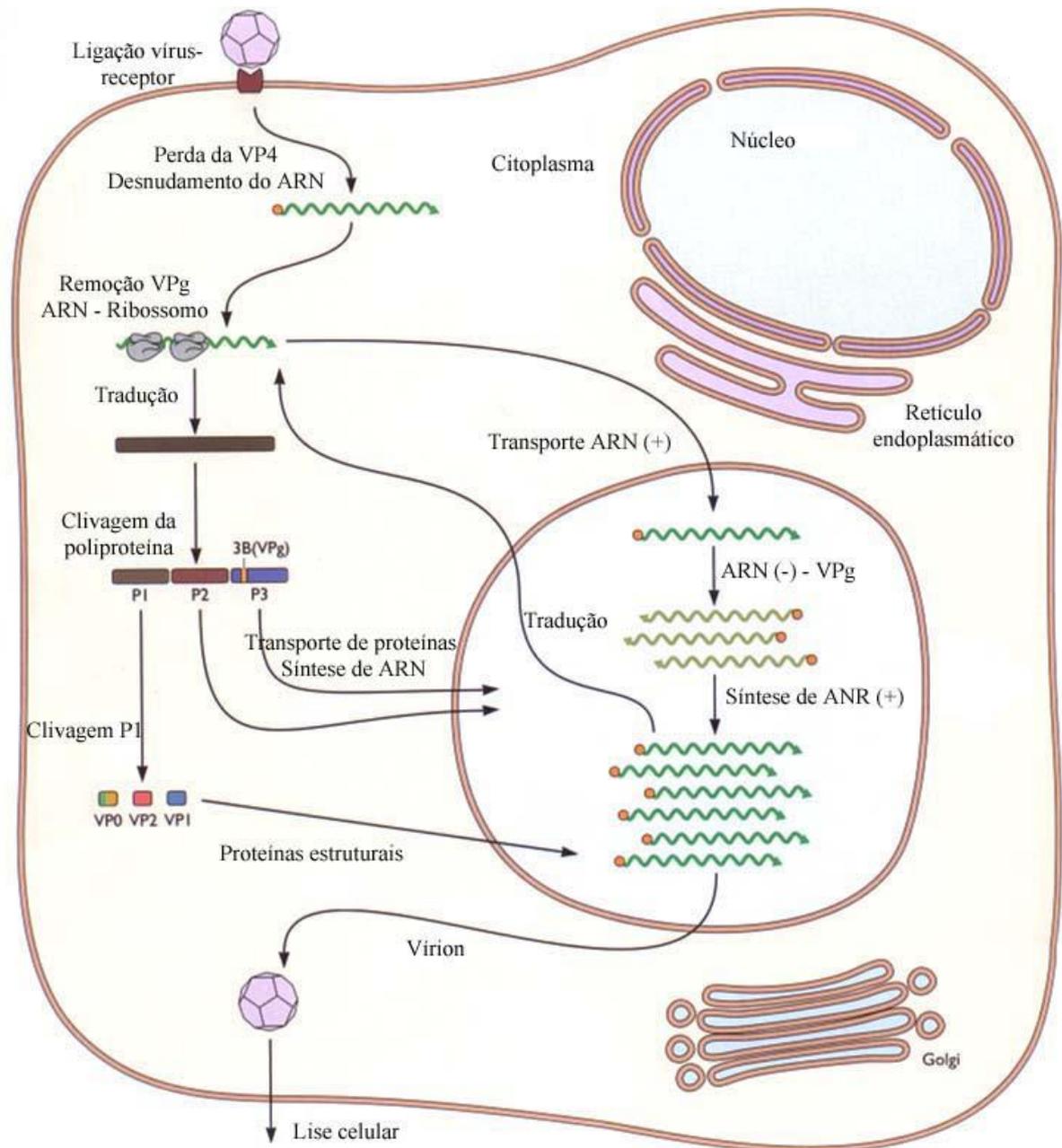


Figura 11 - Estratégia de replicação do *Poliovirus*, membro da família *Picornaviridae*.

Fonte: Adaptado de Flint et al., 2000.

A maioria dos picornavírus induz mudanças morfológicas características nas células infectadas. Um dos efeitos iniciais é a marginação da cromatina, caracterizado pela perda de textura homogênea microscópica do material nuclear que se acumula dentro do envelope nuclear. Podem aparecer vesículas

membranosas no citoplasma, que se iniciam às proximidades do envelope nuclear e se espalham até o citoplasma estar inteiramente envolvido. (Rueckert, 1996).

As doenças são caracterizadas pela especificidade do hospedeiro e um determinado conjunto de sintomas (síndrome), os quais podem geralmente ser correlacionados com infecção em tecidos específicos (tropismo celular). Por exemplo, poliovírus infectam células nasofaríngeas e do intestino, e são estas células que o vírus normalmente usa para se propagar em natureza. A forma paralítica do poliovírus também tem alta especificidade pelas células do corno anterior da medula espinhal, o que contribui para as características paralíticas especiais da doença. Um tipo similar de especificidade é visto nos Coxsackievirus, os quais, como os poliovírus, infectam as células nasofaríngeas, mas, ao contrário dos poliovírus, tem uma propensão por músculos do coração e esqueléticos, e ainda são capazes de infectar camundongos recém-nascidos, mas não adultos (Rueckert, 1996).

Os mecanismos responsáveis pelo tropismo celular não estão totalmente esclarecidos. Há inúmeros relatos de infecções ditas abortivas ou restritas nas quais o ARN viral sofre desnudamento com sucesso e inicia uma infecção, que em seguida é abortada em uma etapa crítica do ciclo de replicação. Isto implica na necessidade de moléculas celulares específicas na multiplicação do vírus, que poderiam ser fatores do hospedeiro envolvidos na função de proteinase viral ou proteínas virais envolvidas na síntese do seu ARN (Rueckert, 1996).

2.6 O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O sistema nervoso central (SNC) é envolvido em um grande número de infecções virais, através das seguintes características: 1) neuroinvasividade, quando o vírus possui a capacidade de invadir o SN a partir de sítios periféricos de replicação; 2) neurotropismo, que é a habilidade de um vírus em infectar o SN periférico (SNP) ou sítios específicos do SNC, e 3) neurovirulência, que refere-se à habilidade de um vírus em produzir doença neurológica. Dentre os vírus que primariamente causam doença neurológica ao homem podemos citar os membros da família *Picornaviridae* (*Poliovirus*, *Coxsackievirus*, *Echovirus*), *Togaviridae* (Vírus das encefalites eqüinas leste, oeste e venezuelana), *Flaviviridae* (Vírus do Nilo ocidental, encefalite de St Louis, encefalite japonesa), *Rhabdoviridae* (Raiva), *Retroviridae* (HIV 1 e 2, HTLV-2), *Herpesviridae* (*Varicella-zoster*, Herpes simples, Epstein-Barr, citomegalovirus), entre outras.

O SNC é composto por dois distintos grupos celulares: os neurônios e as células da glia, sendo estas últimas caracterizadas por quatro tipos: oligodendrócitos, endimócitos, astrócitos e microglia. A interação entre essas células e os neurônios é responsável por diversas funções no processamento de informações, garantindo a funcionalidade cerebral e o desenvolvimento do SNC (Kandel, 1991; Lent, 2001).

O neurônio é a unidade morfofuncional do SNC responsável pela produção e condução dos sinais elétricos, com habilidade de codificar o que se passa no ambiente externo e no interior do corpo (Gartner et al., 1999; Lent, 2001). Apresenta morfologia variada, dependente da localização no sistema nervoso. Os neurônios possuem um corpo celular no qual se encontra a maioria das organelas

intracelulares, e deles partem longos e numerosos prolongamentos, chamados neuritos, os quais são representados pelos axônios e pelos dendritos.

Os oligodendrócitos possuem corpo celular pequeno e com poucos prolongamentos e participam na formação da bainha de mielina que envolve os axônios dos neurônios na substância branca do cérebro (Kimelberg & Norenberg, 1989).

Os endimócitos também são células da glia e formam uma camada de células que limita o espaço ventricular do cérebro dos vertebrados (Reichenbach, 1989). Por estarem presentes, mesmo no cérebro de indivíduos adultos, uma subpopulação destas células é associada com a possível função precursora neural do sistema nervoso (Momma et al., 2000).

Os astrócitos podem ser divididos de acordo com a sua morfologia e função em dois grupos: astrócitos fibrosos, de corpo celular pequeno e com prolongamentos longos e finos, encontrados na substância branca, e astrócitos protoplasmáticos, que apresentam um corpo celular maior, com prolongamentos finos e ramificados, sendo encontrados na substância cinzenta (Marin-Padilla, 1995). Os astrócitos possuem diversas funções no SNC, desde os primórdios embrionários até a fase adulta. Podem secretar fatores de crescimento para neurônios, modulando a sobrevivência e a diferenciação dos mesmos (Gomes et al, 1999), além de funcionarem como células acessórias nas reações imunes, produzindo moléculas de resposta inflamatória (Aloisi et al., 2001).

As microglias, sob condições fisiológicas, são encontradas inativas e distribuídas por todo o SNC. No seu processo clássico de fagocitose são encontradas moderadamente ativadas. Proliferam alterando para uma morfologia amebóide e fagocitam células que são lesadas ou desnecessárias. O início da

ativação microglial ainda não foi estabelecido, embora algumas citocinas estejam envolvidas, promovendo ativação ou inibição (Nakamura, 2002).

Infecção em astrócitos já foi observada pelo Citomegalovirus induzindo a produção de fator transformador do crescimento beta (Kossmann et al., 2003). Os astrócitos também estão associados como reservatórios para herpes vírus 6 humano (Donati, et al., 2005). O vírus Theiler infecta microglias, astrócitos e oligodendrócitos *in vivo* (Aubert et al., 1987). A cepa GDVII infecta principalmente neurônios, onde o capsídeo viral determina a habilidade na infecção de neurônios em cultivos primários (Jarousse et al., 1998). As cepas atenuadas DA e BeAn são encontrados na segunda fase da doença em macrófagos, oligodendrócitos e astrócitos (Jarousse, et al., 1998; Jnaoui, et al., 2002). Os Coxsackievirus B3 infectam principalmente neurônios, provocando extensa morte neuronal em camundongos recém-nascidos (Feuer et al., 2003).

Na infecção por HIV os astrócitos podem servir como reservatório para o vírus, produzindo uma infecção restrita em oligodendrócitos e neurônios, embora haja estudos controversos (Nitkiewicz et al., 2004; Borgmann, et al., 2005; Kramer-Hammerle, et al., 2005; Seth & Major, 2005). Nos coronavírus a neurovirulência está associada com a habilidade diferencial do vírus em induzir citocinas pró-inflamatórias (Interleucina 12 [IL-12] p40, fator alfa de necrose tumoral [TNF α], IL-6, IL-15 e IL-1beta) em astrócitos e microglias também no cérebro e medula espinhal de camundongos (Li, et al., 2004). Replicação do vírus do Nilo ocidental foi observada em neurônios e astrócitos, mas não em células microgliais, entretanto, as mesmas induziram a produção de IL-6, TNF α e quimiocinas, influenciando desta maneira a neuropatogênese da infecção (Cheeran, et al., 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o vírus Juruaçá, isolado de morcego, baseando-se em suas propriedades morfológicas, físico-químicas, antigênicas e moleculares, bem como aspectos histopatológicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Realizar a caracterização viral utilizando testes sorológicos e físico-químicos;
- ❖ Determinar sistemas de cultivos celulares sensíveis à replicação viral;
- ❖ Caracterizar ultraestruturalmente as partículas virais a partir de cultivos celulares e tecidos de cérebro de camundongos albinos suíços recém-nascidos infectados pelo vírus Juruaçá;
- ❖ Caracterizar o ácido nucléico viral a partir de cérebro de camundongos albinos suíços recém-nascidos infectados pelo vírus Juruaçá;
- ❖ Avaliar alterações anatomo-patológicas em camundongos albinos suíços recém-nascidos experimentalmente infectados pelo vírus Juruaçá;
- ❖ Classificar, preliminarmente, o vírus Juruaçá em um táxon viral.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

O vírus Juruaça (BE AN 401933) foi isolado de um morcego capturado no dia 03 de maio de 1982, às proximidades do Igarapé do Batata, localizado no km 15, na região de Porto Trombetas, município de Oriximiná (longitude - 57°29' O e latitude - 1°12' S), mesorregião Baixo Amazonas, Pará, Brasil (Figura 12).

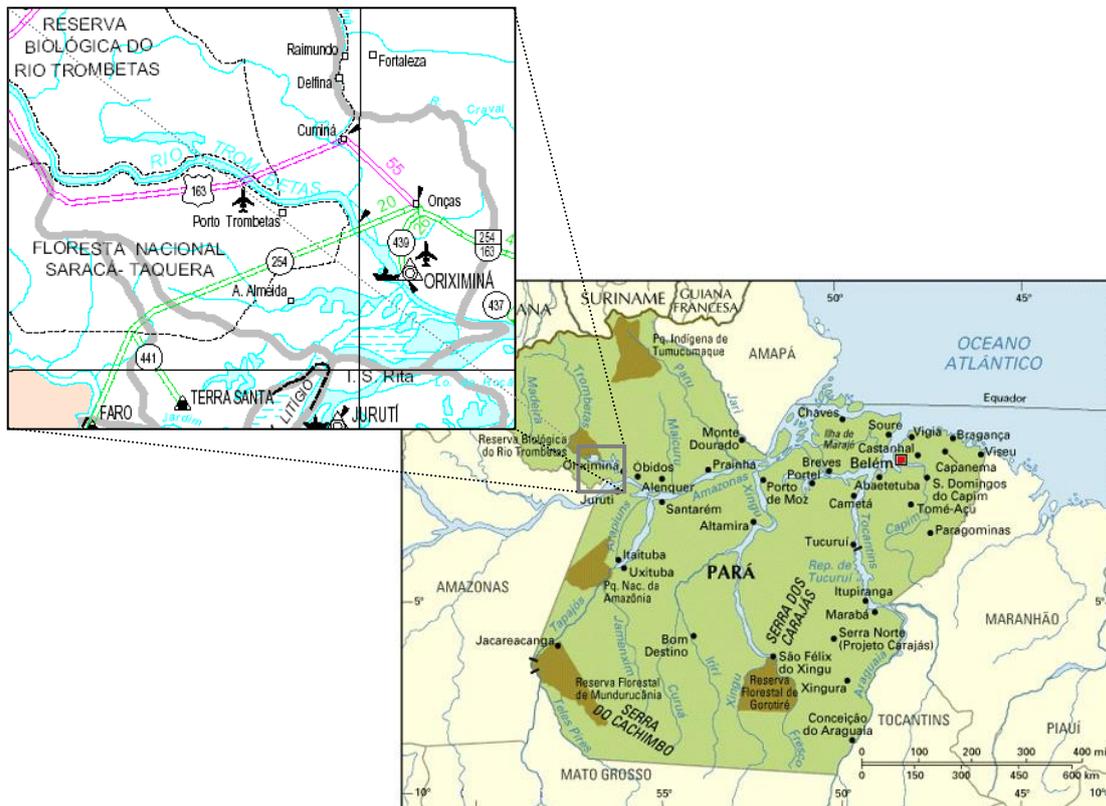


Figura 12 – Localização geográfica da região de Porto Trombetas, município de Oriximiná, onde o morcego foi capturado.

Fonte: <http://www.guianet.com.br/pa/mapapa.htm> e <http://www.aondefica.com/mapaparaax.asp>

Até o momento da utilização o material coletado foi acondicionado em botijão criobiológico contendo nitrogênio líquido e posteriormente estocado em freezer mecânico à temperatura de -70°C .

O vírus foi isolado em camundongos albinos suíços recém-nascidos, a partir de um lote de fragmentos de vísceras (baço, coração, fígado e rins) de morcego, não identificado em família. Inicialmente foi feita uma triagem sorológica contra vírus de diferentes gêneros e famílias, não se obtendo nenhum cruzamento sorológico, postergando assim, o processo de caracterização viral à época em que o vírus foi isolado.

4.1.1 Isolamento do vírus em camundongo albino suíço recém-nascido

Todos os procedimentos foram executados observando-se as normas e critérios pré-estabelecidos e exigidos pelo Comitê Internacional de Biossegurança, sendo também aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisas com Animais (CEPAN) do IEC para a execução de procedimentos de isolamento e técnicas sorológicas destinadas a agentes infecciosos pertencentes ao nível de biossegurança 2.

O estoque viral foi estabelecido a partir de suspensões de cérebro de camundongos infectados com o vírus Juruáçá, proveniente da quinta passagem, do estoque da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do IEC.

Essas suspensões de cérebro de camundongos infectados foram feitas a partir da maceração de cérebro de camundongo infectado na proporção de 1:10 em solução fosfato salina tamponada (PBS) pH 7,2 contendo albumina bovina a 0,75%, estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e penicilina (100 UI/mL); sendo centrifugadas a 8.000

r.p.m. durante 15 minutos à 4°C, e em seguida, foram inoculadas por via intracerebral (i.c.) em camundongos albinos suíços recém-nascidos (dois a três dias de idade). Os camundongos foram observados diariamente até manifestarem sinais de doença (paralisia, tremores, retardo no crescimento, entre outros), observando-se as convenções: E = estragado; ? = desaparecido; D = doente; M = moribundo; + = morto; ± = sacrificado, quando então foram acondicionados a -70°C para posterior manipulação (Figura 13).

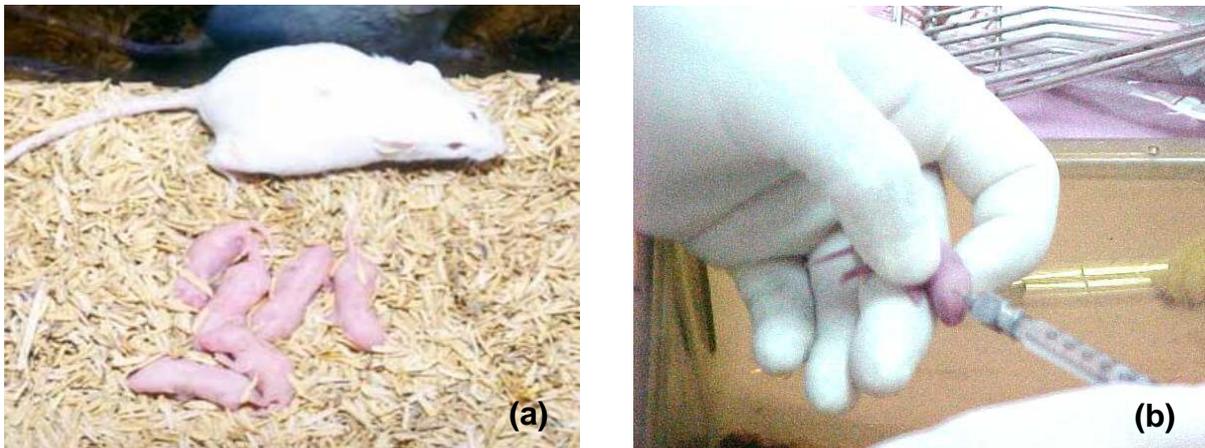


Figura 13 – Camundongos albinos suíços recém-nascidos utilizados para as tentativas de isolamento viral no IEC. (a) Manutenção dos camundongos em gaiolas. (b) Inoculação da suspensão viral via i.c.

Fonte: Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas - IEC

4.1.2 Título Viral

A titulação viral foi realizada a partir do preparo de diluições seriadas de 10 vezes (10^{-1} a 10^{-7}) de suspensão de cérebro de camundongo infectado em PBS pH 7,2 contendo albumina bovina e antibióticos, como descrito anteriormente. O volume de 0,02 mL das diluições foi inoculado via i.c. em grupos de seis

camundongos recém-nascidos. O título viral foi calculado pelo método descrito por Reed & Muench (1938) e expresso como $DL_{50}/0,02$ mL, que representa a dose letal para 50 % dos camundongos infectados.

4.1.3 Preparo do Soro Homólogo

O soro homólogo foi produzido a partir de quatro inoculações de 0,2 mL de suspensão de cérebro de camundongo infectado na proporção de 1:10 em solução de NaCl a 0,85%, via intraperitonal (i.p.), em camundongos albinos suíços adultos (três a quatro semanas de idade), administradas num intervalo de uma semana. Ao final da última inoculação, os animais foram anestesiados e sangrados por punção cardíaca e o sangue coletado foi centrifugado a 8.000 r.p.m. durante 10 minutos para a obtenção do soro, e depois armazenado a -20°C para posterior uso (Casals, 1967). A especificidade do soro foi comprovada pelo teste de FC e IFI.

4.1.4 Preparo de Antígeno (Sucrose-Acetona)

Para a sua realização foram utilizados 2g de cérebros de camundongos infectados em uma solução de sucrose a 8,5%, num volume correspondente a quatro vezes o peso final de cérebros infectados (8 mL). Em seguida colocou-se esta mistura em acetona pura, num volume igual a 20 vezes a quantidade final da mistura sucrose-antígeno (200 mL), agitando-se e guardando-se a mistura por cinco minutos a 4°C . Depois deste tempo, a acetona foi decantada e repostada em mesmo volume, permanecendo o material em repouso por uma hora a 4°C . Decantou-se a acetona e o material precipitado foi colocado para secar em uma bomba de vácuo por uma

hora, sendo posteriormente hidratado por 30 minutos a 4°C, utilizando-se uma solução de NaCl a 0,85% num volume correspondente a duas vezes o peso inicial de cérebros infectados (4 mL). O material foi centrifugado por 10 minutos a 8.000 r.p.m. a 4°C, separando-se o sobrenadante que foi conservado a – 70°C até o uso.

4.2 ISOLAMENTOS EM CULTIVOS CELULARES

Para o crescimento viral em cultivos celulares foram utilizadas linhagens contínuas derivadas de vertebrados como a Vero (rim de macaco *Cercopithecus aethiops*); a linhagem originária de invertebrado clone C6/36 (*Aedes albopictus*), além de cultivo primário de astrócitos, microglias e neurônios de camundongo albino suíço recém-nascido.

4.2.1 Cultivos de Linhagens Permanentes

A linhagem de células Vero foi mantida em estufa a 37 °C, contendo uma atmosfera de 95% de O₂ e 5% de CO₂, sendo semanalmente tripsinizada. As células foram mantidas com o uso de meio 199 acrescido de 2% de L-glutamina (200 mM), 10% de soro bovino fetal (SBF), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (Lennette, 1995).

A linhagem C6/36 foi mantida em meio Leibowitz (L-15), acrescido de triptose fosfato, aminoácidos não essenciais, estreptomicina (100 µg/mL), penicilina (100 UI/mL) e 5% de SBF, para o meio de crescimento e 2% para o meio de manutenção (Beaty et al., 1989). Essas células foram mantidas em temperatura ambiente (TA),

sem necessidade de atmosfera de CO₂ e repicadas a cada sete dias não sendo utilizada a etapa de tripsinização.

4.2.2 Cultivo Primário de Astrócito

Os cultivos primários de astrócitos foram preparados a partir de cérebro de camundongo albino suíço recém-nascido. Inicialmente foi retirado o órgão, através da decapitação dos animais, seguido da extração da calota craniana e das meninges. O encéfalo foi picotado em solução de PBS acrescida de 0,6% de glicose e os fragmentos foram dissociados mecanicamente através do uso de pipetas pasteurs, em solução PBS/glicose acrescida de tripsina 0,02M. As células dissociadas foram colocadas em estufa a 37°C por cinco minutos e posteriormente centrifugadas a 3000 r.p.m. por 3 minutos a 4 °C e ressuspensas em meio DMEM/F12 (Gibco) - suplementado com 30 mM de glicose, 2 mM de glutamina, 3 mM de bicarbonato de sódio, penicilina (100 µg/mL), estreptomicina (100 UI/mL), fungizon (2,5 µg/mL) e 10% de SBF.

As células foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas à densidade de 10³ células por poço de uma placa de cultura de 24 poços (1,9 cm² por poço) e 10⁵ células por garrafa de cultura (25 cm²), previamente tratadas com poli-L-lysina a 0,0025% (Sigma). As células foram mantidas em estufa a 37°C sob atmosfera úmida e 5% de CO₂ (Moura Neto et al., 1983) e a observação foi diária em microscópio invertido Axiovert S100 (Zeiss).

4.2.3 Cultivo Primário de Microglias

Para o preparo de cultivo de células da microglia foi utilizada a técnica descrita por Lima et al. (2001) com adaptações. As microglias foram obtidas de garrafas de cultivo primário de astrócito envelhecidas (2 semanas). As microglias foram soltas por agitação manual por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 3.000 r.p.m. por 5 minutos. As células foram dissociadas e plaqueadas com D-MEM/F-12 contendo 10% de SBF. O cultivo foi mantido em estufa a 37°C sob atmosfera úmida e 5% de CO₂ e observado em microscópio invertido Axiovert S100 (Zeiss).

4.2.4 Cultivo Primário de Neurônios

Para o cultivo de neurônios foram utilizados camundongos embrionários (15-16 dias de vida intra-uterina). Primeiramente anestesiou-se o camundongo fêmea prenha, seguido do sacrifício do animal por deslocamento cervical. O útero com os fetos foi retirado e colocado em PBS-glicose, seguido da dissecação dos fetos para a obtenção do encéfalo. Retirou-se as meninges e dissociou-se o encéfalo com auxílio de pipeta Pasteur em PBS-glicose. Centrifugou-se a suspensão de células a 3.000 r.p.m. por três minutos. Desprezou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspenso em meio Neurobasal (Gibco), de acordo com o protocolo adaptado de Brewer (1997). As células foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas, sendo a manutenção do cultivo feita em estufa a 37°C sob atmosfera úmida e 5% de CO₂ e observado em microscópio invertido Axiovert S100 (Zeiss).

4.2.5 Infecção dos cultivos celulares

Após o estabelecimento de uma monocamada celular foi feita a inoculação do vírus nos cultivos celulares, onde uma suspensão de cérebro de camundongo infectado foi adicionada na proporção de 1:10 com o meio de manutenção adequado para cada tipo celular. Seguindo-se a inoculação, os cultivos celulares foram mantidos à 37°C em atmosfera úmida de 5% CO₂, com exceção do clone C6/36 (mantido em TA), e observados diariamente ao microscópio óptico invertido (LEICA, modelo BMIRB) com objetivo de visualizar efeito citopático (ECP). Para a confirmação da presença do vírus nas células infectadas, foram realizados testes de imunofluorescência indireta (IFI). O controle foi feito a partir da inoculação de suspensão de cérebro de camundongo normal.

4.3 TESTES FÍSICO-QUÍMICOS

4.3.1 Sensibilidade ao Desoxicolato de Sódio (DCA)

O teste de sensibilidade ao desoxicolato de sódio (Theiler, 1957), tem como objetivo verificar a presença ou ausência de envelope viral (Figura 14). Inicialmente foi feita uma suspensão de cérebros de camundongos infectados com o vírus Juruaçá a 1:5 em PBS pH 7,2 contendo albumina bovina a 0,75%, estreptomicina (100µg/mL) e penicilina (100UI/mL), a qual vai foi centrifugada a 10.000 r.p.m. durante 1 hora a 4°C. Em seguida foi feita uma mistura de volumes iguais da suspensão 1:5 do vírus estoque e DCA (1:500), e outra de volumes iguais da referida suspensão viral e albumina bovina a 0,75% em PBS (controle negativo sem

DCA). Estas misturas foram mantidas em banho-maria a 37°C por 1 hora, sendo posteriormente realizadas diluições seriadas de 10 vezes, as quais foram inoculadas 0,02 mL em camundongos albinos recém-nascidos via i.c. O cálculo do título foi baseado no método de Reed & Muench (1938) e expresso como $DL_{50}/0,02\text{mL}$, ou seja, a dose capaz de matar 50% dos animais inoculados, em que a positividade é representada pelas amostras que apresentaram um índice logarítmico igual ou superior a 1,8.

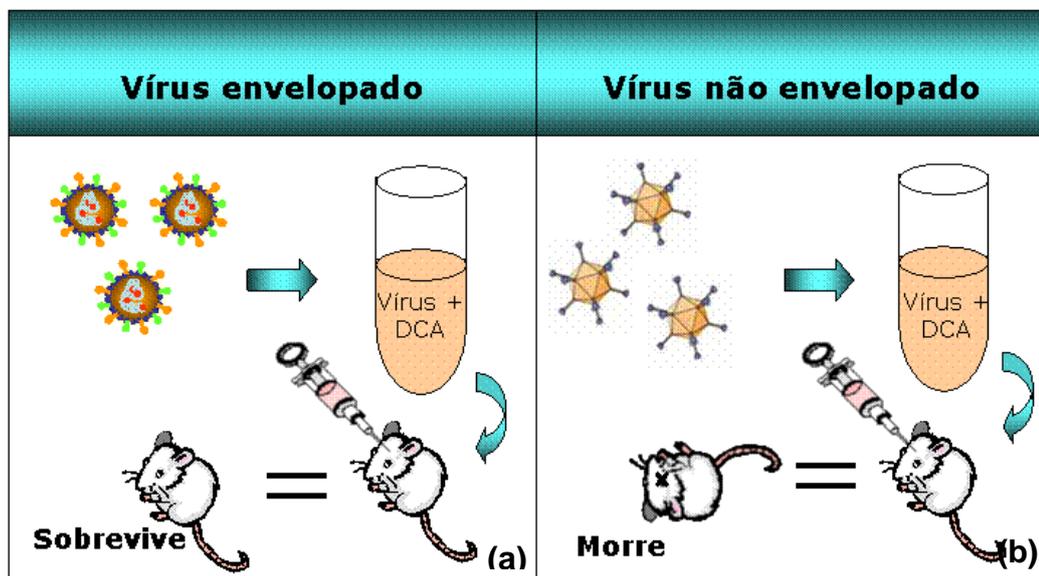


Figura 14 – Representação esquemática do teste de sensibilidade ao DCA. (a) Vírus envelopado submetido ao DCA, resultando na perda da infectividade viral e na sobrevivência dos camundongos; (b) vírus não envelopado submetido ao DCA, resultando na manutenção da infectividade viral e morte dos animais.

4.3.2 Teste de Hemaglutinação (HA)

O teste de HA tem como objetivo constatar a presença ou ausência de hemaglutininas na superfície viral. Este teste é utilizado baseado na técnica de Clarke & Casals, seguindo as modificações estabelecidas por Shope (1963).

Para a realização do teste de HA utilizou-se uma placa de 96 orifícios, sendo primeiramente acrescentado 25 μ L do antígeno do vírus Juruaça preparado pelo método de sucrose-acetona em cada poço da primeira coluna da placa. Em seguida, foi acrescentado, em todos os orifícios, 25 μ L de albumina bovina (BSA) a 0,4% pH 9,0. Com o auxílio de microdiluidores foi realizada a diluição do antígeno a partir da primeira coluna da placa. Nas fileiras correspondentes, acrescentou-se 25 μ L das soluções de pH (5,75; 6,0; 6,1; 6,2; 6,4; 6,8 e 7,0) acrescidas de glóbulos de ganso em solução de Dextrose-Gelatina-Veronal (DGV) na proporção de 1:5. Agitou-se a placa por 15 segundos deixando em seguida em repouso, para finalmente realizar a leitura, considerando o resultado positivo quando há aglutinação dos glóbulos, e negativo quando há sedimentação dos mesmos, formando um botão (Figura 15).

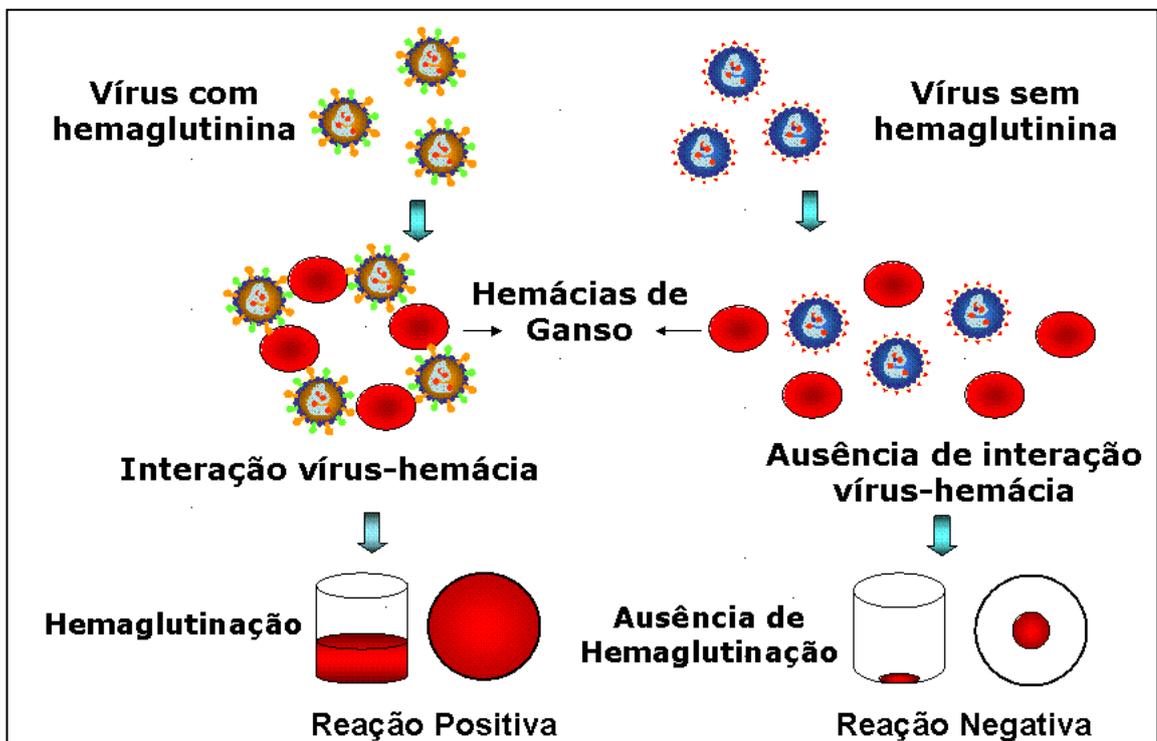


Figura 15 – Representação esquemática da técnica de Hemaglutinação (HA).

4.4 TESTES SOROLÓGICOS

4.4.1 Fixação do Complemento (FC)

O teste de FC é utilizado segundo a microtécnica modificada por Fulton & Dumbell, como descrita por Shope & Sather (1979) (Figura 16). Utilizou-se o antígeno do vírus Juruacá preparado pelo método de sucrose-acetona, o qual foi diluído nas proporções de 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64. Paralelamente, foi feita uma diluição seriada do soro em veronal 1:5, sendo em seguida, inativado por 20 minutos a 60°C. Numa placa, foram misturados 25µL do soro, 50µL de duas unidades de complemento de cobaia e 25µL do antígeno viral, permanecendo a placa em repouso *overnight* (~16h) a 4°C.

Posteriormente, preparou-se o sistema hemolítico, constituído de hemácias de carneiro (2,5%) e hemolisina (1:400), que é um anticorpo anti-hemácias de carneiro, e em seguida, sensibilizado em banho-maria a 37°C por 15 minutos, bem como as placas, também incubadas em estufa 37°C por 15 minutos. Após esse tempo, adicionou-se 50µL do sistema hemolítico em cada orifício da placa, a qual foi colocada para incubar a 37°C durante 30 minutos, sendo agitada a cada 10 minutos. Por fim, guardou-se a placa a 4°C e realizou-se a leitura após três horas. A interpretação dos resultados é baseada no percentual de hemólise observado (Tabela 5).

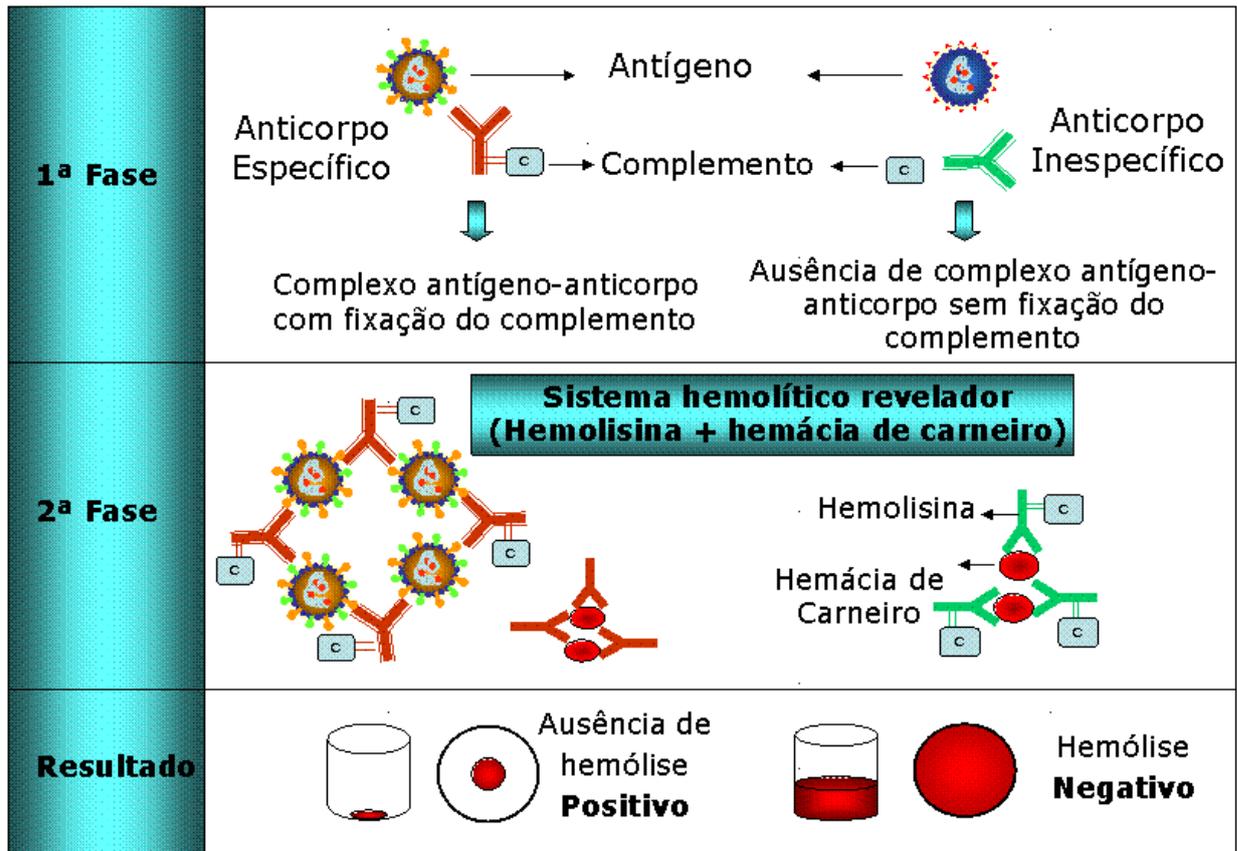


Figura 16 – Representação esquemática do teste de Fixação do Complemento (FC).

Tabela 5 - Interpretação dos resultados do teste de FC.

Percentagem de hemólise	Interpretação em cruces	Resultado
0 %	4	Reação positiva
25 %	3	Reação positiva
50%	2	Reação negativa
75%	1	Reação negativa
100%	0	Reação negativa

4.4.2 Inibição da Hemaglutinação (IH)

Para o tratamento do soro, colocou-se 50 μ L do soro num tubo 13x100 mm e acrescentou-se 0,45 mL de solução de NaCl a 0,85%. Com auxílio de uma seringa de 1mL e agulha nº26, retirou-se do tubo a mistura de soro e NaCl e adicionou-se 12 volumes (6 mL) de acetona gelada. Com a mesma seringa e agulha, verteu-se o soro misturado com NaCl no tubo contendo acetona, tampando e agitando o tubo. Deixou-se em repouso a 4°C por 5 minutos e, após este tempo, centrifugou-se por 2 minutos a 600 r.p.m.. Desprezou-se o sobrenadante e recolocou-se 6 mL de acetona, permanecendo a mistura em repouso a 4°C por 1 hora. Centrifugou-se 5 minutos a 1.500 r.p.m. e novamente desprezou-se o sobrenadante. Colocou-se para secar no vácuo durante 1 hora e hidratou-se com solução borato salina pH 9,0 com a quantidade de 0,5 mL, podendo ser utilizado imediatamente ou acondicionado a -20°C até o uso.

Para a preparação das soluções de pH, utilizou-se hemácias de ganso, centrifugadas durante 10 minutos a 1.800 r.p.m. e os glóbulos foram lavados 4 vezes em DGV (um volume de glóbulos e três volumes de DGV). No final, após as lavagens, as hemácias foram suspensas 1:5 em DGV e guardadas a 4°C em geladeira.

O soro e antígenos foram devidamente identificados nas microplacas, nas quais colocou-se 25 μ L do soro teste e 25 μ L do antígeno diluídos, cobrindo-se a placa para evitar evaporação e incubando-a a 4°C, *overnight*. Após esse período, colocou-se 50 μ L de glóbulos de ganso diluídos (1:40) no pH apropriado e agitou-se a placa. Deixou-se em repouso a TA por 30 minutos e observou-se a formação do botão, cuja leitura é interpretada como positiva (Figura 17).

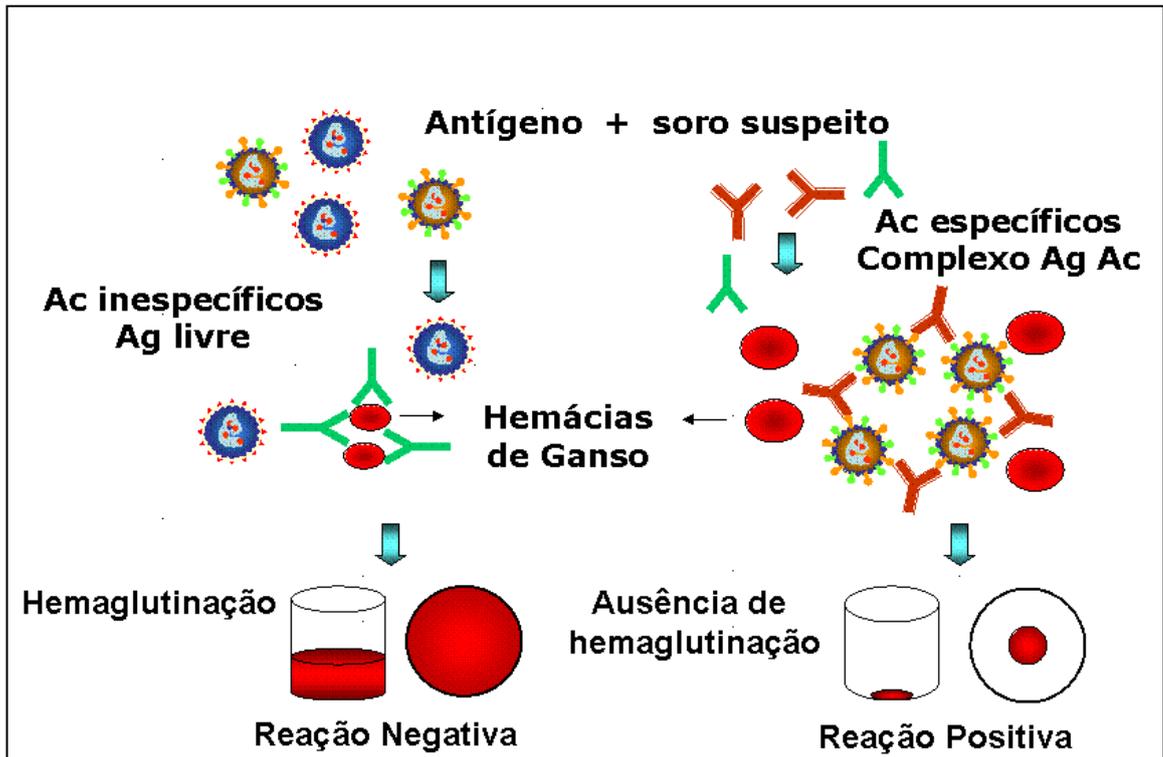


Figura 17 – Representação esquemática da técnica de Inibição da Hemaglutinação (IH).

4.4.3 Imunofluorescência Indireta (IFI)

Foram utilizados os cultivos celulares infectados e controles crescidos sobre lamínulas em placas de quatro poços segundo a técnica de IFI descrita por Gubler et al. (1984) (Figura 18).

Em seguida, as amostras foram fixadas em metanol durante 15 minutos a -20°C e posteriormente em acetona por cinco minutos à mesma temperatura. Em seguida as lamínulas foram passadas rapidamente em PBS e imersas em soluções de BSA nas concentrações de 1% e 3% em PBS pH 7,4 durante 10 minutos em TA. Após esse período o material foi incubado por um período de 12h a 4°C com o primeiro anticorpo (soro homólogo), que foi diluído na proporção de 1:10 em PBS/BSA 1% pH 8,0. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas em PBS/BSA nas concentrações de 3% e 1% durante 10 minutos cada lavagem em TA. O segundo

anticorpo (anticorpo anti-camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína - ITCF) (ICN) foi incubado por 30 minutos, sendo diluído na proporção de 1:100 em PBS/BSA 1% pH 8,0. O material foi lavado em PBS/BSA nas concentrações de 3% e 1% durante 10 minutos cada lavagem em TA. Depois as lamínulas foram lavadas em PBS por 10 minutos a TA. e rapidamente em água destilada, sendo posteriormente montadas em lâminas com n-propil-galato. As amostras foram observadas em microscopia de epifluorescência (Zeiss, Axiophot).

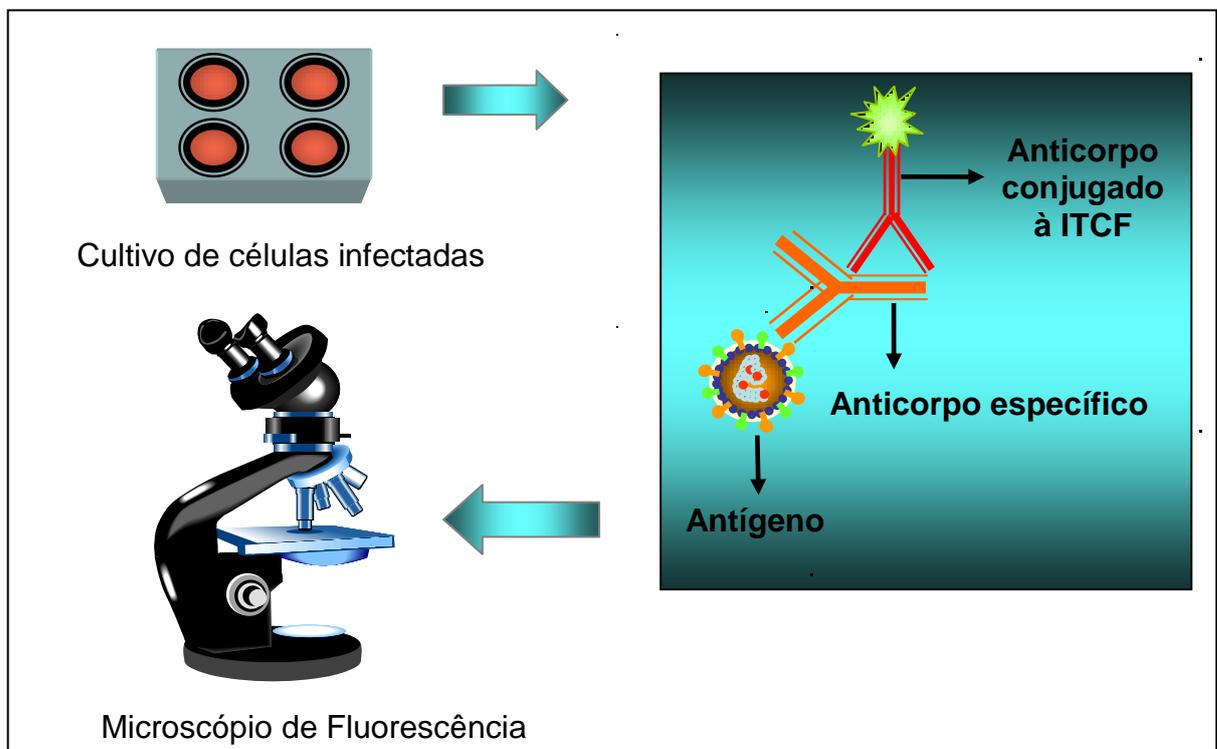


Figura 18 – Representação esquemática do teste de Imunofluorescência Indireta (IFI) utilizado para a detecção de antígeno viral em cultivo celular.

4.4.4 Imunofluorescência Indireta com dupla marcação

As amostras foram fixadas em metanol durante 15 minutos a -20°C e posteriormente em acetona por cinco minutos à mesma temperatura. Foi feita uma

etapa de bloqueio com PBS/BSA 3% adicionado de soro normal de cabra na proporção 1:1 por 30 minutos a TA. Adicionou-se o anticorpo primário anti-Juruaçá (1:10) e os anticorpos contra marcadores celulares, no caso de neurônio foi usado anti neurofilamento diluído 1:200 (Sigma) e para astrócitos anticorpos para proteína acídica fibrilar glial (*glial fibrillary acidic protein* – GFAP) (Dako) na diluição 1:100. O material permaneceu incubado durante 12h a 4°C. Após etapas de lavagem com PBS e novo bloqueio com PBS/BSA 3% com soro normal de cabra, foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com rodamina (Zymed) diluído 1:50, incubado juntamente com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com ITCF (ICN) diluído 1:100 por 1 hora a TA. O material foi lavado em PBS/BSA 1% durante 10 minutos em TA. Depois as lâminulas foram lavadas em PBS por 10 minutos a TA e rapidamente em água destilada, sendo posteriormente montadas em lâminas com n-propil-galato. As amostras foram observadas em microscopia de epifluorescência (Zeiss, Axiophot).

Para o cultivo de microglia, o procedimento foi semelhante, excetuando-se a incubação do primeiro anticorpo (anti-Juruaçá) que foi feita sem a adição simultânea de marcador celular. Na segunda etapa do teste foram utilizados o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com rodamina diluído 1:50 (Zymed) e a isolectina B₄ conjugada a ITCF (Vector) diluída 1:100 por 1 hora a TA. Seguiram-se as etapas de lavagem, montagem das lâminas e observação das mesmas em microscopia de epifluorescência (Zeiss, Axiophot).

Os controles negativos das reações de IFI foram feitos subtraindo o primeiro anticorpo (anticorpo específico). Para controle negativo do vírus foram utilizados cultivos não infectados. Para controle negativo de isolectina B₄ e neurofilamento

utilizou-se cultivo de astrócitos, e para controle de GFAP utilizou-se cultivo de microglias.

4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A microscopia eletrônica é de grande importância para a classificação viral visto a sua contribuição no estudo detalhado da morfologia das partículas. A técnica de contrastação negativa (Brenner & Horne, 1959) permite o estudo de propriedades físicas essenciais à classificação viral, como: tamanho e forma das partículas; simetria do capsídeo; visualização de estruturas de superfície; e presença ou ausência de envelope viral. Os cortes ultrafinos de cultivos celulares e tecidos infectados complementam o estudo da morfologia viral e contribuem para o entendimento do processo de morfogênese das partículas.

4.5.1 Cortes Ultrafinos

4.5.1.1 Cérebro de camundongo albino suíço recém-nascido

Camundongos albinos suíços recém-nascidos foram inoculados via i.c. com 0,02 mL de uma suspensão viral 1:10 preparada com PBS pH 7,2, contendo albumina bovina e antibióticos. Ao apresentarem sinais da doença, os animais foram coletados, sendo retirado o cérebro para seguir com o processamento de rotina para microscopia eletrônica. Como amostra controle, camundongos albinos suíços recém-nascidos foram inoculados via i.c. com 0,02 mL de uma solução de PBS pH 7,2, contendo albumina bovina e antibióticos sem vírus.

Fragmentos de aproximadamente 1mm^3 de cérebro de camundongo infectado e controle foram fixados pela técnica de imersão em solução de glutaraldeído a 2,5% mais paraformaldeído a 4% em tampão PHEM 0,1 M pH 7,2 (Karnovsky, 1965) por 30 minutos TA, seguido de sua refixação em glutaraldeído a 2,5% e CaCl_2 em tampão cacodilato de sódio (CBS) 0,1 M pH 7,2 por 1 hora; pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1%, ferrocianeto de potássio 0,8% e tampão CBS 0,1 M pH 7,2 por 1 hora a 4°C , protegido da luz (Hepler, 1980); contrastação em bloco em acetato de uranila a 5% diluída em acetona 50% por 1 hora a 4°C na ausência de luz; desidratação em série crescente de acetona (50%, 70%, 90% e três vezes de 100%) por 10 minutos cada etapa; infiltração em série crescente de epon-acetona – 1:2, 1:1, 2:1 – até epon puro (Luft, 1961) por 12 horas cada diluição; e inclusão na mesma resina, deixando polimerizar a 60°C por 48 horas.

Após trimagem manual dos blocos, foram obtidos cortes ultrafinos na faixa de 70 nm com o auxílio de um ultramicrótomo (Reichert Ultracuts, Leica) e navalha de diamante (Drukker International). Os cortes foram coletados em grade de cobre de 400 malhas, sendo em seguida contrastados positivamente com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo pH 12,0 (Reynolds, 1963) e visualizados ao microscópio eletrônico de transmissão (MET) (Zeiss, modelo EM 900) (Figura 19) sob orientação do Dr. José Antonio Picanço Diniz, da Seção de Microscopia Eletrônica do IEC.

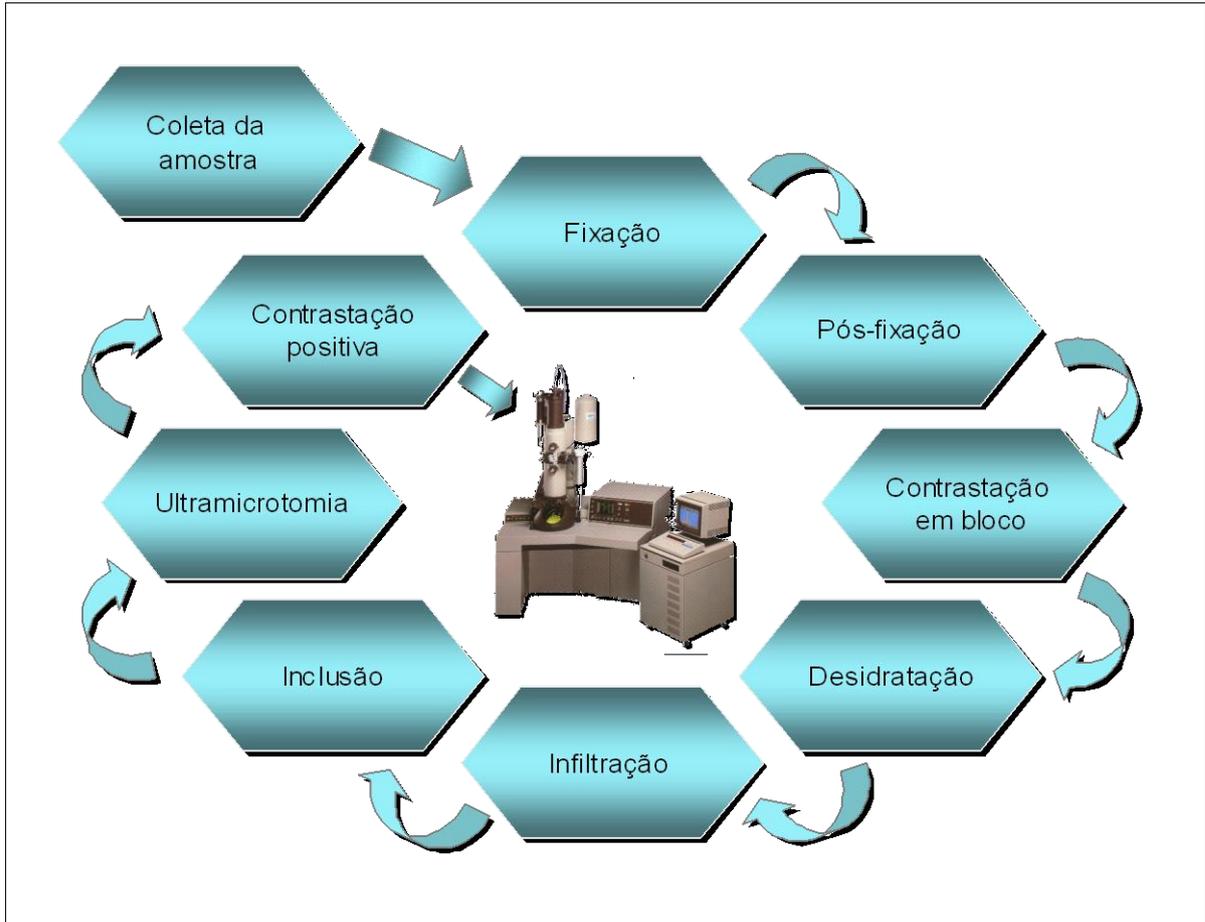


Figura 19 – Representação esquemática do processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Fonte: Adaptado de Bozzola & Russel, 1999

4.5.1.2 Cultivos Celulares

Foram utilizadas garrafas de cultura celular de 25 cm² contendo uma monocamada confluyente de células. As células infectadas foram inoculadas, na proporção de 1:10, com uma suspensão de cérebro de camundongo infectado. As garrafas foram coletadas em diferentes dias para seguir com o processamento. As células controle foram inoculadas, também na proporção 1:10, com uma suspensão de cérebro de camundongo normal (não infectado), sendo processadas simultaneamente com as células infectadas.

Após a remoção do meio de cultura, as células infectadas e controles foram lavadas rapidamente com tampão PHEM 0,1 M, para retirar as células mortas. Ainda aderidas à garrafa, as células foram fixadas, como descrito. Em seguida, as células foram desprendidas da parede da garrafa, com o auxílio de um raspador de células, e processadas como descrito anteriormente, adicionando-se etapas de centrifugação.

4.5.2 Contrastação Negativa

Para a realização da técnica de contrastação negativa foram utilizados sobrenadantes provenientes de cultivos celulares infectados com o vírus Juruaçá. Uma gota do material foi colocada sobre uma grade de cobre de 400 malhas, revestida por uma película plástica de *formvar* reforçada por uma delgada camada de carbono (Almeida, 1980). Após um minuto, o excesso de material foi retirado com uma tira de papel filtro, sendo em seguida adicionada uma gota de ácido fosfotúngstico (PTA) a 2%, pH 6,6, por um minuto (Brenner & Horne, 1959). O excesso também foi retirado com uma tira de papel filtro, sendo o material, posteriormente, observado em MET (Zeiss, modelo EM 900) (Figura 20).

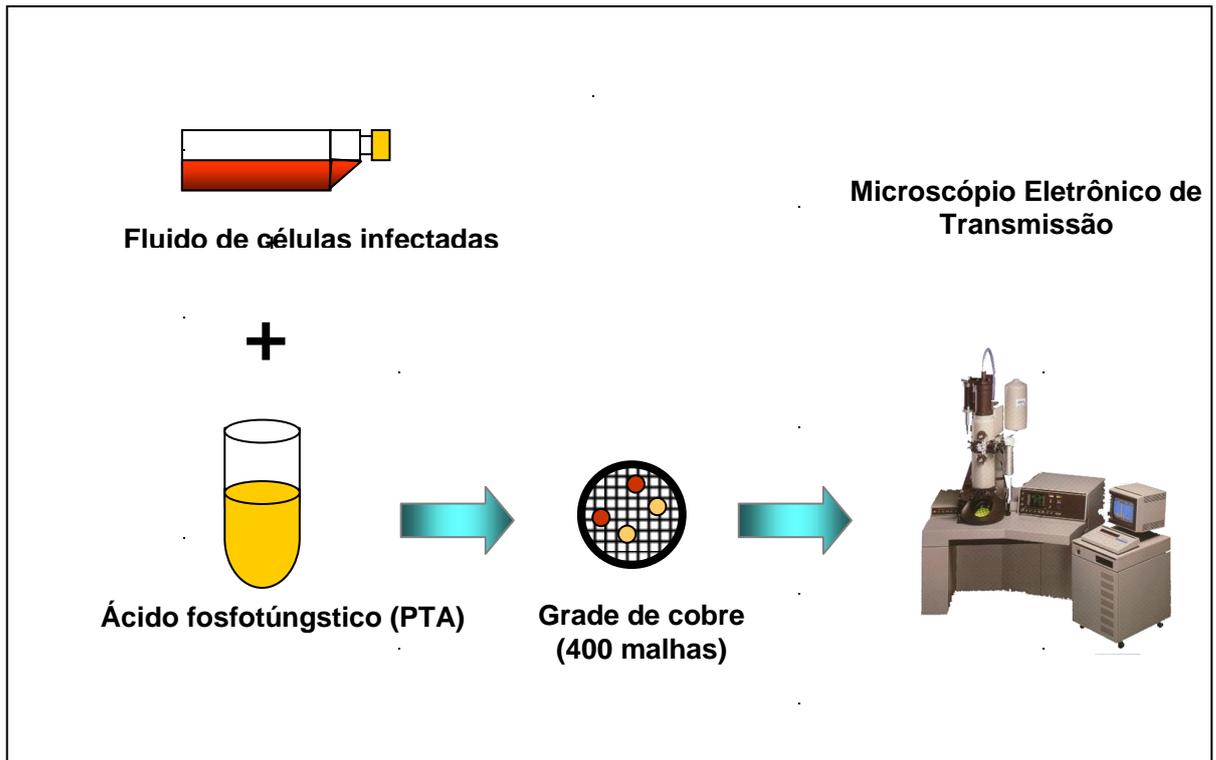


Figura 20 – Representação esquemática da técnica de Contrastação Negativa.

4.5.3 Imunomicroscopia Eletrônica

Fluidos celulares infectados com o vírus e não infectados (controle) foram centrifugados a 12.000 r.p.m. por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a diluição do soro homólogo da amostra em estudo, sendo este diluído a 1:250, 1:500 e 1:750. A mistura permaneceu sob homogeneização em aparelho homogeneizador *overnight* a 4°C. Após este período, a mistura foi centrifugada a 12.000 r.p.m. por 30 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante desprezado e o *pellet* formado foi ressuspensão em água destilada e processado segundo a técnica de contrastação negativa (Brenner & Horne 1959) (Figura 21).

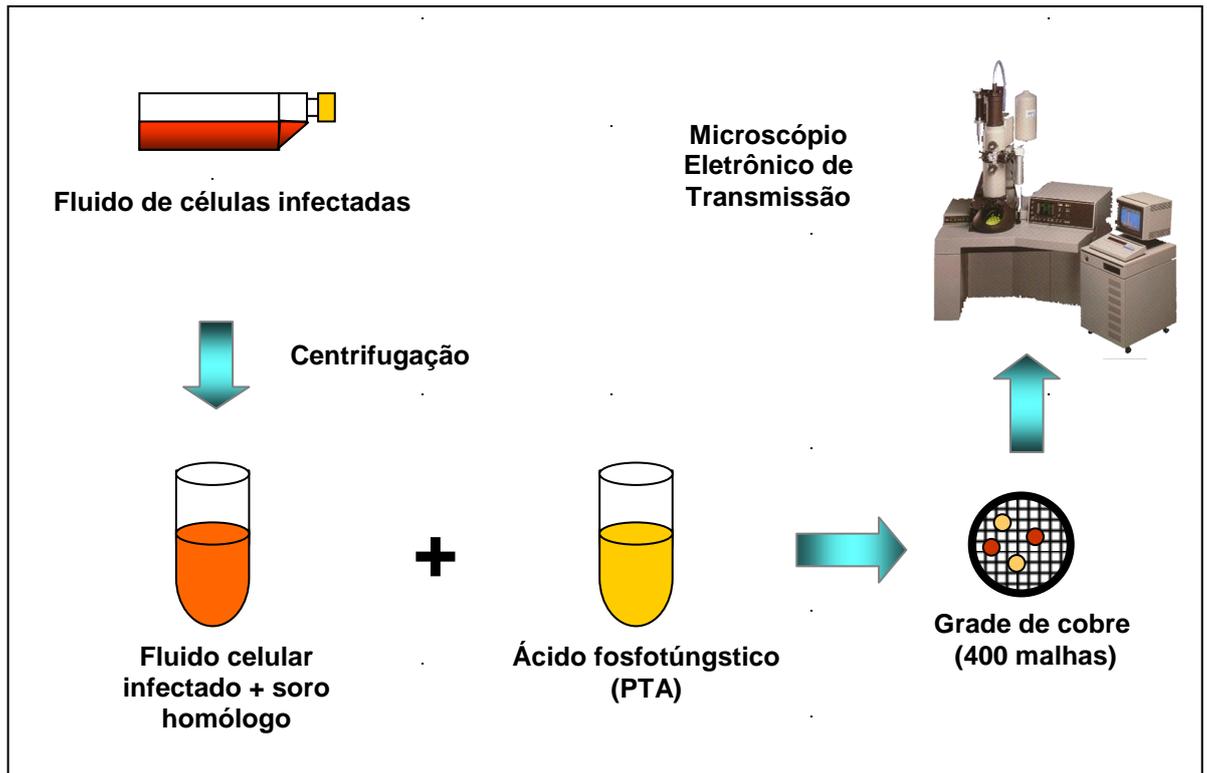


Figura 21 – Representação esquemática da técnica de Imunomicroscopia Eletrônica.

4.6 HISTOPATOLOGIA

4.6.1 Exame Histopatológico

Para a realização do exame histopatológico foram utilizados camundongos albinos suíços recém-nascidos inoculados com a amostra viral, como descrito anteriormente. A cada dia após a inoculação, foram colhidos camundongos infectados e camundongos controles (não infectados) para exame histopatológico utilizando microscopia óptica, os quais foram fixados em paraformol a 4% através de perfusão dos animais, e as amostras obtidas de cérebro, coração, rins, pulmões, fígado e baço foram coradas pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE), que consiste na passagem do tecido em diversas soluções de álcool, iniciando com álcool a 50%

até o etanol absoluto (100%), seguido de duas passagens em xilol à TA, com posterior imersão em dois banhos de parafina à 60°C e inclusão e formatação de blocos de parafina, que após resfriados foram seccionados utilizando micrótomo rotativo (Jung Histocult 820 – Leica), para obtenção de cortes de 5 µm de espessura que foram corados pela técnica de HE (Prophet et al., 1992, Michalany, 1998) (Figura 22). Os cortes foram analisados sob supervisão de médico anatomicopatologista do Núcleo de Medicina Tropical (NMT) da Universidade Federal do Pará (UFPA).

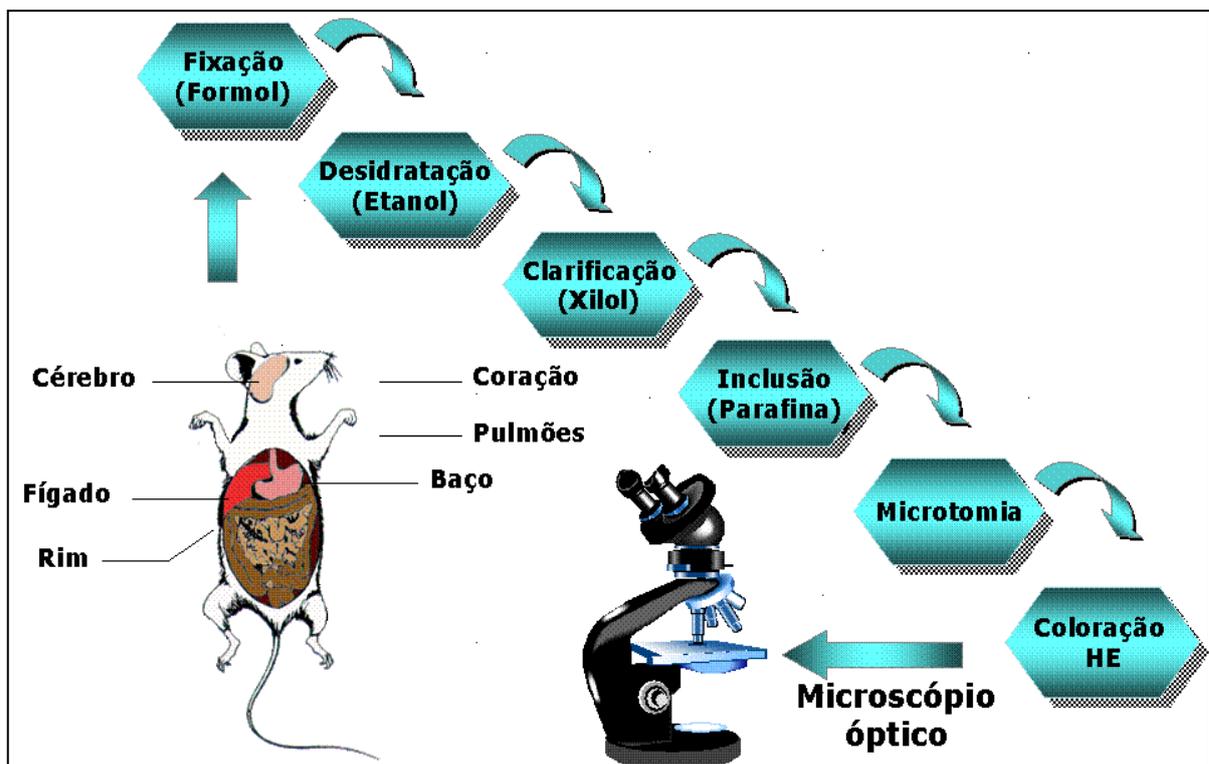


Figura 22 – Representação esquemática do exame histopatológico para a técnica de Hematoxilina-Eosina (HE).

4.6.2 Imunohistoquímica

A técnica utilizada foi a do sistema da peroxidase como descrito por Hsu et al. (1981) (Figura 23), em que os cortes de tecidos foram desparafinizados com banhos em xilol e re-hidratados em álcool absoluto, seguido de lavagens em PBS e H₂O₂ por 5 minutos em cada incubação para reduzir a ação da peroxidase endógena. Em seguida, os cortes foram incubados em tampão cítrico e tratados com tripsina e novamente lavados em PBS. O anticorpo primário policlonal para o vírus Juruacá (soro hiperimune anti-Juruacá 1:800) foi adicionado e incubado a 4°C por 20 minutos, seguido de lavagens em PBS e aplicação do sistema LSAB (Dako, EUA) conjugado à peroxidase. A reação foi revelada com a imersão das lâminas em DAB (3,3'diaminobenzidina) (Dako, EUA) por três minutos. Posteriormente os cortes foram desidratados e contra-corados com hematoxilina 1:1 por um minuto, lavados em água amoniacal e água destilada, sendo montadas em seguida com Entelan (Merck). O exame das lâminas foi realizado sob supervisão de médico anatomo-patologista do NMT da UFPA.

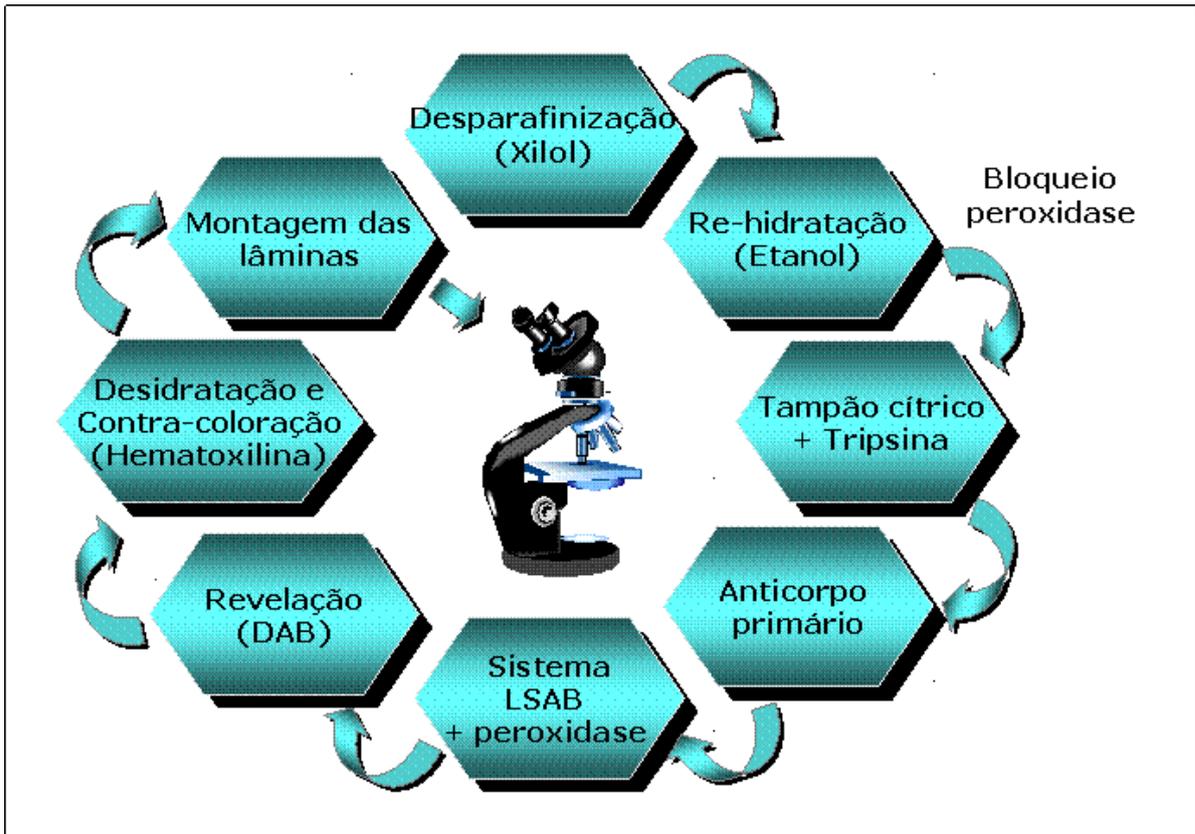


Figura 23 – Representação esquemática da técnica de Imunohistoquímica.

4.7 BIOLOGIA MOLECULAR

4.7.1 Precipitação e Semi-Purificação viral

A técnica foi executada segundo Pinto (2000), com algumas modificações. Foram utilizados trinta cérebros de camundongos albinos suíços recém-nascidos infectados com o vírus Juruacá, os quais foram macerados em solução salina a 0,9% e centrifugados a 5.000 r.p.m. por 30 minutos a 4°C. Ao sobrenadante obtido (74 mL) foi adicionado polietileno glicol 8000 (PEG-8000) a 50% e NaCl a 23% (p/v) pela adição de 37g e 17,02g dos respectivos reagentes. A mistura foi incubada durante 1 hora a temperatura de 4°C em agitador automático objetivando uma melhor homogeneização da solução. Posteriormente realizou-se a centrifugação

deste material a 5.000 r.p.m. por 30 minutos a 4°C, decantou-se o sobrenadante e adicionou-se Tris-ácido bórico-EDTA (TBE). A amostra foi ultracentrifugada a 30.000 r.p.m. por 6 horas a 4°C. Após este período, foi adicionado mais TBE à amostra que foi novamente ultracentrifugada a 30.000 r.p.m. por 6 horas a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado obtido foi reidratado em 1 mL de água livre de RNase, estocando-se a mesma a -70°C para posterior extração do ARN viral.

4.7.2 Extração do Ácido Nucleico viral

Para o isolamento do ARN viral utilizou-se a técnica do TRIZOL LS reagente (Gibco). Em tubos contendo 250µl de amostra foi adicionado 750µl de TRIZOL LS e agitados por 15 segundos, sendo este responsável por lisar as células. Após 5 minutos à TA, foram adicionados 200µl de clorofórmio e novamente agitados, e os tubos deixados à TA por 10 minutos.

Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 12.000 r.p.m. por 15 minutos para separação das fases. A fase aquosa foi transferida para novos tubos, e nestes foram adicionados 500µl de isopropanol para a precipitação do ARN, sendo em seguida agitados e centrifugados a 12.000 r.p.m. por 10 minutos. Após a centrifugação, o isopropanol foi retirado cuidadosamente para não perder o precipitado. Em seguida, adicionou-se 1mL de etanol 75% para a lavagem do precipitado, centrifugou-se a 7.500 r.p.m. por 5 minutos e o etanol foi descartado. Os tubos foram deixados à TA para secar o precipitado. Adicionou-se 20 µl de água livre de RNase para eluir o ARN que foi estocado à - 70°C até o momento do uso. Todos os materiais e reativos usados estavam livres de RNases.

4.7.3 Reação de Transcrição Reversa (RT) com oligonucleotídeo Random Hexâmero

O teste de RT foi realizado usando oligonucleotídeo Random Hexâmero (Invitrogen). O método seguiu as orientações do fabricante. Inicialmente foi colocado 5µl de ARN viral em microtubo e adicionado os seguintes reativos: 1 µl de oligonucleotídeo random hexâmero, 1 µl de uma mistura de dNTPs (A, C, G e T) 10 mM e 5 µl de água livre de RNase. A seguir foi deixado a 65 °C por 5 minutos e colocado no gelo rapidamente; fez-se uma centrifugação rápida e adicionou-se 4 µl de tampão 5X, 2 µl de DTT 0,1 M e 1 µl de inibidor de RNase (RNase OUT/Invitrogen) 40 U/µl. Em seguida foi incubado a 25 °C por 2 minutos e posteriormente adicionado 1 µl (200 U) da enzima transcriptase reversa superscript II, seguida de uma incubação a 25 °C por 10 minutos e logo a seguir incubada a 42°C por 50 minutos. Terminada a transcrição a reação foi aquecida a 70 °C por 15 minutos. Para eliminar ARN não transcrito foi feita uma incubação com a enzima RNase H a 37 °C por 20 minutos. O cDNA produzido foi armazenado a -20 °C até o momento do uso.

4.7.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Após a síntese do cDNA, preparou-se a mistura para a realização da PCR contendo: tampão 1X, MgCl₂ 2mM, dNTPS 1mM, iniciador sense HK-2 e HK-10 0,2 µM, iniciador anti-sense HK-3 0,2 µM (Tabela 6), enzima platinum TAQ DNA polimerase (2,5U), água livre de RNAse e DNAse para um volume final de 30µl e foi adicionado em cada tubo de cDNA sintetizado, e estes foram imediatamente levados

ao termociclador. O programa para amplificação consistiu de uma desnaturação prévia de 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos, cada um composto por etapas de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 2,5 minutos, seguido de um ciclo de extensão final de 72°C por 5 minutos. O produto de PCR foi analisado em gel agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, e visualizado em transiluminador.

Tabela 6 - Oligonucleotídeo correspondente a região não traduzida 5' do genoma de *Poliovirus*.

Oligonucleotídeo iniciador	Seqüência	Posição no genoma
HK-2 (sense)	5' - caagcacttctgtttccccgg - 3'	162-182
HK-3 (anti-sense)	5' - attgtcaccataagcagcca - 3'	577-596
HK-10 (sense)	5' - cgactactttgggtgtccgt - 3'	538-557

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS

5.1.1 Suscetibilidade dos camundongos albinos suíços

Os camundongos albinos suíços recém-nascidos apresentaram suscetibilidade à infecção pelo vírus Juruaçá quando inoculados pela via i.c. Os animais adoeceram no 4^o dia pós-inoculação (p.i.) e apresentaram tremores e paralisia flácida, culminando com a morte no 8^o dia p.i.. O título viral dos animais inoculados foi de 5,6 DL₅₀/0,02 mL.

5.1.2 Suscetibilidade dos cultivos celulares

Os cultivos celulares Vero, C6/36 e cultivos primários de astrócito, neurônio e microglia inoculados com o vírus Juruaçá não apresentaram ECP. Embora tenha sido observada ausência de ECP nos cultivos celulares de microglias e astrócitos mantidos por aproximadamente 60 dias p.i., a presença de antígenos virais foi confirmada por IFI. Os marcadores celulares para astrócitos, microglias e neurônios foram evidenciados pelo uso de anti-GFAP, isolectina B₄ e anti-neurofilamento, respectivamente em cultivos controle (Figura 24) e infectado.

Em experimentos de dupla marcação para antígenos virais e proteínas marcadoras foi observada em cultivo de microglias uma intensa marcação citoplasmática para antígenos virais (Figuras 25 e 26), enquanto que no cultivo de astrócitos foi verificada uma marcação de menor intensidade, caracterizada por

pequenos pontos de fluorescência no citoplasma, próximos ao núcleo da célula (Figuras 27 e 28).

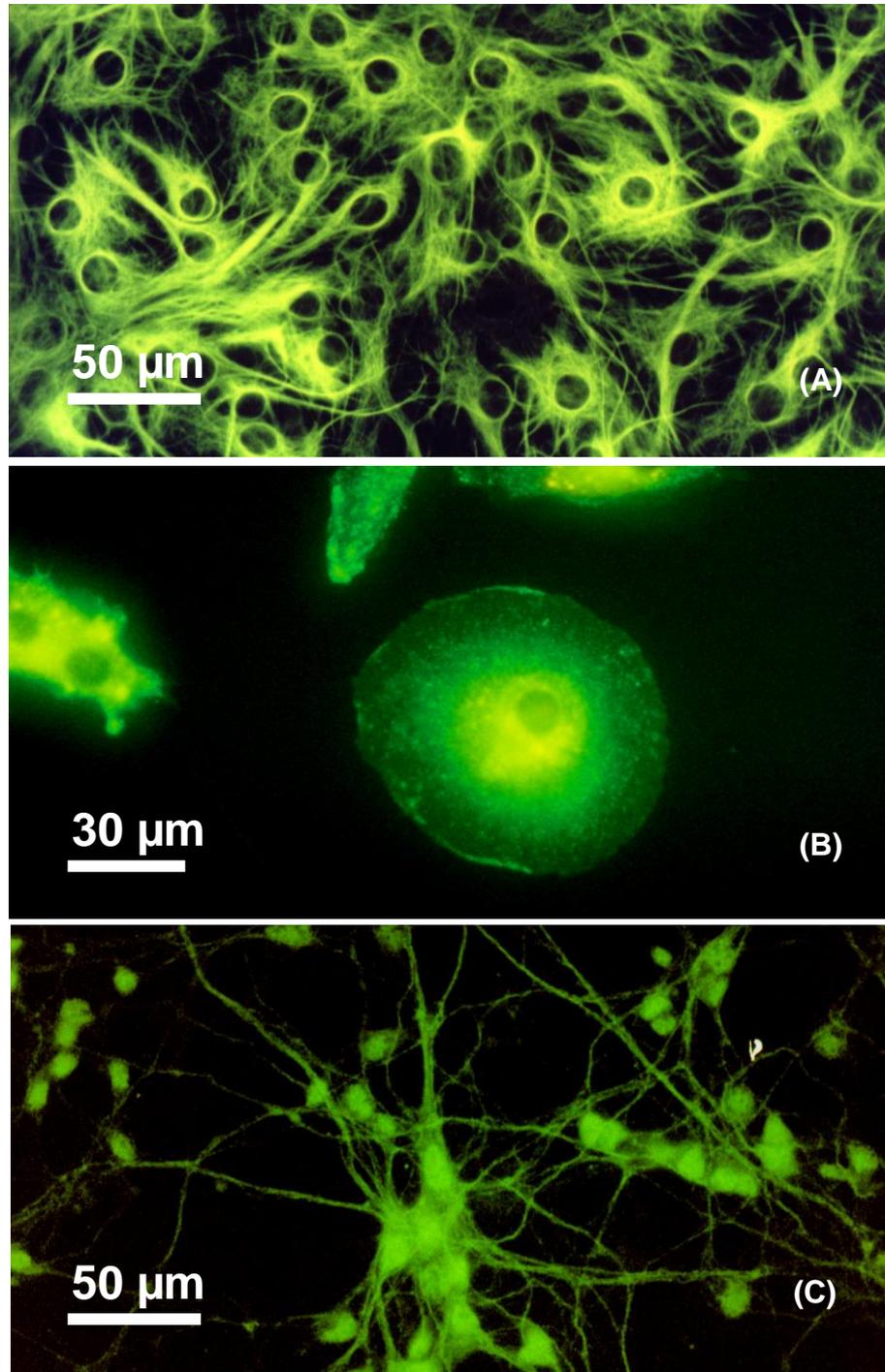


Figura 24 - Marcadores celulares. (A) Micrografia mostrando imunomarcção de GFAP em cultivo de astrócitos. (B) Micrografia de microglias marcadas com isolectina B₄ conjugada com ITCF. (C) Micrografia de fluorescência mostrando imunomarcção de neurofilamentos em cultivo de neurônios.

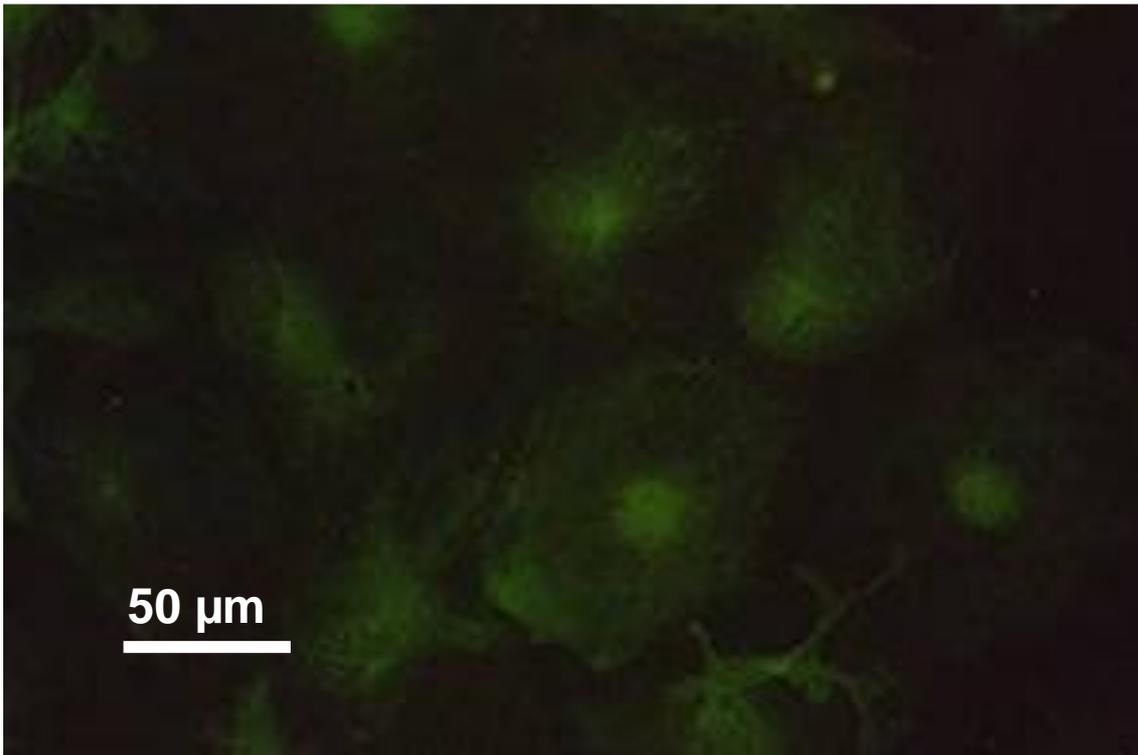


Figura 25 – Micrografia de fluorescência mostrando ausência de marcação em cultivo de microglias não infectadas com o vírus Jiruaça.

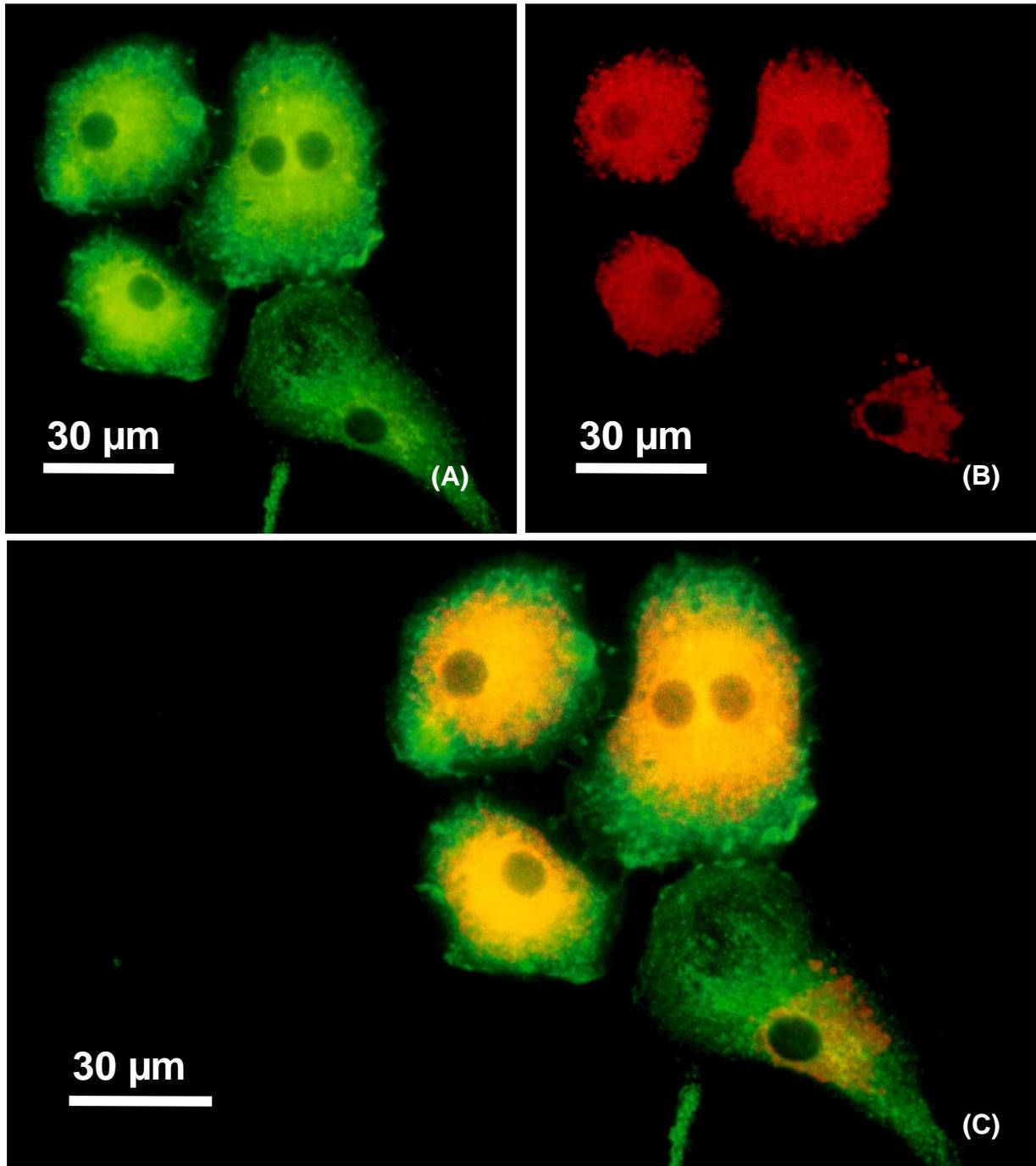


Figura 26 – Dupla marcação. (A) Marcação de microglias com isolectina B₄ conjugada com ITCF. (B) Micrografia de fluorescência com marcação para antígenos do vírus Jiruaça usando segundo anticorpo conjugado com rodamina. (C) Sobreposição das imagens A e B confirmando a infecção de microglias com o vírus Jiruaça (5 dias p.i.).

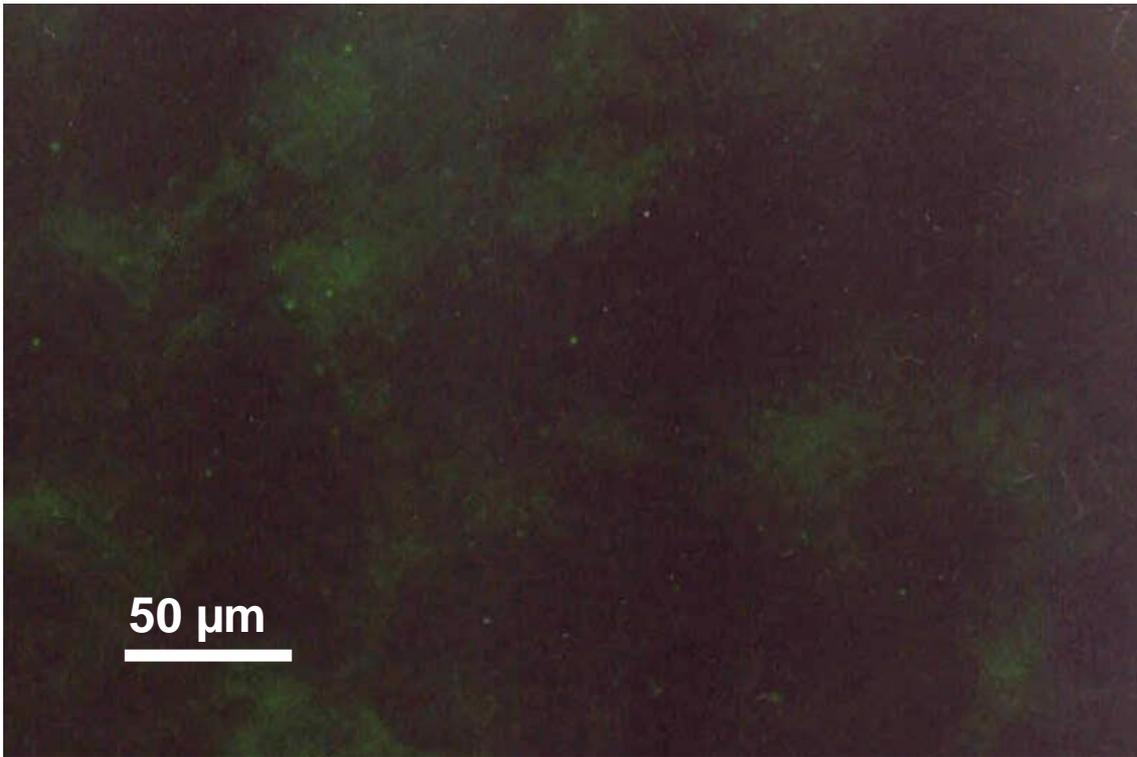


Figura 27 – Micrografia de fluorescência mostrando ausência de marcação em cultivo de astrócitos não infectados com o vírus Juruaçá.

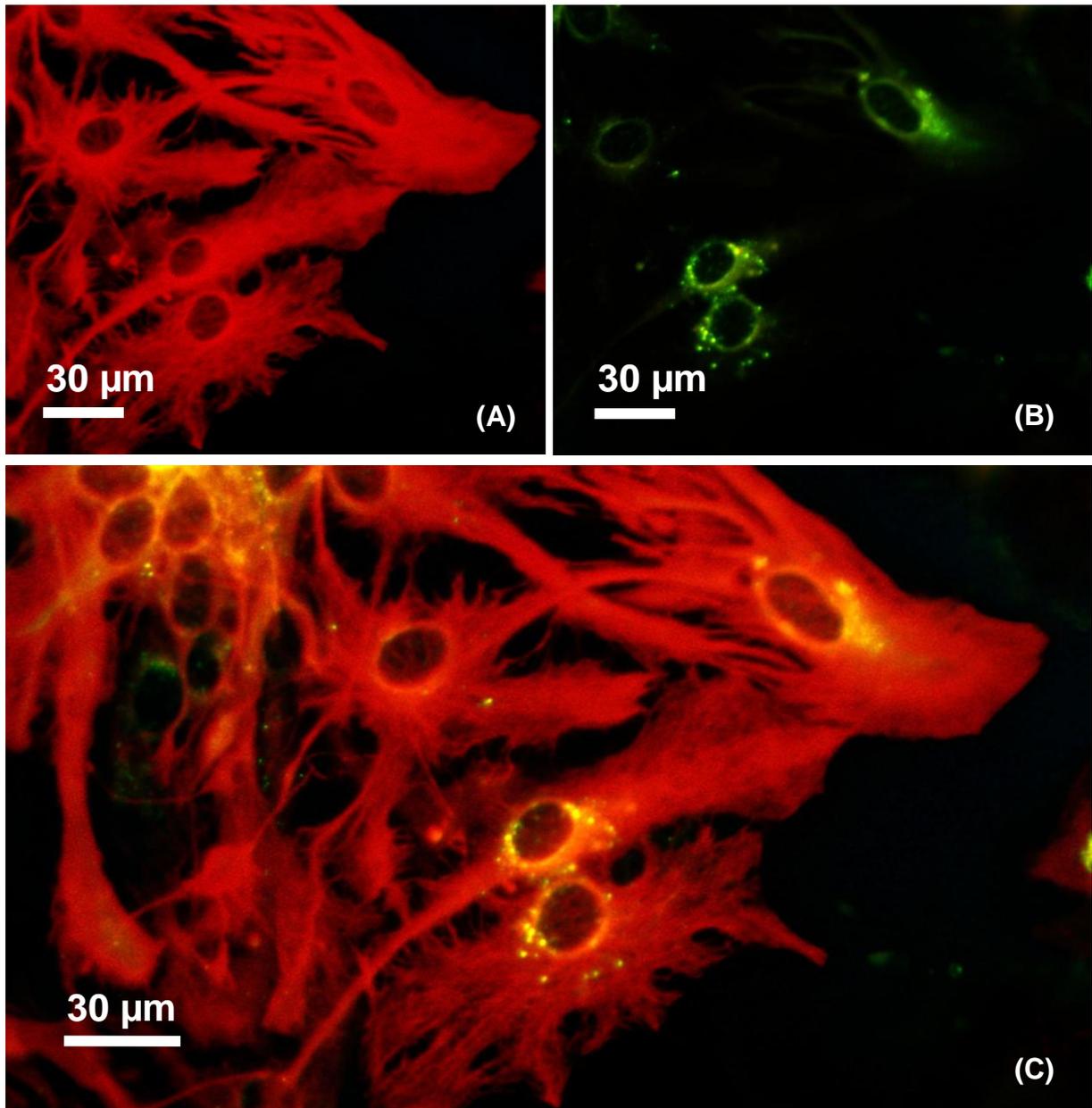


Figura 28 – Imunofluorescência indireta com dupla marcação em cultivo de astrócitos. (A) Micrografia de fluorescência com marcação para GFAP usando segundo anticorpo marcado com rodamina. (B) Micrografia de fluorescência com marcação para antígenos do vírus Jiruaça usando segundo anticorpo conjugado com ITCF. (C) Sobreposição das imagens A e B em maior aumento confirmando infecção de cultivo de astrócitos com o vírus Jiruaça (5 dias p.i.).

5.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

5.2.1 Presença de hemaglutinina

O teste de HA do vírus Juruaçá mostrou-se positivo para a presença de antígenos virais a partir de cérebros infectados num título de 1:80. O antígeno foi preparado pela técnica de sucrose-acetona utilizando pH de 5,75 e incubação a 37°C.

5.2.2 Sensibilidade ao desoxicolato de sódio

Tanto o vírus Juruaçá tratado com DCA e o ensaio controle do vírus sem DCA apresentaram títulos de 5,3 DL₅₀/0,02 mL, mostrando que o vírus Juruaçá não é sensível à este solvente, indicando ausência de envelope viral.

5.3 CARACTERÍSTICAS SOROLÓGICAS

Em relação ao teste de IH, apesar de não ter se encontrado positividade para nenhum dos vírus de diferentes famílias testados contra o vírus Juruaçá (Tabela 7), foi feito um estudo com 200 amostras de soros de morcegos oriundos da soroteca da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do IEC e provenientes da mesma área e obtidos no mesmo período em que o vírus Juruaçá foi isolado, obtendo-se uma reação positiva 1:20 em um dos soros testados contra o vírus Juruaçá.

Tabela 7 - Resultados negativos pelo teste de IH para diversos vírus das famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae* e *Bunyaviridae* para o vírus Juruaçá

Família	Vírus
<i>Togaviridae</i>	<i>Sindbis</i> , <i>Mucambo</i> , encefalite eqüina leste, <i>Mayaro</i> , <i>Chikungunya</i> , <i>Highlands J</i> , <i>Una</i>
<i>Flaviviridae</i>	<i>Entebbe bat</i> , <i>Rio Bravo</i> , encefalite de St. Louis, encefalite japonesa, Nilo ocidental, <i>Dakar bat</i> , <i>Saboya</i> , febre amarela, <i>Ilhéus</i>
<i>Bunyaviridae</i>	Maguari, <i>Nepuyo</i> , <i>Oropouche</i> , <i>Oriboca</i> , <i>Caraparú</i> , Itaqui, <i>Marituba</i> , Apeú, Tlacotalpan, <i>Punta Toro</i> , febre do Vale do Rift

Por FC o vírus Juruaçá não apresentou cruzamento sorológico com nenhum dos soros de arbovírus e outros vírus de vertebrados isolados na Amazônia Brasileira (Tabela 8). A reação positiva restringiu-se ao soro homólogo da amostra viral em estudo quando testado com antígeno de cérebro e o título foi de 4096/64.

Tabela 8 – Soros imunes de diversos vírus de diferentes famílias com resultados negativos pelo teste de FC para o vírus Juruuçá.

Família	Vírus
<i>Togaviridae</i>	<i>Sindbis, Trocará, encefalite eqüina leste, encefalite eqüina venezuelana, Tonate, Chikungunya, Highlands J, Aurá, Una</i>
<i>Flaviviridae</i>	Doença da floresta de Kyasanur, Tamana bat, <i>Montana myotis leukoencephalitis, Entebbe bat, Rio Bravo, encefalite de St Louis, encefalite japonesa, Nilo Ocidental, Jugra, Dakar bat, Cacipacoré, Saboya, Yaounde, Uganda S</i>
<i>Bunyaviridae</i>	Lukuni, Maguari, <i>Wyeomyia, Tucunduba, Nepuyo, Melao, Catú, Guamá, Guaratuba, Mirim, Oropouche, Mojuí dos Campos, Yogue, Issyk-kul, Arumowot, Gabek Forest, Mucura, Soldado, Bandia, Witwatersrand</i>
<i>Reoviridae</i>	<i>Chenuda, Irituia, Ife, Japanaut, Codajás, Tracambé, Acado-like, Abadina, Arkonam, Bauline, Bluetongue, febre do carrapato do Colorado, Changuinola, Corriparta, D'Aguillar, Eubenangee, Doença hemorrágica epizoótica, Eyach, Gurupi, Ieri, Jacareacanga, Kasba, Kemerovo, Lebombo, Lipovinik, Minnal, Mitchell River, Mono Lake, Orungo, Palyam, Pata, Tribec, Tembe, Seletar, Vellore, Wallal, Wad Medani, Warrego</i>
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Lagos bat, raiva, Piry, Kwatta-like, Kern Canyon, Gossas, Mt Elgon bat, Iri, Itacaiunas, Curionópolis</i>
<i>Arenaviridae</i>	<i>Tacaribe, Coriomeningite linfocítica</i>
<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Araguari</i>
<i>Herpesviridae</i>	Água Preta, Parixá, Herpes simples
<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Mapuera</i>
<i>Poxviridae</i>	Cotia
<i>Picornaviridae</i>	Parechovirus 1 e 2, <i>Enterovirus, Poliovirus, Coxsackievirus, Ljungan, GDVII, Vilusik, EMC</i>
Não Grupados/ Não Classificados	Quaranfil, Estero Real, Matucare, Cajazeiras, Marajó, Papura, Galibi, Rio Preto da Eva, Breu Branco

5.4 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

5.4.1 Contrastação negativa

Fluidos dos diversos tipos de cultivos celulares trabalhados foram utilizados para a realização da técnica de contrastação negativa, porém, só foram encontradas partículas virais em sobrenadante de cultivos primários de astrócitos. As partículas virais observadas apresentaram formato esférico e diâmetro médio em torno de 23-30 nm (Figura 29)

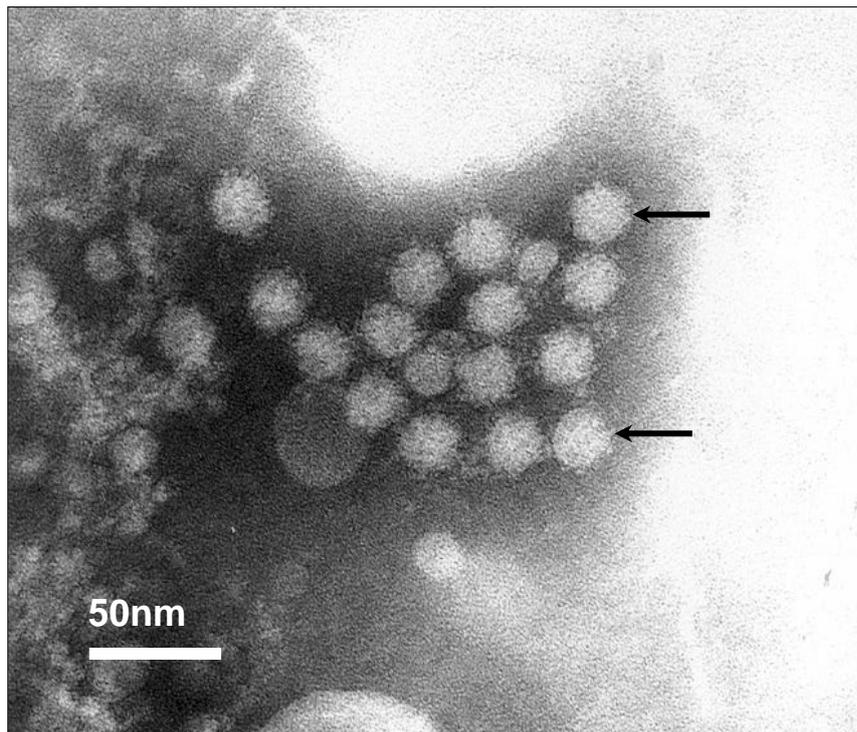


Figura 29 - Contrastação negativa do vírus Juruuçá obtida de fluido de cultivo de astrócitos (6 dias p.i.).

5.4.2 Imunomicroscopia eletrônica

A reação antígeno-anticorpo entre o sobrenadante de cultivo de astrócitos infectados (6 dias p.i.) com o vírus Juruuçá e o seu respectivo soro homólogo mostraram numerosos agrupamentos de partículas virais com morfologia esférica, circundadas por um halo denso de anticorpos na diluição 1:500. (Figura 30)

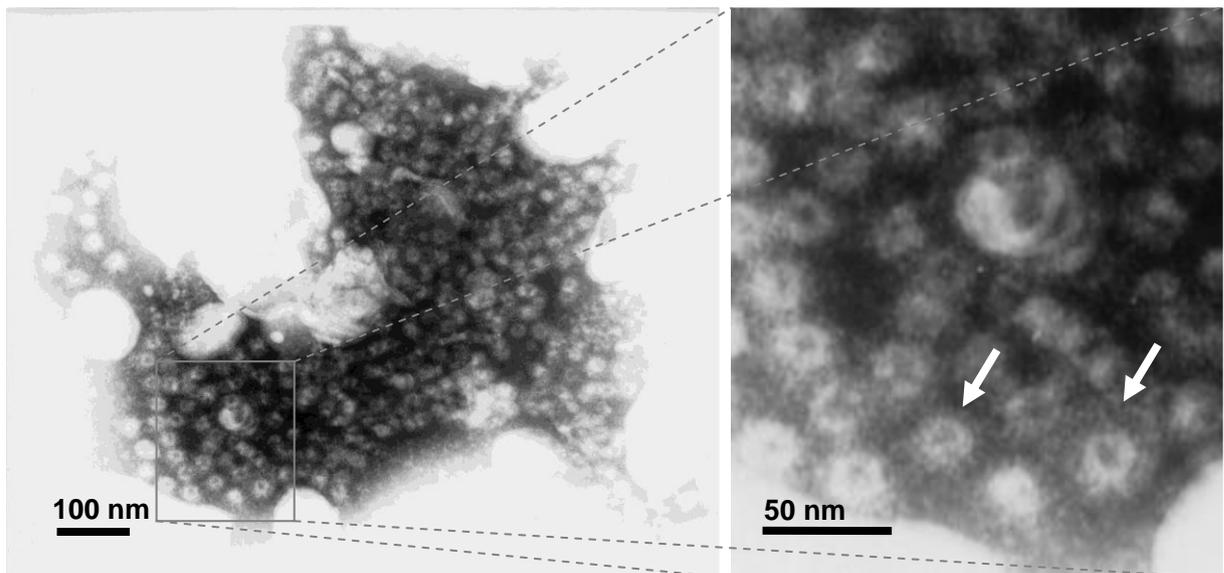


Figura 30 – Imunomicroscopia eletrônica do vírus Juruuçá com seu soro homólogo, mostrando partículas virais circundadas por um halo denso de anticorpos (setas).

5.4.3 Cortes ultrafinos

A análise por microscopia eletrônica de transmissão dos cortes ultrafinos de cérebro de camundongo albino suíço recém-nascido infectado com o vírus Juruuçá mostrou partículas virais visíveis a partir do 4º dia p.i. apresentando morfologia esférica, medindo aproximadamente 23-30 nm de diâmetro localizadas no citoplasma celular, não sendo observada a presença de envelope viral (Figura 31).

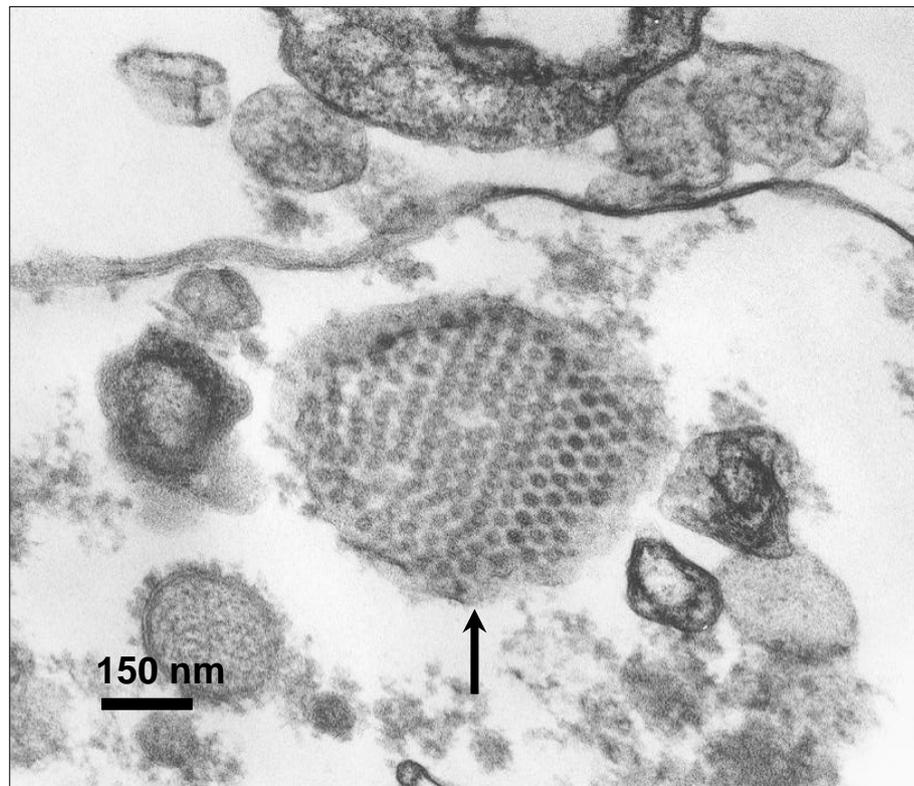


Figura 31 - Micrografia eletrônica do vírus Juruacá em cortes ultrafinos de cérebro de camundongo albino suíço (8 dias p.i.). Notar partículas virais desprovidas de envelope agrupadas no citoplasma celular (seta).

5.5 CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS

5.5.1 Exame histopatológico

A partir dos animais controles e infectados, secções de tecido foram obtidas do cérebro, pulmões, coração, fígado, baço, rins e submetidas à análise histopatológica. Não foram observadas alterações histológicas significativas nas vísceras dos animais do grupo controle. Nos animais infectados não se notaram alterações nos animais perfundidos até o 3º dia p.i.

A análise histopatológica do cérebro de animais infectados revelou alterações cuja intensidade e frequência variaram ao longo do curso da infecção.

No 4º dia p.i. verificou-se uma reatividade glial com tendência à formação de nódulos gliais, leve espongiose, com vasos proeminentes e presença de células neuronais com aspecto apoptótico (condensação citoplasmática, picnose nuclear de células isoladas).

A partir do 5º dia p.i., observou-se a presença de esboços de nódulos gliais, com glia ativada e proeminente, acompanhado de leve à moderada espongiose. Os vasos mostraram endotélio hipertrofiado, com freqüente marginação leucocitária e congestão, além de neurônios apresentando aspecto necrótico com cariorrexis nuclear, por vezes com aspecto apoptótico, e presença de raros neutrófilos no parênquima.

Do 6º ao 8º dia p.i. intensificaram-se as lesões (Figura 32). De fato, os animais perfundidos apresentaram intenso aspecto espongíótico e comprometimento do parênquima cerebral associado à proeminência vascular, necrose e apoptose neuronal, além de infiltrado por células inflamatórias com polimorfonucleares (neutrófilos).

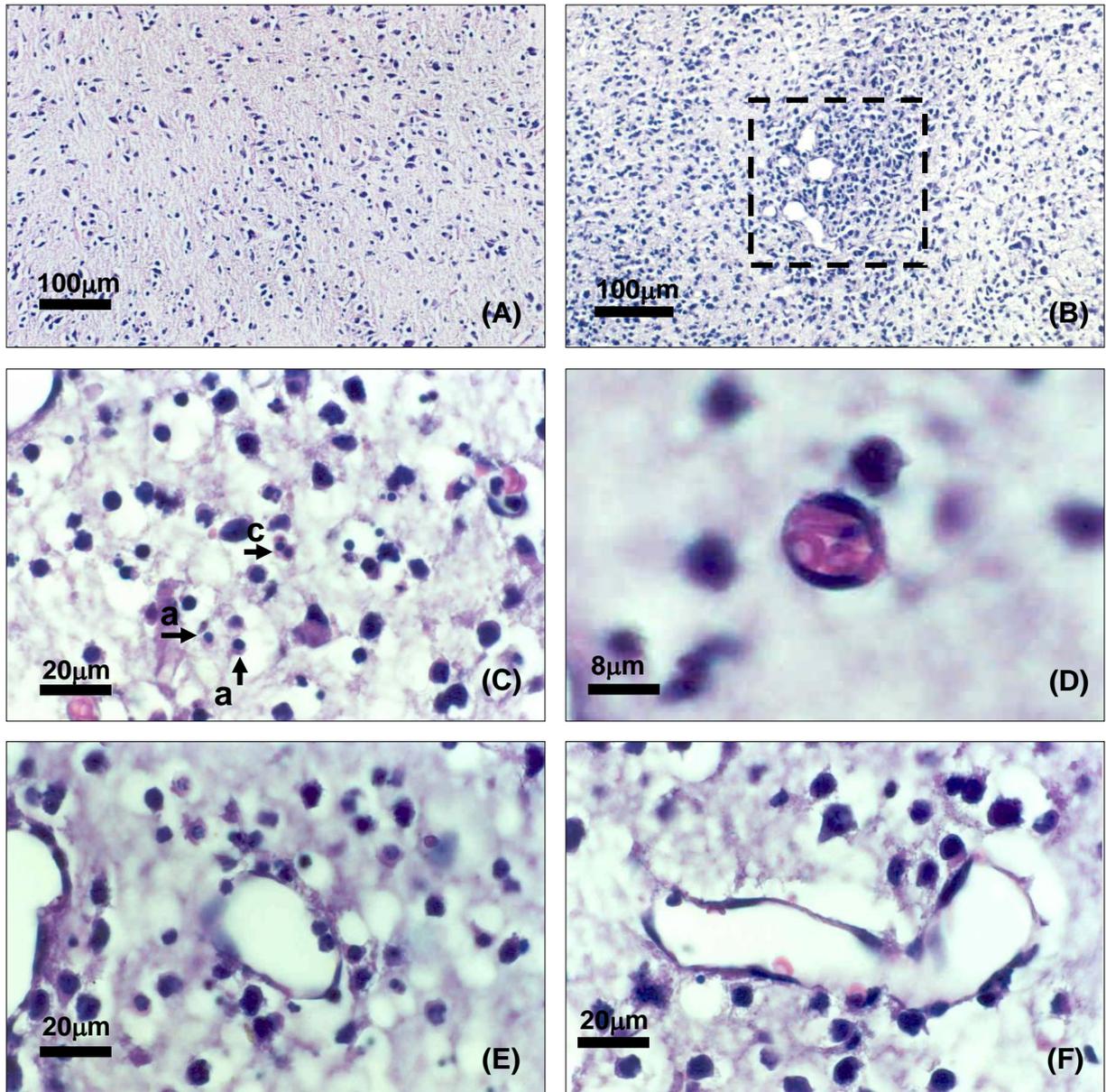


Figura 32 - Aspectos histológicos dos animais controles e infectados. (A) Histologia do sistema nervoso central de camundongo controle. (B) Histopatologia mostrando reação glial constituindo área algo nodular em cérebro de camundongo infectado (7 dias p.i.). (C) Histopatologia mostrando núcleos de aspecto picnótico (apoptóides) (a) e cariorrexe (necrose) (c) (6 dias p.i.). (D) Histopatologia mostrando hipertrofia de células endoteliais e congestão vascular (6 dias p.i.). (E) Histopatologia mostrando marginação leucocitária característica (6 dias p.i.). (F) Histopatologia mostrando proeminente hipertrofia de endotélio (6 dias p.i.).

A análise histopatológica dos demais órgãos dos animais infectados revelou alterações que variaram de discreta à moderada intensidade em geral acompanhada de discreto infiltrado inflamatório misto (Figura 33).

O miocárdio não mostrou alterações histológicas significativas entre os animais controles e inoculados independente da sobrevivência dos mesmos. Há, entretanto discreto infiltrado com predomínio de linfomononucleares entre as fibras miocárdicas dos animais infectados.

O fígado dos animais infectados pelo vírus Juruaçá mostrou freqüente congestão vascular acompanhada de tumefação celular e por vezes alterações vacuolares sugestivas de degeneração gordurosa (esteatose). Há focos de necrose lítica por vezes circundados por infiltrado inflamatório predominantemente linfomononuclear.

O baço dos animais infectados mostra congestão e hiperplasia de células linfóides de intensidade moderada.

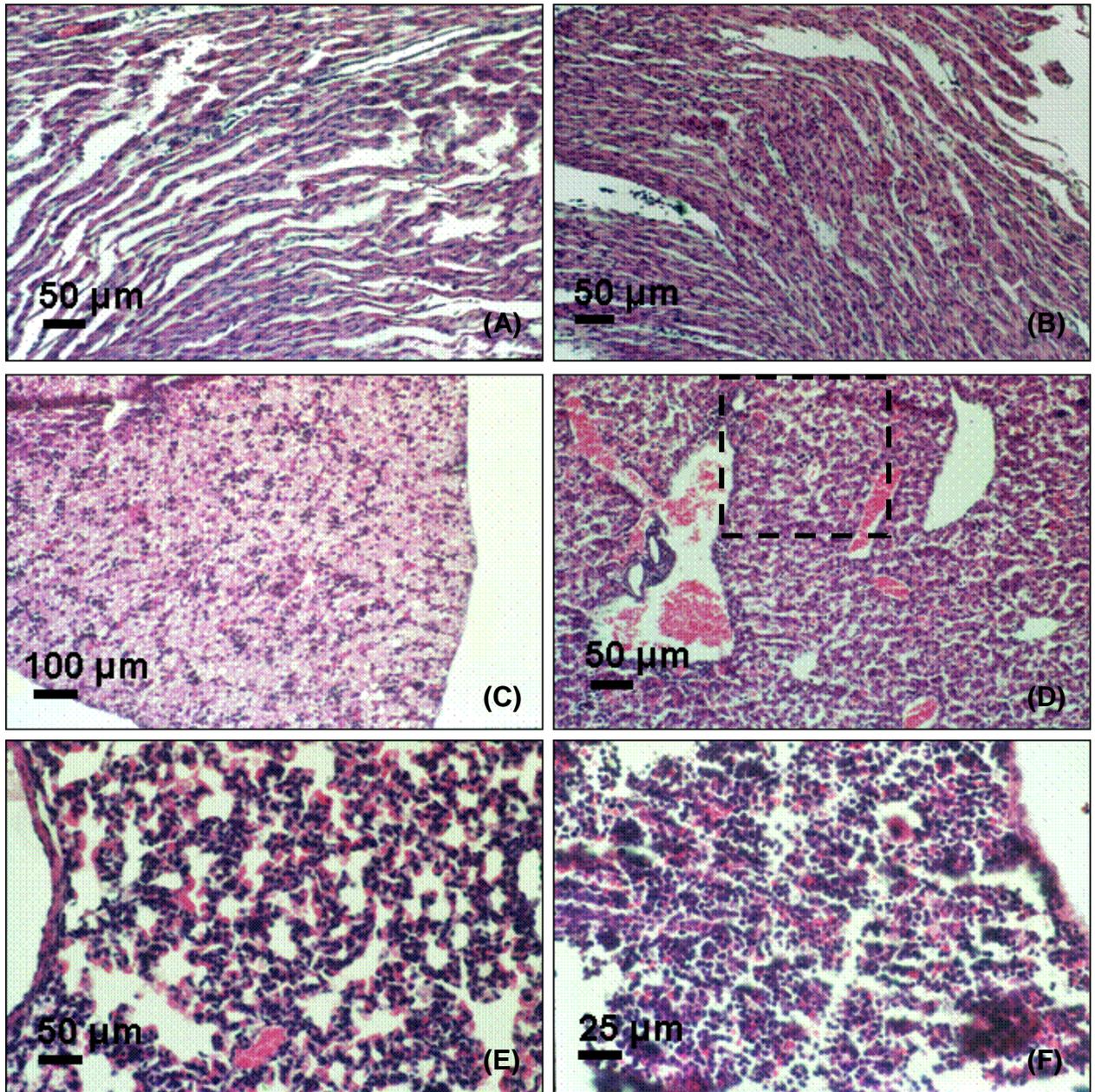


Figura 33 - Aspectos histológicos dos animais controles e infectados. (A) Histologia do miocárdio de camundongo controle. (B) Histopatologia mostrando miocárdio com leve alteração histológica representada, sobretudo por discreto infiltrado linfomononuclear (6 dias p.i.). (C) Histologia do fígado de camundongo controle. (D) Histopatologia do fígado mostrando congestão em espaços porta e áreas acinares com rarefação celular conseqüentes à necrose lítica (retângulo) (6 dias p.i.). (E) Histologia do baço de camundongo controle. (F) Histopatologia mostrando baço com congestão e hiperplasia linfóide moderada (6 dias p.i.).

A análise histológica pulmonar dos animais infectados mostrou congestão e tabiques alveolares espessados à custa de infiltrado inflamatório linfomononuclear conferindo aspecto característico de pneumonite viral. Por vezes esse espessamento se intensificava pelo colapso das paredes alveolares formando áreas sólidas mais proeminentes (Figura 34).

O rim demonstrou leve congestão de glomérulos associadas à tumefação de células de revestimento dos túbulos e discreto infiltrado inflamatório linfomononuclear (Figura 34).

Todas as vísceras examinadas dos animais do grupo controle (não infectados) mostraram aspectos de normalidade e sem alterações teciduais.

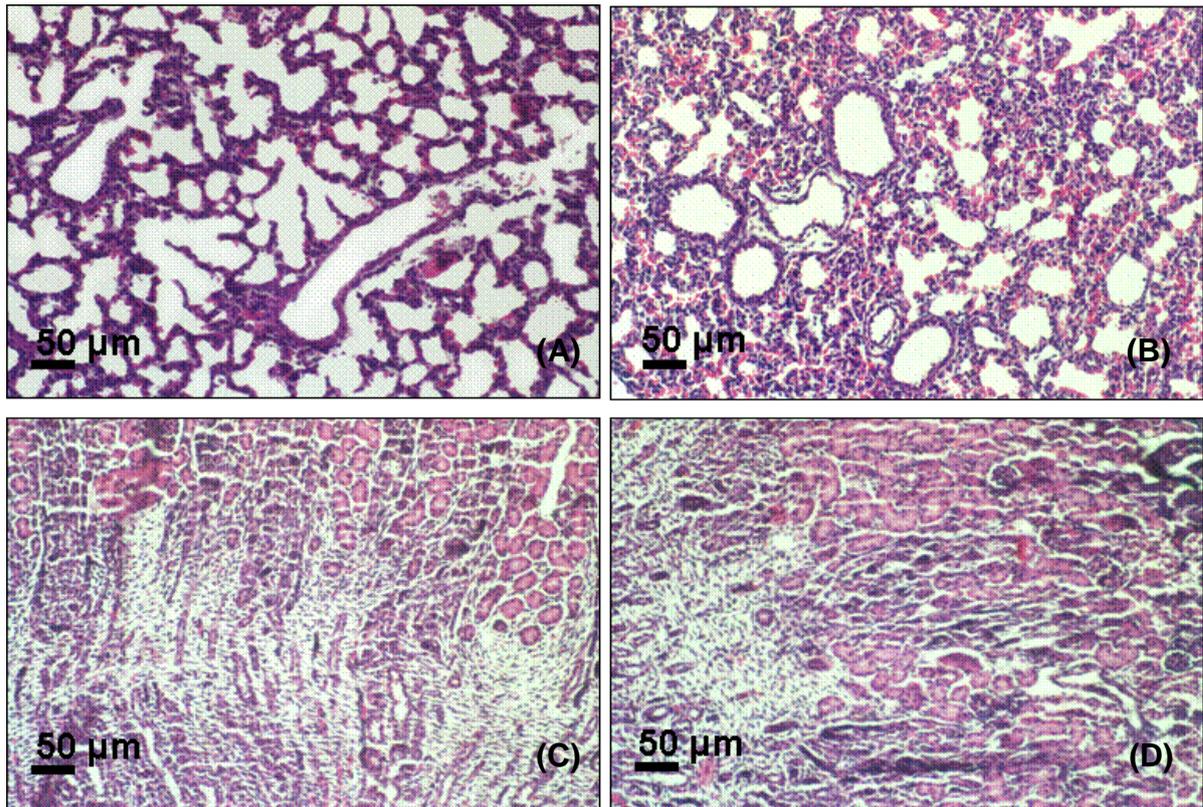


Figura 34 - Aspectos histológicos dos pulmões e rins dos animais controles e infectados. (A) Histologia do pulmão de camundongo controle. (B) Histopatologia mostrando pulmão com congestão e relativo colapamento e espessamento de tabiques alveolares (5 dias p.i.). (C) Histologia do rim de camundongo controle. (D) Histopatologia mostrando rim com congestão glomerular e leve edema de células de revestimento dos túbulos (6 dias p.i.).

5.5.2 Imunohistoquímica

A partir da análise histopatológica que evidenciou o acometimento predominante do sistema nervoso central, sem evidências de lesões importantes de outros órgãos (coração, fígado, rim, pulmão e baço), foi processado técnica imunohistoquímica no tecido neural.

O padrão de imunomarcção revelou nítida positividade representada pelo depósito de material acastanhado e granular, sobretudo nas áreas mais acometidas reveladas pela análise histopatológica. A positividade para a técnica foi

citoplasmática, marcando tanto neurônios quanto células gliais. Por vezes foi observado imunomarcação positiva nítida no citoplasma de células piramidais que evidenciava as porções proximais do dendrito apical, sendo esse padrão também observado em neurônios não piramidais, ou seja, marcação positiva das porções proximais dos dendritos (Figura 35). Não foi observado imunomarcação evidente de axônios.

Quanto à intensidade do padrão de imunohistoquímica, este foi diretamente proporcional à intensidade das alterações histopatológicas, com pico evidente no 7º ao 8º dia p.i.

Células inflamatórias do tipo linfócitos e neutrófilos não apresentaram positividade pela técnica.

Os animais controles não apresentaram imunomarcação evidente.

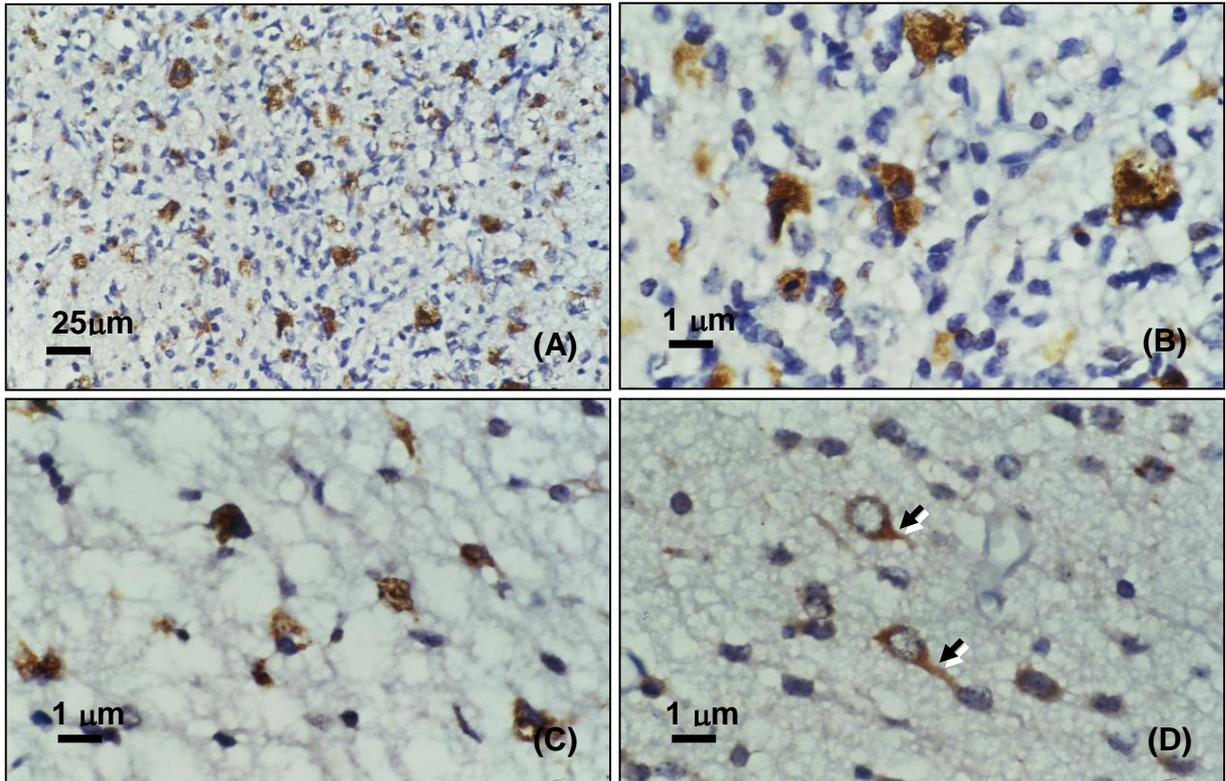


Figura 35 - Imunohistoquímica em cortes de cérebro de camundongo infectado com o vírus Jiruaça 7º dia p.i. (A) Padrão de imunomarcção em tecido, mostrando múltiplas células gliais e neurônios com imunomarcção citoplasmática positiva. (B) Padrão granular de depósito do antígeno viral mostrando evidente localização citoplasmática, notar ausência de marcação nuclear. (C) Área de extenso edema onde se observa nítida predominância de células positivas quando comparadas às áreas com menor intensidade de lesões. (D) Neurônios com marcação citoplasmática positiva para o vírus Jiruaça, notar imunoreação em prolongamentos proximais do dendrito apical (setas).

5.6 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES

De acordo com os resultados morfológicos descritos anteriormente (item 5.4) mostrando a semelhança do vírus Jiruaça com os membros da família *Picornaviridae*, definiu-se uma estratégia de análise para identificar o tipo viral dentro de um gênero desta família. Neste sentido, utilizou-se a técnica de RT-PCR onde a síntese de cDNA por RT foi feita utilizando oligonucleotídeos iniciadores randômicos hexâmeros e para o PCR foram utilizados oligonucleotídeos específicos para o

gênero *Enterovirus* correspondente à região não traduzida 5' do genoma de *Poliovirus*.

Na PCR foram realizadas duas reações com duas associações de iniciadores HK2 com HK3 e HK2 com HK10 (Tabela 6), que produziram dois produtos de PCR com peso molecular semelhantes de 1,23 kb, sendo que na amplificação do HK2 com HK3 foram observadas duas bandas de peso molecular diferentes, uma de 1,23 kb e outra de 922 pb (Figura 36).

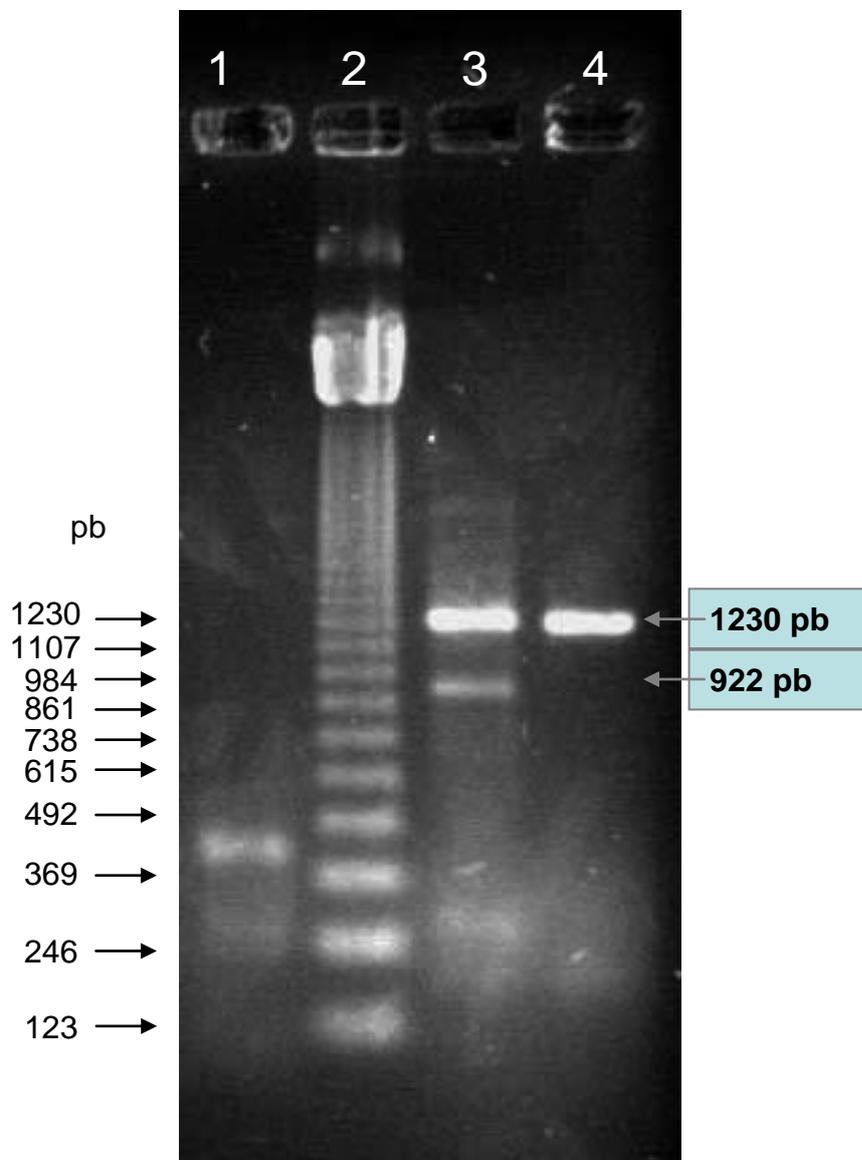


Figura 36 – Produto de PCR em gel de agarose a 1,5% corado por brometo de etidium. Identificação das amostras: Faixa 1: Controle negativo, Faixa 2: Padrão de peso molecular (123 bp DNA Ladder), Faixa 3: Amostra viral com iniciadores HK2 e HK3, Faixa 4: Amostra viral com iniciadores HK2 e HK10.

6 DISCUSSÃO

O estudo do vírus Juruaçá foi iniciado em 1982 quando foi obtido o seu isolamento em camundongos albinos suíços recém-nascidos, a partir de vísceras de morcegos. Na época em que foi isolado, procederam-se testes sorológicos clássicos em uma tentativa de caracterização viral, entretanto, não foi obtida nenhuma evidência sorológica que pudesse sugerir o táxon ao qual este vírus poderia pertencer.

No presente trabalho foi desenvolvido um estudo experimental mais amplo do vírus Juruaçá, incluindo outras metodologias, como microscopia eletrônica, imunomarcacão, técnicas moleculares e o uso de cultivos primários de células do sistema nervoso central de camundongos albinos suíços.

Inicialmente nos propusemos a realizar um estudo de susceptibilidade de cultivos celulares de linhagens contínuas e cultivos primários de células do sistema nervoso central ao vírus Juruaçá, além de infecção experimental em camundongos albinos suíços recém-nascidos que continuam sendo usados extensivamente no estudo de arbovírus e outros vírus de vertebrados.

As células Vero e C6/36 usadas rotineiramente no isolamento de arbovírus e outros vírus de vertebrados não foram sensíveis à infecção pelo vírus Juruaçá. A ausência de ECP e a não detecção de antígenos virais pelas técnicas de IFI e FC, sugerem que tais linhagens celulares não apresentam receptores para este vírus.

O uso de cultivos primários de cérebros de camundongos albinos suíços, além de constituir um sistema alternativo eficiente para o isolamento de vírus que infectam o SNC, permite também a identificação do tropismo viral e estudos *in vitro*

da interação vírus-célula, mesmo dentre populações subcelulares dos hemisférios cerebrais (Diniz et al., 2002).

Em estudos de neurotropismo viral usando cultivo primário de células do SNC, Graves et al. (1986) demonstraram que o vírus Theiler (gênero *Cardiovirus*) infecta liticamente neurônios, oligodendrócitos e persistentemente astrócitos e macrófagos. Nossos resultados também sugerem uma infecção persistente em astrócitos e microglias com a ausência de ECP, porém em relação à infecção com neurônios pelo vírus Juruaçá, difere dos de Graves et al. uma vez que não foi observado ECP nem foram detectados antígenos virais por IFI. Ainda em relação à susceptibilidade em neurônios nossos resultados também diferem dos de Jarousse et al. (1998) com a cepa GDVII do vírus Theiler que infecta principalmente neurônios causando completa destruição do cultivo celular com 24 horas p.i.. e com a cepa atenuada DA que infecta neurônios sem causar morte celular aparente.

Apesar de microglias apresentarem uma intensa marcação citoplasmática para antígenos virais por IFI, partículas virais não foram observadas por técnicas de microscopia eletrônica (contrastação negativa e cortes ultrafinos). Embora cultivos de astrócitos não tenham apresentado uma intensa marcação por IFI, foi detectada a presença de partículas virais nos fluidos analisados por contração negativa.

Estes resultados preliminares obtidos a partir da infecção de cultivos primários de células do SNC, quando comparados com os resultados da histopatologia e imunohistoquímica sugerem que neurônios só expressam receptores para o vírus Juruaçá *in vivo*, enquanto que as células gliais expressam tais receptores *in vivo* e *in vitro*. Todavia novos estudos de infecção experimental em cultivo primário de neurônios devem ser realizados para confirmação desta hipótese.

A atividade hemaglutinante do vírus Juruaçá utilizando-se eritrócitos de ganso foi observada em antígeno de sucrose-acetona proveniente de cérebros de camundongos recém-nascidos infectados, na faixa de pH 5,75, demonstrando desta maneira presença de proteínas hemaglutinantes (hemaglutininas) atuando como antígenos. Assim, com o objetivo de detectar a circulação do vírus Juruaçá na população de morcegos que habitavam a mesma área e proximidades à época em que o vírus foi isolado, 200 soros de morcegos provenientes da soroteca da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do IEC foram testados através da técnica de IH e uma amostra foi positiva, o que nos leva a supor que nesta região, pelo menos durante este período, o vírus Juruaçá estava circulando na população de morcegos.

Os resultados de FC demonstraram que o vírus Juruaçá pode ser um novo vírus, uma vez que não houve cruzamento sorológico entre o antígeno deste vírus com nenhum dos soros hiperimunes de vírus de diversas famílias testados, bem como de vírus não grupados, não classificados e isolados de morcegos, cedidos do acervo da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do IEC e Departamento de Patologia da University of Texas Medical Branch (UTMB) em Galveston-Texas, ocorrendo reação sorológica somente com o soro homólogo da amostra.

A análise físico-química foi feita utilizando DCA, que por ser um sal biliar com propriedade lipossolúvel, atua na bicamada lipídica e danifica o envelope viral, interferindo na infectibilidade das partículas. Uma vez que se observou infectividade após o tratamento do vírus com este solvente, há fortes indicações que o vírus Juruaçá trata-se de um vírus não envelopado.

Para confirmar a evidência da ausência de envelope e caracterizar morfológicamente o vírus em estudo, realizamos a análise ultraestrutural do tecido

nervoso de camundongos infectados com o vírus Juruaçá, em cortes ultrafinos, a qual revelou a presença de partículas virais esféricas não envelopadas, apresentando em média 23-30 nm de diâmetro, sendo essas características compatíveis com membros da família *Picornaviridae* (Fauquet et al., 2005). O vírion foi visualizado apenas no citoplasma de células do SNC a partir do 4º dia p.i., o que condiz com o tempo de aparecimento das lesões teciduais observadas no estudo histopatológico dos animais infectados com o vírus Juruaçá.

Os achados acima foram corroborados pela análise morfológica por contração negativa de fluido de cultivos primários de astrócitos, que também mostrou a presença de partículas virais com as mesmas características daquelas encontradas nos cortes ultrafinos. A imunomicroscopia eletrônica apresentou uma reação antígeno-anticorpo, com formação de um halo denso de anticorpos anti-Juruaçá ligados à superfície viral confirmando a especificidade do soro hiperimune.

O conjunto dos resultados obtidos nos leva a relacionar o vírus Juruaçá aos vírus pertencentes à família *Picornaviridae*, que apresentam tropismo por diversos tecidos e células.

Os estudos experimentais em camundongos recém-nascidos infectados com o vírus Juruaçá para avaliar as alterações anatomo-patológicas, demonstraram que a partir do 4º dia p.i. são observadas alterações progressivas, principalmente no cérebro dos animais, apresentando leve espongiose com vasos proeminentes e presença de células neuronais com aspecto apoptótico, evoluindo para intenso aspecto espongíótico e comprometimento do parênquima cerebral associado à proeminência vascular, necrose e apoptose neuronal, além de infiltrado inflamatório polimorfonuclear com oito dias p.i., semelhante aos poliovírus, que apesar de geralmente causarem uma gastroenterite, em certos casos eles invadem

secundariamente o sistema nervoso, lesando especificamente os neurônios motores inferiores e ocorrendo gliose duradoura nos cornos anteriores afetados da medula espinhal (Girolami et al., 1996).

Em outros estudos de neurotropismo, realizados com macacos, observou-se nas células mais atingidas uma cromatólise difusa que leva a desintegração neuronal, além de infiltrado inflamatório polimorfonuclear e linfomononuclear acompanhada de congestão vascular e microhemorragias (Diament & Kok, 1996), como observado no cérebro de camundongos infectados com o vírus Juruuçá.

Ainda no gênero *Enterovirus*, temos outros membros que também podem ocasionar lesões no cérebro, como o vírus Coxsackie A7. Na literatura encontra-se descrito a presença de alterações neuro-histológicas em alguns casos - e quando estão presentes são semelhantes àquelas produzidas pelos poliovírus – bem como haver relatos de pancardites difusas e pneumonites.

Já os Coxsakievirus B ocasionam principalmente miocardites e meningoencefalites, e com menor freqüência, alterações no pâncreas, adrenais, fígado e pulmões, ocorrendo dilatações dos ventrículos e do miocárdio, com infiltração de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos, sendo as lesões focais, com o SNC mostrando meninges congestionadas, edema e células inflamatórias, sendo citados também focos de hemorragia e congestão no parênquima pulmonar com necrose do epitélio bronquiolar e necrose aguda centro lobular do fígado (Fechner et al., 1963; Baker & Philips, 1979; Waldman & Granato, 1996).

Os demais órgãos dos animais infectados com o vírus Juruuçá revelaram alterações que variaram de discreta à moderada intensidade em geral acompanhada de parco infiltrado inflamatório misto.

Assim sendo utilizamos outra importante ferramenta no nosso estudo, que foi a análise por imunohistoquímica, a qual revelou padrão de positividade que coincidiu com as áreas de maior acometimento do SNC observadas na histopatologia, sobretudo com os achados de nódulos gliais. O padrão de imunomarcção foi difuso, acometendo todas as áreas cerebrais, entretanto com nítida preferência por áreas onde predomina os achados de nódulos gliais e maior intensidade de infiltrado inflamatório. De fato, corpos neuronais, bem como células gliais apresentaram positividade característica para essa técnica, o que pode indicar que a ativação da resposta imune específica cerebral é desencadeada no processo de reconhecimento, processamento e mecanismos efetores da resposta imune.

Esses achados podem em parte confirmar os resultados obtidos *in vitro* que, aponta para um papel fundamental da resposta imune na indução da lesão neuronal, uma vez que em cultivos primários não houve ECP. Entretanto, a avaliação do fenótipo celular específico, bem como do perfil citocínico são ainda necessários para as correlações imunopatológicas adequadas, identificação do papel das principais células imunes e citocinas envolvidas na indução da lesão celular específica durante a infecção.

Foi nítida a constatação de que o vírus Juruacá ocasionou lesão principalmente no SNC e com menos intensidade nos demais órgãos. As alterações histopatológicas descritas no experimento com camundongos recém-nascidos inoculados com o vírus Juruacá, se mostraram condizentes com os dados da literatura sobre alterações teciduais provocadas por membros da família *Picornaviridae*, gênero *Enterovirus*.

Os experimentos desenvolvidos com o vírus Juruacá *in vitro* (com células sem ECP) e *in vivo* (com morte dos animais) se comportaram de maneira diferente,

sugerindo a possibilidade de que as lesões observadas nos animais infectados com o vírus Juruacá possam ter sido ocasionadas por mecanismos imunes, como descrito por Palma et al. (2003), que observou uma potente habilidade do vírus Theiler (gênero *Cardiovirus*) em rapidamente induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias em cultivo de astrócitos de camundongos principalmente IL-2, IL-1, IFN- γ , TNF- α e IL-6, assim como também foi demonstrado nos estudos *in vivo* de Begolka et al. (1998), Chang et al. (2000), Theil et al. (2000) e Kim et al. (2001).

Outras células gliais como microglias e oligodendrócitos também são capazes de expressar níveis significantes de citocinas pró-inflamatórias como resposta à infecção pelo vírus Theiler, embora os níveis de citocinas induzidas possam variar dependendo do tipo celular (Palma et al., 2003).

Um outro exemplo de doença de base imunopatológica é verificado na infecção pelo vírus da hepatite A (gênero *Hepatovirus*), para o qual se observou que o vírus não interrompe a tradução celular do hospedeiro e aparenta ser relativamente não citopático em células de cultura de tecido, onde o dano hepatocelular e conseqüente icterícia resulta da destruição imunopatológica dos hepatócitos infectados, talvez por células T CD8⁺ vírus-específicas que tenham sido identificadas no fígado infectado (Kurane et al., 1985; Karayiannis et al., 1986; Whitton et al., 2005). Por outro lado, Coxsackievirus têm sido associado com o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 1 pela expressão de citocinas e quimiocinas que podem atuar como iniciadores de uma reação autoimune contra as células beta das ilhotas de Langerhans (Serreze et al., 2004; Varela-Calvino et al., 2004; Olsson et al., 2005). O vírus Juruacá não demonstrou ECP em culturas primárias de células do SNC de camundongos, já no tecido cerebral de

camundongos infectados, foi observada uma intensa destruição celular culminando ao final da infecção (8º dia) com um quadro de inflamação generalizada.

Embora não tenha sido realizado experimentos para avaliar a alteração da expressão de citocinas, os resultados deste trabalho sugerem que os animais infectados com o vírus Juruaçá estejam morrendo não só pela presença do vírus mas também por uma resposta imune do hospedeiro, o que poderá ser comprovado em futuros testes qualitativos e quantitativos relacionados à expressão de citocinas pró-inflamatórias e fenótipo da resposta imune na infecção pelo vírus Juruaçá.

Todos os resultados obtidos indicaram para a família *Picornaviridae*, gênero *Enterovirus*, dessa forma direcionamos a análise molecular utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gênero *Enterovirus*, correspondente à região não traduzida 5' do genoma de *Poliovirus*, que é uma região extremamente conservada (Dorner et al., 1982). Nosso resultado do RT-PCR sugere que o vírus Juruaçá pode ser um novo vírus pertencente ao gênero *Enterovirus*, pois obtivemos fragmentos de cDNA a partir do ARN do vírus Juruaçá com oligonucleotídeos iniciadores específicos de *Poliovirus*. Entretanto, estudos visando o sequenciamento nucleotídico devem ser feitos posteriormente, para confirmar sua relação genética com os membros do gênero *Enterovirus*.

Todos os resultados obtidos, apresentados e discutidos nesta dissertação sugerem que os estudos de caracterização antigênica, ultraestrutural e molecular básicos realizados, indicam uma classificação taxonômica preliminar na família *Picornaviridae*, gênero *Enterovirus*, para o vírus Juruaçá.

7 CONCLUSÕES

- ❖ Camundongos albinos suíços recém-nascidos são sensíveis à replicação do vírus Juruaçá, quando inoculados pela via i.c.;
- ❖ Células Vero e C6/36 não foram suscetíveis à infecção pelo vírus Juruaçá;
- ❖ O vírus Juruaçá infecta persistentemente astrócitos e microglias em cultivos primários;
- ❖ Experimentos de cultivos primários de neurônios não foram conclusivos em relação à infecção pelo vírus Juruaçá;
- ❖ O vírus Juruaçá apresentou tropismo por neurônios e células gliais em camundongos albinos suíços recém nascidos;
- ❖ Alterações anatomopatológicas e reações imunohistoquímicas realizadas indicam o SNC de camundongos albinos suíços como principal alvo da infecção, caracterizada por uma doença imune-inflamatória;
- ❖ O vírus Juruaçá apresenta hemaglutininas para eritrócitos de ganso em pH 5,75;
- ❖ O vírus Juruaçá apresenta morfologia compatível com os membros da família *Picornaviridae*;
- ❖ Nossos resultados sugerem que o Juruaçá é um novo vírus isolado de morcego, pertencente à família *Picornaviridae*, gênero *Enterovirus*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, R., TAYLOR, S.K., SULKIN, S.E. Studies of Arthropod-borne virus infections in *Chiroptera*. VIII. Evidence of natural St. Louis encephalitis virus infection in bats. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.19, n.5, p.851-859, 1970.

ALOISI, F. Immune function of microglia. **Glia**, v.36, p.165-79, 2001.

ALMEIDA, J.D. Practical aspects of diagnostic electron microscopy. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v.53, 1980, p.05-18.

AMENGUAL, B. et al. Evolution of European bat *Lyssavirus*. **Journal of General Virology**, v.78, p.2912-2928, 1997.

ANDRAL, L. et al. Etudes sur la fièvre jaune en Ethiopie. **Bull. Org. mond. Santé**, v.38, n.6, p.855-861, 1968.

AUBERT, C. CHAMORRO, M., BRAHIC, M. Identification of Theiler's virus infected cells in the central nervous system of the mouse during demyelinating disease. **Microbial Pathogenesis**, v.3, p.319-326, 1987.

BAKER, D. & PHILIPS, C.A. Fatal hand-foot-and mouth disease in adult caused by coxsakievirus A7. **JAMA**, v.242, p.1065-1072, 1979.

BAYER, N. et al., Inhibition of clathrin-dependent endocytosis has multiple effects on human rhinovirus serotype 2 cell entry. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.3952-3962, 2001.

BEATY, B.J., CALISHER, C.H., SHOPE, R.E. Arboviruses. In: **Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections**. SCHMIDT, N.J., EMMONS, R.W. (Ed) 6.ed. Washington: American Public Health Association, 1989, p.797-855.

BEGOLKA, W.S. et al. Differential expression of inflammatory cytokines parallels progression of central nervous system pathology in two clinically models of multiple sclerosis. **Journal of Immunology**, v.161, p.4437-4446, 1998.

BELL , J.F. & THOMAS, L.A. A new virus, "MML", enzootic in bats (*Myotis lucifugus*) of Montana. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.13, p.607-612, 1964.

BLACKBURN, N.K. et al. Isolation of Sindbis virus from bat organs. **Central African Journal of Medicine**, v.28, n.8, p.201, 1982.

BOIRO, I. et al. Isolement du virus Fomédé à partir de chéiroptères *Nycteris nana* en République de Guinée. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et de ses Filiales**, v.79, n.2, p.180-182, 1986.

BOIRO, I., KONSTANINOV, O.K., NUMEROV, A.D. Isolement du virus de la fièvre de la Vallée du Rift à partir de chéiroptères en République de Guinée. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et de ses Filiales**, v.80, n.1, p.62-67, 1987.

BORGMANN, K., GENDELMAN, H.E., GHORPADE, A. Isolation and HIV-1 infection of primary human microglia from fetal and adult tissue. **Methods in Molecular Biology**, v.304, p.49-70, 2005.

BOS, L. The naming of virus: an urgent call to order. **Archives of Virology**, v.144, n.3, p.631-636, 1999.

_____. Structure and typography of virus names. **Archives of Virology**, v.145, p.429-432, 2000.

BOULGER, L.R. & PORTERFIELD, J.S. Isolation of a virus from nigerian fruit bats. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.52, n.5, p.421-424, 1958.

BOZZOLA, J.J. & RUSSEL, L.D. Specimen preparation for transmission electron microscopy. In: **Electron Microscopy – Principles and Techniques for Biologists**. 2 ed. Massachusetts: Jones and Barlett Publishers, 1999, 670p.

BRASS, D.A. **Rabies in Bats: Natural History and Public Health Implications**. Ridgefield: Livia Press, 1994. 335p.

BRENER, S. & HORNE, R.W., A negative Staining Method for High Resolution Electron Microscopy of Viruses. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.34, p.103-110, 1959.

BREWER, G.J. Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons, **Journal of Neuroscience Methods**, v.71, p.145-158, 1997.

BURNS, K.F. & FARINACCI, C.J. Virus of bats antigenically related to St. Louis encephalitis. **Science**, v.123, n.3189, p.227-228, 1956.

CALISHER, C.H. et al. Isolations of Nepuyo virus strains from Honduras, 1967. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.20, n.2, p.331-337, 1971.

CALISHER, C.H. et al. Identification of a new Venezuelan equine encephalitis virus from Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.31, n.6, p.1260-1272, 1982.

CARINI, A. Sur une grande Epizootie de Rage. **Annales L'Institute Pasteur**, v.25, p.843-846, 1911.

CASALS, J. Immunological techniques for animals viruses. In: **Methods in Virology**. Maramorosh, K. & Koprowski, H. (Ed). New York : Academic Press, v.3, 1967, p.75-81.

CHANG, J.R. et al. Differential expression of TGF- β , IL-2, and other cytokines in the CNS of Theiler's murine encephalomyelitis virus-infected susceptible and resistant strains of mice. **Virology**, v.278, p.346-360, 2000.

CHEERAN, M.C. et al. Differential responses of human brain cells to west Nile virus infection. **Journal of Neurovirology**, v.11, p.512-524, 2005.

CHUA, K.B. et al. *Tioman virus*, a novel *Paramyxovirus* isolated from fruit bats in Malaysia. **Virology**, v.283, n.2, p.215-229, 2001.

CHUA, K.B. et al. Isolation of Nipah virus from Malaysian island flying foxes. **Microbes and Infection**, v.4, n.2, p.145-151, 2002.

CONSTANTINE, D.G. Transmission of pathogenic microorganisms by vampire bats. In: **Natural History of Vampire Bats**. GREENHALL, A.M. & SCHMIDT, U. (Ed). Boca Raton: CRC Press, 1988, p.167-189.

CORREA-GIRON, P., CALISHER, C.H., BAER, G.M. Epidemic strain of Venezuelan equine encephalomyelitis virus from a vampire bat captured in Oaxaca, Mexico, 1970. **Science**, v.175, n.21, p.546-547, 1972.

DeTULLIO, L. & KIRCHHAUSEN, T. The clathrin endocytic pathway in viral infection. **The EMBO Journal**, v.17, n.16, p.4585-4593, 1998.

DIAMENT, A. & KOK, F. Poliomielite. In: **Tratado de Infectologia**. VERONESI, R. & FOCACCIA, R. (Ed). São Paulo: Atheneu, 1996, p.469-475.

DINIZ, J.A.P. et al. The use of primary cultures of newborn mouse brain cells in an useful system for the isolation or arbovirus and other virus of vertebrate. **Virus Review & Research**, v.7, n.1, p.94, 2002.

DONATI, D. et al. Variant-specific tropism of human herpesvirus 6 in human astrocytes. **Journal of Virology**, v.79, p.9439-9448, 2005.

DORNER, A.J. et al. Identification of the initiation site of Polivirus polyprotein synthesis. **Journal of Virology**, v.42, .3, p.1017-1028, 1982.

DOWNS, W.G. et al. Tacaribe virus, a new agent isolated from *Artibeus* bats and mosquitoes in Trinidad, West Indies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.12, p.640-646, 1963.

EISENBERG, J.F. & REDFORD, K.H. **Mammals of the Neotropics: The Central Neotropics – Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil**. v. 3, Chicago: The University of Chicago Press, 1999, p. 117-229.

FALKE, D. In: **Virologia**. 2.ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, v.2, 1979, p.77-80.

FAUQUET, C.M. et al. **Virus Taxonomy**. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 8 ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005, 1276p.

FECHNER, R., SMITH, M.G., MIDDELKAMP, J.N. Coxsackie B virus infection of the newborn. **American Journal of Pathology**, v.42, p.493-505, 1963.

FEUER, R. et al. Coxsackievirus B3 and the neonatal CNS: the roles of stem cells, developing neurons, and apoptosis in infection, viral disseminations, and disease. **American Journal of Pathology**, v.163, p.1379-1393, 2003.

FIELD, H. et al. The natural history of Hendra and Nipah viruses. **Microbes and Infection**, v.3, n.4, p.307-314, 2001.

FLINT, S.J. et al. **Principles of virology: molecular biology, pathogenesis, and control**. Washington: ASM Press, 2000. 804p.

FONTENILLE, D. et al. New vectors of Rift Valley fever in West Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v.4, n.2, p.289-293, 1998.

FRASER, G. et al. Encephalitis caused by a lyssavirus in fruit bats in Australia. **Emerging Infectious Diseases**, v.2, p.327-331, 1996.

FUNASA. **Morcegos em áreas urbanas e rurais: Manual de manejo e controle**. Brasília, 2.ed, 1998, 117p.

GARTNER, L. P. et al. Sistema Nervoso. **Tratado de histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1999, p.163.

GIROLAMI, U., FROSCH, M.P., ANTHONY, D.C. O sistema nervoso central. In: **Patologia Estrutural e Funcional**. COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L. (Ed). 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1996, p.1193.

GOMES, M.L.C. et al. Enteroviroses. In: **Doenças Infecciosas e Parasitárias - Enfoque Amazônico**. LEÃO, R.N.Q. (Ed). Belém: Cejup: UEPA: Instituto Evandro Chagas, 1997, p.243-252.

GOMES, M.L.C. & VASCONCELOS, P.F.C. Poliomielite. In: **Doenças Infecciosas e Parasitárias - Enfoque Amazônico**. LEÃO, R.N.Q. (Ed). Belém: Cejup: UEPA: Instituto Evandro Chagas, 1997, p.363-376.

GOMES, F. C. A. et al. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, n. 4, p.619-631, 1999.

GRAVES, M.C. et al. Theiler's virus in brain cell cultures: lysis of neurons and oligodendrocytes and persistence in astrocytes and macrophages. **Journal of Neuroscience Research**, v.15, n.4, p.491-501, 1986.

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

HALPIN, K. et al. Newly discovered viruses of flying foxes. **Veterinary Microbiology**, v.68, p.83-87, 1999.

HALPIN, K. et al. Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. **Journal of General Virology**, v.81, p.1297-1932, 2000.

HARRISON, S.D., SKEHEL, J.J., WILEY, D.C. Virus Structure. In: **Virology**. FIELDS, B.N., KNIPE, D.M., HONLEY, P.M. (Ed). 3.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996, p. 59-99.

HAUPT, H. & REHAAG, H. Raiva epizoótica nos rebanhos de Santa Catarina, (Sul do Brasil) transmitida por morcegos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária**, v.2, p.17-47, 1925.

HEPLER, P.K. Membranes in the mitotic apparatus of Barley cells. **Journal of Cell Biology**, v.86, p.490-499, 1980.

HENDERSON, G.W. et al. Characterization of Mapuera virus: structure, proteins and nucleotide sequence of the gene encoding the nucleocapsid protein. **Journal of General Virology**, v.76, p.2509-2518, 1995.

HILL, H.E. & SMITH, J.D. **Bats: A natural history**. Austin: University of Texas Press, 1984. 243p.

HSU, S.M., RAINE, L., FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **Journal of Histochemical and Cytochemical**, v.29, n.4, p.577-580, 1981.

HUTH, F. & ARAÚJO, R. Morphologische veränderungen der mäuse-leber nach inoculation von arbo-virus (type Be An 67949). **Virchows Arch. Abt. B. Zellpath**, v.9, p.153-163, 1971.

JNAOUI, K., MINET, M., MICHIELS, T. Mutations that affect the tropism of DA and GDVII strains of Theiler's virus in vitro influence sialic acid binding and pathogenicity. **Journal of Virology**, v.76, n.16, p.8138-8147, 2002.

JAROUSSE, N. et al. The neurovirulence of the DA and GDVII strains of Theiler's virus correlates with their ability to infect cultured neurons. **Journal of Virology**, v.72, n.9, p.7213-7220, 1998.

JOSI-KORPELA, P. et al. Entry of human parechovirus 1. **Journal of Virology**, v.75, p.1958-1967, 2001.

KALUNDA, M. et al. Kasokero virus: a new human pathogen from bats (*Rousettus aegyptiacus*) in Uganda. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.35, n.2, p.387-392, 1986.

KANDEL, E. et al. **Principles of neuroscience**. 3 ed., New York: Elsevier Science Publishing Co., 1991, p.1050-1060.

KARABATSOS, N. **International Catalogue of Arboviruses, including certain other viruses of vertebrates**. 3 ed. San Antonio: The American Society for Tropical Medicine and Hygiene, 1985, 1147p.

KARAYIANNIS, P. et al. Hepatitis A virus replication in tamarins and host immune response in relation to pathogenesis of liver cell damage. **Journal of Medical Virology**, v.18, p.261-276, 1986.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v.27, p.137, 1965.

KEMP, P.G.E. et al. IFE: un novel *Orbivirus* africain isolé chez des chauves-souris *Eidolon helvum* capturées au Nigeria, au Cameroun et en République Centrafricaine. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et de ses Filiales**, v.81, n.1, p.40-48, 1988.

KIM, G.R., LEE, Y.T., PARK, C.H. A new natural reservoir of hantavirus: isolation of hantaviruses from lung tissues of bats. **Archives of Virology**, v.134, n.1-2, p.85-95, 1994.

KIM, B.S. et al. Pathogenesis of virus-induced immune-mediated demyelination. **Immunologic Research**, v.24, p.121-130, 2000.

KIMELBERG, H. K.; NORENBERG, M. D. Astrocytes. **Scientific American**, v. 260, n. 4, p.66-76, 1989.

KOSSMANN, T. et al. Cytomegalovirus production by infected astrocytes correlates with transforming growth factor-beta release. **Journal of Infectious Disease**, v.187, p.534-541, 2003.

KRAMER-HAMMERLE, S. et al. Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus. **Virus Research**, v. 111, p.194-213, 2005.

KURANE, I. et al. Human lymphocyte responses to hepatitis A virus-infected cells: interferon production and lysis of infected cells. **Journal of Immunology**, v.135, p.2140-2144, 1985.

LENNETTE, D.A. General principles of laboratory diagnostic methods for viral, rickettsial and chlamydial infections. In: **Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections**. LENNETTE, E.H., LENNETTE, D.A., LENNETTE, E.T. (Ed.) 7.ed. Washington: American Public Health Association, 1995, p.3-25.

LENT. R. **Cem bilhões de neurônios**. Conceitos fundamentais de neurociência. Rio de Janeiro: Atheneu, 2001.

LEVINE, A.J. The Origin of Virology. In: **Virology**. FIELDS, B.N., KNIPE, D.M., HONLEY, P.M. (Ed) 3.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996, p.1-14.

LI, Y. et al. Coronavirus neurovirulence correlates with the ability of the virus to induce proinflammatory cytokine signals from astrocytes and microglia. **Journal of Virology**, v.78, p.3398-3406, 2004.

LIMA, F.R. et al. Regulation of microglial development: A novel role of thyroid hormone. **Journal of Neuroscience**, v.21, n.6, p.2828-2838, 2001.

LIPTON, H. L. Theiler's virus infection in mice: an unusual biphasic disease process leading to demyelination. **Infect Immuno**. v.11, p.1147-1155, 1975.

LUFT, J.H. Improvements in epoxy resin embedding methods. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v.2, p.409-414, 1961.

LVOV, D.K. et al. "Sokuluk" virus, a new group B arbovirus isolated from *Vespertilio pipistrellus* Schreber, 1775, bat in the Kirghiz S.S.R. **Archiv fur die Gesamte Virusforschung**, v.41, n.3, p.170-174, 1973a.

LVOV, D.K. et al. "Issyk-Kul" virus, a new arbovirus isolated from bats and *Argas (Carios) vespertilionis* (Latr., 1802) in the Kirghiz S.S.R. **Archiv fur die Gesamte Virusforschung**, v.42, n.2, p.207-209, 1973b.

MACHADO, L.F.A. **Vírus Parixá: um novo possível arbovírus isolado do morcego *Lonchophylla thomasi* (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae) na Amazônia Brasileira**. 1998. 81f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Museu Paraense Emílio Goeldi e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Belém, 1998.

MAPAS DO ESTADO DO PARÁ. Disponível em:

<<http://www.guianet.com.br/pa/mapapa.htm>>. Acesso em: Março/2005.

MAPAS DO ESTADO DO PARÁ. Disponível em:

<<http://www.aondefica.com/mapaparaax.asp>>. Acesso em: Março/2005.

MARIN-PADILLA, M. Prenatal development of fibrous (white matter), protoplasmic (gray matter), and layer I astrocytes in the human cerebral cortex: a Golgi study.

Journal of Comparative Neurology., v.357, p.554-572, 1995.

MARJOMAKI, V. et al. Internalization of echovirus 1 in caveolae. **Journal of Virology**, v.76, p.1856-1865, 2002.

MATTHEWS, R.E.F. Classification and Nomenclature of Viruses. Fourth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Intervirolgy**, v.17, p.1-3, 1982.

MAYO, M.A. Recent revisions of the rules of virus classification and nomenclature. **Archives of Virology**, v.141, p.2479-2484, 1996.

MAYO, M.A. & HORZINEK, M.C. A revised version of the international code of classification and nomenclatures. **Archives of Virology**, v.143, p.1645-1654, 1998.

MELNICK, J.L. Portraits of viruses: the picornaviruses. **Intervirolgy**, v.20, p.61-100, 1983.

MEREDITH, C.D., PROSSOUW, A.P., VAN PRAAG KOCH, H. An unusual case of human rabies thought to be of chiropteran origin. **South African Medical Journal**, v.45, p.767-769, 1971.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para cirurgião, enfermeira e citotécnico**. 3 ed. São Paulo: EPU, 1998, 295p.

MOMMA, S.; JOHANSSON, C. B.; FRISEN, J. Get to know your stem cells. **Current Opinion in Neurobiology**. v. 10. n. 1, p. 45-49, 2000.

MOURA NETO, V.; MALLAT, M.; JEANFET, C. Microheterogeneity of tubulin proteins in neuronal and glial cells from the mouse brain in culture. **The EMBO Journal**., v.2, p.1243-1301, 1983.

MURPHY, F. A. Virus taxonomy. In: **Virology**. FIELDS, B. N., KNIPE, D. M., HONLEY, P. M. (Ed). 3.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996, p.15-57.

NAKAMURA, Y. Regulation factors for microglial activation. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v.25, n.8, p.945-953, 2002.

NITKIEWICZ, J. et al. Productive infection of primary murine astrocytes, lymphocytes, and macrophages by human immunodeficiency virus type 1 in culture. **Journal of Neurovirology**, v.10, p.400-408, 2004.

NOWAK, R.M. **Walker's Bats of the World**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1994. 287p.

NOWAK, R.M. & PARADISO, J.L. Order *Chiroptera*. In: **Walker's Mammals of the World**. 4.ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, v.1, 1983, p.169-351.

O'DONNELL, V. et al. Analysis of foot-and-mouth disease virus internalization events in cultured cells. **Journal of Virology**, v.79, n.13, p.8506-8518, 2005.

OLSSON, A. et al. Inflammatory gene expression in Coxsackievirus B-4-infected human islets of Langerhans. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.330, n.2, p.571-576, 2005.

OSBORNE, J.C. et al. Isolation of Kaeng Khoi virus from dead *Chaerephon plicata* bats in Cambodia. **Journal of General Virology**, v.84, p.2685-2689, 2003.

PALMA, J.P. et al. Infection with Theiler's murine encephalomyelitis virus directly induces proinflammatory cytokines in primary astrocytes via NF- κ B activation: potential role for the initiation of demyelinating disease. **Journal of Virology**, v.77, n.11, p.6322-6331, 2003.

PAUL, S.D., RAJAGOPALAN, P.K., SCREENIVASAN, M.A. Isolation of the West Nile virus from the frugivorous bat, *Rousettus leschenaulti*. **Indian Journal of Medical Research**, v.58, n.9, p.1169-1171, 1970.

PAVRI, K.M. & SINGH, K.R. Kyasanur forest disease virus infection in the frugivorous bat, *Cynopterus sphinx*. **Indian Journal of Medical Research**, v.56, n. 8, p.1202-1204, 1968.

PAVRI, K.M., SINGH, K.R.P., HOLLINGER, F.B. Isolation of a new parainfluenza virus from a frugivorous bat, *Rousettus leschenaulti*, collected at Poona, India. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.20, n.1, p.125-130, 1971.

PELCZAR JR, M.J., CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 2 ed. v. 1, São Paulo: Makron Books, 1997. 527p.

PHILBEY, A.W. et al. An apparently new virus (family *Paramyxoviridae*) infectious for pigs, humans and fruit bats. **Emerging Infectious Diseases**, v.4, n.2, p.269-271, 1998.

PIETIAINEN, V. et al. Echovirus 1 endocytosis into caveosomes requires lipid rafts, dynamim II, and signaling events. **Molecular Biology of the Cell**, v.15, p.4911-4925, 2004.

PINTO, E.V. **Caracterização do vírus Araguari, um agente isolado do marsupial *Philander opossum* (Didelphidae) na Amazônia Brasileira**. 2000. 82f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infeciosos e Parasitários) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Museu Paraense Emílio Goeldi e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Belém, 2000.

PRICE, J.L. Isolation of Rio Bravo and a hitherto undescribed agent, Tamana bat virus, from insectivorous bats in Trinidad, with serological evidence of infection in bats and man. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.27, n.1, p.153-161, 1978.

PRINGLE, C.R. Virus Taxonomy – 1999. The universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1998. **Archives of Virology**, v.144, n.2, p.421-429, 1999.

PROPHET, E.B. et al. **Laboratory methods in histotechnology**. Washington: American Registry of Pathology, 1992, p.3-80.

RAJAGOPALAN, P.K., PAUL, S.D. SCREENIVASAN, M.A. Isolation of Kyasanur forest disease virus from the insectivorous bat, *Rhinolophus rouxi* and from Ornithodoros ticks. **Indian Journal of Medical Research**, v.57, n.5, p.805-808, 1969.

REED, L.S. & MUENCH, H. Simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Hygiene**, v.27, p.493-497, 1938.

REICHENBACH, A. Attempt to classify glial cells by means of their process specialization using the rabbit retinal Müller cell as an example of cytotopographic specialization of glial cells. **Glia**. v.2, p.250-259, 1989.

REIS, N.R. & GUILLAUMET, J.L. Les chauves-souris frugivores de la région de Manous et leur rôle dans la dissémination des espèces végétales. **Revue d'Ecologie (Terre et Vie)**, v.38, p.147-168, 1983.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate and high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v.17, p.208-213, 1963.

ROSSMANN, M.G., HE, Y., KUHN, R.J. Picornavirus – receptor interactions. **Trends in Microbiology**, v.10, p.324-331, 2002.

RUECKERT, R. R. *Picornaviridae* and their replication. In: **Virology**. FIELDS, B. N., KNIPE, D. M., HONLEY, P. M. (Ed). 3 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996, p.609-654.

SALAUN, J.J., KLEIN, J.M., HEBRARD, G. Un nouveau virus, Phnom-Penh bat virus, isolé au Cambodge chez un chauve souris frugivore, *Cynopterus brachyotis angulatus*, Miller, 1898. **Annales de Microbiologie (Institute Pasteur)**, v.125, n.4, p.485-495, 1974.

SANMARTIN, C. et al. Encefalitis equine Venezolana en Colombia. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v.74, p.108-137, 1967.

SCHERER, W.F. et al. Ecologic studies of Venezuelan encephalitis virus in southeastern Mexico. IV. Infections of wild mammals. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.20, p.980-988, 1971.

SERREZE, D.V. et al. Diabetes acceleration or prevention by a coxsackievirus B4 infection: critical requirements for both interleukin-4 and gamma interferon. **Journal of Virology**, v.79, n.2, p. 1045-1052, 2005.

SETH, P. & MAJOR, E.O. Human brain derived cell culture models of HIV-1 infection. **Neurotoxicity Research**, v.8, p.83-90, 2005.

SEYMOUR, C., DICKERMAN, R.W., MARTIN, M.S. Venezuelan encephalitis virus infection in neotropical bats. I. Natural infection in a Guatemalan enzootic focus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.27, p.290-296, 1978.

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

_____. A history of Arbovirology in Brazil: Belém, PA, 1954-1965. In: **An overview of Arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., VASCONCELOS, P.F.C., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. (Ed). Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998, p.13-17.

SHOPE, R.E. & SATHER, G.E. Arboviruses. In: **Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections**. LENNETTE, E.H., SCHMIDT, N.J. (Ed) 5 ed. Washington: American Public Health Association, 1979, p.767-814.

STUART, A.D. et al. A novel cell entry pathway for a DAF-using human enterovirus is dependent on lipid rafts. **Journal of Virology**, v.76, p.9307-9322, 2002.

SULKIN, S.E. The bats as a reservoir of viruses in nature. **Progress of Medical Virology**, v.4, p.157-207, 1962.

SULKIN, S.E., SIMS, R.A., ALLEN, R. Isolation of St. Louis encephalitis virus from bats (*Tadarida b. mexicana*) in Texas. **Science**, v.152, n.3719, p.223-225, 1966.

SULKIN, S.E. et al. Studies of Arthropod-borne virus infections in *Chiroptera*. VI. Isolation of Japanese B encephalitis virus from naturally infected bats. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.19, n.1, p.77-87, 1970.

TAJIMA, S. et al. Genetic characterization of Yokose virus, a flavivirus isolated from the bat in Japan. **Virology**, v.332, p.38-44, 2005.

TAMSITT, J.R. & VALDIVIESO, D. Los murciélagos y la salud pública: Estudio con especial referencia a Puerto Rico. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v.69, p.122-140, 1970.

TANDLER, B. Cytomegalovirus in the principal submandibular gland of the little brown bat, *Myotis lucifugus*. **Journal Comparative Pathology**, v.114, n.1, p.1-9, 1996.

THEIL, D.J. et al. Alterations in cytokine but not chemokine mRNA expression during three distinct Theiler's virus infections. **Journal of Neuroimmunology**, v.10, p.22-30, 2000.

THEILER, M. Action of sodium desoxycholate on arthropod-borne viruses. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.96, p. 380-382, 1957.

THEILER, M. & DOWNS, W.G. **The Arthropod-borne viruses of vertebrates: An account of the Rockefeller Foundation Virus Program, 1951-1970**. New Haven: Yale University Press, 1973. 578p.

THEILER, M. & GARD, S. Encephalomyelitis of mice: characteristics and pathogenesis of the virus. **Journal of Experimental Medicine**, v.72, p.49-67, 1940.

TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A. et al. Arboviroses. In: **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. LEÃO, R.N.Q. (Ed). Belém: Cejup: UEPA: Instituto Evandro Chagas, 1997, p.207-226.

TRAVASSOS DA ROSA, E.S. et al. Laboratorial confirmation of human rabies outbreak transmitted by hematophagous bats (*Desmodus rotundus*) in Pará State. **Virus Reviews & Research**, v.9, p.208-209, 2004.

TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. et al. Arboviruses isolated in the Evandro Chagas Institute, including some described for the first time in the Brazilian Amazon region,

their known hosts, and their pathology for man. In: **An overview of Arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., VASCONCELOS, P.F.C., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. (Ed). Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998, p.19-31.

VAN DER MERWE, M. Bats as vectors of rabies. **South African Journal of Sciences**, v.78, p.421-422, 1982.

VAN REGENMORTEL, M.H.V. Applying the species concept to plant viruses. **Archives of Virology**, v.104, n.1-2, p.1-17, 1989.

VAN REGENMORTEL, M.H.V. Virus species, a much overlooked but essential concept in virus classification. **Intervirology**, v.31, n.5, p.241-254, 1990.

_____. 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. et al. (Ed) 7.ed. San Diego: Academic Press, 2000, p.03-16.

_____. Perspectives on binominal names of virus species. **Archives of Virology**, v.146, n.8, p.1637-1640, 2001.

_____. Virus are real, virus species are man-made, taxonomic constructions. **Archives of Virology**, v.148, n.12, p.2481-2488, 2003.

VAN REGENMORTEL, M.H.V. et al. Guidelines to the demarcation of viruses species. **Archives of Virology**, v.142, n.7, p.1505-1518, 1997.

VAN REGENMORTEL, M.H.V. et al. **Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses**. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 7 ed. San Diego: Academic Press, 2000, 1162p.

VAN REGENMORTEL, M.H.V. & FAUQUET, C.M. Only italicized species names of viruses have a taxonomic meaning. **Archives of Virology**, v.147, n.11, p.2247-2250, 2002.

VAN REGENMORTEL, M.H.V. & MAHY, B.W.J. Emerging Issues in Virus Taxonomy. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, n.1, p.8-13, 2004.

VARELA-CALVINO, R. et al. Identification of a naturally processed cytotoxic CD8 T-cell epitope of Coxsackievirus B4, presented by HLA-A2.1 and located in the PEVKEK region of the P2C nonstructural protein. **Journal of Virology**, v.78, n.24, p.13399-13408, 2004.

VASCONCELOS, P.F.C. et al. 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. (Ed). Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998, p.72-99.

VERTEUIL, E. & URICH, F.W. The study and control of paralytic rabies transmitted by bats in Trinidad, British West Indies. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.4, p.317-354, 1935.

WADA, M.Y. et al. Surto de raiva humana transmitida por morcegos no município de Portel – Pará, março/abril de 2004. **SVS – Boletim Eletrônico Epidemiológico**, v.4, n.6, p.1-5, 2004.

WALDMAN, E.A. & GRANATO, C.F.H. Cocksackioses. In: **Tratado de Infectologia**. VERONESI, R. & FOCACCIA, R. (Ed). São Paulo: Atheneu, 1996, p.195-200.

WANZELLER, A.L.M. et al. Ultrastructural, antigenic and physicochemical characterization of the Mojuí dos Campos (*Bunyavirus*) isolated from bat in the Brazilian Amazon region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.3, p.307-311, 2002.

WHITTON, J.L.; CORNELL, C.T.; FEUER, R. Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, n.10, p.765-776, 2005.

WILLIAMS, M.C., SIMPSON, D.I.H., SHEPHERD, R.C. Studies on viruses in East African bats (*Chiroptera*). 2. Virus isolation. **Zoonoses Research**, v.3, n.3, p.141-153, 1964.

WILLIAMS, J.E. et al. Kaeng Khoi virus from naturally infected bedbugs (*Cimicidae*) and immature free-tailed bats. **Bulletin of the World Health Organization**, v.53, p.365-369, 1976.

WONG, K.T. et al. Nipah virus infection, an emerging paramyxoviral zoonosis. **Springer Seminars in Immunopathology**, v.24, n.2, p.215-228, 2002.

YOB, J.M. et al. Nipah virus infection in bats (Order *Chiroptera*) in Peninsular Malaysia. **Emerging Infectious Diseases**, v.7, n.3, p.439-441, 2001.

YOUNG, P.L. et al. Serologic evidence for the presence in *Pteropus* bats of a *Paramyxovirus* related to equine morbilivirus. **Emerging Infectious Diseases**, v.2, n.3, p.239-240, 1996.

ZELLER, H.G. et al. Electron microscopic and antigenic studies of uncharacterized viruses. I. Evidence suggesting the placement of viruses in families *Arenaviridae*, *Paramyxoviridae* or *Poxviridae*. **Archives of Virology**, v.108, n.3-4, p.191-209, 1989a.

ZELLER, H.G. et al. Electron microscopic and antigenic studies of uncharacterized viruses. II. Evidence suggesting the placement of viruses in the family *Bunyaviridae*. **Archives of Virology**, v.108, n.3-4, p. 211-227, 1989b.

ZELLER, H.G. et al. Electron microscopic and antigenic studies of uncharacterized viruses. III. Evidence suggesting the placement of viruses in the family *Reoviridae*.

Archives of Virology, v.109, n.3-4, p.253-261, 1989c.