



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Centro de Pesquisa em Virologia



Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada
Bioagentes Patogênicos

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Detecção de Hantavírus em roedores silvestres e estudo de sua dinâmica populacional na região Nordeste do Estado de São Paulo

Gilberto Sabino-Santos Jr

Ribeirão Preto
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

GILBERTO SABINO-SANTOS JR

Detecção de Hantavírus em roedores silvestres e estudo de sua dinâmica populacional na região Nordeste do Estado de São Paulo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada. Opção: Bioagentes Patogênicos

Orientador: Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo.

**Ribeirão Preto
2010**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO DE PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação
Serviço de Documentação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Sabino-Santos Jr, Gilberto

Detecção de Hantavírus em roedores silvestres e estudo de sua dinâmica populacional na região Nordeste do Estado de São Paulo. Ribeirão Preto, 2010.

119 f.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada. Opção: Bioagentes Patogênicos.

Orientador: Figueiredo, Luiz Tadeu Moraes.

1. hantavírus Araraquara. 2. abundância. 3. biodiversidade. 4. pequenos mamíferos. 5. roedores-reservatório. 6. *spillover*.

Folha de Aprovação

Gilberto Sabino-Santos Jr.

Detecção de Hantavírus em roedores silvestres e estudo de sua dinâmica populacional na região Nordeste do Estado de São Paulo.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada. Opção: Bioagentes Patogênicos.

Aprovado em: ___/___/___

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais:

À meu grande e melhor amigo, que quando presente sempre esteve disposto, pacientemente, a me ouvir e com amor me educar. Meu exemplo, meu herói, com quem aprendi a viver: meu pai Gilberto (in memoriam), por ser o grande idealizador de toda a minha educação e por ter me apresentado meu maior tesouro e ensinado a ser amigo dele, quem dá a vida eterna: Jesus Cristo.

À minha linda, amada minha, sempre minha amiga e companheira, minha mãe Cilé; por todo o seu carinho e amor incondicional e por estar sempre presente mesmo distante fisicamente. Por me ouvir e sempre me dar sábios conselhos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor e amigo Dr. Tadeu Figueiredo que mesmo com todo o seu enorme conhecimento científico sempre ouviu às minhas idéias com simplicidade e respeito, as quais muitas vezes são frutos de minha ingenuidade científica, e com paciência sempre me dizia: - Baiano, *piano piano se va lontano!* Muito obrigado por ter me aceitado como seu aluno e por ser um exemplo de profissional o qual pretendo seguir e pela sua amizade.

Ao professor Dr. Eurico Arruda pelas brilhantes sugestões de correção que contribuíram para a redação deste trabalho. E por ser um exemplo de pesquisador apaixonado e dedicado pelo que faz. A sua empolgação pela pesquisa e virologia é motivo de inspiração para mim.

À Dr^a. Carla Gheler pelas correções que em muito enriqueceram este trabalho no ponto de vista ecológico e por estar sempre disponível para tirar minhas dúvidas sobre aspectos relacionados à dinâmica de pequenos mamíferos. Muito obrigado.

Ao professor Dr. Marcos L Moreli, por me incentivar e através de sua empolgação pela virologia me encaminhou nos caminhos que me trouxe ao professor Dr. Tadeu. Muito obrigado *Marquinho*.

Aos professores Dr. Julio Cascardo (*in memorian*), Dr. Carlos Pirovani, Dr^a Joci Neuby e Dr^a Acássia Pires, por sempre me incentivarem, pelos ensinamentos durante a iniciação científica e pela amizade.

Ao prof. Dr. Jorge Salazar-Bravo pelo treinamento em campo, por ter-me recebido com toda a atenção e cuidado no tempo em que estive nos Estados Unidos a aprender com ele sobre os pequenos mamíferos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo e a CAPES, pelo suporte financeiro concedido.

À prof. Dr^a Coleen Jonsson e Dr. Douglas Goodin pelo apoio financeiro às campanhas de campo através de fundos do *National Institute of Health* (NIH).

Ao meu coordenador, professor Dr. João Santana, com quem aprendi em muito sobre Imunologia. Pelo seu empenho à pesquisa e ao programa que sempre foram motivo de exemplo para mim.

À Aninha (secretária do programa em Imunologia Básica e Aplicada) sempre disposta e com boa vontade em me ajudar. Muito obrigado mesmo pelo carinho e cuidado em responder todas as minhas dúvidas no tocante às questões burocráticas.

Ao grande amigo Felipe GM Maia, *Big rider*, por estar sempre presente nos momentos de dificuldade, pela paciência em me ouvir. Pelos conselhos e amizade, sempre disponível para tomar um bom Açaí. E por me ajudar com as campanhas de campo sendo efetivo membro da equipe, na triagem dos dados e pelas infundáveis discussões que esclareceram exacerbadamente alguns dos resultados aqui demonstrados.

Às minhas amigas que se tornaram minhas irmãs: Juliana Helena Chávez (*Lena*) e Vanessa DM Müller (*Vane*). Por terem me apoiado e acolhido na casa de vocês no momento que mais precisei. Pela leitura, crítica e sugestões durante a redação desta dissertação. Pelas discussões científicas que me esclareceram em muito alguns resultados. Pelas ajudas em experimentos e pelas células VERO E6 cedidas. E pela grande amizade que construímos e manteremos sempre. E também a Teela e Sophie, pela companhia e carinho.

À Luana, *Highlander*, pela amizade e paciência em ouvir e também pelos conselhos.

Aos meus amigos de longa data e conterrâneos que sempre estiveram presente: Kleiton, Danilo, Ciro, Jhimmy, Nilton e Teddy. E aos novos Baianos: João Paulo, João Henrique (pela imensa ajuda na formatação dessa dissertação, meu muito obrigado), e ao Felipe.

Ao Pedro B Pedrosa, pelas valiosas e elucidativas discussões de protocolos, resultados e *papers* na cafeteria do prédio central da FMRP. E pela amizade.

À Soraya pela sua ajuda, pelo cuidado, e por procurar sempre manter o lab em ordem.

Especialmente agradeço aos colegas Alex M Machado e Glauciane G Figueiredo que ajudaram em muito no meu crescimento profissional e pessoal. Pelo que aprendi com vocês no tocante a virologia.

Ao Paulo Paulosso e Dercílio Pavanelli, meus companheiros de equipe de campo, sem os quais este projeto não poderia ter sido desenvolvido. Agradeço em muito a vocês tanto pela ajuda em campo e pelo que aprendi com vocês durante as campanhas.

À Jaqueline R Silva, Felipe Moraes, Mário G Figueiredo pela ajuda em algumas campanhas de campo.

Agradeço à prefeitura de Cajuru nas pessoas dos secretários Antonino, *Toninho*, e Vanderlei, que disponibilizaram todo o suporte para que as campanhas fossem realizadas com sucesso. Ao Zezinho pela hospedagem e espaço físico para o trabalho de campo.

À prefeitura de Batatais. Ao dono da Fazenda Nova Esperança por liberar o espaço físico para campanha e também pela acomodação na pessoa do secretário Toninho.

À prefeitura de Luís Antônio na pessoa do secretário Adão e do Dr. Carlos Simões, por disponibilizarem espaço físico para campanhas de campo e todo o suporte.

Aos colegas de colaboração: Dr^a. Alessandra Borges (UFAL), Dr^a Danielle Malta (UFC), Gregório (Unisul), André (Unisul), e Luana Amorim (Esalq). Muito obrigado pelas colaborações e pelo que aprendi com vocês. E continuemos colaborando.

Aos funcionários do CPV-FMRP-USP: Helder (por sempre me deixar usar a copiadora e por me ajudar da arte desta dissertação), Sueli (por sempre deixar os materiais autoclavados, prontos e também pelo cafezinho de manhã), Maria Lúcia *Pitty* (pelo delicioso café após o almoço e por ter me disponibilizado células para meus experimentos), D^a Maria (pelo cafezinho e doces que sempre deixaste para nós), Bia e Fátima por deixarem o nosso local de trabalho sempre agradável.

A todo o CPV-FMRP-USP que de uma forma ou de outra colaboraram tanto para o meu crescimento profissional como pessoal: professores Dr. Benedito Fonseca e Victor Hugo, e aos colegas e amigos: Alberto e sua esposa Liz, Anibal, Fábio, Mariana, Maira, Talita, Zé (pela ajuda na qualificação), Vinícius, Etóri, Gustavo, Doidinho, Rafael França, Rafael Prado, Viviane, Lúcia, Telma, Carol, Aline.

Aos meus grandes amigos e irmãos em Sampa da zona sul que sempre me receberam com atenção e disposição: Haroldo (sempre disponível para me ouvir, e muito obrigado pelas perguntas que me ajudaram a entender o meu projeto de pesquisa), Tiago, Dell, Daniel, Diegão, Felipão, Cláudio e Aila, Kaarina, Vália, Priscila, Adélcio e Toninha, Livia e Jean, Vanessa, Samuka, Hélio e Marcinha, Kaleb, e a todos que fazem parte desta família amada em Sampa.

Aos meus amados e amigos irmãos em Ilhéus: Fafito e Thai, Lucas e Priscilla, Betão e Silvana, Juliana Campos e a todos, que são muitos, e lembro sempre de cada um especialmente.

Aos meus grandes amigos e irmãos em Feira de Santana: Josias e Norminha, Renan, Laerte, Giovanni e Pedrão e a toda a família de Feira de Santana.

Agradeço enormemente a minha família em Ilhéus que sempre esteve ao meu lado a me apoiar: minha linda mãe Airé e pai Gilberto (*in memorian*); meus irmãos: Deão e Jane, Ney e Nadja, Jú e Sérgio, Bina, Gil, Ninha, e Gildam; meus sobrinhos: Serginho, Annie, Ana Clara, Mariana, Hanninha, Giordana e José, Thales, Rebeka, Marcinho e Pel, Daniel, Reuel, Binho, Naiá, e Lucas.

À minha família em Porto Alegre: minha linda vó Edília Scheffer e meu avô Felisberto Vieira (*in memorian*), meus tios: Natanael e Linda, Nice e Toninho, Miriã e Carlinhos, Nenê e João; meus primos: Dani e Beti, Dinael e Gisele, Dyson, Biga e Alecs, Tati, Miriã e Vande, Moisés e esposa, Neno e esposa, Zeca e esposa.

Agradeço àquele que em tudo me capacitou e continua a me capacitar, pois sem ele nada posso fazer. Pela sua vida em mim e amor incondicional. Pela sua amizade e presença que nunca me deixaram tanto em momentos de alegria como de dificuldades. Muito obrigado meu amigo: Jesus.

Agradeço a todos que de uma forma ou de outra me ajudaram nesta caminhada.

*“Se alguém julga saber alguma coisa, com efeito,
não aprendeu ainda como convém saber”*

II Co. 8:2

RESUMO

Gilberto Sabino-Santos Jr. **Detecção de Hantavírus em roedores silvestres e estudo de sua dinâmica populacional na região Nordeste do Estado de São Paulo.** Dissertação de Mestrado. Centro de Pesquisa em Virologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 119 f., 2010.

Hantavirus são vírus zoonóticos principalmente de roedores silvestres, pertencentes à família *Bunyaviridae*. Entre os reservatórios naturais, os hantavírus não causam nenhum efeito patogênico aparente, contudo, quando transmitidos ao homem, estes vírus podem causar graves doenças como a febre hemorrágica com síndrome renal (FHSR) na Eurásia e uma síndrome pulmonar e cardiovascular (SPCVH) no continente Americano. Na América do Sul, os Hantavírus estão associados a roedores-reservatório da subfamília *Sigmodontinae* (família *Cricetidae*). Neste estudo, objetivou-se detectar a infecção por Hantavírus em pequenos mamíferos silvestres vivendo em quatro ambientes distintos e avaliar a dinâmica populacional de possíveis animais-reservatório considerando a influência de parâmetros ecológicos com a infecção por Hantavírus na região Nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. Para tanto, de junho de 2008 a julho de 2009, capturaram-se pequenos mamíferos silvestres vivendo em 4 ambientes: áreas com vegetações nativas de cerrado e floresta semidecidual atlântica e vegetações modificada por culturas de cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) e capim braquiária (*Brachiaria decumbens*), nos Municípios de Batatais, Cajuru e Luis Antônio. Pequenos mamíferos foram capturados vivos em duas grades de 100 armadilhas *Sherman's*, colocadas em intervalos de 10-m, por 2–3 noites consecutivas. As grades foram separadas por pelo menos 800-m para representação individual da população. Também, foi feita uma linha para sacrifício com 100 armadilhas *Sherman's* dispostas 5-10-m, uma da outra, para coleta de órgãos dos animais capturados. Os animais capturados foram identificados pelos caracteres morfológicos, marcados para recaptura, quando das grades, e tiveram sangue total coletado pelo seio retro-orbital. Anticorpos IgG para Hantavírus foram detectados por ELISA indireto utilizando a proteína N recombinante do Hantavírus Araraquara. Amostras de tecido de três roedores infectados foram utilizadas para o isolamento viral. Durante esse período 568 animais foram capturados, com um sucesso de captura de 4,8 %. Os roedores silvestres mais encontrados foram: *Necromys lasiurus* (212), *Akodon* sp (151) e *Calomys tener* (103). Houve uma diferença significativa entre os ambientes estudados quanto à abundância de animais, mas não em termos de biodiversidade das espécies. A soropositividade para Hantavírus nos roedores silvestres foi de 6.3 % e encontrou-se, apenas, o vírus Araraquara infectando os animais. Observou-se maior abundância de roedores silvestres e também, mais alta soropositividade no ambiente de capim braquiária, mostrando-se este um fator de risco para infecção por Hantavírus nestes animais e no homem. A abundância de roedores e a infecção por Hantavírus nos animais mostraram tendência sazonal, com elevação na estação seca, de abril a setembro. Também, a taxa de infecção por Hantavírus mostrou-se maior em animais adultos e subadultos que em juvenis. Ainda, identificou-se um provável *spillover* do Hantavírus Araraquara, a partir de seu reservatório *N. lasiurus* para *C. tener* e possivelmente, *A. montensis* e *Rhipidomys* sp. Desta forma, sugerimos que a degradação do ambiente e a perda da diversidade biológica são fatores de risco à infecção por Hantavírus nos roedores *Sigmodontinae* podendo ocasionar fenômenos de *spillover* na região estudada.

Palavras-chave: Hantavírus Araraquara, abundância, biodiversidade, pequenos mamíferos, roedores-reservatório, *spillover*.

ABSTRACT

Gilberto Sabino-Santos Jr. **Detection of hantavirus in wild rodents and study on its populations dynamics in the Northeastern region of São Paulo State, Brazil.** Master's thesis. Center for Virological Research, School of Medicine in Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, 119 p., 2010.

Hantaviruses, family *Bunyaviridae*, are predominantly rodent-borne pathogens. Within natural reservoir hosts, hantaviruses do not cause obvious pathogenic effects; transmission to humans, however, can lead to hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Eurasia and hantavirus cardiopulmonary syndrome (HCPS) in the American continent. In South America hantaviruses are associated with rodent hosts of the subfamily *Sigmodontinae* (family *Cricetidae*). Our goal in this study was to detect hantavirus infection in wild small mammals in four different habitats and to assess the dynamics fluctuation, as well as ecological patterns in its natural reservoirs associated with hantavirus infection in the northeastern region of São Paulo State, Brazil. Captures were conducted during 13 months, from June 2008 to July 2009, in four different environments: native vegetation of *cerrado* and semideciduous atlantic forest, and in exotic vegetation of grassland (*Brachiaria decumbes*) and sugar cane (*Saccharum officinarum*) at the counties of Batatais, Cajuru and Luis Antônio. Small mammals were live-trapped in 2 grids of 100 Sherman's traps each, placed at 10-m intervals, for 2–3 consecutive nights. Grids were separated by at least 800 m to represent individual populations. At least 800 m from the grids a trap line were done with 100 Sherman's, placed 5 to 10-m intervals, to collect animals organs for viral isolation and carcasses for further morphological identification. Captured animals were identified by morphological features, marked for recapture and had blood collected by retro-orbital sinus. IgG antibodies to hantavirus were detected by indirect ELISA using as antigen a N recombinant protein of Araraquara hantavirus. Tissue samples from three wild rodents were used for viral isolation. During the study period 568 small mammals were captured, with a trap success ratio of 4.8 %. The most abundant animals were *Sigmodontinae* rodents as follow: *Necromys lasiurus* (212), *Akodon* sp (151), and *Calomys tener* (103). There was a significant difference in abundance but not in diversity of species among the habitats. Seropositivities in all captured animals were 6.3 %, and only Araraquara hantavirus was detected. In grassland was noted even high abundance as seropositivities, which may characterize this habitat as a risk factor for hantavirus infection in wild rodents and humans. Seasonal preference was noted for abundance and hantavirus infection from April to September, dry season. Regarding age there was a significant difference with more subadults and adults rodents infected than young rodents. We also could detect a possible spillover of Araraquara hantavirus from its natural reservoir *N. lasiurus* to *C. tener* and probably to *A. montensis* or *Rhipidomys* sp. Thus, our results suggest that environmental degradation and loss of biodiversity may be a risk factor for hantavirus infection in wild rodents *Sigmodontinae* and it may be causing a spillover phenomenon in the study region.

Key-words: Araraquara hantavirus, abundance, biodiversity, small mammals, rodents-reservoir, spillover.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Hantavírus descritos no Brasil e seus respectivos hospedeiros naturais.....	30
Figura 2. Morfologia dos <i>Bunyaviridae</i>	31
Figura 3. Ciclo de replicação dos Hantavírus	34
Figura 4. Distribuição geográfica da subfamília <i>Sigmodontinae</i>	41
Figura 5. <i>Necromys lasiurus</i> e distribuição geográfica de <i>N. lasiurus</i> e <i>N. urichi</i>	42
Figura 6. Dieta de roedores <i>Sigmodontinae</i>	45
Figura 7. Mapa localizando os sítios de captura dos pequenos mamíferos nos municípios da região Nordeste do Estado de São Paulo, Brasil, microrregião de Ribeirão Preto	53
Figura 8. Vegetações distintas observadas nos sítios de captura dos pequenos mamíferos.	54
Figura 9. Esquema mostrando a disposição das armadilhas (letra X) utilizadas para a captura de roedores no campo	57
Figura 10. Captura, processamento e liberação de pequenos mamíferos capturados.	60-61
Figura 11. Microplaca de ELISA contendo proteína N recombinante de ARAV como antígeno	64
Figura 12. Sucesso de captura e biodiversidade de pequenos mamíferos capturados ao longo dos meses de estudo	74
Figura 13. Número de pequenos mamíferos capturados segundo a espécie	76
Figura 14. Características morfológicas externas do roedor <i>Sigmodontinae Rhipidomys</i> sp.....	78
Figura 15. Eletroforese em gel de agarose corado com <i>GelRed</i> sob luz UV, mostrando <i>amplicons</i> de 1140 pb oriundos da amplificação por PCR de gene do <i>cyt b</i> de diferentes espécies de roedores silvestres.....	81
Figura 16. Número de animais capturados (em barras) e soropositividade para Hantavírus (em losangos)	84
Figura 17. Resultado da RT-PCR em gel de agarose corado com <i>GelRed</i> , sob luz UV, exibindo <i>amplicons</i> dos segmentos genômicos M (gene Gn) e S (gene N) de Hantavírus oriundos do sangue de roedores.....	85
Figura 18. Imagem à microscopia de lâminas de imunofluorescência e resultado de RT-PCR em foto de gel de agarose a 1,8 %, corado com brometo de etídio, sob luz UV, mostrando: na coluna 1 – marcador escada de 100 pb; nas colunas 2 e 3 – cultura	

celular não infectada, como controle negativo; na coluna 4 –*amplicon* do gene Gn de Hantavirus, com ~ 324 pb; na coluna 5 - *amplicon* do gene N de Hantavírus com ~ 264 pb. Estes 2 amplicons foram obtidos do Hantavírus isolado do tecido pulmonar de *C. tener*. Na coluna 6, observa-se *amplicon* do gene Gn de Hantavírus, com ~ 324 pb; na coluna 7 observa-se *amplicon* do gene N de Hantavírus, com ~ 264 pb. Estes 2 últimos *amplicons* foram obtidos de culturas celulares infectadas com vírus Rio Mamoré, usado como controle positivo **87**

Figura 19. Árvore gerada pelo método de *neighbor-joining*, modelo (HKY+IG), conforme selecionado pelo hLRT em programa Modeltest 3.7., com distribuição gamma (G) de 0,7149 e de proporção de sítios invariáveis (I) de 0,3231. O alinhamento e a edição de nucleotídeos foram conduzidos utilizando programas Clustal W em Mega 4.0. As setas mostram as seqüências do segmento S do Hantavírus Araraquara isoladas como parte deste trabalho, de duas espécies de roedores, *Necromys lasiurus* (R 11) e *Calomys tener* (R 147). Também, contém seqüências referentes ao gene N de outros Hantavírus depositadas no *GenBank* **88**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição de idade dos roedores e do marsupial <i>G. agilis</i> capturados com base na massa corpórea	58
Tabela2. <i>Primers</i> utilizados na RT-PCR para Hantavírus.....	65
Tabela 3. <i>Primers</i> utilizados na PCR para amplificação do gene do citocromo b e para seqüenciamento nucleotídico.....	70
Tabela 4. Pequenos mamíferos capturados segundo cada ambiente	77
Tabela 5. Resultado do <i>BLASTn</i> como identificação molecular de roedores <i>Sigmodontinae</i>	80
Tabela 6. Soropositividade para Hantavírus entre os roedores capturados	82
Tabela 7. Distribuição dos animais capturados e soropositividade para hantavírus em cada época do ano, segundo gênero e idade	83
Tabela 8. Abundância de roedores capturados segundo o <i>habitat</i> destes animais e soropositividade para Hantavírus.....	84

LISTA DE SIGLAS

ANDV	–	Vírus Andes
ANJV	–	Vírus Anajatuba
ARAV	–	Vírus Araraquara
BAYV	–	Vírus Bayou
BCCV	–	Vírus Black Creek Canal
BLAST	–	Basic local alignment search tool
BMJV	–	Vírus Bermejo
CASV	–	Vírus Castelo dos Sonhos
cDNA	–	DNA complementar
CDV	–	Vírus Caño Delgadito
CETEA	–	Comissão de Ética em Experimentação Animal
DAF	–	Fator acelerador do decaimento
DNA	–	Ácido desoxirribonucléico
DO	–	Densidade Ótica
DOBV	–	Vírus Dobrava
ELISA	–	Ensaio Imunoenzimático
EMCV	–	Vírus El Moro Canyon
FHSR	–	Febre Hemorrágica com Síndrome Renal
HEPA	–	High Efficient Particulate Air
HTNV	–	Vírus Hantaan
IBAMA	–	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
IBGE	–	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFA	–	Ensaio de Imunofluorescência
IFN-γ	–	Interferon gamma
IL-1β	–	Interleucina 1 beta
IL-6	–	Interleucina 6
JABV	–	Vírus Jabora
JUQV	–	Vírus Juquitiba
LECV	–	Vírus Lechiguanas
LMCV	–	Vírus Limestone Canyon
LNV	–	Vírus Laguna Negra
MACV	–	Vírus Maciel
MAPV	–	Vírus Maporal
MIAF	–	Fluído Ascítico Murino
MULV	–	Vírus Mule Shoe
NBS-3	–	Nível de segurança 3
NE	–	Nefropatia Epidêmica
NJ	–	Neighbor Joining
NK	–	Células natural killers
NOS-2	–	Óxido nítrico sintase 2
NYV	–	Vírus New York
ORNV	–	Vírus Oran
PBS	–	Tampão Fosfato Salino
PBST	–	Tampão Fosfato Salino com Tween 20
PCR	–	Reação da Polimerase em Cadeia
PRGV	–	Vírus Pergamino

PRNT	–	Teste de neutralização por redução de placa
PUUV	–	Vírus Puumala
RdPd	–	RNA polimerase dependente de RNA
RER	–	Retículo endoplasmático rugoso
RIMEV	–	Vírus Rio Mearim
RIOSV	–	Vírus Rio Segundo
RMV	–	Vírus Rio Mamoré
RNA	–	Ácido Ribonucléico
RT	–	Transcriptase Reversa
SEOV	–	Vírus Seoul
SNV	–	Vírus Sin Nombre
SPCVH	–	Síndrome Pulmonar e Cardiovascular por Hantavírus
TGF-β	–	Fator de crescimento beta
TNF-α	–	Fator de necrose tumoral alfa
UV	–	Ultravioleta
WB	–	Western Blot

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
1.1. Histórico.....	27
1.2. Características morfológicas.....	30
1.3. Ciclo Replicativo.....	31
1.4. Imunopatogênese.....	35
1.5. Diagnóstico Laboratorial.....	37
1.6. Roedores-reservatório naturais de Hantavírus americanos	38
1.6.1. História evolutiva.....	39
1.6.2. Distribuição.....	40
1.6.3. Características físicas dos Sigmodontinae.....	42
1.6.4. Habitat, comportamento e dieta dos Sigmodontinae	43
1.6.5. Ciclo reprodutivo dos Sigmodontinae	45
1.7. Importância dos Sigmodontinae para o homem.....	46
2. OBJETIVOS	49
2.1. Objetivo Geral.....	50
2.2. Objetivos Específicos	50
3. MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1. Atividades de campo	52
3.1.1. Locais de Estudo	52
3.1.3. Captura e recaptura de pequenos mamíferos para estudo populacional ...	55
3.1.4. Captura de animais para isolamento de Hantavírus	59
3.2. Atividades em laboratório	62
3.2.1. ELISA para detecção de anticorpos da classe IgG contra Hantavírus.....	62
3.2.2. Detecção do genoma de Hantavírus em pequenos mamíferos por RT-PCR	64
3.2.3. Isolamento viral	66
3.2.4. Teste de imunofluorescência indireta (IFA)	67
3.2.5. Análises filogenéticas	67
3.2.6. Identificação genética das espécies de roedores capturados.....	68
3.3. Análises Estatísticas	71
4. RESULTADOS	72
4.1. Captura de pequenos mamíferos	73
4.1.1. Sucesso de captura e recaptura de pequenos mamíferos	73
4.1.2. Abundância e diversidade das espécies de pequenos mamíferos capturados	74
4.2. Níveis de anticorpos para Hantavírus entre os roedores capturados.....	82
4.3. Detecção de Hantavírus por RT-PCR	85
4.4. Isolamento viral	86
4. DISCUSSÃO	90
5. CONCLUSÃO	99
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
7. ANEXOS	114

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

A infecção por Hantavírus em seres humanos, de acordo com relatos históricos, parece ser mais antiga do que se conhece, embora seja considerada emergente, desde o reconhecimento de seu patógeno há aproximadamente 32 anos (Lee et al 1978). Segundo Vapalahti et al (2003), há 900 anos, os chineses descreviam uma doença similar à febre hemorrágica com síndrome renal (FHSR). Entretanto, foi só no século passado que dois grandes surtos direcionaram os pesquisadores à descoberta dos Hantavírus no Velho e Novo Mundo. O primeiro destes surtos ocorreu de 1950 a 1953, durante a guerra da Coreia. Nesta ocasião, soldados norte-americanos adoeceram com uma febre hemorrágica, hoje reconhecida como a FHSR. O agente etiológico dessa doença, portanto, permaneceu desconhecido até a detecção por Lee et al (1976), em tecidos pulmonares de roedor silvestre *Apodemus agrarius*, capturado próximo ao rio Hantaan, de antígenos específicos de um vírus, posteriormente reconhecido como o vírus Hantaan (HTNV), que reagem com soros de pacientes com FHSR. Esta descoberta foi de grande importância para o reconhecimento de doenças similares à FHSR por toda a Ásia e também Europa, onde ocorria uma doença denominada Nefropatia Epidêmica (NE) e que também foi associada a estes novos vírus, os Hantavírus. O outro surto aconteceu em 1993, no continente Americano, quando foram detectados casos de grave pneumonia, com alta letalidade, na região de *Four Corners* nos Estados Unidos. Nesta ocasião descobriram tratar-se da Síndrome Pulmonar e Cardiovascular (SPCVH), uma doença nova, causada por Hantavírus de roedores silvestres americanos (Jonsson et al 2010, Vapalahti et al 2003).

Antes do reconhecimento da SPCVH, em 1984, descreveu-se um Hantavírus nos Estados Unidos, o Prospect Hill. Entretanto, este, isolado de roedores *Microtus pennsylvanicus*, não foi associado à infecção humana (Yanagihara et al 1987, Tsai et al 1985). Os avanços da biologia molecular e o conhecimento prévio do agente causador da FHSR contribuíram para que, em 1993, fosse caracterizado, mais rapidamente, o agente etiológico da SPCVH. Foi o Hantavírus Sin Nombre (SNV) associado ao roedor-hospedeiro *Peromyscus maniculatus*.

Já foram descritos mais de 50 Hantavírus no mundo e destes 21 mostraram-se causadores de doença humana, FHSR no Velho Mundo ou SPCVH no Novo Mundo.

Os Hantavírus conhecidos são associados a roedores hospedeiros ou a pequenos mamíferos insetívoros, os musaranhos (ver Anexo III) (Jonsson et al 2010, Olsson et al 2010).

No Brasil, assim que foi reconhecido o potencial dos Hantavírus de se disseminarem pelo mundo iniciaram-se pesquisas sobre esses vírus. Nos anos 80s, buscas por roedores infectados tiveram início no Brasil e outros países da América do Sul. Capturas de roedores urbanos e peri-urbanos ocorreram em cidades portuárias e na ocasião, descreveu-se o isolamento, realizado nos Estados Unidos, de um hantavírus similar ao vírus Seoul (SEOV) oriundo de um rato urbano, *Rattus norvegicus*, capturado na cidade de Belém no Pará (Le Duc et al 1985). Sabe-se que este vírus não relaciona-se a FHSR ou SPCVH. Na mesma ocasião detectaram-se anticorpos contra HTNV em roedores das cidades de Recife – PE, Belém – PA e São Paulo – SP. Entre 1986 e 1990 um estudo foi conduzido, no sul e sudeste brasileiro, pesquisando níveis de anticorpos contra Hantavírus por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando, como antígeno, Hantavírus do Velho Mundo (HTNV, SEOV e Puumala - PUUV). Na ocasião, analisaram-se 1063 soros de indivíduos que referiam contato com roedores urbanos, silvestres e pequenos mamíferos, tendo sido observados anticorpos contra Hantavírus em 32 pessoas (Iversson et al 1994). Em 1993, observou-se que casos suspeitos de leptospirose na cidade de Recife – PE, apresentavam anticorpos para Hantavírus do Velho Mundo (Hindrichsen et al 1993). Ainda, em 1993, seguindo-se à descrição inicial da SPCVH e dos Hantavírus americanos, diagnosticaram-se os três primeiros casos fatais da doença no Brasil. Eram três moradores de Jujutiba, SP, e esse novo Hantavírus, foi denominado vírus Jujutiba (JUQV) (Da Silva et al 1997, Vasconcelos et al 1997). Johnson et al 1999, descreveram outros Hantavírus com base na amplificação parcial de seus seguimentos genômicos por RT-PCR, a partir de materiais clínicos encaminhados aos Estados Unidos para diagnóstico. Estes foram o vírus Castelo dos Sonhos (CASV) obtido de um paciente da vila de Castelo dos Sonhos-PA, atendido em 1995 e o vírus Araraquara (ARAV) a partir de dois casos ocorridos em 1996 nos municípios de Araraquara e Franca - SP. Dois casos fatais de SPCVH, em agricultores do município de Guariba-SP, foram descritos em por Figueiredo et al (1999). Estes casos foram diagnosticados por ELISA e por RT-PCR, tendo sido possível implicar o ARAV

como agente infectante. Contudo, somente em 2004, divulgou-se o reservatório natural de ARAV, com base em capturas de roedores silvestres no campo. Tratava-se do roedor *Necromys lasiurus* da família *Cricetidae*, subfamília *Sigmodontinae* (Suzuki et al 2004).

Conhecem-se, até o momento, sete Hantavírus no Brasil, sendo cinco deles associados à SPCVH: o vírus Anajatuba (ANAV), ARAV, CASV, JUQV e o vírus Laguna Negra-símile (LNV) (Figura 1). Quanto ao ARAV, este ocorre nas regiões de cerrado do sudeste e planalto central brasileiro, sendo considerado o Hantavírus mais virulento do Brasil e possivelmente do mundo, pois causa 50% de letalidade nos pacientes com SPCVH (Figueiredo et al 2009a, Raboni et al 2009, Rosa 2008).

De 1993 até 2009, no Brasil, foram notificados 1195 casos de SPCVH no país com 40% de letalidade. Os estados do sul e sudeste juntos abrigam o maior número de casos, 413 e 311 respectivamente. O estado de Minas Gerais apresentou o maior índice de casos (194), seguido por Santa Catarina (187), Paraná (166), Mato Grosso (136), São Paulo (117), Rio Grande do Sul (60), Distrito Federal (55), Pará (45), Goiás (31), Maranhão (9), Rio Grande do Norte (2) e Bahia (1) (Ministério da Saúde, 2009).

Hantavírus circulantes no Brasil e seus roedores hospedeiros:

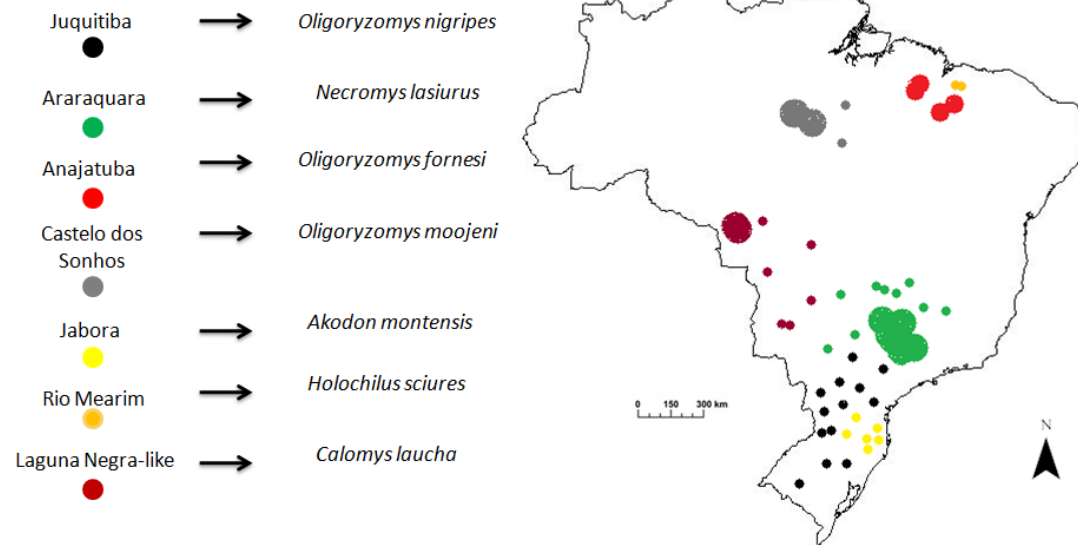


Figura 1. Hantavírus descritos no Brasil e seus respectivos hospedeiros naturais. Na legenda, à esquerda e no mapa, cada círculo refere-se a um Hantavírus e representam 10 casos de SPCVH para hantavírus patogênicos e 10 roedores infectados para hantavírus não patogênicos. ● Refere-se ao Hantavírus Juquitiba (JUQV) e seu roedor-reservatório *Oligoryzomys nigripes*. ● Hantavírus Araraquara (ARAV) associado ao reservatório natural *Necromys lasiurus*. ● Vírus Anajatuba (ANJV) e seu reservatório *Oligoryzomys fornesi*. ● Hantavírus Castelo dos Sonhos (CASV) associado ao *O. moojeni*. ● Hantavírus Jabora (JABV) associado ao *Akodon montensis* e não relacionado com SPCVH. ● Rio Mearim (RIMEV) e seu reservatório o *Holochilus sciures*, não associado a SPCVH. ● Vírus Laguna Negra-símile (LNV) associado ao roedor *Calomys laucha* (Raboni et al 2009, Figueiredo et al 2009a, Rosa et al 2008).

1.2. Características morfológicas

Os *Hantavirus* compõem um gênero da família *Bunyaviridae*. São vírus envelopados, pleomórficos de 80 a 120 nm de diâmetro, que possuem genoma de 11,8 Kb como os *Hantavirus* do Velho Mundo, por exemplo, o HTNV, e 12,3 Kb como os do Novo Mundo, por exemplo, SNV. O genoma viral consiste de três segmentos de RNA com polaridade negativa designados: grande (L), médio (M) e pequeno (S). O segmento L codifica a RNA polimerase dependente de RNA viral (RdRp), o segmento M, uma glicoproteína amino-terminal (Gn), carboxi-terminal (Gc), bem como, uma proteína não estrutural denominada NSm, e o segmento S, a proteína N do nucleocapsídeo. (Schmaljohn et al 2007) (Figura 2).

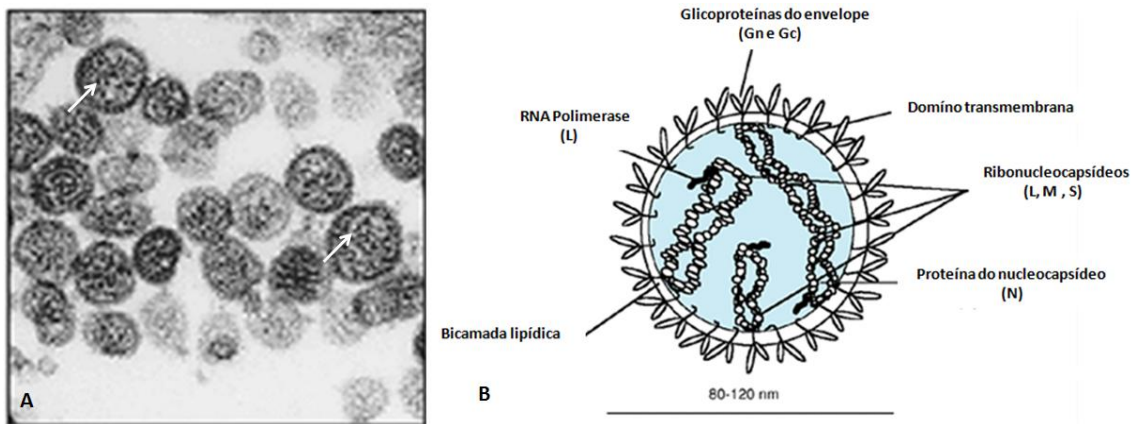


Figura 2. Morfologia dos *Bunyaviridae* em **A** e **B**. **A.** Eletromicrografia fixada com glutaraldeído, evidenciando partículas do Hantavírus Hantaan. As glicoproteínas do envelope formam padrão semelhante a várias grades juntas. As setas mostram ranhuras produzidas, provavelmente, à conformação das ribonucleoproteínas virais. **B.** Os três segmentos genômicos de RNA (S, M e L) encontram-se complexados com a nucleoproteína N formando as ribonucleoproteínas virais. Estas ribonucleoproteínas estão contidas em um envelope de bicamada lipídica que contém as glicoproteínas transmembrana Gn e Gc (Adaptado de Schmaljohn et al 2007).

1.3. Ciclo Replicativo

Os Hantavírus infectam células endoteliais, epiteliais, macrófagos, células dendríticas foliculares e linfócitos após ligação das glicoproteínas virais a receptores da superfície celular (Mackow et al 2001) (Figura 3). Os receptores da superfície celular são integrinas (Gavrilovskaya et al 1999a, 1999b, 1998). O uso de $\beta 3$ integrinas é próprio de Hantavírus patogênicos, causadores de FHSR e SPCVH, e o uso de $\beta 1$ integrinas é próprio de Hantavírus não patogênicos (Larson et al 2005, Gavrilovskaya et al 2001). Contudo, estes receptores parecem não serem os únicos, visto que células sem $\beta 3$ integrina são permissivas à entrada de alguns Hantavírus (Mou et al 2006, Song et al 2005). O pré-tratamento de células com anticorpos específicos para o fator acelerador do decaimento (DAF/CD55) bloqueia a adsorção de Hantavírus do Velho Mundo como o HTNV, sugerindo que CD55 possa ser um co-fator para a infecção (Krautkramer et al 2008).

Os Hantavírus utilizam ambas as glicoproteínas, Gn e Gc, como ligantes às células hospedeiras. Porém, Gc parece ser mais importante, visto que sua ausência impossibilita a infecção. Isso sugere que Gn, talvez, se ligue a um co-receptor,

provavelmente CD55 e a adsorção do vírus à célula seja mediada, principalmente, por Gc (Plassmeyer et al 2005). A entrada dos HTNV na célula foi demonstrada ser mediada por proteína clatrina (Figura 3), seguida do direcionamento para o endossoma primário e subsequente entrega a endossoma tardio ou lisossomas (Jin et al 2002). Presume-se que a acidificação da vesícula endossomal promova mudança conformacional de Gn ou Gc, facilitando a fusão do envelope viral à membrana endossomal. Em seguida, o genoma viral envolto pela nucleoproteína (N), que o protege da ação de RNases, seja liberado para o citoplasma da célula infectada (Schmaljohn et al 2007). Uma vez presente, o genoma viral, no citoplasma, este sofre ação da polimerase de RNA viral, iniciando a transcrição primária dos RNAs mensageiros referentes aos segmentos S, M e L. Para tanto, é requerido um iniciador presente nos RNAs mensageiros da célula, as sequências *Cap*. A polimerase de RNA viral captura estas sequências *Cap* após promover sua clivagem e as incorporam aos seus próprios RNAs mensageiros. Isto resulta em RNAs mensageiros virais acrescidos de 10 a 20 nucleotídeos, os quais não são encontrados no RNA molde viral (Panganiban et al 2009, Mir et al 2008). Mecanismos controladores da polimerase de RNA viral que permitem à mesma interromper a transcrição e começar a replicação do RNA viral são pouco conhecidos. Entretanto, sabe-se que a síntese de N é requerida para a replicação do genoma viral, bem como para o tráfico intracelular das proteínas e montagem do *virion*. Presume-se que N funcione como chaperona de RNA pelo constante desenovelamento e enovelamento do RNA viral, facilitando a interação deste com a polimerase de RNA (Jonsson et al 2001, Betenbaugh et al 1995). É sabido que N é a proteína mais sintetizada durante o processo replicativo viral e estudos recentes, sugerem que ela interaja modulando a resposta imune do hospedeiro contra a infecção (Taylor 2009).

A tradução de transcritos dos segmentos S e L ocorre em agrupamentos polirribossomais livres no citoplasma, enquanto que os transcritos do segmento M, acontecem em ribossomos associados à membrana do retículo endoplasmático (RER) (Figura 3). A NSm é sintetizada e liberada no citoplasma sendo importada para o núcleo, onde irá atuar, principalmente, inibindo fatores de transcrição para os genes do tipo interferon. Os precursores das glicoproteínas são processados proteoliticamente em

Gn e Gc durante o transporte no RER (Ramanathan et al 2008, 2007). Ainda no RER as glicoproteínas são glicosiladas e transportadas ao complexo de Golgi onde dois processos são descritos. Para os Hantavírus do Velho Mundo, a montagem viral acontece diretamente no complexo de Golgi. Para os Hantavírus do Novo Mundo, as glicoproteínas são ancoradas na superfície da membrana plasmática da célula infectada onde ocorreria a montagem e saída das novas partículas virais mediadas por microfilamentos de actina (Ravkov et al 2001, 1998, 1997).

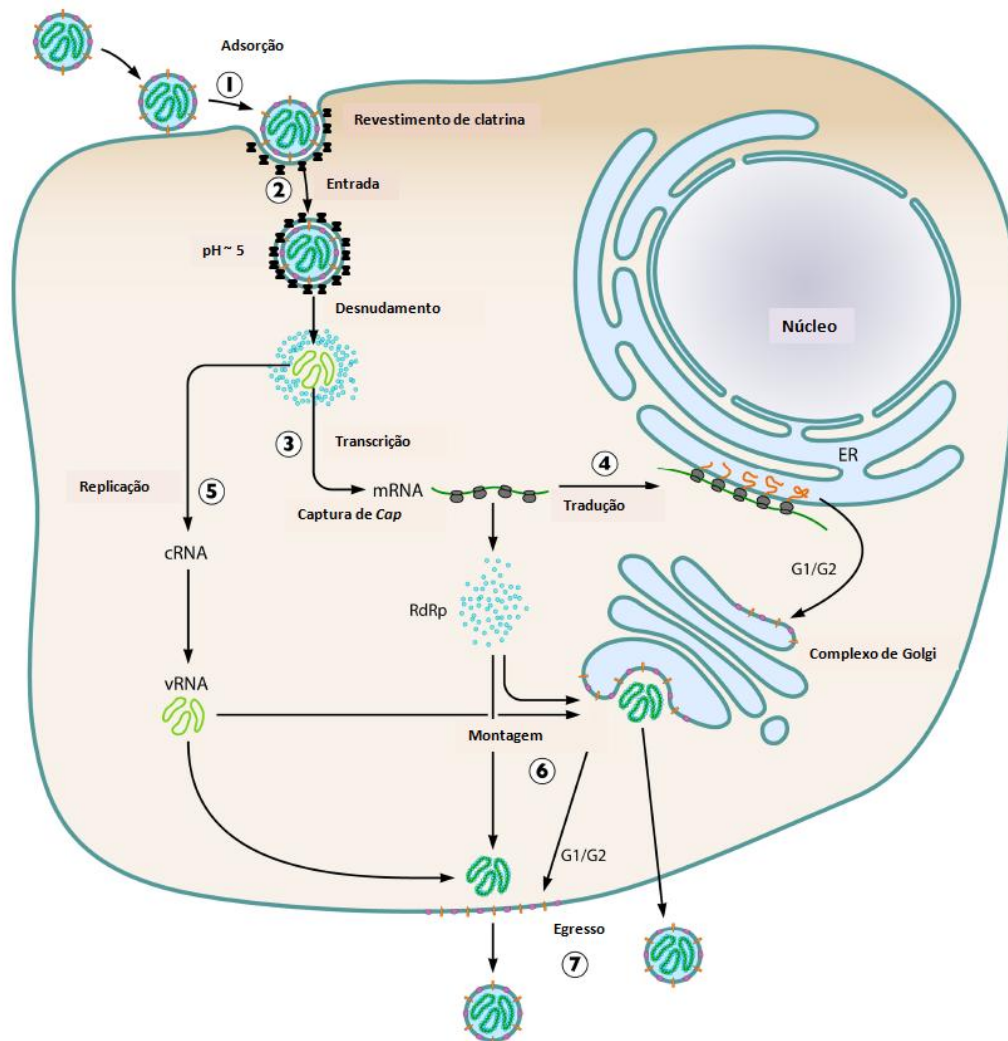


Figura 3. Ciclo de replicação dos Hantavírus. (1) Inicia-se o processo, com a ligação dos receptores β integrinas e co-receptores CD55 às glicoproteínas Gc e Gn respectivamente; (2) a entrada viral depende de clatrina, formando-se o endossoma primário que ao ser acidificado (pH 5) como endossoma tardio permite a fusão do envelope viral à membrana endossômica com internalização e desnudamento do genoma no citoplasma; (3) ocorre captura de sequências *Cap* dos RNAs mensageiros celulares pela polimerase de RNA formando-se os RNAs mensageiros virais; (4) a tradução dos transcritos dos segmentos S e L ocorre em agrupamentos polirribossomais no citosol e a dos transcritos de segmento M, Gn e Gc, em ribossomos associados ao RER; (5) a replicação do genoma viral é dependente da síntese de N que emite sinal para a polimerase de RNA viral mudar da síntese de RNAs mensageiros à de RNAs complementares e síntese dos genomas da progênie; (6) a montagem das novas partículas virais acontece no complexo de Golgi para Hantavírus do Velho Mundo e na membrana plasmática contendo glicoproteínas previamente ancoradas, para os Hantavírus do Novo Mundo; (7) saída das novas partículas mediado por microfilamentos de actina (adaptado de Jonsson et al 2010).

1.4. Imunopatogênese

Os Hantavírus são disseminados por aerossóis de excretas de pequenos mamíferos e a principal via de transmissão ao homem ocorre pela inalação de partículas pelo trato respiratório, ou contato direto de sangue ou saliva de animais infectados com uma mucosa ou ferimento. Entretanto, a transmissão homem a homem foi descrita na Argentina e no Chile (Machado et al 2009, Schönrich et al 2008).

O período de incubação da SPCVH varia de 3 a 33 dias, em média 14 a 17 dias. A doença caracteriza-se por pneumonia intersticial que evolui com extravasamento capilar e edema pulmonar, resultando em insuficiência respiratória. A dispnéia leva o paciente a procurar assistência médica, tipicamente, entre o terceiro e o quarto dia de doença. Este quadro é agravado com o choque cardiogênico que costuma acompanhar o acometimento pulmonar (Borges et al 2008b, 2007, 2006). Os pacientes costumam apresentar quadro clínico muito grave e freqüentemente, necessitam internação em unidade de terapia intensiva. Observam-se no hemograma de pacientes com SPCVH a hemoconcentração, resultante do extravasamento capilar, a plaquetopenia e uma linfomonocitose com predomínio de células monócito-símiles. Exames radiológicos de tórax destes pacientes costumam exibir infiltrados intersticiais bilaterais difusos que progridem rapidamente para consolidações alveolares paralelamente à piora do quadro clínico. O óbito ocorre em, aproximadamente, 40% dos casos, sobretudo, em decorrência de choque cardiogênico (Saggiaro et al 2007).

O quadro clínico pulmonar associado à hemoconcentração e, em alguns casos, à presença de derrames pleurais, sugere que a SPCVH produza uma síndrome de extravasamento capilar específica do leito vascular pulmonar acometendo interstício e alvéolos. As células endoteliais não são lisadas pelos Hantavírus, embora células do sistema imune sejam recrutadas para o endotélio infectado (Borges et al 2008b). Verificou-se um predomínio de macrófagos produtores de TNF- α no interstício miocárdico de casos fatais por SPCVH e um importante afluxo de linfócitos T CD8⁺ ativados. O grande número de células *natural killers* (NK) encontradas no miocárdio de pacientes com SPCVH, caracterizam uma miocardite (Borges et al 2008^a, Saggiaro et al 2007). Finalmente, analisando sangue periférico de pacientes com SPCVH, por citometria de fluxo, observou-se uma predominância de linfócitos T CD8⁺ vírus-

específicos, que expressam CD38⁺. O excesso de TNF- α , IFN-gamma e IL-6 produzido por estas células T ativadas é, provavelmente, crítico na patogênese da SPCVH, levando à falência respiratória conseqüente ao extravasamento capilar em leito vascular pulmonar. Desta forma, a gravidade da doença pode ser conseqüência de uma intensa resposta de células T CD8⁺ e Th₁ nos pulmões (Borges et al 2008a, 2007, 2006). Observou-se que citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 desempenham papel importante na gravidade da SPCVH, podendo assim, sugerir, talvez, um possível envolvimento de células do padrão Th₁₇ (Borges et al 2008a). Observou-se envolvimento tanto de células ligada à resposta imune tipo Th₁ como à Th₂ e é possível que as citocinas secretadas pelas células Th₁ estejam associadas a um mau prognóstico da doença. Observou-se nos casos de SPCVH uma redução da citocina TGF- β , sugerindo atividade de células T reguladoras deficientes e, portanto, um processo inflamatório fora de controle e com tempestade de citocinas (Borges et al 2008a). Recentemente, observou-se que o alelo TNF-308G/A, associado à aumentada produção de TNF- α , é mais freqüente em casos fatais da SPCVH (Borges et al 2010). Portanto, a pneumonite intersticial, o edema pulmonar e o choque cardiogênico, que caracterizam a SPCVH, ocorrem, principalmente, por ativação exacerbada da resposta imune, especialmente desencadeada por linfócitos Th₁, T CD8⁺ e macrófagos e suas citocinas inflamatórias. Embora as células endoteliais, alvos da infecção viral, produzam uma resposta antiviral de interferon, muitos Hantavírus podem inibir ou retardar ativamente tais respostas provavelmente através da NSm, codificada pelo segmento M. Além disso, os Hantavírus exercem efeito inibidor sobre receptores celulares responsáveis pela manutenção da integridade capilar. E inversamente, anticorpos neutralizantes contra Hantavírus parecem exercer efeito protetor contra as formas graves da doença (Tischler et al 2008, Figueiredo 2006, 2004, Figueiredo et al 2001).

Em seus reservatórios naturais, os Hantavírus não costumam causar qualquer doença aparente, porém observou-se que alguns roedores finlandeses infectados com PUUV tinham dificuldade em sobreviver ao inverno rigoroso (Kallio et al 2007). Roedores *Peromyscus maniculatus* machos infectados com o SNV apresentam menor taxa de reprodução (Calisher et al 2005). Nos roedores, observaram-se células T reguladoras que desempenhariam papel limitador da extensão e gravidade da infecção

nos animais-reservatório. As células T reguladoras, explicariam a infecção persistente nesses animais, uma vez que linfócitos efetores, capazes de eliminar vírus e relacionar-se a respostas imunes exacerbadas e doença grave, estariam sob controle das T reguladoras. Citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e NOS 2 mostraram-se reduzidas durante a infecção pulmonar de roedores silvestres. A produção de citocinas anti-virais como interferons parecem estar sendo inibidas pela NSm, proteína não estrutural codificada pelo segmento M (Easterbrook et al 2008, Schountz et al 2007).

1.5. Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico da infecção por Hantavírus nos soros de pacientes suspeitos é realizado, principalmente, na detecção de anticorpos IgM e IgG contra o vírus, utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA). No Centro de Pesquisa em Virologia FMRP-USP, utiliza-se como antígeno do ELISA a proteína N recombinante de ARAV e o teste é realizado segundo Figueiredo et al (2009^b, 2008). Para confirmação da infecção, podem ser utilizados testes de imunofluorescência indireta (IFA) em células de rim de macaco verde africano (VERO E-6) infectadas, testes de neutralização por redução de placa (PRNT) ou *Western Blot* (WB) (Machado et al 2009, Figueiredo et al 2006, 2004, 2001, Padula et al 2000). Os anticorpos da classe IgM contra Hantavírus costumam aparecer desde o primeiro dia de doença e podem ser detectados até cerca de sessenta dias após a infecção. Quando não é possível definir o diagnóstico pela sorologia, em amostra única, detectando IgM, recomenda-se a coleta de uma segunda amostra, com intervalo de duas semanas após a coleta da primeira. Neste caso, havendo soroconversão de anticorpos, IgM ou IgG, esta amostra é considerada positiva (Rosa 2008).

Ainda, para diagnóstico das infecções por Hantavírus, faz-se a detecção do genoma viral por técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia mediada pela polimerase (RT-PCR) utilizando iniciadores (*primers*) adequados que amplificam os genes da nucleoproteína ou das glicoproteínas Gn e Gc. Esta técnica tem possibilitado a caracterização genética dos Hantavírus através do seqüenciamento nucleotídico dos produtos amplificados (*amplicons*) (Rosa 2008, Moreli et al 2004, Nichol et al 1993). A RT-PCR, além de ser mais específica que as técnicas sorológicas de ELISA e outras, é

também mais rápida. Contudo, seu sucesso está associado à coleta precoce da amostra, nos primeiros 10 dias de doença e à preservação da mesma, a -70°C .

O isolamento viral em culturas de células VERO-E6 é uma técnica que toma cerca de 4 meses e é muito laboriosa, requerendo pessoal treinado, pois deve ser realizada em laboratório de segurança nível 3 (NBS-3). Portanto, o isolamento viral não se mostra adequado ao diagnóstico rotineiro das infecções por Hantavírus (Machado et al 2009).

Por ser a SPCVH uma doença grave e de alta letalidade, existe premência de um diagnóstico rápido e testes têm sido elaborados neste sentido. A maioria dos testes rápidos baseia-se na detecção de anticorpos contra a proteína N de Hantavírus por imunocromatografia. Figueiredo et al 2009^b avaliaram a eficácia de um teste rápido (Nanocore, Brasil) utilizando a proteína recombinante N de ARAV. Estes resultados foram encorajadores, visto que detectaram anticorpos IgM e IgG em pacientes com SPCVH, em 10 a 15 minutos, com alta sensibilidade e especificidade (Machado et al 2009).

Em roedores, que sofrem infecção persistente por Hantavírus, são utilizados no diagnóstico destas infecções, principalmente, o ELISA indireto ou IFA para detecção de IgG contra proteína N viral. Também utiliza-se a RT-PCR, que ultimamente, vem sendo otimizada para a metodologia em tempo real, permitindo com rapidez, sensibilidade e especificidade, conhecer a carga viral. Porém, para esta técnica, é necessário conservar a -70°C , os materiais clínicos de origem humana e de roedores (Korva et al 2009, Vaheiri et al 2008, Araujo et al 2008).

1.6. Roedores-reservatório naturais de Hantavírus americanos

Na América do Sul, Hantavírus são causas de zoonoses de roedores da família *Cricetidae*, subfamília *Sigmodontinae*. Existe grande diversidade entre os *Sigmodontinae*, com aproximadamente 540 espécies e 84 gêneros distribuídos pelo Continente Americano (Figura 4) (Jonsson et al 2010, D'Elía et al 2008, 2007). Isso faz desta subfamília a mais diversa dentre os mamíferos do Novo Mundo e a segunda em escala mundial, perdendo apenas para os roedores do Velho Mundo, da subfamília

Murinae (D'Elía et al 2007). A diversidade de espécies entre os gêneros de *Sigmodontinae* é irregular, sendo que *Akodon* e *Thomomys* apresentam mais de 40 espécies descritas (D'Elía 2003a). Trata-se de um desafio estudar a dinâmica destes roedores, quando novas espécies são constantemente descritas, como uma de *Juliomys* descrita na Floresta Atlântica do Paraguai (De La Sancha et al, 2009), e porque estão ocorrendo constantes mudanças nos ecossistemas causadas pelo homem. Tais mudanças favorecem uma competição interespecífica com uma das competidoras sobressaindo. Portanto, para estudar a dinâmica desses roedores silvestres é preciso estabelecer padrões definidos com marcadores para captura e recaptura (Lima et al 1999, Mills et al 1997). Ainda, flutuações na densidade populacional de roedores são dependentes do clima e *habitat* dos animais (Ghizoni et al 2005, Lima et al 1999). Finalmente, em 2008, detectaram-se por PCR em tempo real, genoma de Hantavírus em tecidos de morcegos e marsupiais da cidade de Biritiba Mirim-SP (Araujo et al 2008). Entretanto, esse é o único relato detectando Hantavírus em pequenos mamíferos não *Sigmodontinae*, na América do Sul.

1.6.1. História evolutiva

Fósseis encontrados na América do Norte sugerem que os *Sigmodontinae* da América do Norte e do Sul teriam se originado de um único ancestral comum, o *Copemys*, gênero de roedores da América do Norte há 25 milhões de anos (Baskin 1978). Cinco gêneros neotropicais de *Sigmodontinae* foram observados no Arizona-USA, embora três deles, ainda, possam ser encontrados: *Calomys*, *Sigmodon* e *Oryzomys*. Outros fósseis de roedores neotropicais não têm sido encontrados na América do Norte (Baskin 1989). Quanto à América do Sul, os primeiros fósseis de *Sigmodontinae* (*Auliscomys* e *Necromys*), datam aproximadamente de três milhões de anos (D'Elía 2003b, Reig 1987). Seguem-se os gêneros *Akodon*, *Graomys* e *Reithrodon*, com 2,5 milhões de anos. Portanto, com base em fósseis encontrados, não se sabe ao certo como formou-se a grande especiação da fauna *Sigmodontinae* encontrada atualmente (Stepan 1995). Dentre os aspectos que permanecem obscuros quanto à história natural dos *Sigmodontinae*, desconhece-se região geográfica de origem e quando linhagens destes roedores teriam invadido a América do Sul. Sabe-se que o

ancestral dos *Sigmodontinae* viveu na América do Norte e Central. Entretanto, estes roedores poderiam ter migrado da América do Sul para a Central e a do Norte. Estima-se que os *Sigmodontinae* estejam na América do Sul há ~ 20 milhões de anos, porém este é um tema em debate (D'Elía 2003a).

1.6.2. Distribuição

Os *Sigmodontinae* são um grupo de roedores do Novo Mundo. Atualmente, eles habitam desde a *Tierra del Fuego* na América do Sul até os Estados Unidos na América do Norte (Figura 4). Eles estão presentes em algumas ilhas, adjacentes ao continente ou oceânicas, como as do Arquipélago de Galápagos e as de Fernando de Noronha. A maioria dos *Sigmodontinae*, 61 dos 84 gêneros, existentes encontra-se no continente Sul Americano, com o Brasil abrigando 46 dos 61 gêneros existentes no continente Sul Americano (Bonvicino et al 2008, Reis et al 2006, D'Elía 2003a).

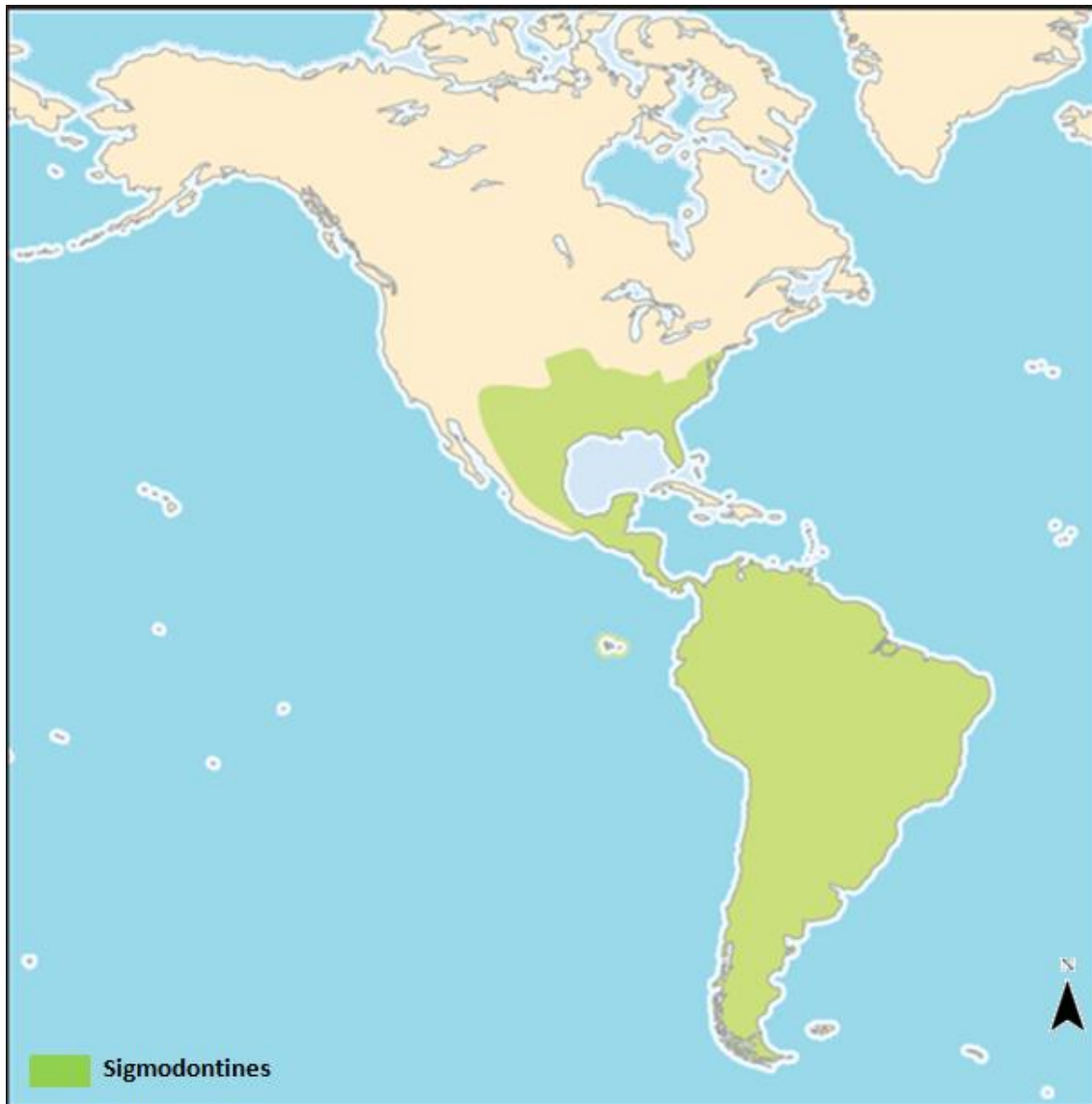


Figura 4. Distribuição geográfica da subfamília *Sigmodontinae* representada em cor verde no mapa (Adaptado de D'Elía 2003a).

Três gêneros de *Sigmodontinae* habitam as três Américas: *Oligoryzomys*, *Sigmodon* e *Oryzomys*, este último não presente no Brasil (Weksler et al 2006). *Nesoryzomys* ocorrem nas ilhas Galápagos. Também, sabe-se de gêneros presumivelmente extintos, como os *Megalomys*, *Megaoryzomys*, e *Noronhomys* que ocorriam nas ilhas Antilhas, Galápagos e Fernando de Noronha, respectivamente. Quanto aos *Rhagomys*, pensava-se que ocorressem apenas na costa do estado do Rio de Janeiro, habitando fragmentos de Mata Atlântica, contudo, surgiram relatos destes roedores nos Andes peruanos e recentemente, na Bolívia (Villalpando et al 2006, Luna

et al 2003). O gênero *Necromys* possui nove espécies, dentre elas o *N. lasiurus*, que é amplamente distribuído, principalmente no Brasil, ocorrendo desde o leste do estado do Pará até o norte do Rio Grande do Sul e sudoeste de Rondônia. No norte do Brasil há indícios de que ali ocorra o *N. urichi* (Figura 5) (Bonvicino et al 2008, Musser et al 2005).

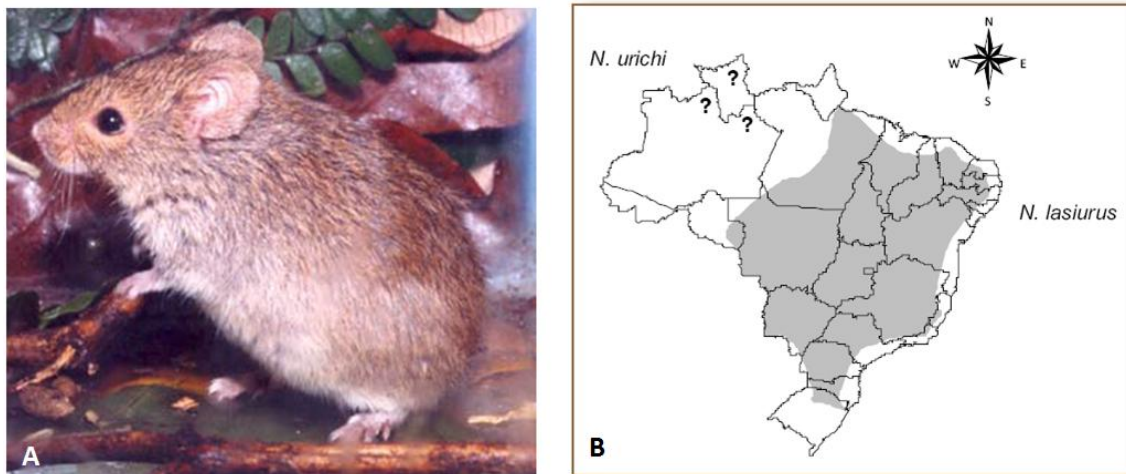


Figura 5. Foto de *Necromys lasiurus* e distribuição geográfica de *N. lasiurus* e *N. urichi*. **A.** *N. lasiurus* caracteriza-se pelo tamanho médio, cauda menor que o corpo, pelagem do dorso de castanho-amarelada a castanho-acinzentada, com limite pouco definido com o ventre que é branco-acinzentado. Nota-se também um anel periocular mais claro, em ambos os olhos, que pode ser muito tênue em algumas espécies. A parte superior das patas é geralmente escura com garras parcialmente cobertas de pêlos claros. Trata-se de roedor de hábito terrestre ocupando principalmente ambientes abertos. **B.** O *N. lasiurus* distribui-se pelos estados do Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, norte do Rio Grande do Sul, sudoeste de Rondônia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Tocantins e Minas Gerais. Quanto ao *N. urichi*, este encontra-se, provavelmente, no norte do Brasil (Adaptado de Bonvicino et al 2008, Musser et al 2005).

1.6.3. Características físicas dos Sigmodontinae

Embora sejam roedores com características típicas, como os camundongos e ratos, os *Sigmodontinae* divergem muito quanto a características físicas. São, em geral, de tamanho pequeno, quando comparados aos de outras subfamílias de roedores, variando de 12 a 400 gramas. O espécime de maior porte dentre os

Sigmodontinae, *Kunsia tomentosus*, não ultrapassa 300 mm de comprimento total. A orelha destes roedores varia de ausente ou quase reduzida como, por exemplo, em *Blarinomys breviceps* (8 a 10 mm), a moderada como em *N. lasiurus* (Figura 5) e *Akodon montensis* (12 a 20 mm), e grande como em *K. tomentosus* e *Scapteromys tumidus* (21 a 32 mm) (Bonvicino et al 2008, Musser et al 2005, Matson et al 1977). A cauda destes roedores depende do tipo de comportamento de cada espécie. Em geral, é anelada com terminações pontiagudas e pouco pêlo. Em *Rhipidomys*, roedores de comportamento arborícola e escalador, a cauda é maior que o corpo, assim como em *Oligoryzomys nigripes*. Em roedores terrestres como os *Necromys*, *Akodon* e *Calomys*, a cauda é menor ou do tamanho do corpo (Bonvicino et al 2008). As patas dependem do tipo de comportamento dos roedores. Arborícolas possuem patas grandes e fortes. Semi-aquáticos possuem pata grande com membranas interdigitais, e os terrestres e fossoriais (adaptados a cavar) geralmente, possuem patas que não ultrapassam 37 mm, na idade adulta, com garras salientes sendo maiores nos fossoriais. Como em toda ordem *Rodentia*, os incisivos são encontrados no maxilar superior e inferior e nunca presentes os caninos e pré-molares. O número total de dentes é dezesseis. Faz exceção o *Neusticomys oyapocki* que possui dois molares no maxilar inferior e superior. Observa-se grande variação quanto ao tamanho dos molares, morfologia e número de raízes. *Sigmodontinae* que se alimentam de animais, sementes, frutas ou fungos possuem coroa molar baixa e distinta daquela presente nos que se alimentam de vegetação abrasiva como pastos e cana-de-açúcar (D'Elía 2003a, Luna et al 2003, Reig 1987).

1.6.4. Habitat, comportamento e dieta dos Sigmodontinae

Sigmodontinae habitam praticamente todos os ecossistemas do continente Americano, incluindo desertos, florestas equatoriais e tropicais, pântanos, cerrados, campos de altitude, salinas e caatinga. Em sua maioria são terrestres como, por exemplo, *Akodon* sp, *Necromys* sp, *Calomys* sp, *Oligoryzomys* sp, *Juliomys* sp (De la Sancha et al 2009, D'Elía et al 2008, D'Elía 2003b). Porém, existem alguns semifossoriais, como *Blarinomys breviceps*, *Oxymycterus judex* e *Juscelinomys* sp (Gonçalves et al 2004, Emmons 1999, Matson et al 1977), arborícolas como *Rhipidomys*

sp, *Oecomys* sp, *Phaenomys* sp, e *Rhagomys* sp (Luna et al 2003) e semi-aquáticos como *Scapteromys tumidus*, *Nectomys squamipes* (Ernest et al 1986). Algumas espécies semi-aquáticas habitam florestas como, *Nectomys squamipes*. Outros semi-aquáticos habitam vegetações rasteiras e cerrados como *Scapteromys tumidus*. Alguns *Sigmodontinae* possuem mais de um *habitat*. O *Akodon azarae*, *A. montensis* e o *Necomys lasiurus* vivem em diferentes tipos de ambientes abertos: pantanal úmido e seco, nos pampas, e sistemas agrícolas de cana-de-açúcar e braquiária (Bonvicino et al 2008, D'Elía 2003^b). Enquanto alguns *Sigmodontinae* são altamente sensíveis à destruição de seu *habitat*, outros se adaptam a esta situação. É o caso do *A. azarae*, *A. montensis*, *N. lasiurus*, *Calomys tener* e algumas espécies de *Oligoryzomys*. Ainda, alguns *Sigmodontinae* vivem como comensais dos seres humanos. Este é o caso do *A. Reigi*, que tem sido coletado em casas rurais no Uruguai (D'Elía 2003a).

Os *Sigmodontinae* possuem comportamento noturno, contudo, algumas espécies semi-aquáticas, como *Holochilus sciureus* têm hábito diurno. Ainda, espécies semi-aquáticas de *Scapteromys* sp, *Nectomys* sp, *Oryzomys* sp, *Holochilus* sp, *Amphinectomys* sp e *Lundomys* sp são excelentes nadadores e mergulhadores, podendo escapar de predadores e explorar estes ambientes em busca de alimento. Em geral, os *Sigmodontinae* fazem seus ninhos com 10 a 15 cm de largura e profundidade de 30 cm, podendo ser mais profundos no caso dos fossoriais e semifossoriais. Menos comum, são ninhos entre pedras e em raízes de árvores. Alguns, de hábito semi-aquático, fazem seus ninhos próximos à água. Arborícolas, como *Thomasomys aureus* e espécies de *Oecomys* e *Rhipidomys*, constroem seus ninhos em árvores, podendo até utilizar ninhos de pássaros. Os *Sigmodontinae* machos têm hábito de andar em torno de seus ninhos, podendo chegar a dois hectares (D'Elía 2003a, 2003b). Contudo, estudos de ecologia mostraram que *Sigmodontinae* terrestres tem sazonalidade e dispersão, principalmente no outono como é o caso de espécies de *Akodon* (Cook et al 2001, Ernest et al 1986). Pouco se sabe sobre a comunicação entre os *Sigmodontinae*. Porém, é conhecido que a dominância é comunicada por estes roedores, principalmente, pelo odor das excretas, fezes e urina e que espécies semi-aquáticas, particularmente *Nectomys squamipes*, emitem sons de alta frequência (D'Elía 2003a, Ernest et al 1986).

O conhecimento sobre a dieta dos *Sigmodontinae* baseia-se, principalmente, em análises do conteúdo estomacal desses animais. Como esperado de roedores tão diversos, os mesmos possuem, também, dietas variadas. Alguns são onívoros, podendo, a depender da disponibilidade, se alimentar tanto de tecidos vegetais como de tecidos animais. Espécies de hábito terrestre, em sua maioria, são granívoros. Arborícolas e semi-fossoriais costumam ser frugívoros e carnívoros respectivamente (Figura 6) (D'Elía 2003a). A dieta mais estudada foi a do roedor semi-aquático *Nectomys squamipes*, que se alimenta de insetos e pequenos animais com até 20 cm e também, de pequenos peixes (Ernest et al 1986).



Figura 6. Dieta de roedores *Sigmodontinae*. **A.** Dieta de um roedor carnívoro. Observa-se o roedor norte americano *Onychomys leucogaster* se alimentando de um rato de bolso (*Perognathus longimembris*) que ele mesmo matou. Trata-se do único roedor carnívoro norte-americano. **B.** Dieta de um roedor insetívoro. *Reithrodontomys sumichrasti* é um predador natural da borboleta monarca *Danaus plexippus* (Adaptado de D'Elía 2003a).

1.6.5. Ciclo reprodutivo dos *Sigmodontinae*

Os *Sigmodontinae* são, em geral, de vida curta. Atingem a maturidade na mesma estação de nascimento. Vivem por nove meses e chegam à maturidade sexual em 45 dias. A média do número de embriões destes animais é de 4,5. Informações sobre a reprodução dos *Sigmodontinae* vêm, principalmente, da análise de espécimes capturados, onde são avaliadas as medidas externas, posição dos testículos, membrana

na vagina e do número de embriões. Desta forma, inferências no tocante à sazonalidade da atividade reprodutiva e tamanho da prole puderam ser realizadas (D'Elía 2003a). Espécies de *Zygodontomys* se reproduzem continuamente, mesmo em locais com estações bem definidas (seca e chuvosa). Outras espécies respeitam a sazonalidade, reproduzindo-se, principalmente, na primavera e verão. Em espécies do gênero *Calomys* os padrões de comportamento de cópula foram bem descritos. Tanto machos como fêmeas têm comportamento agressivo no momento de cópula e os machos, em sua maioria, não são monogâmicos (Lassere et al 2000, Laconi et al 1998). Na espécie *A. azarae* cromossomas sexuais XY ocorrem em 30 a 60 % das fêmeas férteis. Nestes casos, apesar de presente, ocorre expressão deficiente do cromossomo Y, resultando no desenvolvimento de ovários em vez de testículos (D'Elía 2003a).

Um aspecto marcante na dinâmica populacional dos *Sigmodontinae* são os freqüentes surtos que tornam suas populações abundantes em curto espaço de tempo. Esse fenômeno é denominado *ratada*. As *ratadas* envolvem, geralmente, o crescimento de quatro espécies, com sobreposição dos nichos ecológicos das espécies envolvidas. O fenômeno ocorre por desequilíbrio ecológico causado pelo homem, ou é decorrente de fenômenos climáticos naturais como o *El niño*. Ainda, sabe-se que a introdução tanto de animais como de vegetações exóticas em uma determinada região, leva à extinção de espécies de roedores, como relatado por Mann (1945), ou ao fenômeno de *ratadas* (Lima et al 1999).

1.7. Importância dos *Sigmodontinae* para o homem

Sigmodontinae são roedores de grande importância para o homem. Sabe-se que muitas espécies desta subfamília desempenham importante papel em seus ecossistemas naturais. Algumas são importantes na dispersão de sementes, e ainda servem como fonte alimentar para animais vertebrados carnívoros, como corujas e cobras. As espécies terrestres *Necromys* sp, *Akodon* sp, e *Calomys* sp são verdadeiras pragas em sistemas agrícolas, pois eles quebram as sementes inviabilizando a germinação, podendo comer até 2 kg de comida por ano. *N. Lasiurus*, *Sigmodon hispidus* e *Zygodontomys brevicauda*, são pragas da plantação de cana-de-açúcar (D'Elía 2003a). Também, vários destes animais são reservatórios naturais de agentes

etiológicos de várias doenças na América do Sul. Este é o caso dos *Oligoryzomys* sp, *Necromys lasiurus*, *Calomys laucha*, *Akodon azarae* e o rato de algodão *Sigmodon alstoni*, reservatórios naturais de Hantavírus. De forma similar, *Calomys musculinus* e o rato da cana *Z. brevicauda* são, respectivamente, hospedeiros dos Arenavírus Junin, na Argentina, e Guanarito na Venezuela. Os roedores *O. nigripes*, *A. montensis*, *Thaptomys nigrita*, *Euryoryzomys russatus* (Weksler et al 2006), abrigam ectoparasitas que, por sua vez, são reservatórios do agente etiológico da doença de Lyme: *Borrelia burgdorferi* (Salked et al 2010, Figueiredo et al 2009, Suzuki et al 2004, Chiappero 2003).

Diante disso, acredita-se que a emergência da hantavirose na região Nordeste do Estado de São Paulo, fato detectado nos últimos 12 anos, se deva, principalmente, à degradação ambiental intensa para a monocultura de campi braquiária (*Brachiaria decumbens*) e cana de açúcar (*Saccharum officinarum*), ambas vegetações exóticas à região. Tal degradação estaria afugentando animais, como algumas espécies de roedores, de seu ambiente natural, bem como os seus predadores e incentivando o aumento populacional de espécies de roedores oportunistas. Estes roedores silvestres procuram alimento e abrigo em paióis, armazéns, silos ou outros lugares criados pelo homem. E assim, o homem fica sujeito a zoonoses transmitidas por estes animais (Figueiredo et al 2003, Kotchetkoff-Henriques 2003). Na região de Ribeirão Preto, o ARAV, associado a *Necromys lasiurus* e possivelmente a *Calomys tener* e *Akodon* sp, tem causado grande número de casos de SPCVH, com 50 % de letalidade (Figueiredo et al 2009a, 2003). Portanto, para conhecer a epidemiologia e lograr o controle da hantavirose faz-se importante entender a ecologia dos roedores-reservatório destes vírus (De Sousa et al 2008, Suzuki et al 2004). Estudos visando a este entendimento devem, primeiramente, buscar conhecer as variações populacionais destes roedores e estabelecer padrões como, idade e gênero dos roedores bem como seus *habitats* (Lima et al 1999).

Esta Dissertação de Mestrado tem como base a captura de roedores no campo, em quatro ambientes diferentes, visando a um estudo de sua população, a detecção viral e isolamento de Hantavírus. Os locais de campo selecionados para o estudo mostraram previamente uma abundante população de roedores-reservatório, inclusive, com animais comprovadamente infectados por Hantavírus sendo adequados

para estudos sobre a epidemiologia da hantavirose (Figueiredo et al 2010, De Sousa et al 2008).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Detectar a infecção por Hantavírus em pequenos mamíferos silvestres vivendo em quatro ambientes distintos e avaliar a dinâmica populacional de possíveis animais-reservatório considerando a ecologia dos animais, a idade, o gênero (sexo), e verificar a influência destes parâmetros na infecção por Hantavírus na região Nordeste do Estado de São Paulo, Brasil.

2.2. Objetivos Específicos

Capturar pequenos mamíferos, possíveis animais-reservatório de Hantavírus, em quatro ambientes: com áreas nativas de cerrado e floresta semidecidual atlântica e com áreas de vegetação modificada para cultivo do capim braquiária e da cana de açúcar.

Determinar nos animais capturados, espécie, idade e gênero visando relacionar estes parâmetros com infecção por Hantavírus.

Identificar as espécies de pequenos mamíferos capturados segundo aspectos morfológicos, caracteres externos, e genéticos, baseado no gene mitocondrial do citocromo b.

Avaliar a diversidade ecológica de pequenos mamíferos nos diferentes ambientes estudados considerando quantidade de espécies e número de animais capturados.

Detectar infecção por Hantavírus em pequenos mamíferos, por sorologia, RT-PCR e isolamento viral.

Avaliar a frequência da infecção por Hantavírus nos animais capturados segundo a sazonalidade das capturas, considerando aquelas ocorridas na estação seca, que compreende os meses de abril a setembro e na chuvosa, de outubro a março.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Atividades de campo

Como parte deste trabalho realizou-se captura, manuseio e processamento de pequenos mamíferos silvestres. Para tanto, todos os procedimentos basearam-se nas diretrizes e normas de segurança preconizadas por Mills et al (1995) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP – USP) nº 115/2008, bem como, pelo IBAMA, (protocolo número 02027.008732/08-97), renovação do original 0115/07) (ver Anexo I e II).

3.1.1. Locais de Estudo

As capturas de pequenos mamíferos foram realizadas na região de Ribeirão Preto, SP, de junho de 2008 a julho de 2009 (ver Figura 7). Foram escolhidos quatro ambientes de estudo, com diferentes características paisagísticas e, portanto, diferentes *habitats* de roedores, nos Municípios de Luis Antônio, Cajuru e Batatais. Também, as capturas compreenderam coletas em duas épocas do ano, incluindo a estação seca, que compreende os meses de abril a setembro e a chuvosa, nos meses de outubro a março (Kotchetkoff-Henriques 2003).

O Município de Luís Antônio (21° 33' Sul e 47° 42' Oeste, 675 m) possui área de 597,6 Km² e uma população estimada de 7.837 habitantes. Ali se localiza a reserva ecológica de Jataí, da Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo, com extensa vegetação natural caracterizada por formações de cerrado descontínuas à floresta semidecidual atlântica tropical (mata semidecídua) predominante. Aspectos de interesse sobre este local de captura são exibidos nas Figuras 7 e 8 (IBGE 2000, Talamoni et al 2000).

O Município de Cajuru (21° 16' Sul e 47° 18' Oeste, 775 m) tem uma população estimada de 21.917 habitantes, em 660,687 km². Possui vegetação com formação característica de Cerrado e ali existem fazendas de plantio para coleta de sementes do capim braquiária (*Brachiaria decumbens*). Aspectos de interesse sobre este local de captura são exibidos nas Figuras 7 e 8 (IBGE 2000).

O Município de Batatais (20° 53' Sul e 47° 35' Oeste, 862 m) possui área de 850,7 km² e uma população estimada de 53.525 habitantes. Em Batatais a vegetação natural predominante é de Cerrado, com extensas áreas plantadas com cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) e braquiária. Aspectos de interesse sobre este local de captura são exibidos nas Figuras 7 e 8 (IBGE 2000).

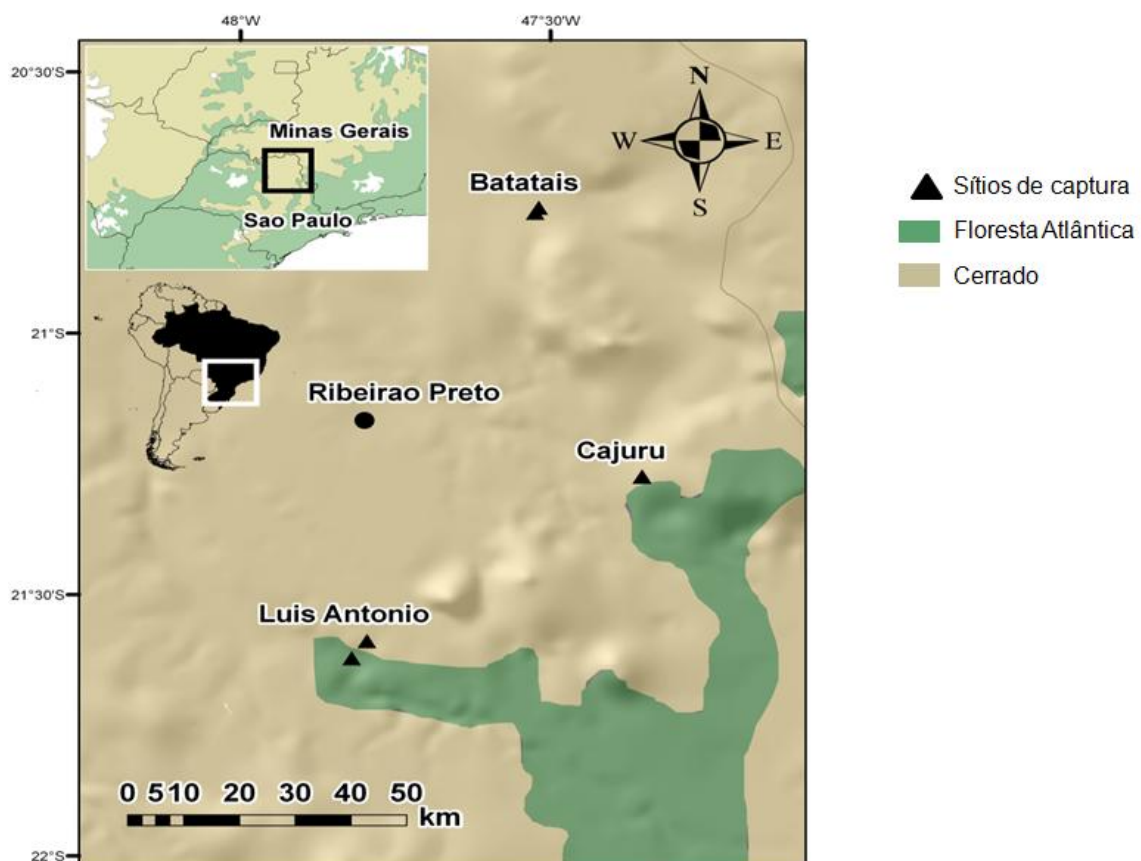


Figura 7. Mapa localizando os sítios de captura dos pequenos mamíferos nos municípios da região Nordeste do Estado de São Paulo, Brasil, microrregião de Ribeirão Preto. No Município de Cajuru, a vegetação do sítio de captura foi modificada para monocultura do capim braquiária; coordenadas dos sítios de captura: Caj 1: -47,352 e -21,274; Caj 2: -47,353 e -21,275. No Município de Batatais, havia 3 sítios de captura, um deles apresentando vegetação nativa de cerrado, o segundo, apresentando vegetação modificada pela cultura de cana de açúcar, e o terceiro, vegetação modificada pelo capim braquiária; coordenadas dos sítios de captura: Bat 1: -47,5192 e -20,760; Bat 2: -47,353 e -20,770. No Município de Luís Antônio, as capturas ocorreram na reserva Jataí, que possui vegetação composta por mata semidecídua; coordenadas dos sítios de captura: Jat 1: -47,820 e -21,621; Jat 2: -47,796 e -21,588. Este mapa foi construído utilizando o programa ArcGIS9 ver. 9.1 (Environmental Systems Research Institute, EUA) com a gentil ajuda de Dr. Noé de la Sancha e Nicté Ordóñez-Garza, MSc do Departamento de Ciências Biológicas, Texas Tech University, Lubbock, TX, Estados Unidos.

3.1.2. Equipe de campo

As capturas de pequenos mamíferos foram realizadas por equipe de campo treinada que incluía: Gilberto Sabino-Santos Jr (responsável), Felipe G. M. Maia, MSc e pelos técnicos Dercílio A. Pavanelli e Paulo S. M. Paulosso. Aspectos referentes aos animais silvestres, particularmente aqueles relacionados à identificação de espécimes, que baseou-se em caracteres morfológicos dos espécimes e análise de genoma, foram orientados pelo especialista em pequenos mamíferos, Dr. Jorge Salazar-Bravo, Professor Associado do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Texas Tech, em Lubbock, Texas, Estados Unidos.

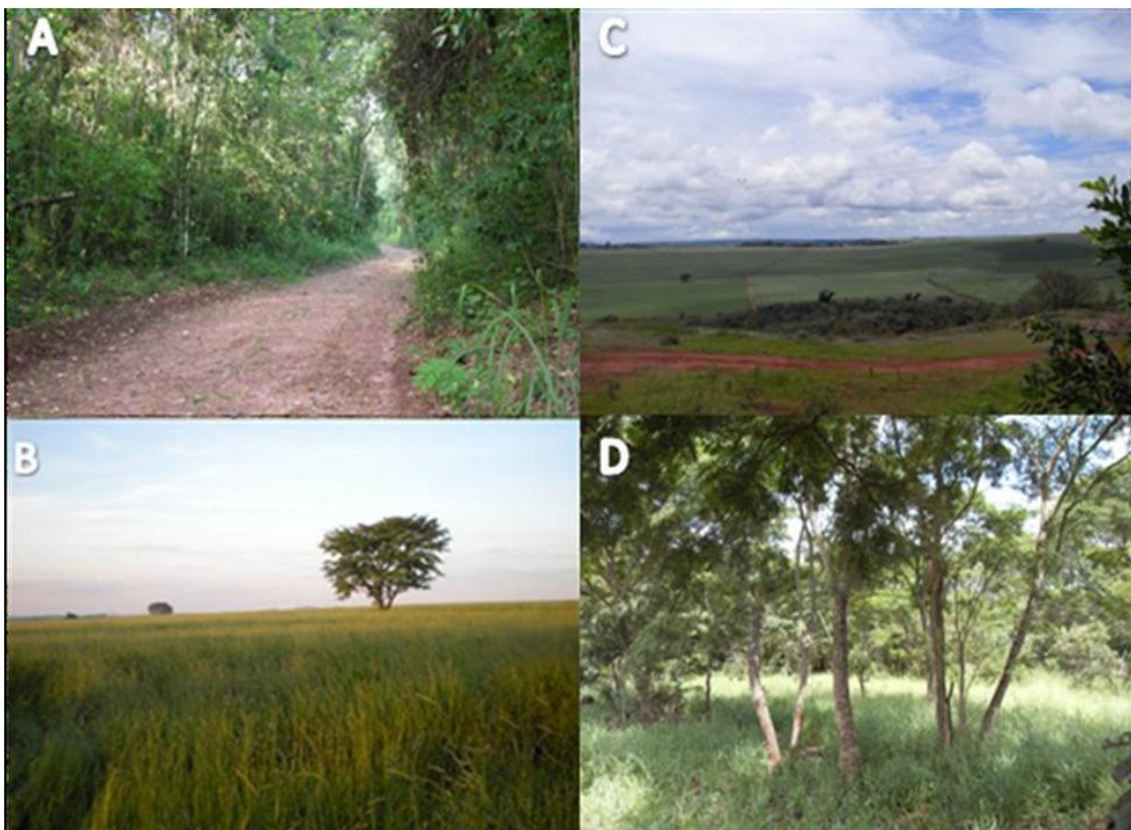


Figura 8. Fotografias mostrando vegetações distintas observadas nos sítios de captura de pequenos mamíferos. **A.** Mata semidecídua na Reserva Jataí, Município de Luis Antônio. **B.** Plantação de capim braquiária no Município de Cajuru. **C.** Plantação de cana-de-açúcar rodeando vegetação nativa de Cerrado, em **D,** no Município de Batatais. Fotos por: Felipe GM Maia, MSc e Dr. Mário G Figueiredo.

3.1.3. Captura e recaptura de pequenos mamíferos para estudo populacional

Realizando captura e recaptura de pequenos mamíferos, visamos a avaliar a ecologia de possíveis animais-reservatório, principalmente a dos roedores *Necromys lasiurus*, *Akodon* sp e *Calomys tener*, nas diferentes épocas do ano.

Os animais foram capturados vivos, em duas grades, incluindo, cada uma, 100 armadilhas tipo *Sherman* (8 ´ 9 ´ 23 cm, Sherman Trap Co., EUA). As grades foram separadas por pelo menos 800 metros, para obter uma representação individual da população de roedores e a distância entre cada armadilha foi de 10 metros, como esquematizado na Figura 9. As coordenadas de cada grade eram registradas utilizando equipamento de geo-posicionamento por satélite (GPSMAP® 60CSx, Garmin, EUA). As armadilhas foram colocadas ao final do dia em cada sítio de captura contendo como isca uma mistura de flocos de aveia, paçoca de amendoim e extrato de baunilha (McIntyre et al 2005, Ruedas et al 2004, Calisher et al 2001). As armadilhas foram verificadas na manhã quanto à presença ou não de roedores, por 2 a 3 noites consecutivas. Aquelas contendo roedores foram acondicionadas em sacos plásticos por operadores devidamente paramentados, usando luvas de borracha, protetores para calçados e máscaras de proteção nível dois (PFF2-8801, 3M™, EUA). Estas armadilhas foram, então, conduzidas ao local de processamento dos animais capturados, na Unidade Móvel do Centro de Pesquisa em Virologia da FMRP - USP.

Usando os equipamentos de proteção adequados, constituído de aventais descartáveis impermeáveis, luvas cirúrgicas, protetores para calçados e máscara de proteção acoplada a respirador de ar com filtro HEPA (*High-efficiency particulate air – Air-mate belt-mounted powered air purifying respirator*, 3M™, EUA), anestesiaram-se os animais capturados, colocando em cada saco plástico contendo armadilha um chumaço de algodão embebido em éter etílico ou isoflurano (Halocarbon, Kern, EUA), como ilustrado na Figura 10. Anestesiados, os pequenos mamíferos foram identificados quanto à espécie considerando seus caracteres morfológicos externos (Bonvicino et al, 2008 e Reis et al, 2006) e marcados com uma anilha para identificação em futura recaptura. Em seguida, determinou-se o sexo (gênero), a massa corporal utilizando balança Kern, modelo cm1k1 (Kern, EUA) e verificou-se a idade, segundo Bonvicino et al (2008) e Reis et al (2006) (Tabela 1). Avaliaram-se as condições reprodutivas dos

animais capturados, pela presença de testículos nos machos e de vagina perfurada nas fêmeas, analisando, ainda, as medidas do comprimento do corpo, da cauda, pata traseira, orelha, e procurava-se – quando possível – pela presença de ferimentos externos, buscando entender a natureza dos mesmos. Finalmente, amostras de sangue foram coletadas do seio retro-orbital em capilares heparinizados, que foram acondicionados em criotubos e armazenados em nitrogênio líquido, para posterior detecção de anticorpos contra Hantavírus e genomas virais. Uma pequena amostra de tecido da orelha esquerda foi coletada de cada animal e armazenada a 4 °C em criotubos contendo álcool a 90 %. Terminados estes procedimentos os animais foram liberados no mesmo sítio de captura.

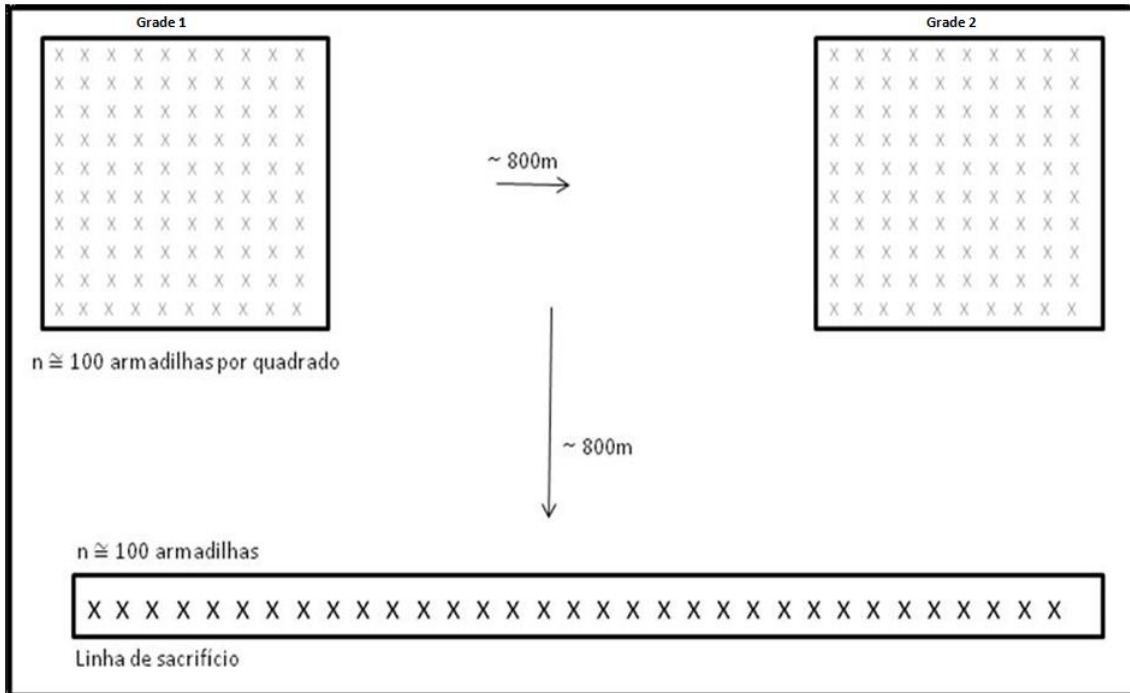


Figura 9. Esquema mostrando a disposição das armadilhas (X) utilizadas para a captura de roedores no campo. Para avaliar a dinâmica dos pequenos mamíferos capturados, armaram-se duas grades separadas por distância de aproximadamente 800 metros. Cada grade contém 100 armadilhas do tipo *Sherman*, que mantém o animal vivo, distantes 10m umas das outras. Separada por no mínimo 800 m das duas grades quadradas, armaou-se uma linha de armadilhas na qual os animais capturados foram sacrificados visando à coleta de seus sangues e órgãos para o isolamento de Hantavírus. Nesta linha, 80 a 100 armadilhas foram armadas, a uma distância de 10m.

Tabela 1. Distribuição de idade dos roedores e do marsupial *G.agilis* capturados com base na massa corpórea.

Espécie	Peso (g) de acordo com fase de crescimento		
	Juvenil	Subadulto	Adulto
<i>Necromys lasiurus</i>	≤ 19	20 a 39,9	≥ 40
<i>Akodon</i> sp	≤ 15	16 a 29,9	≥ 30
<i>Calomys tener</i>	≤ 8	9 a 14,4	≥ 14,5
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	≤ 8	9 a 15,9	≥ 16
<i>Mus musculus</i>	≤ 5	6 a 9,9	≥ 10
<i>Scapteromys tumidus</i>	≤ 35	36 a 85,9	≥ 86
<i>Gracilinanus agilis</i>	≤ 10	11 a 16,9	≥ 17
<i>Rhipidomys</i> sp	≤ 20	21 a 45,9	≥ 46
<i>Euryoryzomys nitidus</i>	≤ 35	36 a 69,9	≥ 70
<i>Oxymycterus judex</i>	≤ 29	30 a 54,9	≥ 55

Fonte: Bonvicino et al 2008, Reis et al 2006, Weksler et al 2006.

3.1.4. Captura de animais para isolamento de Hantavírus

Distantes pelo menos 800 metros das duas grades descritas armaou-se, também, uma linha com 80 a 100 armadilhas tipo *Sherman* (8'9'23 cm, Sherman Trap Co., USA) (Figura 9), para a captura de animais a serem sacrificados visando à coleta do sangue e órgãos para o isolamento de Hantavírus. Como regra geral as armadilhas permaneciam armadas por duas a três noites consecutivas, sendo verificadas, todas as manhãs para verificação da presença de roedores. Os procedimentos utilizados com as armadilhas contendo animais capturados, bem como aqueles utilizados na Unidade Móvel do Centro de Pesquisa em Virologia da FMRP – USP, foram os mesmos descritos anteriormente. Entretanto, neste caso, sacrificaram-se os animais por aprofundamento da anestesia e a seguir foram dissecados para coleta de fragmentos de pulmão, baço, rim, fígado e coração. Estes fragmentos foram acondicionados em criotubos de 1 a 2 mL de capacidade, devidamente identificados, congelados em nitrogênio líquido, e então, transportados ao laboratório onde foram mantidos e armazenados a -70 °C. As carcaças dos roedores foram acondicionadas em sacos individuais, devidamente identificados, fixadas em um tanque de formol a 10 %, e no laboratório, após três dias, estas carcaças foram desidratadas com álcool etílico a 70 %, sendo, então utilizadas para a confirmação taxonômica dos animais, segundo caracteres morfológicos do crânio (Steppan 1995).

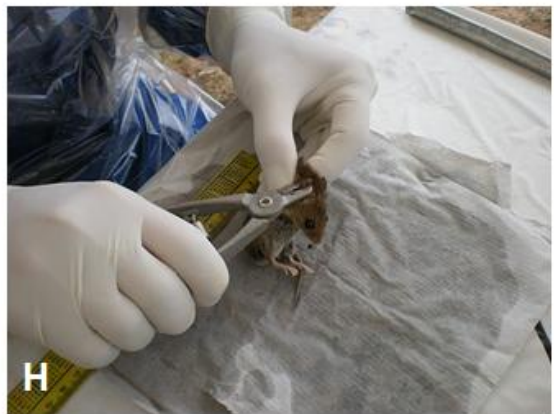
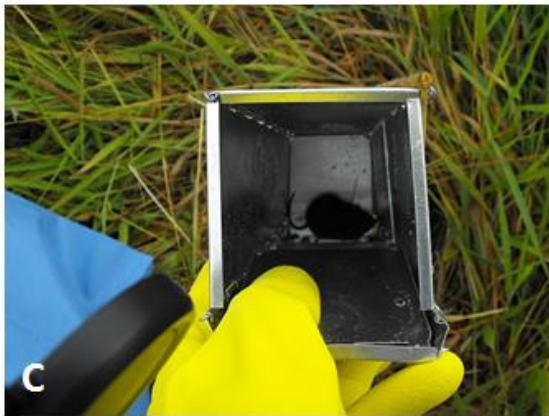




Figura 10. Captura, processamento e liberação de pequenos mamíferos capturados **A.** Isca de flocos de aveia, paçoca de amendoim e essência de baunilha utilizada para captura dos pequenos mamíferos. **B.** Armadilha tipo *Sherman* contendo isca. **C e D.** Captura de pequeno mamífero, que foi levado para a Unidade móvel de Pesquisa em Virologia do CPV-FMRP-USP. **E.** Anestesiando o pequeno mamífero. **F.** Coleta de sangue pelo seio retro-orbital. **G e H.** Marcação do animal com anilha para recaptura. **I.** Coleta de tecido da orelha para identificação molecular. **J.** Biometria do pequeno mamífero. **L.** Coleta de órgãos para isolamento viral (animal capturado em armadilha da linha de sacrifício). **M.** Liberação dos roedores capturados nas grades. Fotos por: Felipe GM Maia, MSc e Dr. Mário G Figueiredo.

3.2. Atividades em laboratório

As atividades laboratoriais deste Projeto de Pesquisa, no tocante ao isolamento de Hantavírus, foram realizadas nos Laboratórios de Biossegurança Nível 3 (NBS-3) do Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (CPV-FMRP-USP).

Sangues dos pequenos mamíferos capturados foram inicialmente triados, pesquisando-se anticorpos do tipo IgG contra Hantavírus, por ELISA indireto utilizando como antígeno a proteína N recombinante do ARAV produzida em nosso laboratório (Figueiredo et al 2009b, 2008). Os soros positivos foram usados para pesquisa do genoma de Hantavírus por RT-PCR. Finalmente, tentativa de isolamento viral foi realizada em amostras positivas por PCR do genoma viral.

3.2.1. ELISA para detecção de anticorpos da classe IgG contra Hantavírus

Para pesquisa de anticorpos contra Hantavírus nas amostras dos pequenos mamíferos capturados, utilizou-se um ELISA tendo a proteína N recombinante de ARAV como antígeno, como padronizado por Figueiredo et al (2009b, 2008). Como antígeno controle-negativo foi usada uma suspensão de extrato de *Escherichia coli*.

Microplacas de poliestireno com 96 orifícios de fundo chato (Corning, EUA) foram sensibilizadas com a proteína N recombinante de ARAV diluída a 2 µg/mL em solução tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M, de pH 9,6 (Sigma-Aldrich, Inc., EUA), em volume de 50 µL por orifício, na metade superior da microplaca (poços: A, B, C e D de 1 a 12). Da mesma forma e com mesmo volume, adicionou-se o extrato de *E. coli* (antígeno controle-negativo) aos orifícios na metade inferior da microplaca (poços E, F, G, H de 1 a 12) excetuando os poços, H 11 e 12 que foram considerados Brancos, por não conterem qualquer um dos antígenos. As microplacas foram incubadas, por cerca de 18 horas (h), em câmara úmida, a 4 °C, sendo, em seguida, lavadas por 6 vezes com *Tween* 20 (Merck, Alemanha) a 0,1 % em PBS pH 7,4 (PBST). Ressalta-se que, entre todas as fases do ensaio, as microplacas foram submetidas às mesmas lavagens. Em continuação, adicionou-se 150 µL da solução bloqueadora composta de leite em pó desnatado Molico (Nestlé) a 10 % (m/v) em PBST a todos os orifícios das microplacas e

estas foram incubadas, por 2 h, a 37°C. Em seguida, adicionou-se, 50 µL/orifício de sangue dos roedores diluído a 1:100 em solução de leite em pó desnatado Molico (Nestlé) a 10 % (m/v) em PBST, em regiões equivalentes de ambas as metades das microplacas. Adicionaram-se soros controles negativos para Hantavírus oriundos de camundongos (*Mus musculus*) de laboratório não infectados e soros-controle (fluidos ascíticos-controle) positivos oriundos de camundongos da linhagem *Swiss* imunizados com a proteína N recombinante de ARAV. As microplacas foram incubadas por 1 h a 37 °C em câmara úmida, e após lavagem dos orifícios, adicionaram-se a todos eles, 50 µL, de uma mistura 1:1 de conjugados com peroxidase contendo uma mistura de anticorpos caprinos contra imunoglobulinas de roedores silvestres do Novo Mundo (*Sigmodontinae*) anti-*Peromyscus leucopus* e contra imunoglobulinas de roedores do Velho Mundo (*Murinae*) anti-*Rattus rattus* (KPL, EUA) a 1:2000 em solução de leite em pó desnatado Molico (Nestlé) a 10 % (m/v) em PBST. Ainda, nos orifícios 11 e 12, de A a G, adicionou-se o conjugado de peroxidase anti-Mouse (*Mus musculus*) (Sigma-Aldrich, EUA) diluído 1:2000. As microplacas, novamente, foram incubadas por 1 h a 37 °C em câmara úmida, e em seguida, lavadas. Finalmente, procedeu-se à adição do substrato de peroxidase ABTS (KPL, EUA), 100 µL/orifício, as microplacas foram cobertas em papel alumínio, e incubadas por 15 a 20 min a 37 °C em câmara úmida. Após surgimento de cor azul-esverdeada, a reação foi bloqueada com 50 µL de solução de HCl 1M, tomando o aspecto mostrado na Figura 11. Neste momento, procedia-se à leitura espectrofotométrica dos orifícios das microplacas, por densidade ótica (DO), em equipamento (Titertek Multiskan Flow, Finlândia) com filtro de 405 nm.

As densidades óticas (DOs) obtidas dos soros oriundos de orifícios sensibilizados com o antígeno N recombinante de ARAV tiveram subtraídos os valores obtidos, para os mesmos soros, frente ao antígeno-controle negativo, resultando nas DOs usadas nos cálculos. O ponto de corte determinante dos soros positivos (*cut off*) foi determinado a partir da média das réplicas para cada diluição de soros negativos acrescidos de 3 desvios-padrão. Foram considerados positivos aqueles soros com DOs maiores que o valor do ponto de corte.

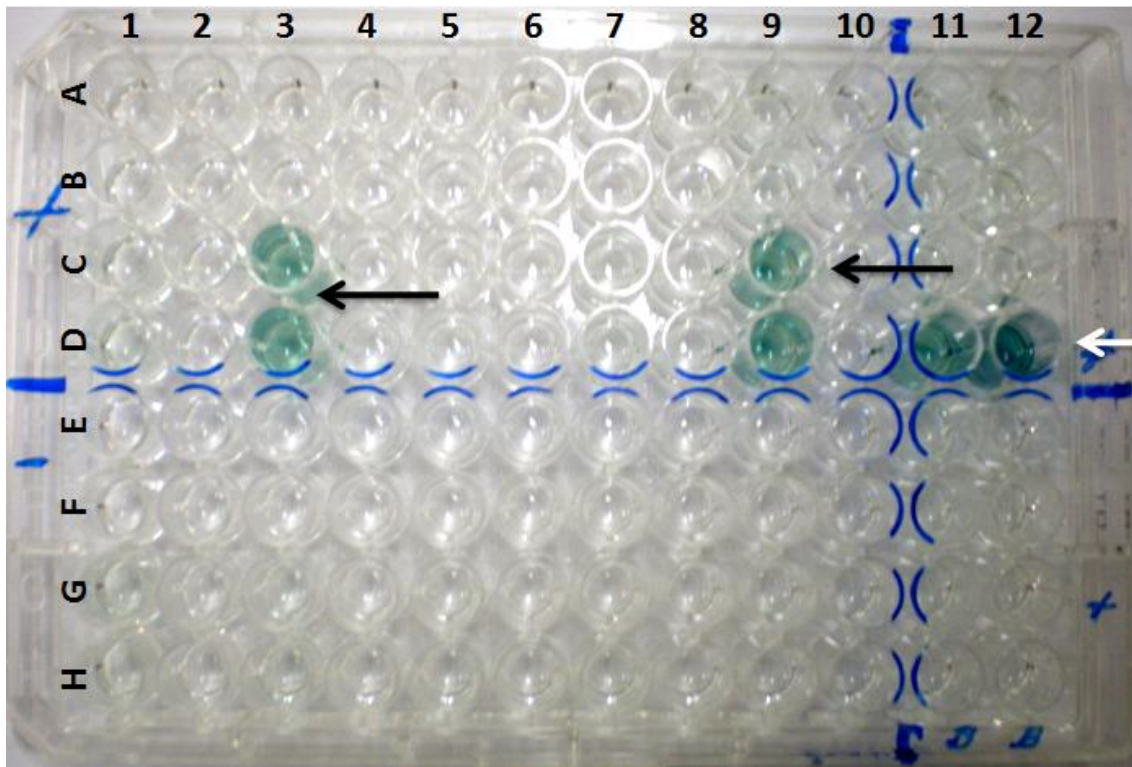


Figura 11. Pesquisa de anticorpos contra Hantavírus utilizando microplaca de ELISA contendo proteína N recombinante de ARAV como antígeno. A parte superior da microplaca, contendo os orifícios A-D, foi sensibilizada com antígeno recombinante da proteína N de ARAV. A parte inferior, contendo os orifícios E a H, foi sensibilizada com antígeno controle-negativo (extrato de *E. coli*). As setas pretas mostram duas amostras séricas positivas, em duplicata. A seta branca mostra a reação do substrato com o líquido ascítico murino (MIAF) utilizado como controle positivo.

3.2.2. Detecção do genoma de Hantavírus em pequenos mamíferos por RT-PCR

RT-PCR foi utilizada para detecção de seqüências genômicas de Hantavírus específicas dos segmentos S e M, a partir de sangue coletado dos pequenos mamíferos, de suspensões infectantes do vírus Rio Mamoré (RMV) em cultivo de célula e também, do vírus isolado de órgãos dos pequenos mamíferos capturados. Amplificaram-se no teste porções genômicas do segmento S no gene codificador da proteína N, e porções genômicas do segmento M, no gene codificador da glicoproteína Gn (Moreli et al, 2004).

3.2.2.1. Extração de RNA

RNAs do sangue e suspensão do macerado de órgãos dos animais infectados foram extraídos utilizando o *kit* QIAamp® *Viral RNA extraction* (Qiagen,

Alemanha). Resumidamente, 100 μL de coágulo sanguíneo foram depositados em micro tubo de 1,5 mL onde foi processado seguindo protocolo do fabricante. O RNA extraído foi eluído em 60 μL de água destilada livre de RNase (Invitrogen Tech-LineSM, EUA) e em seguida, submetido a RT-PCR.

3.2.2.2. RT-PCR

Na RT-PCR utilizaram-se os *primers* SAHN e HGn, mostrados na Tabela 2 (Moreli et al 2004).

Tabela 2. *Primers* utilizados na RT-PCR para Hantavírus.

Nome	Orientação	Seqüência Nucleotídica (5' – 3')	Gene	Localização
SAHN – F	foward	CAAACCCAGTTGATCAACAGGG	N	213 a 235
SAHN – R	reverso	GATGAATCATCCTTGAACCTTAT	N	455 a 477
HGn – F	foward	GGGCAGTAAGTGCTGAAAC	Gn	1301 a 1320
HGn – R	reverso	ACATTTAGCAGTTTGCCATGGG	Gn	1602 a 1625

Primeiramente, realizou-se a transcrição reversa (RT). Para tanto, fez-se mistura de reação com 20 μL , contendo 6 μL do extrato de RNA, 1 μL de *primer* randômico 3 μM (Invitrogen, EUA) e 1 μL dos deoxynucleotídeos trifosfatos (DNTPs) 10 mM. A mistura foi aquecida a 65 °C, por 5 minutos (min), para desnaturação das fitas de RNA e imediatamente transferida para uma cuba de gelo, por 2 min. Em seguida, adicionou-se uma mistura contendo 4 μL da solução tampão 5 vezes concentrada (contendo 10 mM de Tris pH 8.9, 1.5 mM MgCl_2 , 80 mM KCl), 2 μL de DTT (Invitrogen, EUA) 0.1 M e 1 μL de inibidor de RNase (Invitrogen, EUA) e incubou-se a 37 °C, por 2 min. Posteriormente, transferiu-se esta mistura para cuba com gelo onde adicionaram-se 10 U de transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen, EUA) e incubou-se, a 25 °C, por 10 min, 50 °C, por 50 min e 70 °C, por 15 min. O DNA complementar (cDNA) assim obtido foi utilizado na PCR.

Para a reação em cadeia pela polimerase (PCR), preparou-se mistura de reação de 50 μL contendo 0,3 μM dos pares de *primers* (SAHN-F e SAHN-R, HGn-F e HGn-R), 2,5 mM dos deoxynucleotídeos trifosfatos (DNTPs), 3,5 μL do cDNA obtido

com a RT e 5 µL da solução tampão 10 vezes concentrada contendo 10 mM Tris pH 8.9, 2.5 mM MgCl₂, 80 mM KCl. Em seguida, adicionou-se 1.5 U da Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA). Esta mistura foi submetida, em equipamento MJ PTC-200 (MJ Research, EUA), a 35 ciclos térmicos de 95 °C, por 30 segundos (seg), 54 °C por 1 min e 72 °C por 180 seg. Ao final, foi mantida a 72 °C, por 15 min, para uma extensão final de fitas de DNA. Os produtos da PCR (*amplicons*) foram visualizados, em volume de 8 µL, à luz UV, após eletroforese em gel de agarose a 1,8 % (m/v), em solução tampão TAE (1X) corada em solução GelRed (BioTium, EUA) a 1,5 µg/mL. O tamanho do *amplicon* foi determinado por comparação com marcador tipo escada de 100 pb (Fermentas, EUA).

3.2.3. Isolamento viral

Os procedimentos para isolamento viral foram realizados sob proteção apropriada, em laboratório NBS-3 do CPV-FMRP-USP. Para tanto, maceraram-se fragmentos do pulmão de roedores que apresentaram genoma viral detectável por RT-PCR, em meio de essencial mínimo de Eagle (MEM), contendo L-glutamato, penicilina e estreptomicina (Cultilab, Brasil). Inoculou-se 1 mL do fluido destes tecidos macerados e 1 mL de MEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) em monocamadas confluentes de células Vero (do rim de macaco verde africano) do clone E6 (ATCC, EUA), contidas em frascos plásticos estéreis de 25 cm². Os frascos foram incubados a 37 °C, sob atmosfera com 5 % de CO₂, por 2 h. Esses frascos foram agitados, a cada 15 min, durante o procedimento de infecção. O mesmo procedimento foi realizado com o controle positivo, vírus Rio Mamoré e com o controle negativo, incluindo somente o meio. Ao final, incubaram-se as células inoculadas a 37 °C, em atmosfera com 5 % de CO₂, por 14 dias. A cada 3 dias os meios de cultivo dos frascos foram trocados e estocados a -80 °C, para posterior realização de RT-PCR. Após 14 dias, estocaram-se os frascos a -70 °C, *overnight*. Na manhã seguinte, centrifugou-se o fluido dos frascos a 15.000 rpm, por 10 min e inoculou-se 1 mL deste em novos frascos contendo monocamada confluyente de células Vero E6. Esse procedimento, realizado durante 90 dias, resultou em 6 passagens (Padula et al 2002, Galeno et al 2002, Nemirov et al 1999). Finalmente, após comprovar a presença viral nas células por imunofluorescência indireta e por RT-PCR, realizou-se seqüenciamento nucleotídico de *amplicons* dos

genes N visando identificar e classificar Hantavírus isolados.

3.2.4. Teste de imunofluorescência indireta (IFA)

Utilizou-se este teste para verificar o isolamento viral em células infectadas por 14 dias, com base na presença de seus antígenos. As células foram tripsinizadas e transferidas para *spots* de lâmina de microscopia por imunofluorescência. Em seguida, as células foram secas e fixadas em acetona a 4°C. Como controle positivo, utilizando células sabidamente infectadas com o vírus Rio Mamoré e como controle negativo, células não infectadas. As lâminas contendo células fixadas foram estocadas a -70°C até a realização do teste. Fluidos ascíticos oriundos de camundongos imunizados com a proteína N recombinante de ARAV ou soros de roedores silvestres foram adicionados aos *spots* das lâminas (40 uL por *spot*). Estas lâminas foram incubadas por 30 min a 37°C lavadas por 2 vezes com PBS e secas. Em seguida, adicionou-se aos *spots* o conjugado de isotiocianato de fluoresceína com anticorpos caprinos contra imunoglobulinas de roedores silvestres do Novo Mundo (*Sigmodontinae*) anti-*Peromyscus leucopus* e contra imunoglobulinas de roedores do Velho Mundo (*Murinae*) anti-*Rattus rattus* (KPL, EUA). As lâminas foram incubadas por 30 min a 37°C e lavadas 2 vezes com PBS por 5 min sendo, para finalizar, mergulhadas brevemente em água e secadas. Prepararam-se as lâminas cobrindo-as com o tampão Glicerol-PBS (9:1) e lamínula. Estas lâminas foram observadas ao microscópio de fluorescência (Nikon 120, Japão). A presença de antígenos de Hantavírus foi visualizada à luz UV do microscópio como uma areia fluorescente no citoplasma das células infectadas, onde ocorria a replicação viral (Le Duc et al 1985).

3.2.5. Análises filogenéticas

Realizou-se a análise filogenética com base nas sequências nucleotídicas dos *amplicons* contendo parte do gene codificador da proteína N viral. Para tanto, os *amplicons* visualizados em gel de agarose a 1,8 %, com solução tampão TAE 1X e GelRed (BioTium, EUA), foram purificados com QIAquick *Kit* (Qiagen, Alemanha) e sequenciados utilizando o ABI Prism BigDye *Terminator Cycle Sequencing Ready*

Reaction Kit (Applied Biosystems, EUA), sendo utilizado um equipamento ABI PRISM® 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, EUA). Obtiveram-se seqüências do segmento S, incluindo o gene codificador da proteína N de Hantavírus, no *Genebank* e alinharam-se estas às seqüências dos vírus isolados. Desta forma, alinharam-se seqüências nucleotídicas, bem como seqüências aminoacídicas inferidas, com auxílio do pacote computacional para análise genômica MEGA 4.0, que inclui o programa Clustal W (Tamura et al 2007). As seqüências alinhadas foram analisadas, para construção de dendogramas, utilizando o programa Modeltest 3.7. macX, contido no mesmo pacote MEGA 4.0 e que identifica o melhor modelo de substituição nucleotídica, fornecendo diferentes critérios estatísticos (tais como, *hierarchical likelihood ratio tests* - hLRT, *Akaike Information Criterion* - AIE, *Bayesian Information Criterion* - BIC) e ajudando a definir qual o melhor método de substituição. Usou-se para as análises filogenéticas deste trabalho o critério estatístico hLRT e construiu-se dendograma pelo método do *neighbor-joining* (NJ), disponível no programa PAUP* 4.0. (Felsenstein 1993). Como parâmetro, usou-se o modelo HKY+IG de substituição nucleotídica com distribuição gama de 0,7149.

3.2.6. Identificação genética das espécies de roedores capturados

Para tornar mais confiável a identificação das espécies de roedores capturados, utilizou-se a análise de seqüências nucleotídicas dos genomas destes animais amplificadas parcialmente por PCR. Padronizou-se este método sob orientação do professor Dr. Jorge Salazar Bravo e do Dr. Noeh de La Sancha, no Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Texas Tech, em Lubbock, Texas, Estados Unidos.

3.2.6.1. Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de pequenos fragmentos (4 mm²) do tecido da orelha dos roedores capturados, preservados em 90 % de etanol. Para tanto, digeriu-se o tecido em 200 µL de uma solução contendo 20 µL de proteinase K (atividade de 40 mAU/mL) (Qiagen, EUA) e 180 µL da solução tampão de lise tecidual *ATL Tissue Lysis Buffer* (Qiagen, EUA), *overnight*, a 56 °C. Em seguida, extraiu-se o DNA utilizando o *DNA Kit for tissue and blood* (Qiagen, EUA), seguindo protocolo do

fabricante (Martin et al 2000).

3.2.6.2. PCR

Utilizou-se PCR para amplificar a seqüência completa do gene mitocondrial citocromo b, com 1140 a 1143 pares de base, com os *primers* LH 4115 e H1 5288, mostrados na Tabela 3. Para tanto, preparou-se 25 µL de reação contendo solução tampão do *kit* da Taq polimerase, 2 mM de MgCl₂, 0,4 mM de cada dNTP, 0,4 mM de cada *primer*, 0,1U de Taq *high-fidelity* DNA polimerase (Promega, EUA) e 50 ng de DNA. Submeteu-se a mistura a 94 °C por 3 min e a 36 ciclos de 94 °C por 40 seg, 47 °C por 45 seg e 72 °C por 1min e 15 seg. Para finalizar, foi feita incubação a 72 °C por 10 min, para a extensão completa do produto amplificado. Após a amplificação, visualizou-se os *amplicons*, sob luz UV, em gel de agarose a 0.8% corado com GelRed (BioTium, EUA), após eletroforese em solução tampão TAE 1X. O tamanho dos *amplicons* foi estimado utilizando marcador de 1 Kb (Promega, EUA) (Martin et al 2000, Braun et al 2008).

3.2.6.3. Seqüenciamento nucleotídico

Os *amplicons* foram preparados com ExoSAP-IT® (USB Corporation, EUA) para o seqüenciamento nucleotídico. Para tanto, preparou-se reação com 5 µL do produto final da PCR e 2.0 µL ExoSAP-IT®, totalizando volume de 7 µL. Esse foi incubado por 15 min, a 37 °C e em seguida, por 15 min, a 80 °C. Utilizaram-se, para o sequenciamento, os *primers* internos mostrados na Tabela 3 e 80 ng do produto purificado foi processado na reação de seqüenciamento utilizando o ABI Prism BigDye *Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O seqüenciamento foi realizado em um ABI 3130 *Aviant automated sequencer* (Applied Biosystems, EUA). As seqüências nucleotídicas obtidas foram editadas e alinhadas utilizando o programa Clustal W *MEGA version 4* (Tamura et al 2007) e analisadas, *on line*, pelo programa *basic local alignment search tool* (BLAST) (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) usando algoritmo megablast para seqüências altamente similares. Uma espécie foi considerada identificada quando houve identidade de seqüência superiore a 95% (Ordóñez-Garza et al 2010).

Tabela 3. *Primers* utilizados na PCR para amplificação do gene do citocromo b e para seqüenciamento nucleotídico.

Primers de Cyt b	Seqüência nucleotídica
LH1 4115	5'-AAT GAC ATG AAA CAT CGT TG-3'
H1 5288	5'-ACA AGA CCA GAG TAA TGT TTA TAC TAT C-3'
Primers de seqüenciamento	
L1 4648	5'-TGA ATY TGA GGR GGC TTC TCA GTA-3'
MVZ 127	5'-TRY TAC CAT GAG GAC AAA TAT C-3'
MVZ 04	5'-GCA GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT C-3'
H1 4742	5'-GGG TTG TTD GAT CCW GTT TC-3'

3.3. Análises Estatísticas

Dados obtidos neste trabalho foram transferidos dos formulários de campo (Anexo V) e laboratório para um banco de dados em computador utilizando o programa *Excel 2007* (Microsoft, EUA), que permitiu avaliar relações entre parâmetros ecológicos com a infecção viral e sua dinâmica. O sucesso de captura foi determinado pelo número de capturas por noite, dividido pelo produto do número de armadilhas armadas (a cada noite) pelo número de noites (Mills et al 1997). Para analisar diferenças sorológicas entre massa corpórea e idade dos animais, utilizaram-se testes χ^2 . O teste exato de Fisher ($2 \times 2 \chi^2$) foi usado para analisar as diferenças entre taxas de soroprevalência para Hantavírus segundo gênero e sazonalidade, e níveis de abundância e tipo de *habitat* dos pequenos mamíferos capturados. Testes de correlação foram utilizados para análise dos níveis de abundância de pequenos mamíferos capturados, soroprevalência e tipo de *habitat* dos mesmos. Realizaram-se todas estas análises no programa *GraphPad InStat versão 5* (GraphPad, EUA). Diferenças foram consideradas significantes quando o valor de *p* mostrou-se inferior a 0,05 (De Sousa et al 2008, Ruedas et al 2004, McIntyre et al 2005).

4. RESULTADOS

4.1. Captura de pequenos mamíferos

Durante um período de 13 meses, de junho 2008 a julho 2009, nos municípios de Cajuru, Batatais e Luis Antônio (vide Figuras 7 e 8), foram capturados 607 pequenos mamíferos. Considerando que 39 destes animais foram recapturados, estes foram contados apenas uma vez e, portanto, o total de animais capturados foi de 568, como mostra a tabela 4. As coletas ocorreram durante as estações: seca, de abril a setembro e chuvosa, de outubro a março. Cada sítio de captura foi visitado pelo menos duas vezes em cada época do ano. A Figura 8 mostra os distintos ambientes em que foram realizadas as capturas dos roedores, incluindo áreas de vegetações nativas de cerrado e mata semidecídua, e áreas de vegetações modificadas para plantação de capim braquiária e cana de açúcar.

4.1.1. Sucesso de captura e recaptura de pequenos mamíferos

O sucesso de captura foi determinado pelo número de capturas por noite, dividido pelo produto do número de armadilhas armadas (a cada noite) pelo número de noites (Mills et al 1997). Desta forma, o sucesso de captura durante todo o período, foi de 4,85 % com taxa maior na estação seca, 6,2 % como mostra a Figura 12. A taxa de recaptura, produto de número de animais recapturados pelo total de animais capturados, foi de 6,4 %.

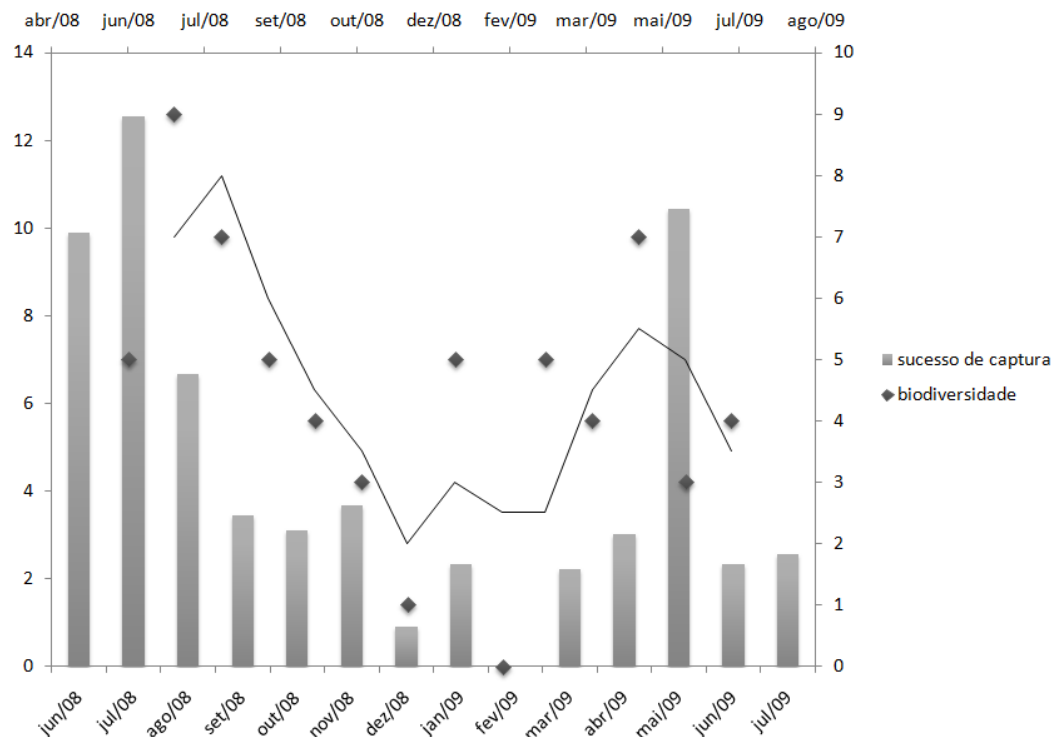


Figura 12. Sucesso de captura (barras) e biodiversidade (losango) de pequenos mamíferos capturados ao longo dos meses de estudo. A linha de tendência informa uma possível sazonalidade do sucesso de captura e biodiversidade.

4.1.2. Abundância e diversidade das espécies de pequenos mamíferos capturados

Os 568 pequenos mamíferos capturados foram de nove espécies de roedores e uma de marsupial. Dos roedores capturados, 93,7 % pertenciam à família *Cricetidae*, subfamília *Sigmodontinae*. As espécies mais capturadas foram *Necomys lasiurus* (n = 212), *Akodon* sp (n = 151), *Calomys tener* (n = 103) e *Oligoryzomys nigripes* (n = 45). Outras espécies, como *Euryoryzomys nitidus*, *Rhipidomys* sp, *Scapteromys tumidus*, *Gracilinanus agilis* e *Oxymycterus judex* atingiram uma média de 6 espécimes. Somente 4,6 % dos animais capturados, 27 animais, pertenciam à família *Muridae*, subfamília *Murinae*, espécie *Mus musculus*. Marsupiais *Didelphidae*, subfamília *Didelphinae*, *Gracilinanus agilis*, representaram 1,5 % dos animais capturados. Estes resultados são mostrados na Figura 13.

No tocante à riqueza de espécies (biodiversidade), foi possível verificar que o cerrado mostrou-se o ambiente de maior diversidade biológica para *Sigmodontinae* e *Didelphinae*, conforme mostra a Tabela 4. O número total de espécies capturadas, ou

riqueza de espécies, durante o período de estudo, foi de 10, atingindo média de 7,6, variando de 3 a 9 para o total. Observou-se uma média de 1,4 espécies capturadas por dia de captura. A biodiversidade foi maior nos meses correspondentes à estação seca (Figura 12).

O número total de animais capturados esteve diretamente relacionado à condição climática, sendo que, na estação seca esta foi significativamente maior que na chuvosa ($p < 0,0001$, teste exato de Fisher). Considerando a condição climática, o número de animais machos capturados na estação chuvosa foi menor que o de fêmeas, mas na estação seca observou-se o inverso, embora, sem significância estatística ($p > 0,05$, teste exato de Fisher), estes resultados são mostrados na Tabela 7.

Analisando os critérios, de abundância e sucesso por mês de captura, observa-se uma clara tendência sazonal, ou seja, um maior número de animais capturados nos meses da estação seca quando comparados aos meses da chuvosa ($p < 0,05$, IC = 95% 19,02 a 58,66), como mostra a Figura 12 e 16.

Analisando o número de roedores capturados segundo os ambientes em que foram realizadas as capturas, observa-se que na vegetação introduzida de capim braquiária obteve-se um maior número, seguido daquela com vegetação nativa de cerrado, conforme os números mostrados na Tabela 4. Pôde-se observar que *Necromys lasiurus* foi principalmente encontrado no capim braquiária (179 animais). O ambiente de floresta semidecidual atlântica apresentou o menor número de animais capturados (8 animais).

Animais do gênero *Akodon* sp foram encontrados nos 4 tipos de ambiente. O roedor *Rhipidomys* sp (ver Figura 14), foi encontrado em três ambientes distintos: cerrado, cana de açúcar e mata semidecídua. Quanto ao *Oxymycterus judex*, este foi somente encontrado no cerrado. Verificou-se que *C. tener* foi encontrado principalmente no capim braquiária e cerrado. O roedor antropofílico *M. musculus* foi encontrado na braquiária e cana de açúcar. Ainda, o *Didelphinae G. agilis* teve abundância, principalmente, no cerrado. Estes resultados são mostrados na Tabela 4.

Quanto à idade dos roedores capturados, foram mais abundantes os subadultos na estação seca, e os adultos na estação chuvosa. No total, foram mais abundantes os subadultos e adultos, como mostrado na Tabela 7.

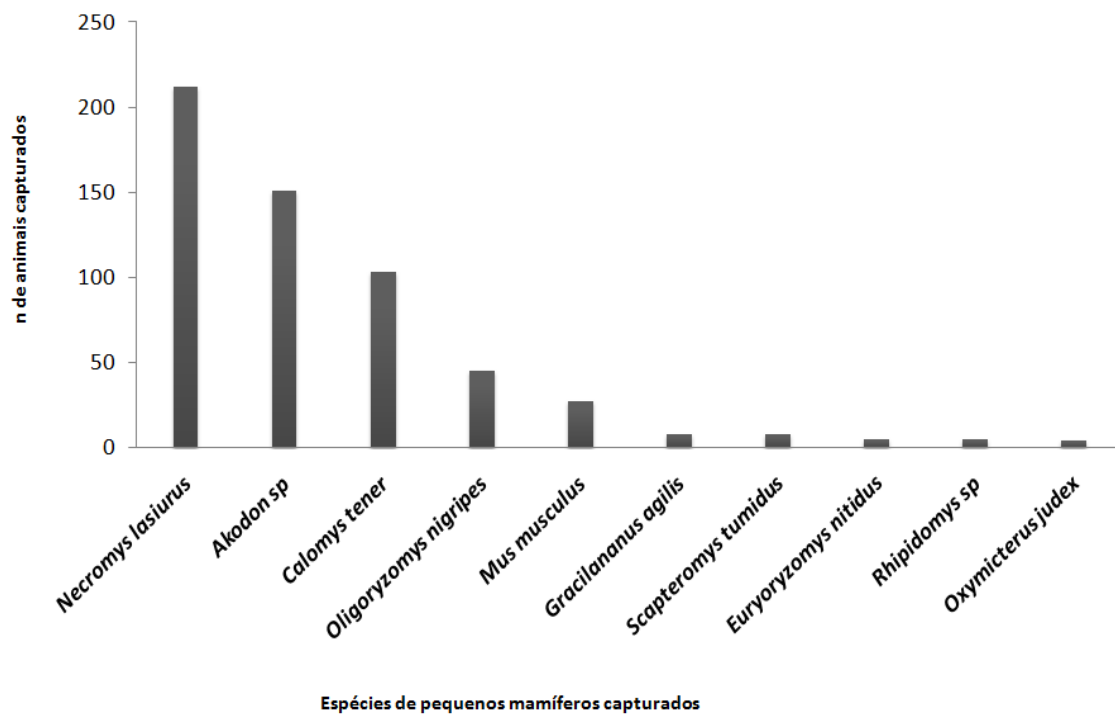


Figura 13. Número de pequenos mamíferos capturados segundo a espécie.

Tabela 4. Pequenos mamíferos capturados segundo cada ambiente.

Espécies	Ambiente				Total
	Capim braquiária	Cerrado	Cana de açúcar	Mata semidecídua	
<i>Necomys lasiurus</i>	179	25	8	-	212
<i>Akodon</i> sp	85	60	3	3	151
<i>Calomys tener</i>	61	34	8	-	103
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	29	6	6	4	45
<i>Mus musculus</i>	17	-	10	-	27
<i>Gracilinanus agilis</i>	1	7	-	-	8
<i>Scapteromys tumidus</i>	2	4	2	-	8
<i>Euryoryzomys nitidus</i>	2	2	1	-	5
<i>Rhipidomys</i> sp	-	4	-	1	5
<i>Oxymycterus judex</i>	-	4	-	-	4
Total	375	144	38	8	568

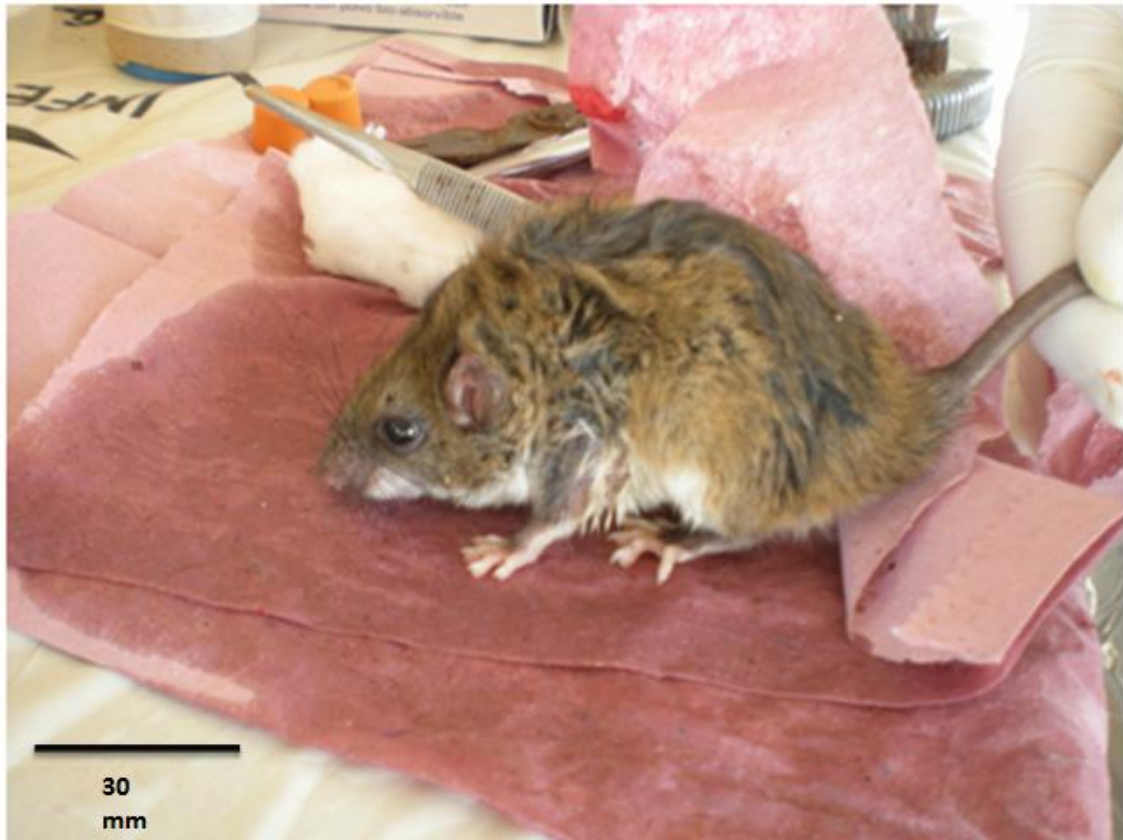


Figura 14. Características morfológicas externas do roedor *Sigmodontinae Rhipidomys* sp. Roedor de médio porte com uma mancha escura na parte superior das patas traseiras, que é uma característica morfológica externa que determina este gênero. As garras firmes caracterizam o seu hábito arborícola. Também o caracteriza a cauda anelada maior que o corpo e a pelagem dorsal amarelada em contraste com a ventral que é branca (Bonvicino et al 2008 e Reis et al 2006). Barra em escala de 30 mm. Foto por: Dr. Felipe Morais.

4.1.3. Identificação genética das espécies de roedores capturados

Utilizando sequências de 410 nucleotídeos, parte de *amplicons* contendo 1140 nucleotídeos do gene mitocondrial citocromo b, que são mostrados na Figura 15, foi possível identificar espécies de roedores *Sigmodontinae* pertencentes aos gêneros *Necromys*, *Akodon* e *Calomys*, em número de 26. Essas sequências foram testadas ao *BLASTn*, para identificar percentuais de identidade conforme mostrado na Tabela 5. Quanto às espécies *Oligoryzomys nigripes*, *Oxymycterus judex*, *Euryoryzomys nitidus*, *Rhipidomys* sp, *Scapteromys tumidos* e *Gracilananus agilis*, não foi possível identificação utilizando este método, provavelmente porque não se obteve *amplicon* do gene citocromo b, ou devido a uma identidade molecular inferior a 90 % no *BLASTn*.

Entre os animais analisados, foi possível identificar geneticamente um roedor *Sigmodontinae* da espécie *Akodon montensis*, que se mostrou infectado por Hantavírus. Neste espécime, a identidade, pelo *BLASTn*, foi de 98 % com a seqüência AF184055.2, do gene de citocromo b de *Akodon montensis*, depositada no *GenBank*, (Tabela 5).

Tabela 5. Resultado do *BLASTn* como identificação molecular de roedores *Sigmodontinae*.

nº de captura	Ambiente	Espécies		Identidade molecular %	Número de acesso <i>GenBank</i>
		identificação morfológica	identificação molecular		
423	Capim braquiária	<i>Akodon</i> sp	<i>Necromys lasiurus</i>	96	EF531688.1
442	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	ND*	ND	ND
457	Cerrado	<i>Akodon</i> sp	ND	ND	ND
458	Cerrado	<i>Akodon</i> sp	ND	ND	ND
465	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	<i>N. lasiurus</i>	99	EF531688.1
471	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	<i>N. lasiurus</i>	100	EF531688.1
484	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	<i>N. lasiurus</i>	98	EF622509.1
491	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	<i>N. lasiurus</i>	99	EF531688.1
510	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	<i>N. lasiurus</i>	100	EF531688.1
546	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	<i>N. lasiurus</i>	99	EF531688.1
558	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	<i>N. lasiurus</i>	100	EF531688.1
614	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	<i>N. lasiurus</i>	95	EF531688.1
617	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	ND	ND	ND
666	Capim braquiária	<i>Akodon</i> sp	<i>N. lasiurus</i>	92	EF531690.1
671	Capim braquiária	<i>Calomys tener</i>	<i>N. lasiurus</i>	99	EF622509.1
677	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	<i>N. lasiurus</i>	96	EF531662.1
678	Cana de açúcar	<i>N. lasiurus</i>	<i>N. lasiurus</i>	98	EF531688.1
697	Cerrado	<i>Rhipidomys</i> sp	ND	ND	ND
703	Cerrado	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	ND	ND	ND
719	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	ND	ND	ND
728	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	<i>N. lasiurus</i>	96	EF531688.1
747	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	<i>N. lasiurus</i>	99	EF531688.1
748	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	<i>N. lasiurus</i>	97	EF531688.1
752	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	<i>N. lasiurus</i>	95	EF531688.1
770	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	<i>N. lasiurus</i>	98	EF531688.1
792	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	<i>N. lasiurus</i>	97	EF622509.1
796	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	ND	ND	ND
914	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	<i>N. lasiurus</i>	96	EF531688.1
924	Cana de açúcar	<i>Calomys tener</i>	ND	ND	ND
932	Capim braquiária	<i>Akodon</i> sp	ND	ND	ND
947	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	<i>N. lasiurus</i>	97	EF531662.1
958.2	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	<i>N. lasiurus</i>	97	EF531688.1
968	Capim braquiária	<i>Akodon</i> sp	ND	ND	ND
986	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	<i>N. lasiurus</i>	98	EF531688.1
1006	Cerrado	<i>Akodon</i> sp	<i>Akodon montensis</i>	99	AF184055.2
1028	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	<i>N. lasiurus</i>	99	EF531668.1

ND – Não determinado, ou porque não houve *amplicon*, ou devido a um *match* inferior a 90%.

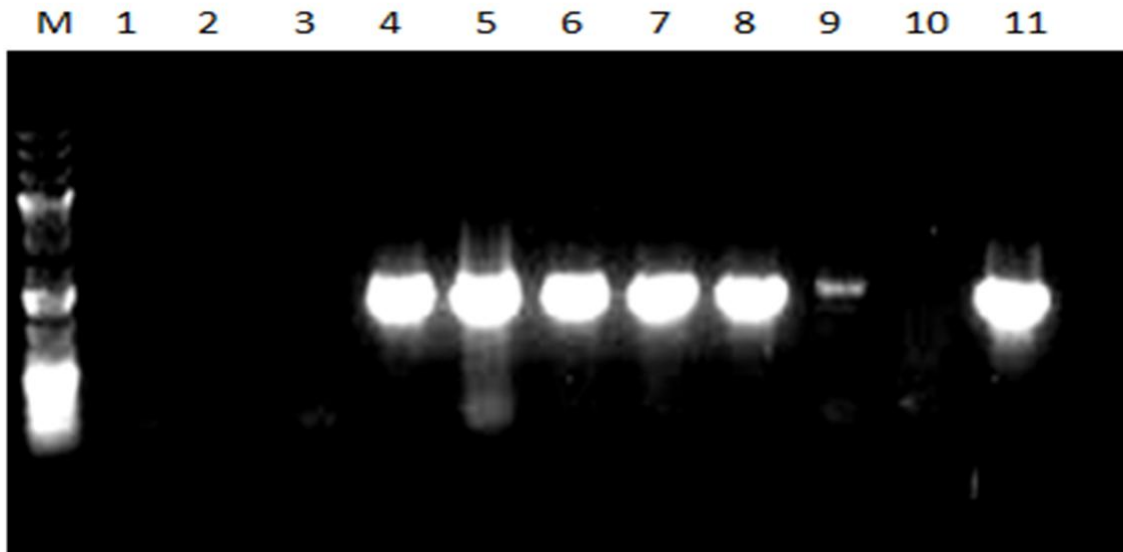


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose corado com *GelRed* sob luz UV, mostrando *amplicons* de 1140 pb oriundos da amplificação por PCR de gene do *cyt b* de diferentes espécies de roedores silvestres. Coluna M – marcador tipo escada de 1kb, coluna 1 – controle negativo, coluna 2 – PCR de uma amostra de *Rhipidomys* sp que não resultou em *amplicon*, coluna 3 – PCR de uma amostra de *Euryoryzomys* sp que não resultou em *amplicon*, colunas 4, 5 e 6 – *amplicons* de 1140 pb oriundos de amostras de *N. lasiurus*, colunas 7 e 8 – *amplicons* de 1140 pb proveniente de amostras de *Akodon* sp, coluna 9 – amostra de *C. tener* que resultou em *amplicon* de 1140 pb, coluna 10 – PCR de *O. judex* que não resultou em *amplicon*, coluna 11 – *amplicon* de 1140 pb de um *pool* do DNA de roedores da subfamília *Sigmondontinae* utilizado como controle positivo.

4.2. Níveis de anticorpos para Hantavírus entre os roedores capturados

Dentre os pequenos mamíferos capturados, somente roedores *Sigmodontinae* apresentaram anticorpos IgG para Hantavírus. Observaram-se 36 roedores soropositivos e, portanto, 6,3 % de positividade. As soropositividades segundo as distintas espécies foram: *N. lasiurus* 12,2 %, *Akodon* sp 4,6 %, *Oligoryzomys nigripes* 2,2 %, *Calomys tener* 0,97 % e *Rhipidomys* sp 20 %, como mostrado na Tabela 6. Nos animais apresentando anticorpos para Hantavírus foram observados títulos séricos de 100 e 1600 em 7,5 %, de 200 17,5 %, de 6400 em 15 %, de 400, 800 e 3200 em 10 % 51200 em 5 %. Estes resultados são mostrados no Anexo IV.

Tabela 6. Soropositividade para Hantavírus entre os roedores capturados.

Espécies	Nº de animais capturados*	Nº de animais infectados*	Soropositividade (%)
<i>Necromys lasiurus</i>	212	26	12,2
<i>Akodon</i> sp	151	7	4,6
<i>Calomys tener</i>	103	1	0,97
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	45	1	2,2
<i>Rhipidomys</i> sp	5	1	20,0

*Descontou-se o número de animais recapturados.

Observou-se uma possível sazonalidade na soropositividade para Hantavírus, que foi de 7,2 % na estação seca e 2,7 % na chuvosa, embora sem significância estatística ($p = 0,1230$ no teste exato de Fisher), como mostrado na Tabela 7. Porém, a frequência da soropositividade para Hantavírus mostrou-se significativamente maior nos meses da estação seca quando comparados aos meses da chuvosa ($p < 0,05$, IC 95 % - 60,9 a -18,4), revelando assim a sazonalidade da zoonose (Figura 16).

Não se observou soropositividade significativamente diferente entre os gêneros (sexos) de roedores capturados ($p > 0,05$, teste exato de Fisher), embora, o número de machos infectados tenha sido maior que o das fêmeas. Também, foi observada soropositividade significativamente maior entre os animais subadultos e

adultos do que nos juvenis ($\chi^2 = 5.340$, $p = 0.02$), o que é de se esperar, sendo associada a um efeito cumulativo. Estes resultados são mostrados na Tabela 7.

As análises mostraram que a soropositividade para Hantavírus está correlacionada positivamente com a abundância de pequenos mamíferos capturados, como mostrado na Figura 16 e esta correlação, também, é ligada ao tipo de ambiente ($r = 0.9703$, $p = 0.0148$). A vegetação introduzida de capim braquiária mostrou um provável efeito positivo na abundância dos roedores e na soropositividade para Hantavírus destes animais, sobretudo *N. lasiurus*, como mostra a Tabela 8. Isto não foi observado na mata semidecídua, que é um ambiente de área nativa. No cerrado, que também é um ambiente de área nativa, verificou-se que a soropositividade foi intermediária entre capim braquiária e mata semidecídua para os animais capturados. Não houve diferença significativa quando comparou-se soroprevalência à abundância dos animais capturados neste ambiente ($p > 0,05$, teste exato de Fisher). Ainda, quando se comparou soroprevalência com abundância de roedores, no ambiente com braquiária, esta mostrou-se significativamente maior que nos outros ambientes ($p < 0,05$, teste exato de Fisher).

Tabela 7. Distribuição dos animais capturados e soropositividade para hantavírus em cada época do ano, segundo gênero e idade.

	^{††} Estação Seca (Abril a Setembro)				Estação Chuvosa (Outubro a Março)				Total				[†] <i>p</i>
	Positivo		Total		Positivo		Total		Positivo		Total		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Gênero													0.3968
Macho	19	8,6	221	48,2	2	3,0	68	61,8	21	7,2	289	51,0	
Fêmea	14	6,0	237	51,7	1	2,3	42	38,1	15	5,3	279	49,1	
Idade*													0,0208
Juvenil	5	5,2	96	50,7	0	0	25	22,7	5	4,1	121	21,3	
Subadulto	9	4,1	220	14,8	2	5,7	35	31,8	11	4,3	255	45,0	
Adulto	19	13,4	142	34,3	1	2,0	50	45,4	20	10,4	192	34,0	

* Idade segundo a massa corpórea específica para cada espécie e caracteres sexuais secundários externos. [†] Valor de *P* para o gênero e idade. ^{††} Valor de *P* para a abundância das espécies capturadas é significativa na estação seca $P = 0.0001$.

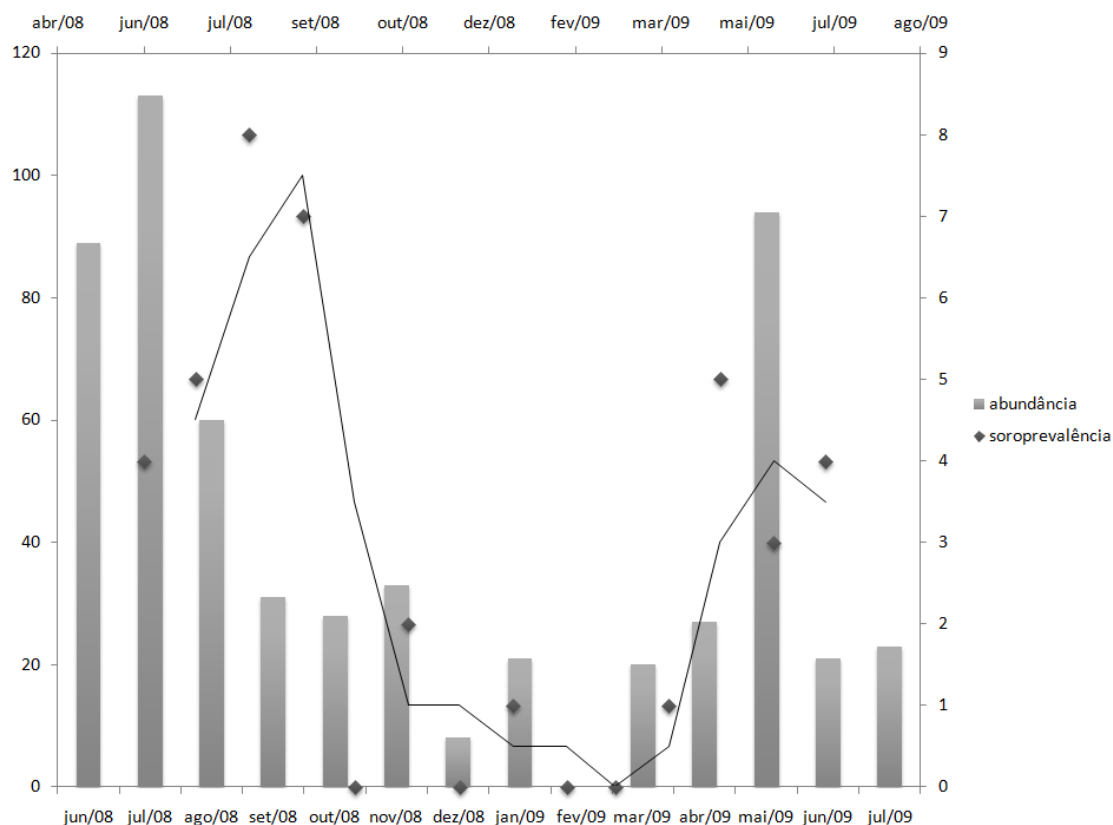


Figura 16. Número de animais capturados (em barras) e soropositividade para Hantavírus (em losangos). A linha de tendência informa uma possível sazonalidade do número de animais capturados, bem como da soropositividade para Hantavírus.

Tabela 8. Abundância de roedores capturados segundo o *habitat* destes animais e soropositividade para Hantavírus.

<i>Habitat</i>																			
Capim braquiária		Cerrado		Cana de açúcar		Mata semidecdua		Total											
Positivo	Total	Positivo	Total	Positivo	Total	Positivo	Total	Positivo	Total										
n	%	n	%	n	%	n	%	n	%										
29	7,7	375	66,0	5	3,4	144	25,3	2	5,0	40	7,0	0	0,0	8	1,4	36	6,3	568	100

4.3. Detecção de Hantavírus por RT-PCR

Dentre os 36 roedores apresentando anticorpos contra Hantavírus, detectaram-se fragmentos dos segmentos M e S do genoma deste vírus, por RT-PCR, em 16, como mostra a Figura 17. Portanto, a presença de Hantavírus foi observada em *Sigmodontinae* das seguintes espécies, *N. lasiurus*, *Akodon* sp, inclusive *Akodon montensis* e *C. tener*. Não foi possível detectar genoma de Hantavírus nos roedores soropositivos *Rhipidomys* sp e *Oligorzyomys nigripes*.

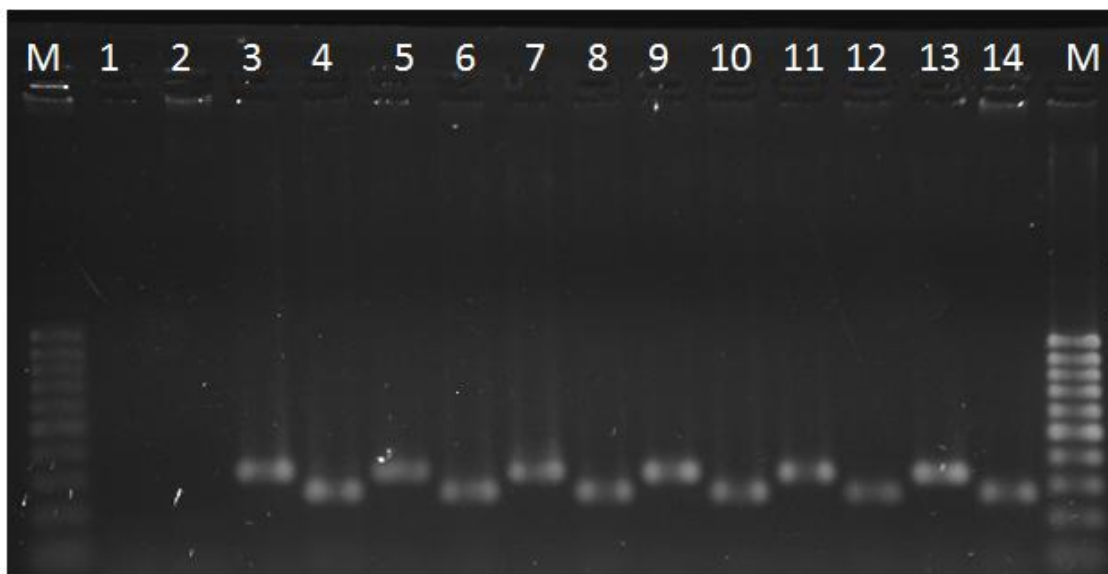


Figura 17. Resultado da RT-PCR em gel de agarose corado com *GelRed*, sob luz UV, exibindo *amplicons* dos segmentos genômicos M (gene Gn) e S (gene N) de Hantavírus oriundos do sangue de roedores. Coluna M – marcador tipo escada de 100 pb, colunas 1 e 2 – fluido de cultura celular não infectada, utilizada como controle negativo, colunas 3, 5 e 7 mostram *amplicon* do gene Gn de Hantavírus com ~ 324 pb e as colunas 4, 6 e 8 mostram um *amplicon* do gene N de Hantavírus com ~ 264 pb. Estes amplicons foram obtidos do sangue de *Necromys lasiurus*. Na coluna 9 observa-se um *amplicon* do gene Gn de Hantavírus com ~ 324 pb e na coluna 7, um *amplicon* do gene N de Hantavírus com ~ 264 pb, ambos obtidos do sangue de *Akodon montensis*. A coluna 11 mostra um *amplicon* do gene Gn de Hantavírus com ~ 324 pb e a coluna 12, um *amplicon* de ~ 264 pb do gene N de Hantavírus, também, as colunas 13 e 14 mostram *amplicons* de ~ 324 pb do gene Gn e ~ 264 do gene N de Hantavírus, estes últimos obtidos de culturas celulares infectadas com o vírus Rio Mamoré, usado como controle positivo.

4.4. Isolamento viral

Confirmou-se o isolamento de Hantavírus em células Vero E6 inoculadas com fragmentos do pulmão de roedores *N. lasiurus* e *C. tener*, nos quais se detectou genoma de Hantavírus. As células foram coletadas dos frascos na 6ª passagem de cultivo, foram lavadas por duas vezes com PBS e transferidas para lâminas de microscópio sobre as quais realizou-se teste de imunofluorescência indireta. No teste utilizaram-se como anticorpo primário, um *pool* de soros de roedores com anticorpos anti-proteína N recombinante de ARAV ou um *pool* de soros de pacientes com SPCVH. Como anticorpo secundário, usou-se conjugado de fluoresceína com anti-IgG de camundongo ou anti-IgG humano (Sigma-Aldrich, EUA). No mesmo teste, células não inoculadas foram usadas como controle negativo e células inoculadas com vírus Rio Mamoré, como controle positivo. Considerou-se isolado o Hantavírus quando células exibiram fluorescência citoplasmática de seus antígenos, como mostra a Figura 18. A presença do vírus isolado foi confirmada, na mesma cultura celular de 6ª passagem, por RT-PCR. Em continuação, o *amplicon* da RT-PCR teve seus nucleotídeos seqüenciados, estas sequências foram alinhadas com outras de Hantavírus, para o gene codificador de N, depositadas no *GenBank* e em seguida, construiu-se a árvore filogenética da Figura 19, mostrando claramente que o Hantavírus isolado trata-se do ARAV.

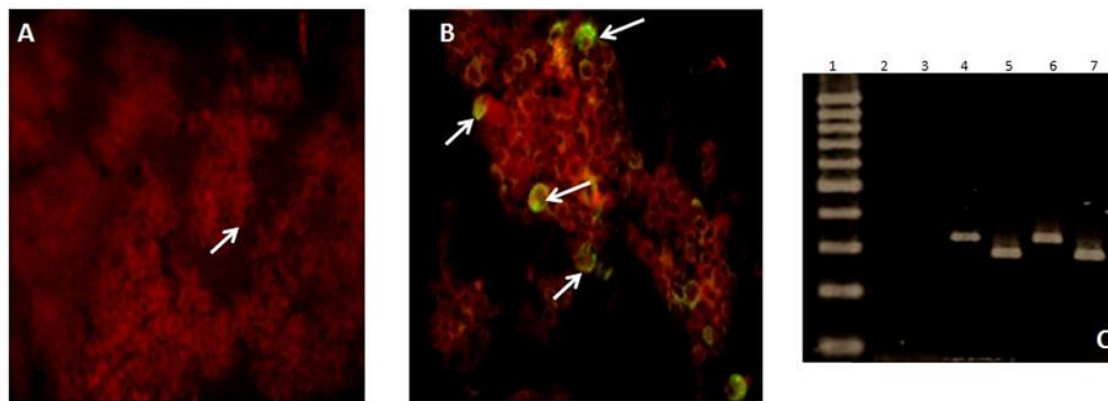


Figura 18. Imagem à microscopia de lâminas de imunofluorescência contendo, em **A**, IFA de células Vero E6 não infectadas como controle negativo, a seta aponta células não infectadas. Em **B**, observam-se células Vero E6 infectadas da 6ª passagem após inoculação com tecidos pulmonares de *Calomys tener*; as setas apontam para antígenos do Hantavírus isolado, no citoplasma das células Vero E6 infectadas. Em **C**, observa-se resultado de RT-PCR em foto de gel de agarose a 1,8 %, corado com brometo de etídio, sob luz UV, mostrando: na coluna 1 – marcador escada de 100 pb; nas colunas 2 e 3 – cultura celular não infectada, como controle negativo; na coluna 4 – *amplicon* do gene Gn de Hantavírus, com ~ 324 pb; na coluna 5 - *amplicon* do gene N de Hantavírus com ~ 264 pb. Estes 2 amplicons foram obtidos do Hantavírus isolado do tecido pulmonar de *C. tener*. Na coluna 6, observa-se *amplicon* do gene Gn de Hantavírus, com ~ 324 pb; na coluna 7 observa-se *amplicon* do gene N de Hantavírus, com ~ 264 pb. Estes 2 últimos *amplicons* foram obtidos de culturas celulares infectadas com vírus Rio Mamoré, usado como controle positivo.

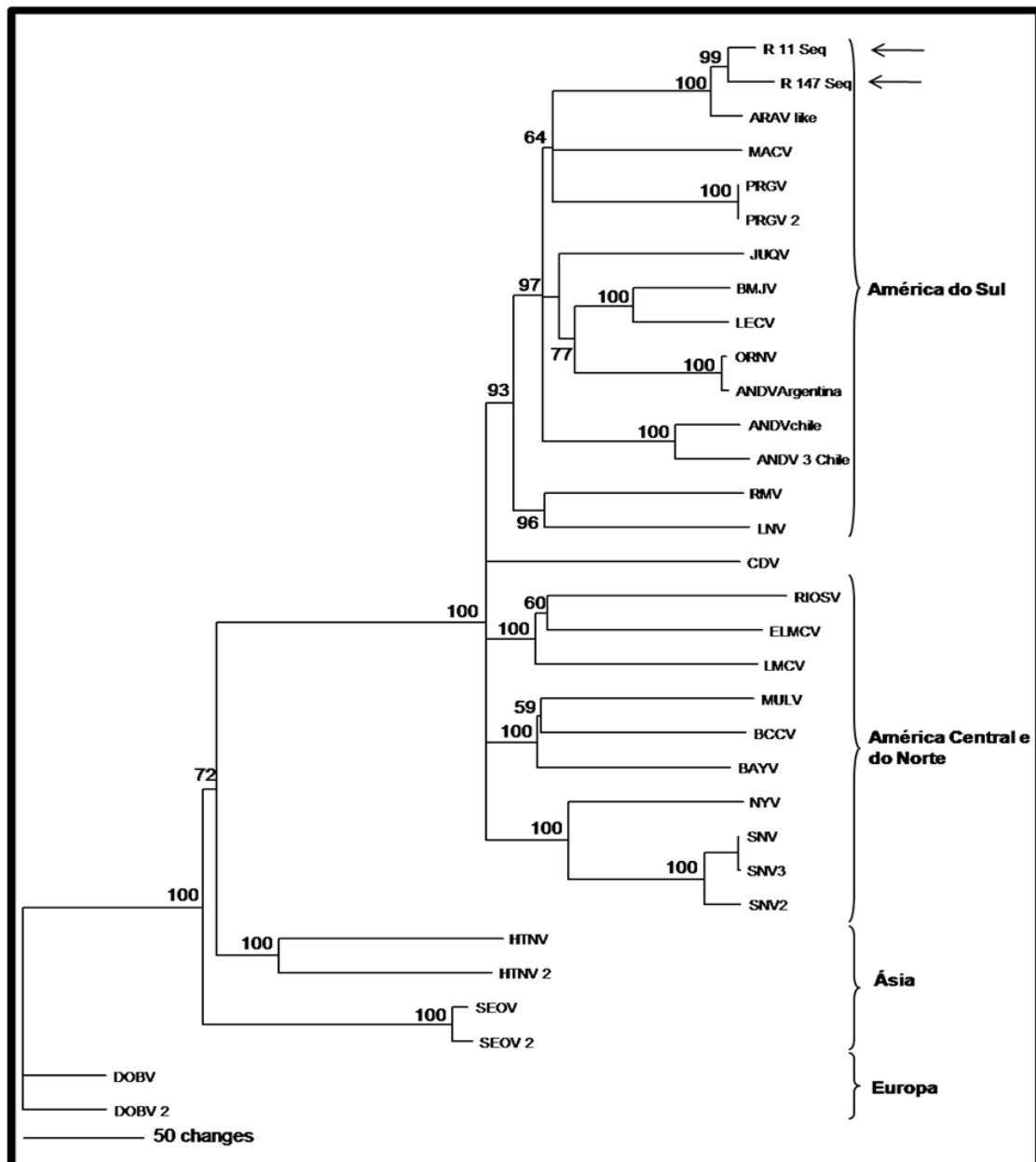


Figura 19. Árvore gerada pelo método de *neighbor-joining*, modelo (HKY+IG), conforme selecionado pelo hLRT em programa Modeltest 3.7., com distribuição gamma (G) de 0,7149 e de proporção de sítios invariáveis (I) de 0,3231. O alinhamento e a edição de nucleotídeos foram conduzidos utilizando programas Clustal W em Mega 4.0. As setas mostram as seqüências do segmento S do Hantavírus Araraquara isoladas como parte deste trabalho, de duas espécies de roedores, *Necromys lasiurus* (R 11) e *Calomys tener* (R 147). Também, contém seqüências referentes ao gene N de outros Hantavírus depositadas no *GenBank*: Araraquara-like (ARAV) (EF571895); Juquitiba (JUQV) (GU213198); Rio Mamore (RMV) (AF133254); Laguna Negra (LNV) (FJ816031); Bermejo (BMJV) (AF482713); Lechiguanas (LECV) (AF482714); Oran (ORNV) (AF482715); Maciel (MACV) (AF482716); Andes (ANDV-Chile) (AF291702); Andes (ANDV-Argentina) (AF325966); Andes (Andes_2-Chile) (AY228237); Pergamino (PRGV_2) (AF482717); Caño Delgadito (CDV) (DQ285566); Rio Segundo (RIOSV) (RMU18100); Maporal (MAPV) (AY267347); El Moro Canyon (EMCV) (RMHU11427); Limestone Canyon (LMCV)

(AF307322); Muleshoe (MULV) (U54575); Black Creek Canyon (BCCV) (L39949); Bayou (BAYV) (L36929); New York (NYV) (U09488); Sin Nombre (SNV) (NC_005216); Sin Nombre (SNV2) (AF281851); Sin Nombre (SNV3) (L37904); Pergamino (PRGV) (AF482717); Seoul (SEOV) (FJ803217); Seoul (SEOV_2) (GU361893); Dobrava (DOBV) (U188452); Dobrava (DOBV_2) (AY533120); Haantan (HTNV) (GU329991); Haantan (HTNV_2) (GU329991). Seqüências dos Hantavírus, Seoul, Haantan e Dobrava foram utilizadas como *out-group*. O *bootstrap* é de 1000 réplicas.

4. DISCUSSÃO

A perda acelerada da diversidade biológica é um processo com conseqüências profundas, pois inviabiliza os ecossistemas com notável prejuízo para a sociedade humana. Os benefícios dos ecossistemas ao homem são diversos e incluem, principalmente, o fornecimento de alimentos e a prevenção de inundações por drenagem de água das chuvas. Contudo, tais benefícios são reduzidos, tornando-se quase inexistentes, com a perda da diversidade biológica (Dearing et al 2010, Suzán et al 2009, Chan et al 2006). Também, acredita-se que a alta diversidade biológica possa proteger os seres humanos contra doenças transmitidas por animais silvestres reduzindo a disseminação e prevalência de patógenos entre os animais silvestres reservatórios (Keesing et al 2006, Ostfeld et al 2003). Ainda, a alteração dos ecossistemas pelo homem, assim como sua influência indireta, através de mudanças climáticas, além de extinguir algumas espécies, estaria produzindo surtos de distúrbio populacional em roedores silvestres. Esses surtos, chamados *ratadas*, quando muito exacerbados, aumentam enormemente a população de algumas espécies e reduzem a diversidade biológica em determinados ambientes (D'Elía 2003a, Lima et al 1999).

Na América do Sul, muitas espécies de roedores silvestres são reservatórios naturais de microrganismos causadores de várias doenças humanas. *Oligoryzomys* sp, *Necromys lasiurus*, *Calomys laucha*, *Akodon azarae* e o rato de algodão, *Sigmodon alstoni*, são reservatórios naturais de diferentes Hantavírus. Da mesma forma, os roedores *Calomys musculinus* e o rato da cana *Zygodontomys brevicauda* são, respectivamente, hospedeiros dos arenavírus Junin, na Argentina, e Guanarito na Venezuela. Os roedores *O. nigripes*, *A. montensis*, *Thaptomys nigrita* e *Euryoryzomys russatus*, abrigam ectoparasitas que são reservatórios do agente etiológico da doença de Lyme: *Borrelia burgdorferi* (Salked et al 2010, Figueiredo et al 2009a, Suzuki et al 2004, Chiappero 2003). Suzán et al (2008), no Panamá, mostraram que o aumento na abundância de algumas espécies e a redução da biodiversidade, estão altamente associados a *habitats* alterados e degradados pelo homem. Naquele estudo, observou-se que animais-reservatório de Hantavírus, *Oligoryzomys fulvescens* e *Zygodontomys brevicauda* sobrevivem bem em áreas antropizadas. Estes roedores silvestres, nas áreas desmatadas, próximos ao homem, procurariam por alimento em ambientes peri-domésticos e buscariam por abrigo em paióis, armazéns, silos ou outros lugares

construídos pelo homem. Como consequência, o local ficaria sujeito às zoonoses transmitidas por estes animais.

Na região Nordeste do Estado de São Paulo, duas plantas exóticas foram introduzidas no último século: o capim braquiária (*Brachiaria decumbens*) e a cana de açúcar (*Saccharum officinarum*). O capim braquiária, oriundo da África, é cultivado, em alguns locais, para a coleta de suas sementes visando à formação de pastagens para o gado. Entretanto, as sementes deste capim, produzidas em quantidade, para fins comerciais, representam um alimento de predileção dos pequenos roedores silvestres. Por outro lado, as plantações de cana de açúcar, planta originária do sudeste asiático, ocupam hoje extensas áreas na região, representando praticamente uma monocultura. A expansão da cana de açúcar, com montagem de uma gigantesca estrutura agroindustrial na região, deveu-se a notáveis estímulos governamentais visando à produção do açúcar e principalmente, de um combustível renovável para veículos, o etanol. Quanto aos roedores silvestres, a raiz e o caule da cana de açúcar lhes servem de alimento. Por outro lado, as queimadas de canaviais, método comumente usado para facilitar a colheita desta planta, exterminam cobras e os ninhos das aves de rapina, que são predadores comuns dos roedores silvestres (Kotchetkoff-Henriques 2003).

Nas últimas décadas, na região de Ribeirão Preto, a degradação ambiental para a plantação do capim braquiária e principalmente, da cana de açúcar, aumentou notavelmente (Figueiredo et al 2009a, Kotchetkoff-Henriques 2003, Figueiredo et al 1999). Assim, capim braquiária e cana de açúcar, estão alterando os ecossistemas na região Nordeste do Estado de São Paulo, diminuindo a diversidade biológica e ocasionando a proliferação aumentada de determinadas espécies de roedores. Nestes locais, proliferariam zoonoses de roedores, como a hantavirose.

No presente trabalho, objetivando avaliar a dinâmica de pequenos mamíferos na região Nordeste do Estado de São Paulo, incursões ao campo foram realizadas. Como resultados, foram capturados nove espécies de roedores e uma de marsupial. Das espécies de roedores capturadas oito eram silvestres e pertencentes à subfamília *Sigmodontinae*, e somente uma espécie, *Murinae* (oriunda do Velho Mundo), de roedores peri-urbanos, foi capturada, *Mus musculus*, como mostra a

Figura 13. De Sousa et al (2008) detectaram prevalência de *N. lasiurus* (45.40 %), seguida de *Mus musculus* (22.41 %), *Akodon* sp (12.64 %) e *Calomys tener* (9.19 %), na região nordeste do Estado de São Paulo. Katz et al (2001), em Guariba, região nordeste do Estado de São Paulo, capturaram, principalmente, *Akodon* sp (39,7 %) e *N. lasiurus* (23,07 %). Estudos conduzidos em Anajatuba, no Maranhão em 2003, a maioria dos animais capturados era roedores *Sigmodontinae*, destacando *N. lasiurus* (64,3 %) e *Akodon* sp (28,1 %) (Rosa et al 2005). Na mesma região em 2005 houve também uma predominância de *N. lasiurus* (85 %) seguida de *Oligoryzomys aff. fornesi* (2,5 %) (Rosa 2008). Estes resultados são semelhantes ao nosso estudo, onde se observou a predominância dos roedores *Necromys lasiurus*, *Akodon* sp e *Calomys tener* (Figura 13).

A taxa de recaptura é um indicativo de densidade populacional. Quando esta taxa é baixa, sugere uma alta densidade populacional e vice-versa (Mills et al 1997). Em nosso estudo comparado a outros, que utilizaram os mesmos métodos de captura e recaptura, no Panamá (Armién et al 2009) e nos Estados Unidos (Luis et al 2010) a taxa foi muito pequena, embora o período de captura no presente estudo tenha sido inferior. Desta forma, a baixa taxa de recaptura, em nosso estudo, sugere que a densidade populacional dos roedores silvestres na região esteja em crescimento. Fato que favorece a sobreposição de nichos ecológicos e assim fenômenos extremos, como é o da *ratada*. Também, o estudo mostrou que isto teria haver com a modificação ambiental pelo homem, já que, no ambiente modificado pela cultura de capim braquiária, foi significativamente maior esta abundância de animais capturados, sobretudo de *N. lasiurus* (Tabelas 4 e 8). Ainda, reforça a idéia de uma densidade populacional crescente de roedores, o grande número de animais subadultos e adultos capturados, sugerindo que a população de roedores naqueles ambientes atinge a maturidade em um tempo muito curto de vida (Tabela 7). Estes resultados são suportados com os realizados por Figueiredo et al (2010), De Sousa et al (2008), e Katz et al (2001) que encontraram, também, uma abundância de roedores subadultos e adultos significativa em áreas de vegetação modificada para o capim braquiária. E ainda, D’Andrea et al 2007 avaliou na região de Sumidouro, Rio de Janeiro, que os

roedores estavam atingindo a maturidade precocemente de acordo com a idade baseada na massa corporal.

A biodiversidade de pequenos mamíferos encontrada no presente estudo foi de 10 espécies e mostrou-se diferente da observada por Bonvicino et al (2005, 2002) que, na chapada dos Veadeiros, estado de Goiás, encontraram 19 espécies. Também, Katz et al (2001), em estudo na região Nordeste do Estado de São Paulo observaram uma diversidade de 13 espécies de roedores, mais parecida com a encontrada no presente estudo. Entretanto, a biodiversidade de pequenos mamíferos observada no presente trabalho corroborou as observadas por De Sousa et al (2008) e por Figueiredo et al (2010) que encontraram 9 espécies na região nordeste do Estado de São Paulo.

No presente estudo, o ambiente com áreas nativas de cerrado, mostrou-se possuidor da maior biodiversidade de pequenos mamíferos, o que fica evidenciado pela presença de uma espécie, apenas naquele local, o roedor *Oxymycterus judex*. Este achado, corrobora o de Bonvicino et al (2002), que analisando a biodiversidade em cerrado, na chapada dos Veadeiros, estado de Goiás, e comparando-a com a de áreas nativa de mata semidecídua, no estado do Espírito Santo, observou maior biodiversidade no cerrado. Por outro lado, os roedores do gênero *Akodon* sp foram capturados nos quatro ambientes estudados (Tabela 4). Bonvicino et al (2002), também, verificaram que espécies do gênero *Akodon* sp encontravam-se em cerrado e mata semidecídua. Tal fato, provavelmente, se deve ao grande número de espécies do gênero *Akodon*, o que permite que estas sejam distribuídas em diferentes ambientes (Steppan 1995). Ainda, no presente estudo, pôde-se notar, no cerrado, a presença de um pequeno mamífero *Didelphinae*, *Gracilinanus agilis*. Magrini et al (2008), também, encontraram espécies desse *Didelphinae* no cerrado da região peri-urbana de Uberlândia, Estado de Minas Gerais. Um achado inédito do presente estudo, foi a captura de roedores do gênero *Rhipidomys* sp (Figura 14), ainda não descritos na região. Estes foram encontrados em ambientes de áreas nativas, 4 espécimes no cerrado e uma na mata semidecídua (Tabela 4).

O roedor silvestre *Necomys lasiurus*, reservatório do Hantavírus ARAV (Suzuki et al 2004), mostrou-se o mais abundante, representando 47,7 % dos animais

capturados no ambiente contendo vegetação introduzida, capim braquiária. Esse resultado corrobora os de estudos anteriores realizados por Figueiredo et al (2010) que verificaram 46,1 % de *N. lasiurus* dentre os roedores capturados e também, de De Sousa et al (2008) observaram 45,4 %, assim como, Katz et al (2001) que encontraram 74,2 %. Todos estes trabalhos foram realizados em áreas de capim braquiária da região nordeste do Estado de São Paulo. *N. lasiurus* possui hábito terrestre e habitam principalmente, ambientes de vegetações abertas. Este animal utiliza alimentos variados, tais como: grãos, vegetais e insetos (Hjelle et al 2001). Este ecletismo alimentar talvez venha colaborando para sua melhor adaptação e maior prevalência em ambientes antropizados, quando comparado às outras espécies. Por outro lado, observa-se que no cerrado, uma área de vegetação nativa e pouco antropizada, a abundância desse roedor é menor que a dos outros dois roedores mais capturados neste estudo, *Akodon* sp e *Calomys tener* que são, também, roedores comuns de áreas abertas de cerrado e ambientes antropizados, possuindo grande plasticidade quanto a qualidade do *habitat* (Gheler-Costa 2006) (Tabela 4). Também, o cerrado mostrou-se o ambiente com maior diversidade biológica o que, inclusive, corrobora a hipótese de que a diversidade biológica controlaria o fenômeno de *ratada* (D'Elía 2003a).

A abundância e riqueza de animais capturados, assim como o alto sucesso de captura (6,2 %), foram maiores na estação seca, que corresponde ao outono-inverno (Figura 12 e 16). Embora não se tenha investigado se a disponibilidade de alimento está associada à sazonalidade, é provável que esta seja maior na estação seca, indicando que a taxa de reprodução destes roedores estaria relacionada à disponibilidade de alimentos e esta, à sazonalidade. Corroborando este achado, Luis et al (2010) demonstraram que a sazonalidade tem grande influência na abundância do roedor silvestre reservatório do SNV, *Peromyscus maniculatus*, em Montana, EUA. Também, D'Andrea et al (2007) demonstraram que a abundância de pequenos mamíferos silvestres está altamente associada à época de inverno e estação seca, na região de Sumidouro, Rio de Janeiro.

Dentre os 568 pequenos mamíferos capturados como parte deste estudo, somente roedores *Sigmodontinae* foram soropositivos para Hantavírus, 6.3 % (Tabela 6). Também, dentre os *Sigmodontinae*, *N. lasiurus* mostraram-se os mais soropositivos

12.2 %, seguidos por *Akodon* sp (4.6 %), *Oligoryzomys nigripes* (2.2 %) e *Calomys tener* 0.97 %. Resultados semelhantes foram obtidos por De Sousa et al (2008), na região de Ribeirão Preto. Em 174 roedores capturados observaram uma soroprevalência de 5,17 % para Hantavírus. Quanto à soropositividade intraespécies, estes autores observaram 4,02 % em *N. lasiurus* e 0,57 % em *Akodon* sp e *C. tener*. Também, Figueiredo et al (2010), em estudo realizado na mesma região, analisaram 595 pequenos mamíferos detectando somente roedores *Sigmodontinae* soropositivos para Hantavírus (*N. lasiurus* 4,0 %, *Akodon* sp 1,5 % e *C. tener* 1,9 %). Os *Rhipidomys* sp podem ser vistos como exceção porque apesar de pouco capturados, apenas cinco espécimes, exibiram 20 % de soropositividade para Hantavírus (Tabela 6). A análise dos resultados de De Sousa et al (2008), de Figueiredo et al (2010) e os obtidos no presente trabalho, permitem inferir que a perda da diversidade biológica na região Nordeste do Estado de São Paulo tem sido um fator de risco para a infecção por Hantavírus entre os roedores silvestres. Suzán et al (2009), observaram que, quanto menor a diversidade biológica de um ambiente, maior é a taxa de transmissão de Hantavírus entre os animais silvestres e o risco de doença humana. Da mesma forma, LoGiudice et al (2008) e Swaddle et al (2008), relataram que a alta diversidade das espécies de roedores silvestres e aves silvestres diminuía a taxa de transmissão da doença de Lyme e do vírus West Nile, respectivamente. No presente trabalho, a baixa diversidade biológica, associada à maior taxa de transmissão de Hantavírus corroborada pela alta soroprevalência, associou-se à vegetação introduzida do capim braquiária. Esta diminuída diversidade aumenta o risco de dois fenômenos, o de *ratadas* e o de *spillover* de Hantavírus, descrito adiante (Allen et al 2009, Suzán et al 2009, Mills et al 1997).

Os resultados exibidos na Tabela 8 sugerem que o capim braquiária seja uma vegetação de risco para infecção por Hantavírus em roedores silvestres, pois onde se observou maior abundância de roedores, também, houve maior risco de infecção por Hantavírus. O capim braquiária, também, mostrou-se um ambiente de risco no estudo conduzido por De Sousa et al (2008), na mesma região.

A infecção por Hantavírus ocorreu de forma semelhante em roedores *Sigmodontinae* de ambos os sexos, como previamente observado por De Sousa et al

(2008), que, também, não encontraram diferença significativa ao compararem taxa de infecção por Hantavírus entre roedores machos e fêmeas, embora tenham observado um número maior de fêmeas infectadas. Quanto à idade dos animais, no presente estudo, constatou-se influência desta na infecção por Hantavírus. Observaram-se mais roedores subadultos e adultos infectados do que roedores juvenis. Esse achado deve ser conseqüência de um efeito cumulativo nas infecções por Hantavírus, durante a vida dos roedores (Tabela 7).

A soropositividade para Hantavírus mostrou-se altamente associada à abundância de roedores e esta abundância, por sua vez, mostrou-se claramente dependente da sazonalidade (Tabela 7). Portanto, a soropositividade para Hantavírus entre roedores silvestres *Sigmodontinae* na região Nordeste do Estado de São Paulo, segue uma tendência sazonal com elevação na estação seca (7,2% nos meses de abril a setembro, Figura 16). Outros estudos, também, mostram alterações sazonais na soroprevalência dos roedores para Hantavírus (Luis et al 2010, Dearing et al 2009, McIntyre et al 2005).

Observou-se no presente estudo o roedor *Rhipidomys* sp apresentando anticorpos IgG para Hantavírus (Tabela 6). Trata-se de achado inédito para este gênero de roedores e sugere a possibilidade de que outros Hantavírus possam estar circulando na região. Por outro lado, o ARAV, poderia estar se adaptando a roedores de outras espécies que não o *N. lasiurus*. Reforça esta idéia o achado de anticorpos IgG contra ARAV e detecção de genoma de Hantavírus por RT-PCR, no roedor *Akodon montensis* (Figura 17). A infecção pelo Hantavírus Jabora foi previamente demonstrada em roedores desta espécie, no estado do Paraná (Raboni et al, 2009).

Hantavírus poderiam infectar habitualmente mais de uma espécie de roedor (Allen et al 2009, Klingström et al 2002). Isto poderia ocorrer quando há sobreposição dos nichos ecológicos destes animais, com maior probabilidade de adaptação dos Hantavírus a novos animais-reservatório (Dearing et al 2010, Allen et al 2009 e Suzán et al 2009). O fenômeno de um Hantavírus estar infectando mais de uma espécie de roedores-reservatório denomina-se *spillover* interespecífico (Klingström et al 2002). O nome surgiu da observação de Klingström e colaboradores (2002), de que o Hantavírus PUUV era capaz de infectar os roedores silvestres *Microtus agrestis* e

Lemmus sibiricus, além do seu previamente reconhecido reservatório, *Clethrionomys glareolus*. Os achados do presente estudo, incluindo o isolamento do ARAV em *C. tener* (Figuras 18 e 19), corroboram os do trabalho referido acima e reforçam a idéia de os Hantavírus não serem espécie-específicos e de estarem, ainda, em fase de espalhamento entre estes animais, na natureza.

A parte deste estudo que inclui nas análises os dados referentes à captura e recaptura de roedores, ainda não se encontra concluída e deverá ter continuidade com o Doutorado. Na próxima etapa, pretende-se finalizar a identificação genética de todas às espécies capturadas bem como, terminar as análises sobre a população destas distintas espécies e a perda da diversidade biológica nos quatro ambientes estudados.

Em suma, o presente estudo evidencia, indubitavelmente, a existência da zoonose por Hantavírus entre os roedores silvestres da região Nordeste do Estado de São Paulo, com risco comprovado de estes patógenos acometerem o homem. Trata-se de um dos trabalhos pioneiros no Brasil quanto à pesquisa das variações populacionais e do comportamento ecológico dos roedores-reservatório de Hantavírus. Com base na coleta de roedores silvestres em diferentes *habitats* do Nordeste do estado de São Paulo, os resultados permitiram conhecer importantes dados epidemiológicos sobre tais animais, bem como, permitiram identificar e isolar Hantavírus infectando estes animais. Portanto, obtiveram-se novas informações, algumas inéditas e que contribuirão para entender o comportamento dos roedores-reservatório de Hantavírus e seus níveis de infecção na região. Também, os achados evidenciam e devem servir de alerta ao sistema de saúde sobre a importância da degradação do meio ambiente produzida pela agricultura como fator de risco à infecção por Hantavírus tanto em animais silvestres como em humanos. E, ainda, o aumento populacional dos roedores silvestres na estação seca poderia ocasionar *spillover* de Hantavírus entre espécies destes animais e o grave distúrbio ecológico representado pelas *ratadas*.

5. CONCLUSÃO

- Os roedores silvestres mais encontrados na região Nordeste do estado de São Paulo foram *Necromys lasiurus*, *Akodon* sp e *Calomys tener*.
- A soropositividade para Hantavírus nos roedores silvestres foi de 6.3 %.
- Encontrou-se, apenas, o Hantavírus Araraquara infectando os roedores silvestres.
- Existe maior abundância de roedores silvestres e também, mais alta soropositividade no ambiente de capim braquiária, *Brachiaria decumbes*, fazendo desta vegetação introduzida um fator de risco para infecção por Hantavírus nestes animais e conseqüentemente, no homem.
- Há uma tendência sazonal, com elevação na estação seca, de abril a setembro, para abundância de roedores silvestres e também, de maior ocorrência das infecções por Hantavírus.
- A taxa de infecção por Hantavírus é maior nos roedores silvestres adultos e subadultos que em juvenis, independentemente do gênero (sexo).
- Ocorre na região Nordeste do estado de São Paulo provável *spillover* do Hantavírus Araraquara, a partir de seu reservatório *Necromys lasiurus* para *Calomys tener* e possivelmente, *Akodon montensis* e *Rhipidomys* sp.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allen L J S, Wesley C L, Owen R D, Goodin D G, Koch D, Jonsson C B, Chu Y K, Hutchinson J M S, Paige R L. A habitat-based model for the spread of hantavirus between reservoir and spillover species. *J. Theor. Biol.* 260 (4): 510-522, 2009.

Araujo J, Henriques DA, Lautenschlager DA, Dutra LMM, Aires CC, Favorito S, Durigon EL. Detection of hantavirus by real time PCR in tissues of bats and opossums in the region of Biritiba Mirim, São Paulo. *Virus Reviews & Research.* 13: 129, 2008.

Armién A G, Armién B, Koster F, Pascale J M, Avila M, Gonzalez P, de la Cruz M, Zaldivar Y, Mendoza Y, Gracia F, Hjelle B, Lee S J, Yates T L, Salazar-Bravo J. Hantavirus infection and habitat associations among rodent populations in agroecosystems of Panama: implications for human disease risk. *Am J Trop Med Hyg.* 81 (1): 59-66, 2009.

Baskin JA. *Bensonomys*, *Calomys*, and the origin of the phyllotine group of neotropical cricetines (Rodentia, Cricetidae). *J. Mammal.* 59:125–135, 1978.

Baskin JA. The initial origin and diversification of the Neotropical Sigmodontinae (Rodentia: Muridae)—a perspective from the North American fossil record. Pp. 263–264 *in* Abstracts of papers and posters. Fifth International Theriological Congress, Rome, 1989.

Betenbaugh M, Yu M, Kuehl K, White J, Pennock D, Spik K, and Schmaljohn C. Nucleocapsid- and virus-like particles assemble in cells infected with recombinant baculoviruses or vaccinia viruses expressing the M and the S segments of Hantaan virus. *Virus Res.* 38:111–124, 1995.

Bonvicino CR, Oliveira JA, D’Andrea PS. Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa – OPMAS/OMS, 2008.

Bonvicino CR, Lemos B, Weksler M. Small mammals of Chapada dos Veadeiros National Park (Cerrado of Central Brazil): ecologic, karyologic, and taxonomic considerations. *Braz J Biol.* 65(3): 395-406, 2005.

Bonvicino CR, Lindbergh SM, and Maroja IS. Small non-flying mammals from conserved and altered areas of Atlantic Forest and Cerrado: comments on their potential use for monitoring environment. *Braz J Biol.* 62(4B): 765-774, 2002.

Borges AA, Donadi EA, Campos GM, Moreli ML, de Sousa RL, Saggiaro FP, de Figueiredo GG, Badra SJ, Deghaide NH, Figueiredo LTM. Association of -308G/A polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter with susceptibility to development of hantavirus cardiopulmonary syndrome in the Ribeirão Preto region, Brazil. *Arch Virol.* Jun;155(6):971-5, 2010.

Borges AA, Campos GM, Moreli ML, Moro Souza RL, Saggiaro FP, Figueiredo GG, Livonesi MC, Moraes Figueiredo LTM. Role of mixed Th1 and Th2 serum cytokines on pathogenesis and prognosis of hantavirus pulmonary syndrome. *Mic Infect.* 10(10-11):1150-7, 2008a.

Borges AA and Figueiredo LTM. Mechanisms of shock in Hantavirus pulmonary syndrome. *Cur Opin Infec Dis.* 10: 1-10, 2008b.

Borges AA, Figueiredo LTM. Atualização de conhecimentos sobre a patogênese da síndrome pulmonar e cardiovascular por hantavírus. *Rev Pat Trop* 36: 191-204, 2007.

Borges AA, Campos GM, Moreli ML, Sousa RLM, Aquino VH, Saggiaro FP, Figueiredo LTM. Hantavirus cardiopulmonary syndrome: Immune response and pathogenesis. *Micro Infec.* 8: 2324-2330, 2006.

Braun JK, Coyner BS, Mares MA, and Van Den Bussche RA. Phylogenetic relationship of South American grass mice of the *Akodon* various group (*Rodentia*, *Cricetidae*, *Sigmodontinae*). *J Mammal.* 89(3): 768 – 777, 2008.

Brower J E, Zar J H, von Ende C. Field and laboratory methods for general ecology, 4th ed. McGraw–Hill, New York, 273, 1998.

Calisher C H, Mills J N, Sweeney W P, Choate J R, Sharp D E. Do unusual site-specific population dynamics of rodent reservoirs provide clues to the natural history of hantaviruses? *Jour Wild Dis.* 37(2): 280–288, 2001.

Calisher CH, Root J, Mills JN, Roew JE, Reeder SA, Jentes ES, Wagoner K, and Beaty BJ. Epizootiology of Sin Nombre and El Moro Canyon hantaviruses, Southeastern Colorado, 1995 – 2000. *Jour Wild Dis.* 41(1):1–11, 2005.

Chan KMA, Shaw MR, Cameron DR, Underwood EC, Daily GC, et al. Conservation planning for ecosystem services. *PLoS Biol* 4: 2138–2152, 2006.

Chiappero MB, Gardenal CN. Restricted gene flow in *Calomys musculus* (*Rodentia*, *Muridae*), the natural reservoir of Junin virus. *J Hered.* Nov-Dec;94(6):490-5, 2003.

Cook WM, Timm RM, and Hyman DE. Ability in three Costan Rican Dry Forest rodents. *Rev Biol Trop.* 49:1177-1181, 2001.

Da Silva MV, Vasconcelos MJ, Hidalgo NT, Veiga AP, Canzian M, Marotto PC. Hantavirus pulmonary syndrome. Report of the first three cases in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop. Sao Paulo.* 39 (4), 231-234, 1997.

Dearing DM, and D E. Ecology of hantavirus in a changing world. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1195: 99–112, 2010.

Dearing DM, Previtalli A, Jones JD, Ely PW, and Wood BA. Seasonal variation in Sin Nombre vírus infections in deer mice: preliminary results. *Jour of Wild Dis.* 45(2):430–436, 2009.

De la Sancha N, D'Elía, Netto F, Pérez P and Salazar-Bravo J. Discovery of *Juliomys* (*Rodentia, Sigmodontinae*) in Paraguay, a new genus of *Sigmodontinae* for the country's Atlantic Forest. *Mammalia.* 73: 162–167, 2009.

De Sousa RLM, Moreli ML, Borges AA, Campos GM, Livonesi MC, Figueiredo LTM, Pinto AA. Natural host relationship and genetic diversity of rodent associated hantaviruses in Southeastern Brazil. *Intervirolgy.* 51: 299-310, 2008.

De Sousa RLM. Tese de doutorado. Detecção *in vitro* de hantavírus e arenavírus e soropidemiologia associada à caracterização molecular de hantavírus em roedores das regiões nordeste do Estado de São Paulo e sudoeste do Estado de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2005.

D'Andrea PS, Gentile R, Maroja LS, Fernandes FA, Coura R and Cerqueira R. Small mammal populations of an agroecosystem in the Atlantic Forest domain, southeastern Brazil. *Braz. J. Biol.,* 67(1): 179-186, 2007.

D'Elía G, Pardiñas UFJ, Jayat JP, Salazar-Bravo J. Systematics of *Necomys* (*Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae*): species limits and groups, with comments on historical biogeography. *Jour Mammal.* 89(3):778–790, 2008.

D'Elía G and Pardiñas UFJ. Putting names to the phylogenetic diversity of neotropical sigmodontine rodents: new genera for known species. *Mammalia.* 71:146–149, 2007.

D'Elía G. *In: Grzimek's animal life encyclopedia, 2nd edition.* Hutchins M, Kleiman DG, Geist V, and McDade MC (Eds). Volumes 12 – 16, mammals I – V. Farmington Hills, MI: Gale Group, 2003a.

D'Elía G. Phylogenetics of *Sigmodontinae* (*Rodentia, Muroidea, Cricetidae*), with special reference to the akodont group, and with additional comments on historical biogeography. *Cladistics* 19:307–323, 2003b.

Easterbrook JD, Klein SL. Immunological Mechanisms Mediating Hantavirus Persistence in Rodent Reservoirs. *PLoS Pathog* 4(11): e1000172, 2008.

Emmons LH. Two new species of *Juscelinomys* (*Rodentia: Muridae*) from Bolivia. *Am Mus Nov.* 3280:1-15, 1999.

Ernest KA, and Mares MA. Ecology of *Nectomys squamipes*, the neotropical Water rat, in central Brazil: home range, habitat selection, reproduction and behaviour. *J Zool. Lond. (A)* 210:599-612, 1986.

Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle. <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>, 1993.

Figueiredo GG, Borges AA, Campos GM, Machado AM, Saggiaro FP, Sabino GSJ, Alberilla A, Figueiredo LTM. Diagnosis of human and rodent infections by hantavirus in Ribeirão Preto, Brazil. *Rev Soc Brasil Med Trop.* 43(4):348-354, 2010.

Figueiredo LTM, Moreli ML, Sousa R L M, Borges, A A, Figueiredo G G, Martins AM, Bisordi I, Nagasse-Sugahara TK, Suzuki A, Pereira LE, de-Souza RP, de-Souza LT, Braconi CT, Harsi CM, de-Andrade-Zanotto PM; Viral Diversity Genetic Network Consortium.. Distinct hantaviruses causing Pulmonary Syndrome in Central Plateau, Southeastern and Southern Brazil. *Emerg Infect Dis.* 15(4): 561-7, 2009a.

Figueiredo LTM, Moreli ML, Borges AA, de Figueiredo GG, Badra SJ, Bisordi I, Suzuki A, Capria S, Padula P. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on Araraquara virus recombinant nucleocapsid protein. *Am J Trop Med Hyg.* 81(2):273-6, 2009b.

Figueiredo LT, Moreli ML, Borges AA, Figueiredo GG, Souza RL, Aquino VH. Expression of a hantavirus N protein and its efficacy as antigen in immune assays. *Braz J Med Biol Res.* 41(7):596-9, 2008.

Figueiredo LTM. Viral hemorrhagic fevers in Brazil. *Rev Soc Bra Med Trop* 39(2):203-210, 2006.

Figueiredo LTM. Hantavíruses. In: Cinerman S, Cinerman B. *Conduas em infectologia*. São Paulo: Editora Atheneu, p.123-132, 2004.

Figueiredo LTM, Moreli ML, Campos GM, Sousa RLM. Hantaviruses in Sao Paulo State, Brazil. *Emer Infec Dis.* 9(7):891 – 892, 2003.

Figueiredo LTM, Campos GM, Rodrigues FB. Síndrome pulmonar e cardiovascular por Hantavirus: aspectos epidemiológicos, clínicos, do diagnóstico laboratorial e do tratamento. *Rev Soc Bras Med Trop.* 34(1): 13-23, 2001.

Figueiredo LTM, Moreli ML, Kashima S, Almeida VSO, Félix PC, Bruno JC, Ferreira IV, Mançano FD. Hantavirus pulmonary syndrome (HCPS) in Guariba, SP, Brazil. Report of 2 cases. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 41: 131-137, 1999.

Galeno H, Mora J, Fernandez J, Hernandez J, Mertz G J, Ramirez E. First Human Isolate of Hantavirus (*Andes vírus*) in the Americas. *Emerg Infect Dis.* 7(8): 657-661, 2002.

Gavrilovskaya IN, Peresleni T, Geimonen E, Mackow ER. Pathogenic hantaviruses selectively inhibit beta3 integrin directed endothelial cell migration. *Arch. Virol.* 147:1913–1931, 2002.

Gavrilovskaya IN, LaMonica R, Fay ME, Hjelle B, Schmaljohn C, Shaw R, Mackow ER. New York 1 and Sin Nombre viruses are serotypically distinct viruses associated with hantavirus pulmonary syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 37:122–126, 1999a.

Gavrilovskaya IN, Brown EJ, Ginsberg MH, Mackow ER. Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by beta3 integrins. *J. Virol.* 73:3951–3959, 1999b.

Gavrilovskaya IN, Shepley M, Shaw R, Ginsberg MH, Mackow ER. Beta3 integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:7074–7079, 1998.

Gheler-Costa C. Tese de Doutorado. Distribuição e abundância de pequenos mamíferos em relação à paisagem da bacia do rio Passa-Cinco, São Paulo, Brasil. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2006.

Ghizoni IRJ, Layme VMG, Lima AP, and Magnusson WE. Spatially explicit population dynamics in a declining population of the tropical rodent, *Bolomys lasiurus*. *Jour Mammal.* 86(4):677–682, 2005.

Gonçalves PR, Oliveira JA. Morphological and genetic variation between two sympatric forms of *Oxymycterus* (*Rodentia: Sigmodontinae*): an evaluation of hypotheses of differentiation within genus. *J Mammal.* 85(1):148–161, 2004.

Hindrichsen S, Medeiros de Andrade A, Clement J, Leirs H, McKenna P, Matthys P, Neild GH. Hantavirus infection in Brazilian patients from Recife with suspected leptospirosis. *Lancet.* 2;341(8836):50, 1993.

Hjelle B, and Yates T. Modeling hantavirus maintenance and transmission in rodent communities. *Curr Top Microbiol Imm.* 256:77-90, 2001.

Holmes R, Boccanera R, Figueiredo LTM, Mançano SR, Pane C. Seroprevalence of Human Hantavirus Infection in the Ribeirão Preto Region of São Paulo State, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 6(5):560-1, 2000.

IBGE. Estimativas da população para 1º de julho de 2009. Estimativas de População e Divisão territorial do Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (14 de agosto de 2009). Página visitada em 16 de agosto de 2009, 2000.

Iversson L B, Da Rosa A P, Rosa M D, Lomar A V, Sasaki M G, Leduc J W. Human infection by Hantavirus in southern and southeastern Brazil. *Rev Assoc Med Bras.* 40: (2), 85-92, 1994.

Jin M, Park J, Lee S, et al. Hantaan virus enters cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *Virology*. 294(1):60-69, 2002.

Johnson AM, de Souza LT, Ferreira IB, Pereira LE, Ksiazek TG, Rollin PE, Peters CJ, Nichol ST. Genetic investigation of novel hantaviruses causing fatal HPS in Brazil. *J Med Virol*. 59(4):527-35, 1999.

Jonsson CB, Figueiredo LTM, and Olli Vapalahti O. A Global Perspective on Hantavirus Ecology, Epidemiology, and Disease. *Clin Microbiol Rev*. 23: (2) 412-441, 2010.

Jonsson CB, and Schmaljohn CS. Replication of hantaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 256:15–32, 2001.

Kallio ER, Voutilainen L, Vapalahti O, Vaheri A, Henttonen H, Koskela E, Mappes T Endemic hantavirus infection impairs the winter survival of its rodent host. *Ecol*. 88:(8) 1911-1916, 2007.

Katz G, Williams RJ, Burt MS, de Souza LT, Pereira LE, Mills JN, Suzuki A, Ferreira IB, Souza RP, Alves VA, Bravo JS, Yates TL, Meyer R, Shieh W, Ksiazek TG, Zaki SR, Khan AS, Peters CJ. Hantavirus pulmonary syndrome in the State of São Paulo, Brazil, 1993-1998. *Vec Born Zoo Dis*. 1(3):181-90, 2001.

Keesing F, Holt RD, Ostfeld RS. Effects of species diversity on disease risk. *Ecol Lett* 9: 485–498, 2006.

Klempa B, Fichet-Calvet E, Lecompte E. Novel hantavirus sequences in shrew, Guinea. *Emerg Infect Dis*. 13: 520–522, 2007.

Klingström J, Heyman P, Escutenaire S, Sjölander KB, De Jaegere F, Henttonen H, Lundkvist A. Rodent host specificity of European hantaviruses: evidence of Puumala virus interspecific spillover. *J Med Virol*. Dec;68(4):581-8, 2002.

Korva M, Duh D, Saksida A, Trilar T, Avsic-Zupanc T. The hantaviral load in tissues of naturally infected rodents. *Microb Infect* 11:344-351, 2009.

Kotchetkoff-Henriques O. Tese de Doutorado. Caracterização da vegetação natural em Ribeirão Preto, SP – Bases para conservação. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2003.

Krautkramer E, Zeier M. Hantavirus causing hemorrhagic fever with renal syndrome enters from the apical surface and requires decay-accelerating factor (DAF/CD55). *J. Virol*. 82:4257–4264, 2008.

Laakkonen J, Kallio R, Kallio-Kokko H, Vapalahti O, Vaheri A and Henttonen H. Is there an association of Pneumocystis infection with the presence of arena-, hanta-, and poxvirus antibodies in wild mice and shrews in Finland? *Parasitology*. 132: 461–466, 2006.

Laconi MR, and Castro-Vásquez A. Precopulatory fighting and other aggressive interactions during mating encounter in the corn mouse, *Calomys musculinus* (*Muridae: Sigmodontinae*). *Mast Neot*. 5:21-28, 1998.

Lasserre A, Cebal E, and Vitullo AD. Successful capacitation and homologous fertilization *in vitro* in *Calomys musculinus* and *Calomys laucha* (*Rodentia: Sigmodontinae*). *J Rep Fert*. 120, 41–47, 2000.

Larson RS, Brown DC, Ye C, Hjelle B. Peptide antagonists that inhibit Sin Nombre virus and Hantaan virus entry through the beta3- integrin receptor. *J. Virol*. 79:7319–7326, 2005.

Lee HW, Lee PW, Johnson KM. Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 137:298-308, 1978.

Lee HW, Johnson KM. Korean hemorrhagic fever: demonstration of causative antigen and antibodies. *Korean J. Intern. Med*. 19:371, 1976.

LeDuc J W, Smith G A, Pinheiro F P, Vasconcelos P F, Rosa E S, Maiztegui J I. Isolation of a Hantaan-related virus from Brazilian rats and serologic evidence of its widespread distribution in South America. *Am J Trop Med Hyg*. 34 (4): 810-815, 1985.

Lima M, Keymer JE, and Jaksic MF. El Niño–Southern Oscillation–driven rainfall variability and delayed density dependence cause rodent outbreaks in western south America: linking demography and population dynamics. *Am. Nat*. Vol. 153, pp. 476–491, 1999.

LoGiudice K, Duerr S, Newhouse M, Schmidt KA, Killilea ME, Ostfeld RS. Impact of community composition on Lyme disease risk. *Ecology*. 89: 2841–2849, 2008.

Luis AD, Douglass RJ, Mills JN, and Bjørnstad ON. The effect of seasonality, density and climate on the population dynamics of Montana deer mice, important reservoir hosts for Sin Nombre hantavirus. *Jour Ani Ecol*. 79: 462–470, 2010.

Luna L, and Patterson BD. A remarkable new mouse (*Muridae: Sigmodontinae*) from Southeastern Peru: with comments on the affinities of *Rhagomys rufescens* (Thomas, 1886). *Fieldiana Zoo*. N.S. 101:1-24, 2003.

Machado AM, Figueiredo GG, Sabino dos Santos Jr G, Figueiredo LTM. Laboratory diagnosis of human hantavirus infection: novel insights and future potential. *Future Virology*.vol 4: (4) 383-389, 2009.

Mackow ER, Gavrilovskaya IN. Cellular receptors and hantavirus pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 256:91–115, 2001.

Magrini L, and Facure KG. Barn owl (*Tyto alba*) predation on small mammals and its role in the control of hantavirus natural reservoirs in a periurban area in southeastern Brazil. *Braz J Biol.* 68(4): 733-740, 2008.

Mann G. Mamíferos de Tarapacá. *Biológica.* 2:23-98, 1945.

Martin Y, Gerlach G, Schlötterer C, and Meyer A. Molecular Phylogeny of European Muroid Rodents Based on Complete Cytochrome *b* Sequences. *Mol Phyl Evol.* 16(1): 37 – 47, 2000.

Matson JO, Abravaya JP. *Blarinomys breviceps*. *Mammal Spec.* 74:1-3, 1977.

McIntyre NE, Chu YK, Owen RD, Abuzeineh A, de la Sancha N, Dick CW, Holsomback T, Nisbett RA, AND Jonsson C. A longitudinal study of Bayou vírus, hosts, and habitat. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 73(6), 1043–1049, 2005.

Mir MA, Duran WA, Hjelle BL, Ye C, and Panganiban AT. Storage of cellular 5' mRNA caps in P bodies for viral cap-snatching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:19294–19299, 2008.

Mills JN, Ksiazek TG, Ellis BA, Rollin PE, Nichol ST, Yates TL, Gannon WL, Levy CE, Engelthaler DM, Davis T, Tanda DT, Frampton JW, Nichols CR, Peters CJ, and Childs JE. Patterns of association with host and habitat: antibody reactive with Sin Nombre vírus in small mammals in the major biotic communities of the Southeastern United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 56(3), pp. 273 – 284, 1997.

Mills JN, Yates TL, Childs JE, Parmenter RR, Ksiazek TG, Rpllin PE, Peters CJ. Guidelines for working with rodents potentially infected with hantavirus. *J Mammal.* 76:716-722, 1995.

Ministério da Saúde Brasileiro. Report on hantavirus infections in Brazil. Brazilian Ministry of Health, Brasilia, Brazil, 2009.

Moreli ML. Tese de doutorado. Diagnóstico de hantavírus por detecção genômica, com estudo filogenético e produção de uma proteína N recombinante. Faculdade de Medicina de Ribeirão da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2005.

Moreli M L, De Sousa R L M, Figueiredo L T M. Detection of Brazilian Hantavirus by RT-PCR amplification of N gene with patients with Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome. *Mem Inst Osw Cruz.* 99: 633-638, 2004.

Mou DL, Wang YP, Huang CX, Li GY, Pan L, Yang WS, Bai XF. Cellular entry of Hantaan virus A9 strain: specific interactions with beta3 integrins and a novel 70kDa protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339:611–617, 2006.

Musser GG, and Carleton MD. Superfamily *Muroidea*. In: Wilson DE and Reeder DM. Mammals species of the world, a taxonomic and geographic reference. 3th edition. The Johns Hopkins University Press, Baltimore. Vol 2, 849-1531, 2005.

Nemirov K, Vapalahti O, Lundkvist AL KE, Vasilenko V, Golovljova I, Plyusnina A, Niemimaa J, Laakkonen J, Henttonen H, Vaheri A, Plyusnin A. Isolation and characterization of Dobrava hantavirus carried by the striped field mouse (*Apodemus agrarius*) in Estonia. *J Gen Virol*. 80: 371–379, 1999.

Nichol S T, Spiropoulou C F, Morzunov S, Rollin P E, Ksiazek T G, Feldmann H et al. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* 262: 914-917, 1993.

Olsson GE, Leirs H, Henttonen H. Hantaviruses and Their Hosts in Europe: Reservoirs Here and There, But Not Everywhere? *Vec Born Zoo Dis*. 10: (6) 549-561, 2010.

Ordóñez-Garza N, Matson JO, Strauss RE, Bradley RD, and Salazar-Bravo J. Patterns of phenotypic and genetic variation in three species of endemic mesoamerican *Peromyscus* (*Rodentia, Cricetidae*). *Jour of Mammol*. 91(4):848–859, 2010.

Ostfeld RS, LoGiudice K. Community disassembly, biodiversity loss, and the erosion of an ecosystem service. *Ecology* 84: 1421–1427, 2003.

Ostfeld R, Keesing F. The function of biodiversity in the ecology of vectorborne zoonotic diseases. *Can J Zool* 78: 2061–2078, 2000.

Padula P J, Sanchez A J, Edelstein A, Nichol S T. Complete nucleotide sequence of the M RNA segment of Andes virus and analysis of the variability of the termini of the virus S, M and L RNA segments. *Journ of Gen Virol*. 83: 2117-2122, 2002.

Padula PJ, Rossi CM, Della Valle MO, Martínez PV, Colavecchia SB, Edelstein A, Miguel SDL, Rabinovich RD, Segura EL. Development and evaluation of a solid-phase enzyme immunoassay based on Andes hantavirus recombinant nucleoprotein. *J Med Microbiol* 49: 149–155, 2000.

Panganiban AT, and Mir MA. Bunyavirus N: eIF4F surrogate and cap-guardian. *Cell Cycle* 8:1332–1337, 2009.

Plassmeyer ML, Soldan SS, Stachelek KM, et al. California serogroup Gc (G1) glycoprotein is the principal determinant of pH-dependent cell fusion and entry. *Virology*. 338(1):121-132, 2005.

Raboni SM, Hoffmann FG, Oliveira RC, Teixeira BR, Bonvicino CR, Stella V, Carstensen S; Bordignon J, D’Andrea PS, Lemos ERS & Dos Santos CND. Phylogenetic characterization of

hantaviruses from wild rodents and HPS cases in the state of Paraná (Southern Brazil). *Jour Gen Virol.* 90: 2166–2171, 2009.

Ramanathan, H. N., and C. B. Jonsson. New and Old World hantaviruses differentially utilize host cytoskeletal components during their life cycles. *Virology* 374:138–150, 2008.

Ramanathan, H. N., D. H. Chung, S. J. Plane, E. Sztul, Y. K. Chu, M. C. Guttieri, M. McDowell, G. Ali, and C. B. Jonsson. Dynein-dependent transport of the Hantaan virus nucleocapsid protein to the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *J. Virol.* 81:8634–8647, 2007.

Ravkov EV, and Compans RW. Hantavirus nucleocapsid protein is expressed as a membrane-associated protein in the perinuclear region. *J. Virol.* 75:1808–1815, 2001.

Ravkov EV, Nichol ST, Peters CJ, and Compans RW. Role of actin microfilaments in Black Creek Canal virus morphogenesis. *J. Virol.* 72:2865–2870, 1998.

Ravkov EV, Nichol ST, and Compans RW. Polarized entry and release in epithelial cells of Black Creek Canal virus, a New World hantavirus. *J. Virol.* 71:1147–1154, 1997.

Reig AO. An assessment of the systematics and evolution of the Akodontini, with the description of new fossil species of *Akodon* (Cricetidae: Sigmodontinae). *Fieldiana Zool. N.S.* 39:347–399, 1987.

Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP. *Mamíferos do Brasil*. UEL Bibliot Cent. 437p, 2006.

Rosa STE. Tese de doutorado. Correlação vírus-hospedeiro e epidemiologia molecular de hantavírus em dois distintos ecossistemas amazônicos: Maranhã e Pará-Mato Grosso. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2008.

Ruedas L A, Salazar-Bravo J, Tinnin D S, Armién B, Cáceres L, García A, Díaz M A, Gracia F, Suzán G, Peters C J, Yates T L, Mills J N. Community ecology of small mammal populations in Panamá following an outbreak of Hantavirus pulmonary syndrome. *J Vec Ecol.* 29 (1): 177-191, 2004.

Saggiaro FP, Rossi MA, Duarte MI, Martin CC, Alves VA, Moreli ML, Figueiredo LT, Moreira JE, Borges AA, Neder L. Hantavirus infection induces a typical myocarditis that may be responsible for myocardial depression and shock in hantavirus pulmonary syndrome. *J Infect Dis.* 15;195(10):1541-9, 2007.

Salkeld DJ, Lane RS. Community ecology and disease risk: lizards, squirrels, and the Lyme disease spirochete in California, USA. *Ecology.* Jan;91(1):293-8, 2010.

Schönrich G, Rang A, Lütteke N, Raftery M J, Charbonnel U, Ulrich R G. Hantavirus-induced immunity in rodent reservoirs and humans. *Immunol Rev.* 225: 163–189 2008.

- Schmaljohn CS, Nichol TS. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, and Straus SE (ed.), *Fields virology*, 5th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. *Fields Virology, 5th Edition Lippincott Williams & Wilkins* 2007.
- Schountz T, Prescott J, Cogswell AC, Oko L, Mirowsky-Garcia K, Galvez AP, and Hjelle B. Regulatory T cell-like responses in deer mice persistently infected with Sin Nombre virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:15496–15501, 2007.
- Song JW, Song KJ, Baek LJ, Frost B, Poncz M, Park K. In vivo characterization of the integrin beta3 as a receptor for Hantaan virus cellular entry. *Exp. Mol. Med.* 37:121–127, 2005.
- Sneath P H A, SOKAL R R. *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification.* W. H. Freeman, San Francisco. 573, 1973.
- Steppan SJ. In: Revision of the tribe Phyllotini (*Rodentia: Sigmodontinae*), with a phylogenetic hypothesis for the *Sigmodontinae*. *Fieldiana Zool. N.S.* 80: 1-112, 1995.
- Suzán G, Marce E, Giermakowski T, Mills JN, Ceballo G, Ostfeld RS, Armién B, Pascale JM, Yates TL. Experimental evidence for reduced rodent diversity causing increased hantavirus prevalence. *PLoS One* 4(5): e5461, 2009.
- Suzán G, Marce E, Giermakowski T, Armién B, Pascale JM, Mills JN, Ceballo G, Gomez A, Aguirre AA, Salazar-Bravo J, Arimén A, Parmenter R, and Yates TL. The effect of habitat fragmentation and species diversity loss on hantavirus prevalence in Panama. *An Bio Eme Dis: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1149: 80–83, 2008.
- Suzuki A, Bisordi I, Levis S, Garcia J, Pereira L E, Souza R P et al. Identifying rodent hantavirus reservoirs, Brazil, *Emerg. Infect. Dis.* 10(12): 2127-2134, 2004.
- Swaddle JP, Calos SE. Increased avian diversity is associated with lower incidence of human West Nile infection: observation of the dilution effect. *PLoS One* e2488, 2008.
- Talamoni SA, Motta-Junior CJ, Dias MM. Fauna de mamíferos da Estação Ecológica de Jataí e da Estação Experimental de Luiz Antônio. In: Santos JE & Pires JSR. *Est Eco Jat.* v1 São Carlos: Rima Editora, 345 pp, 2000.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, and Kumar S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol Biol Evol.* 24(8): 1596–1599, 2007.
- Taylor SL, Frias-Staheli N, Garcia-Sastre A, and Schmaljohn CS. Hantaan virus nucleocapsid protein binds to importin alpha proteins and inhibits tumor necrosis factor alpha-induced activation of nuclear factor kappa B. *J. Virol.* 83:1271–1279, 2009.

Tsai TF, Bauer SP, Sasso DR, Whitfield SG, McCormick JB, Caraway TC, McFarland L, Bradford H, Kurata T. Serological and virological evidence of a Hantaan virus-related enzootic in the United States. *J Infect Dis.* 152(1):126-36, 1985.

Tischler ND, Roseblatt M, Valenzuela PD. Characterization of cross-reactive and serotype-specific epitopes on the nucleocapsid proteins of hantaviruses. *Virus Res.* 135(1):1-9, 2008.

Vaheri A, Vapalahti O, Plyusnin A. How to diagnose Hantavirus infections and detect them in rodents and insectivores. *Rev Med Virol.* 18: 277–288, 2008.

Vapalahti O, Mustonen J, Lundkvist A, Henttonen H, Plyusnin A, Vaheri A. Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infect Dis.* 3: 653–61, 2003.

Vasconcelos MI, Lima VP, Iversson LB, Rosa MD, Rosa AP, da Roa ES, Pereira LE, Nassar E, Katz G, Matilda LH, Zaparoli MA, Ferreira JJ, Peters CJ. Hantavirus pulmonary syndrome in the rural area of Juquitiba, São Paulo metropolitan area, Brazil. *Rev Inst Med Trop. São Paulo.* 39(4), 237-238, 1997.

Villalpando G, Vargas J, and Salazar-Bravo J. First Record of *Rhagomys* (*Mammalia: Sigmodontinae*) in Bolivia. *Mast Neot.* 13(1):143-149, 2006.

Yanagihara R, Daum CA, Lee PW, Baek LJ, Amyx HL, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr. Serological survey of Prospect Hill virus infection in indigenous wild rodents in the USA. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 81(1):42-5, 1987.

Weksler M, Percequillo AR, and Voss RS. Ten New Genera of Oryzomyine Rodents (*Cricetidae: Sigmodontinae*). *Ame Mus Nat Hist.* 3537: 29 pp. 2006.

.

7. ANEXOS

Anexo I. Parecer nº 115/2008 da Comissão de Ética em Experimentação Animal.

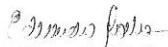
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 115/2008, sobre o projeto intitulado “*Deteção de Hantavírus em roedores e estudo da dinâmica populacional de roedores-reservatório na região de Ribeirão Preto*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Luiz Tadeu Moraes Figueiredo** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **25 de agosto de 2008**.

(We certify that the protocol nº 115/2008, about “*Detection of Hantavirus in rodents and study of dynamics of rodents-reservoir populations in the region of Ribeirão Preto*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in **08/25/2008** meeting).

Ribeirão Preto, 25 de agosto de 2008.


Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal

Anexo II. Autorização IBAMA nº 0115/07, processo 02027.008732/08-97.



Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Centro de Pesquisas em Virologia

D D O U M E N T O

02027.008732/08-97

IBAMA/MMA - SUP. ESTADUAL/SP

DATA: 13 / 08 08

Relatório Relativo ao Projeto:
**ESTUDOS COM VÍRUS ASSOCIADOS A ROEDORES DE
IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA NO BRASIL**

Autorização Ibama nº: 0115/07 SUPESP/ Fauna/ LIC

Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo

Ribeirão Preto

2008

Anexo III. Hantavírus do Velho e Novo Mundo e seus respectivos hospedeiros naturais segundo Jonsson et al 2010.

Group and subfamily	Virus isolate or strain	Abbreviation*	Geographic distribution	Rodent host	Associated disease	
Old World <i>Murinae</i>	Hantaan virus	HTNV	China, South Korea, Russia	<i>Apodemus agrarius</i>	HFRS	
	Dobrava-Belgrade virus	DOBV	Balkans	<i>Apodemus flavicollis</i>	HFRS	
	Seoul virus	SEOV	Worldwide	<i>Rattus</i>	HFRS	
	Saaremaa virus	SAAV	Europe	<i>Apodemus agrarius</i>	HFRS	
	Amur virus	AMRV	Far East Russia	<i>Apodemus peninsulae</i>	HFRS	
	Soochong virus	—	South Korea	<i>Apodemus peninsulae</i>	Unknown	
	<i>Arvicolinae</i>	Puumala virus	PUUV	Europe, Asia, and Americas	<i>Clethrionomys glareolus</i>	HFRS/NE
		Khabarovsk virus	KHAV	Far East Russia	<i>Microtus fortis</i>	Unknown
		Muju virus	MUJV	South Korea	<i>Myodes regulus</i>	Unknown
		Prospect Hill virus	PHV	Maryland	<i>Microtus pennsylvanicus</i>	Unknown
		Tula virus	TULV	Russia/Europe	<i>Microtus arvalis</i>	Unknown
		Isla Vista virus	ISLAV	North America	<i>Microtus californicus</i>	Unknown
		Topografov virus	TOPV	Siberia	<i>Lemmus sibericus</i>	Unknown
		New World <i>Sigmodontinae</i>	Sin Nombre virus	SNV	North America	<i>Peromyscus maniculatus</i>
	Monongahela virus		MGLV	North America	<i>Peromyscus leucopus</i>	HPS
New York virus	NYV		North America	<i>Peromyscus leucopus</i>	HPS	
Black Creek Canal virus	BCCV		North America	<i>Sigmodon hispidus</i>	HPS	
Bayou virus	BAYV		North America	<i>Oryzomys palustris</i>	HPS	
Limestone Canyon virus	—		North America	<i>Peromyscus boylii</i>	Unknown	
Playa de Oro virus	—		Mexico	<i>Oryzomys couesi</i>	Unknown	
Catacamas virus	—		Honduras	<i>Oryzomys couesi</i>	Unknown	
Choclo virus	—		Panama	<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	HPS	
Calabazo virus	—		Panama	<i>Zygodontomys brevicauda</i>	Unknown	
Rio Segundo virus	RIOSV		Cost Rica	<i>Reithrodontomys mexicanus</i>	Unknown	
Cano Delgado virus	CADV		Venezuela	<i>Sigmodon alstoni</i>	Unknown	
Andes virus	ANDV		Argentina, Chile	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	HPS	
Bermejo virus	BMJV		Argentina	<i>Oligoryzomys chocoensis</i>	HPS	
Pergamino virus	PRGV		Argentina	<i>Akodon azarae</i>	Unknown	
Lechiguanas virus	LECV		Argentina	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	HPS	
Maciel virus	MCLV		Argentina	<i>Bolomys obscurus</i>	HPS	
Oran virus	ORNV		Argentina	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	HPS	
Laguna Negra virus	LANV		Paraguay, Bolivia, Argentina	<i>Calomys laucha</i>	HPS	
Alto Paraguay virus	—		Paraguayan Chaco	<i>Holochilus chacoensis</i>	Unknown	
Ape Aime virus	—		Eastern Paraguay	<i>Akodon montensis</i>	Unknown	
Itapúa virus	—		Eastern Paraguay	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Unknown	
Rio Mamore virus	—		Bolivia, Peru	<i>Oligoryzomys microtis</i>	Unknown	
Araraquara virus	—		Brazil	<i>Bolomys lasiurus</i>	HPS	
Juquitiba virus	—		Brazil	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	HPS	
Jaborá virus	—		Brazil, Paraguay	<i>Akodon montensis</i>		

Anexo IV. Níveis de anticorpos dos animais soropositivos para Hantavírus.

nº de captura	Ambiente	Espécies	Níveis de IgG
423	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	200
442	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	800
457	Cerrado	<i>Akodon sp</i>	100
458	Cerrado	<i>Akodon sp</i>	100
465	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	800
471	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	400
484	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	3200
491	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	3200
510	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	1600
546	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	6400
558	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	6400
614	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	6400
617	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	400
666	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	3200
671	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	6400
677	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	6400
678	Cana de açúcar	<i>N. lasiurus</i>	200
697	Cerrado	<i>Rhipidomys sp</i>	200
703	Cerrado	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	400
719	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	200
728	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	800
747	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	25600
748	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	100
752	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	400
770	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	6400
792	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	200
796	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	100
914	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	800
924	Cana de açúcar	<i>Calomys tener</i>	200
932	Capim braquiária	<i>Akodon sp</i>	100
947	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	400
958.2	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	400
968	Capim braquiária	<i>Akodon sp</i>	1600
986	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	6400
1006	Cerrado	<i>Akodon sp</i>	200
1028	Capim braquiária	<i>N. lasiurus</i>	6400

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)