DYANA ALVES HENRIQUES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ARBOVÍRUS ISOLADOS DA FAUNA
DIPTERA NEMATOCERA DO ESTADO DE RONDÔNIA (AMAZÔNIA
OCIDENTAL BRASILEIRA)**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências (Microbiologia).

São Paulo
2008

DYANA ALVES HENRIQUES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ARBOVÍRUS ISOLADOS DA FAUNA
DIPTERA NEMATOCERA DO ESTADO DE RONDÔNIA (AMAZÔNIA OCIDENTAL
BRASILEIRA)**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências .

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Edison Luiz Durigon

São Paulo
2008

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Henriques, Dyana Alves.

Caracterização molecular de arbovírus isolados da fauna diptera
nematocera do Estado de Rondônia (Amazônia ocidental brasileira) /
Dyana Alves Henriques. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Edison Luiz Durigon.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração:
Microbiologia. Linha de pesquisa: Vírus emergentes.

Versão do título para o inglês: Molecular characterization of
arboviruses isolated from mosquitoes fauna (Diptera: nematocera)
Rondonia state (western brazilian Amazon).

Descritores: 1. Arbovírus 2. Diptera 3. *Flavivirus* 4. Mosquitos 5.
Culicidae 6. RT-PCR I. Durigon, Edison Luiz II. Universidade de
São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós
graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB170/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Dyana Alves Henriques.

Título da Tese: Caracterização molecular de arbovírus isolados da fauna diptera nematocera do Estado de Rondônia (Amazônia ocidental brasileira).

Orientador(a): Edison Luiz Durigon.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (051) 3091-7700 - Telefax: (051) 3091-7428
e-mail: icb@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 219/07, referente ao projeto intitulado: "*Caracterização molecular de arbovírus isolados da fauna díptera nematócera do Estado de Rondônia (Amazônia Ocidental Brasileira)*" sob a responsabilidade de Dyana Alves Henriques, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SÉRIES HUMANAS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 20 de julho de 2007.

PROF. DR. CARLOS P. TABORADA
Vice-Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. PAULO M.A. ZANOTTO
Vice-Coordenador da CEPSh - ICB/USP

À minha mãe,
fonte de minha inspiração e admiração.
Pela sua força e coragem
e por ter me ensinado o prazer da Biologia
Amo-te.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Edison Luiz *Barrigudon* pela oportunidade oferecida, pela confiança, pelo apoio, risadas, discussões, reuniões e pela Pitú gelada com limão, claro! Não curou a dor de garganta, mas valeram as risadas!

Ao professor Marcelo Bahia Labruna por ter oferecido a disciplina *VPS5715-2 - O papel dos artrópodes nas Zoonoses*, pois foi onde ganhei o maior presente de doutorado, uma *Coisiinha* muito especial! Obrigada, Carlos por tudo que tem me proporcionado, pelo carinho, paciência, apoio e respeito. Amo te.

À *Dona Coisa* e o *Seu Coisa*, pais da *Coisiinha*, pela forma como me receberam, pela ajuda na tese, pelos presentes, e claro, pelos almoços e jantares! Obrigada, D. Helena e Seu Carlos.

À grande pequena Malu sempre sorridente, pela paciência comigo, pela ajuda no final do trabalho e pelas receitas de alisamento de cabelos!

À TODOS que eu tive contato desde aquele 10/04/2003, quando entrei na Virologia. Obrigada por tudo, pelas *conversas super científicas*, pelas conversas realmente científicas, pela confiança, pela paciência comigo, pelos chás de bebês, de cozinha, congressos, casamentos; pelas fofocas, desentendimentos, entendimentos, *Bio Business*, choros, velas etc, etc, etc...

Gostaria que cada um, ao ler este documento, sinta-se, no momento, abraçado.

ARRUMAMALA AÊ!

À minha irmã *Pequena*, por ser simplesmente minha irmã. O amor nem sempre se expressa de forma convencional, mas o sentimento une, mesmo pessoas tão diferentes. Amo-te.

À minha querida, saudosa e alegre família viçosense, por ter me ensinado e proporcionado o mais puro e sincero significado da palavra amizade. Amo vocês!

À MINHA GRANDE AMIGA JAMÁRIA. Está ficando cada vez mais perto o dia em que ocuparemos as cadeiras de presidente e vice-presidente da SBV!

Aos meus filhos Hércules Augusto e Penélope Rita, por todos os dias, me receberem com prazer e felicidade incondicionais!

Aos meus enteados Junior Della Vitta e Clarica, por me deixar conquistá-los.

Àquele que tem o sorriso mais lindo e que faz a vida, de repente, ter outro sentido, simplesmente, fazer valer a pena. Obrigada, Léo, por me tornar a *CaGay*!

À FAPESP, por aquele motivinho bobo mas que sem ele...

E por último, porém não menos importante, àquele que eu falava mal e reclamava todos os dias, mas todo final de tarde, estava lá, o aguardando ansiosamente: Ao *Pedrao* (702U – Terminal Parque D. Pedro I/ Butantã/USP)

RESUMO

HENRIQUES, D. A. **Caracterização molecular de arbovírus isolados da fauna diptera nematocera do Estado de Rondônia (Amazônia ocidental brasileira)**. 135 f. Tese - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O Estado de Rondônia tem 2/3 de seu território coberto por floresta Amazônica, área com rica biodiversidade de flora e fauna. A vegetação, a hidrografia e o clima equatorial da região criam ecossistemas favoráveis para a existência de diferentes espécies de artrópodes. Entretanto, poucos estudos são realizados a respeito das espécies, suas distribuições, capacidades e competências vectoriais na transmissão de arbovírus. O presente trabalho teve como objetivo a detecção de arbovírus de importância médica, *Flavivirus*, *Orthobunyavirus* e *Alphavirus*, por meio da reação de RT-PCR e *Duplex* RT-PCR nas espécies da fauna diptera nematocera do Estado de Rondônia, Brasil; bem como a caracterização molecular pela reação de sequenciamento de nucleotídeos, dos diferentes arbovírus identificados na Amazônia ocidental brasileira. No total, foram coletados 37.519 dípteros pertencentes a 20 diferentes gêneros e famílias, sendo distribuídos em cerca de 700 *pools*. Quatrocentos e cinquenta *pools* de mosquitos foram macerados em PBS albumina 4% e, após centrifugação, o sobrenadante foi alíquotado para isolamento em cultura celular e para realização das técnicas de RT-PCR e *Duplex* RT-PCR. A técnica de RT-PCR mostrou-se capaz de detectar os controles positivos de Mayaro e Oropouche em *pools* de 15 mosquitos até 10^4 e 10^1 TCID₅₀/mL, respectivamente. As técnicas não conseguiram detectar o vírus Dengue 2 em *pools* de mosquitos contendo menos de três mosquitos infectados oralmente. A utilização do *primer* para o gene β -actina funcionou como controle endógeno e a técnica de RT-PCR foi positiva em 66,8% das amostras. Em *pools* contendo entre um e três mosquitos, o controle endógeno foi detectado em 47,56% das amostras enquanto nos *pools* formados entre 11 e 15, a detecção de β -actina ocorreu em 86,42% das amostras. No total de amostras analisadas, 0,66% foram positivas para o vírus Oropouche e 0,66% para o flavivírus Cacipacoré. Os resultados observados pela *Duplex* RT-PCR foram semelhantes aos de RT-PCR. O vírus Oropouche foi detectado em dois *pools* do gênero *Coquillettidia* sp e em um *pool* do gênero *Deinocerites* sp. O vírus Cacipacoré foi encontrado em dois *pools* de *Anopheles* sp e em um *pool* do gênero *Culex* sp. O conhecimento dos vetores no processo dinâmico das arboviroses é extremamente importante, uma vez que a principal forma de prevenção de epidemias se concentra no controle do inseto. Técnicas de resultados rápidos e sensíveis tornam-se úteis e adequadas para trabalhos de vigilância epidemiológica e do vetor. As técnicas de RT-PCR e a *Duplex*-RT-PCR possibilitaram a detecção dos arbovírus pesquisados nos *pools* de dípteros coletados em campo.

Palavras-chave: Arbovírus; Diptera; *Flavivirus*; Mosquitos; Culicidae; RT-PCR.

ABSTRACT

HENRIQUES, D. A. **Molecular characterization of arboviruses isolated from mosquitoes fauna (Diptera: Nematocera) in Rondonia State (western Brazilian Amazon).** 135 f. Doctor thesis - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The majority (2/3) of the Rondonia State territory is covered by the Amazon rainforest, an area in which a rich biodiversity of flora and fauna are present. The region vegetation's, hydrography and equatorial climate create favorable ecosystems to the existence of different arthropods species. However, few studies are conducted focusing on the species involved, their distribution and capabilities as well as their ability in the arboviruses transmission. The present work aimed to detect *Flavivirus*, *Orthobunyavirus* and *Alphavirus*, arboviruses of medical importance, using RT-PCR and RT-PCR *Duplex* assays, in the mosquitoes species (Diptera: *Nematocera*) of the fauna from the Rondonia state, as well as the molecular characterization of the distinct identified arboviruses from the Brazilian western Amazon through a nucleotides sequencing reaction. A total number of 37.519 mosquitoes were collected and these belonged to 20 different families and genus that were subsequently distributed in approximately 700 *pools*. Four hundred and fifty mosquitoes *pools* were macerated in PBS albumin 4% and after centrifugation, the supernatant was aliquoted for isolation in cell culture and to carry out RT-PCR and RT-PCR *Duplex*. RT-PCR was able to detect the positive controls of Mayaro and Oropouche viruses in *pools* of 15 mosquitoes up to 10^4 and 10^1 TCID₅₀/mL, respectively. The techniques failed to detect the Dengue virus 2 in those *pools* containing less than three orally infected mosquitoes. The β -actin *primer* was used as an endogenous control and RT-PCR was positive in 66,8% of samples. In *pools* containing from one to three mosquitoes, the endogenous control was detected in 47,56% of the samples. From those *pools* containing from 11 to 15, the detection of β -actin occurred in 86,42% of them. In total, 0,66% was positive for Oropouche virus and 0,66% for Cacipacore *Flavivirus*. The results observed by RT-PCR *Duplex* were similar to those of RT-PCR. The Oropouche virus was detected in two *pools* of genus *Coquillettidia* sp and in a pool of genus *Deinocerites* sp. The Cacipacore virus was found in two *pools* of *Anopheles* sp and in a pool of the genus *Culex* sp. Thus, the knowledge of the role of vectors in the dynamic process of arboviruses infections is extremely important, due to the fact that the epidemic prevention has been focused on insect control. In this way, sensitive techniques to get quick results become useful and appropriate in studies of epidemiological and vector surveillance and based on the results of this paper, it was shown that RT-PCR and RT-PCR *Duplex* permitted the detection of arboviruses in *pools* of mosquitoes collected in the field.

Key words: Arboviruses; Diptera; *Flavivirus*; Mosquitoes; Culicidae; RT-PCR.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Arbovírus associados a doença em humanos isolados no Brasil entre 1954-1994.....	20
Quadro 2 - Descrição dos diferentes pares de <i>primers</i> utilizados na reação de RT-PCR.....	38
Quadro 3 - <i>Primers</i> espécie-específicos para os gêneros <i>Alphavirus</i> e <i>Flavivirus</i>	39
Quadro 4 - Titulação dos controles virais positivos de Dengue 2, Mayaro e Oropouche pela técnica de TCID ₅₀ %.....	46
Quadro 5 - Total de 37.519 dípteros coletados nos municípios de Monte Negro e Buritis, no Parque Nacional dos Pacaás Novos, no Vale do Guaporé/Mamoré, na Usina Hidrelétrica de Samuel e nos rios Madeira e Machado.....	48
Quadro 6 – Distribuição dos 450 <i>pools</i> de dípteros processados pela técnica de RT-PCR e <i>Duplex</i> RT-PCR em gêneros e famílias.....	49
Quadro 7 – Quantidade de amostras processadas e de resultados positivos para reação controle usando <i>primers</i> para o gene que codifica a proteína celular constitutiva β actina.....	50
Quadro 8 – Resultados positivos e negativos apresentados, de acordo com a quantidade de mosquitos por <i>pool</i> em 450 amostras.....	51
Quadro 9 – Relação dos gêneros de <i>pools</i> de mosquitos que apresentaram resultados positivos entre as 450 amostras analisadas.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa do Estado de Rondônia, destacando os pontos de coleta dos mosquitos.....	33
Figura 2 - Armadilha noturna de <i>Shannon</i>	35
Figura 3 - Armadilha CDC.....	35
Figura 4 - Comparação entre três diferentes métodos de extração, kit <i>Virus SeqTM HIV Genotyping System</i> (<i>Applied Biosystems</i>), Trizol [®] - <i>Invitrogen</i> e Qiaamp <i>Viral RNA Kit</i> (<i>QIAGEN Inc.</i> , USA), em <i>pools</i> de 15 mosquitos adicionados das suspensões de vírus controles, Mayaro, Dengue 2 e Oropouche.....	44
Figura 5 - Resultados de RT-PCR realizados em <i>pools</i> contendo 5, 10, 15 e 50 mosquitos adicionados com a amostra controle de vírus Mayaro.....	45
Figura 6 - RT-PCR realizada em <i>pools</i> de 15 mosquitos adicionados com as amostras de Dengue 2 e Mayaro.....	46
Figura 7 - RT-PCR realizada em <i>pools</i> de 15 mosquitos contendo espécimes infectados artificialmente com o vírus Dengue 2.....	47
Figura 8 - Resultados da <i>Semi Nested Multiplex RT-PCR</i> para o gênero <i>Flavivirus</i>	52
Figura 9 - Resultados da RT-PCR para o vírus Oropouche.....	52
Figura 10 – Alinhamento, feito pelo <i>NCBI/Blast</i> , de 166 nucleotídeos da amostra 54Cp (Subject) com a sequência do gene da proteína NS5 da cepa Be An 327600 do vírus Cacipacoré (Query-AF013367.1) disponível no <i>GenBank</i>	53
Figura 11 - Relações de identidade e divergência entre a amostra de vírus Cacipacoré AF013367 disponível no <i>GenBank</i> e as amostras BR02 129A7, BR02 43A5 e 54Cp isoladas em mosquitos.....	54
Figura 12 - Topologia da árvore obtida pelo método de <i>Clustal W</i> das amostras isoladas em mosquitos e diferentes flavivírus isolados no Brasil.....	55
Figura 13 - Eletroferograma do intervalo entre as posições 60 e 130 da sequência da amostra 267Eφ.....	55
Figura 14 – Alinhamento, pelo <i>NCBI/Blast</i> , de 297 nucleotídeos da amostra 267Eφ com a cepa BeAn 19991 do vírus Oropouche disponível no <i>GenBank</i>	56

Figura 15 - Relações de identidade e divergência entre as amostras de vírus Oropouche disponíveis no <i>GenBank</i> e a amostra BR02 267Eφ isolada em mosquitos <i>Coquillettidia</i> sp.....	57
Figura 16 - Topologia da árvore obtida pela metodologia de máxima verossimilhança entre sete outras sequências do segmento S do vírus Oropouche adquiridas no <i>GenBank</i> e a amostra do vírus Oropouche isolada em mosquitos <i>Coquillettidia</i> sp (E).....	58
Figura 17 - Células C6/36 crescidas em meio LB-15 anteriormente à infecção com a amostra 267Eφ, segunda passagem, e 10 dias após a infecção.....	59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Arboviroses	17
2.2 Arboviroses no Brasil	18
2.3 Arbovírus	22
2.3.1 <i>Flavivirus</i>	23
2.3.2 <i>Alphavirus</i>	24
2.3.3 <i>Orthobunyavirus</i>	25
2.4 Vetores	26
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivos Específicos	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Áreas de coleta	31
4.1.1 Descrição geral das regiões	31
4.1.2 Estado de Rondônia	31
4.1.3. Município de Monte Negro	32
4.1.4 Parque Nacional dos Pacaás Novos	32
4.1.5 Vale do Guaporé/Mamoré	33
4.1.6 Usina Hidrelétrica de Samuel	33
4.1.7 Rio Machado ou Jiparaná	33
4.2 Tipos de armadilhas	34
4.2.1 Captura dos dípteros	36
4.3 Processamento das amostras	37
4.4 Extração do RNA viral	37
4.5 Transcrição reversa (RT)	37
4.6 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	38
4.7 <i>Duplex</i> RT-PCR	39
4.8 <i>Semi Nested Multiplex</i> PCR	39
4.9 Detecção do produto amplificado	40

4.10 Precipitação do DNA por acetato de sódio	40
4.11 Reação de sequenciamento	40
4.12 Purificação do produto de sequenciamento	40
4.13 Clonagem	41
4.14 Controles virais	41
4.15 Inoculação em culturas de células	42
4.16 Titulação das amostras virais	42
4.17 Controles positivos de mosquitos	43
4.17.1 Infecção de mosquitos com o vírus Dengue sorotipo 2.	43
5 RESULTADOS	44
5.1 Seleção do método de extração	44
5.2 Determinação da quantidade de mosquitos nos <i>pools</i>	45
5.3 Reação de RT-PCR e <i>Duplex</i> RT-PCR em <i>pools</i> de mosquitos adicionados dos controles virais	46
5.4 Sensibilidade da RT-PCR em mosquitos infectados	47
5.5 Coleta de dípteros	48
5.5.1 Espécimes analisados	49
5.6 Avaliação da técnica de extração e RT-PCR	50
5.7 Detecção dos arbovírus	51
5.8 Caracterização Molecular	53
5.8.1 <i>Flavivirus</i>	53
5.8.2 Vírus Oropouche	55
5.9 Isolamento em cultura celular	59
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXO A	84

1 INTRODUÇÃO

Arboviroses são doenças de etiologia viral veiculadas entre vertebrados por artrópodes hematófagos. Os arbovírus, termo originário da expressão inglesa *arthropod borne viruses*, pertencem a cinco diferentes famílias, Reoviridae, Rhabdoviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae e Togaviridae, porém, somente as três últimas possuem representantes que causam doença em humanos, como a Febre da Dengue, a Febre do Mayaro, a Febre do Oropouche, a Doença do Oeste do Nilo, entre outras.

O Brasil, país com mais de 1/3 de seu território coberto por florestas e ecossistemas naturais, proporciona condições favoráveis para a existência de diferentes arbovírus. O Catálogo Internacional de Arbovírus registrou, em 2001, mais de 500 diferentes espécies e, destas, pelo menos 187 foram isoladas no Brasil.

Atualmente, dentre as arboviroses no país, a de maior importância em saúde pública é a Febre da Dengue, a qual registrou, somente no Estado do Rio de Janeiro entre os meses de janeiro e meados da segunda quinzena de março de 2008, 43.523 casos com 30 óbitos, entre os 514 registros, provocados pela forma grave da doença, a Febre Hemorrágica da Dengue (FHD). Além do vírus da Dengue destacam-se os vírus Oropouche, da Febre Amarela, do Rocio e do Mayaro os quais têm sido associados a surtos e/ou epidemias, e são responsáveis por 95% dos casos de arboviroses no Brasil. Entre os 5% restantes estão outros arbovírus circulantes, capazes de acometerem humanos, como os vírus Cacipacoré, Iguape, Caraparu, da Encefalite de *Saint Louis*, da Encefalite Equina do Leste, da Encefalite Equina Venezuelana, entre outros.

A principal forma de prevenção a surtos e epidemias está centralizada no combate ao inseto vetor e, para isso, o conhecimento dos ciclos silvestre e urbano são esclarecedores para o manejo e a utilização de técnicas eficazes de controle. As arboviroses isoladas na Amazônia brasileira são mantidas por diferentes ciclos, alguns complexos e outros não caracterizados, envolvendo diferentes insetos vetores e hospedeiros vertebrados, exceto a Febre da Dengue, cujo ciclo ocorre entre o mosquito *Aedes aegypti* e o homem.

A região Amazônica, devido à diversidade de artrópodes e vertebrados terrestres e arbóreos, abriga a maioria dos arbovírus. O Estado de Rondônia, localizado na região Norte, possui 2/3 de seu território coberto pela Floresta Amazônica e, atualmente, encontra-se em plena expansão agrícola, fator que pode propiciar a emergência de arboviroses silvestres.

Além disso, por fazer fronteira com a Bolívia e por abrigar a principal ligação rodoviária do Acre com o restante do país, a BR-364, o Estado de Rondônia ocupa posição de destaque na propagação de arbovírus.

Além das características ecológicas, sociais, climáticas e demográficas da região, características inerentes ao vetor como distribuição, capacidade e competência, devem ser consideradas na dinâmica da emergência de determinada arbovirose. O Estado de Rondônia soma aos fatores citados, escassez e dificuldade de acesso ao atendimento médico da maior parte da população e é região endêmica de doenças vetoriais, como Malária e Leishmaniose, o que justifica a necessidade de estudos mais completos e detalhados sobre as arboviroses presentes em seu território.

O presente estudo teve como objetivo a caracterização molecular de arbovírus, obtidos de artrópodes coletados no Estado de Rondônia, com o intuito de contribuir para o melhor conhecimento dos ciclos das arboviroses na região da Amazônia ocidental brasileira.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Arboviroses

Arboviroses são doenças causadas por vírus de um grupo ecologicamente bem definido, genericamente designado arbovírus (PINHEIRO et al., 1991, WEAVER, 1997; GUBLER, 2002). As arboviroses apresentam uma distribuição geográfica ligada diretamente à distribuição do inseto vetor com predomínio nos trópicos, onde os surtos dessas doenças tendem a ser mais comuns nos períodos quentes e chuvosos do ano (BLAIR et al., 2000). Entretanto, em regiões de clima frio, as arboviroses se fazem presentes, a exemplo das encefalites japonesa, russa e equina (PINHEIRO et al., 1991; BROOKS et al., 2000).

A ocorrência das arboviroses pode ser esporádica, epidêmica ou endêmica, adquirindo características regionais bem definidas. O quadro clínico apresentado pode variar desde formas benignas, de natureza febril acompanhada ou não de exantemas, até formas graves, caracterizadas por manifestações hemorrágicas ou alterações neurológicas (DIETZE, 1991; WEAVER, 1997; FIGUEIREDO et al., 2002; WEAVER et al., 2004).

A incidência de arboviroses, anteriormente desconhecidas, emergentes e re-emergentes aumentou drasticamente nas últimas duas décadas e algumas se tornaram problemas de saúde pública (BLAIR et al., 2000; GUBLER, 2002; FIGUEIREDO, 2007). Esse aumento é atribuído a vários fatores, entre os quais se incluem o crescimento das populações humanas e as consequentes devastações de áreas virgens; a entrada do homem e de animais domésticos em novos ecossistemas; os sistemas de irrigação precários; o uso do subsolo; o aumento descontrolado da urbanização; a facilidade do transporte de pessoas e cargas vivas, inclusive entre continentes; as novas rotas de migração assumidas pelas aves; as mudanças climáticas; a falência dos programas de controle do vetor e do sistema de saúde pública (MURPHY, 1988; ROUQUAYROL et al., 1999; TAUIL, 2001; VASCONCELOS et al., 2001, GUBLER, 2002; LUNA, 2002, PIGNATTI, 2003).

A cada ano, as arboviroses acometem número maior de indivíduos, porém, grande parte delas permanece pouco conhecida e sem qualquer tipo de intervenção (KUNIHOLM, et al., 2006). As pesquisas sobre arboviroses, sobretudo as de menor impacto em saúde pública, são realizadas durante os períodos de surto ou epidemia, havendo pouca ou nenhuma

informação a respeito da distribuição, incidência, prevalência e caracterização de seus vetores em períodos interepidêmicos (SHOPE, 1998; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1998).

As florestas tropicais da África e do Brasil apresentam rica diversidade de flora e fauna, as quais somadas às condições climáticas parecem criar ecossistemas favoráveis para a existência de diversas arboviroses (KUNIHOLM et al., 2006; FIGUEIREDO, 2007).

O Brasil, quinto maior país do mundo, com 8.514.215 km² possui cerca de 1/3 de seu território coberto por florestas tropicais. A população, de aproximadamente 185 milhões de habitantes, concentra-se nas cidades médias e grandes das regiões Sudeste e Nordeste e, em muitos casos, as condições, às quais essa população está exposta, favorecem a disseminação dos agentes vetores e etiológicos de diferentes enfermidades (FIGUEIREDO, 2000; FIGUEIREDO, 2007).

O Estado de Rondônia, localizado na região Norte do país, apresenta 2/3 de seu território ocupado pela Floresta Amazônica. O clima é predominantemente equatorial, caracterizado por chuvas abundantes, índice pluviométrico de 1.800 mm/ano e temperatura média anual de 26 °C. A capital, Porto Velho, concentra 1/4 da população do estado, sendo que 51,7% vivem em condições precárias de saneamento básico. Tais características geográficas, sociais e a biodiversidade de fauna e flora, somadas ao intenso desmatamento que o estado vem sofrendo ao longo dos anos, propiciam a emergência e a reemergência de diferentes doenças. Porto Velho é considerada, pela Fundação Nacional de Saúde, região endêmica de doenças de transmissão vetorial como a Malária, Leishmaniose e Febre Amarela (OLIVEIRA, 2002; TOSCANO, 2007). Apesar dessa condição, há uma grande lacuna quanto ao estudo das arboviroses e seus vetores no Estado de Rondônia. A maioria das pesquisas brasileiras na Amazônia concentra-se no Estado do Pará em função dos trabalhos realizados pelo Instituto Evandro Chagas (SHOPE, 1998; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1998).

2.2 Arboviroses no Brasil

Segundo dado do Instituto Evandro Chagas (2007), na Amazônia brasileira são conhecidos 34 tipos distintos de arbovírus responsáveis por infecções humanas (quadro 1). Atualmente, no Brasil, a arbovirose de maior importância em saúde pública é a Febre da Dengue. No ano de 2002, quando o terceiro sorotipo foi isolado no país, a incidência da doença aumentou drasticamente, atingindo o recorde de 794.000 casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006a). Em 2007, foram registrados 560.000 casos ou, aproximadamente, 2/3 do total registrado nas Américas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). Nas treze

primeiras cinco semanas do ano de 2008, o Estado do Rio de Janeiro registrou um aumento de 211% no número de casos de Dengue em relação ao mesmo período de 2007, porém, dados da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS) (2008a) demonstraram queda de 27% da doença no país.

O quarto sorotipo do vírus da Dengue foi isolado pela primeira vez no Brasil em 1981, durante epidemia ocorrida na cidade de Boa Vista, Estado de Roraima (DE FIGUEIREDO et al., 2004; CÂMARA et al., 2007) e, desde então, não foi relacionado a outras epidemias. Todavia, no início do ano de 2008, três casos de Febre da Dengue causados pelo sorotipo 4 foram relatados no Estado do Amazonas. O isolamento viral foi realizado em cultura celular e a detecção e identificação por imunofluorescência indireta e PCR, que confirmaram a presença do quarto e último sorotipo no país (DE FIGUEIREDO et al., 2008).

A Febre do Oropouche, doença causada pelo vírus Oropouche, registrou nas Américas aproximadamente 500.000 casos (AZEVEDO et al., 2007). No Brasil, é a arbovirose com maior número de registros, sendo superada apenas pela Febre da Dengue (FIGUEIREDO, 1999; FIGUEIREDO, 2007).

A primeira epidemia causada pelo vírus Oropouche ocorreu em Belém, Estado do Pará, no ano de 1961. Epidemias posteriores foram relatadas em áreas urbanas da Amazônia e do Planalto Central e a doença parecia estar restrita a essas regiões (PINHEIRO et al., 1997; PINHEIRO et al., 1998). As notificações mais recentes da doença ocorreram nos anos de 2003 e 2004, nos municípios de Parauapebas e Porto Munhoz, Estado do Pará (AZEVEDO et al., 2007). Estudos sorológicos demonstraram a circulação de anticorpos em habitantes de cidades localizadas no centro-sul do Estado de Goiás e, no ano de 2005, o vírus foi isolado de um macaco do gênero *Callithrix* na região de Arinos, Minas Gerais (NUNES et al., 2005a), sugerindo que a enfermidade possa estar ocorrendo além da região Norte.

Quadro 1: Arbovírus associados a doença em humanos isolados no Brasil entre 1954-1994.

<i>Alphavirus</i>	<i>Flavivirus</i>	<i>Orthobunyavirus</i>
Vírus da Encefalite Equina do Leste	Vírus Bussuquara	Vírus Tacaiuma
Vírus da Encefalite Equina do Oeste	Vírus Cacipacoré	Vírus Tucunduba
Vírus Una	Vírus Iguaque	Vírus Xingu
Vírus Aura	Vírus Ilhéus	Vírus Apeú
Vírus da Encefalite Equina Venezuelana 1F	Vírus da Encefalite de <i>Saint Louis</i>	Vírus Caraparú
Vírus Pixuna	Vírus Dengue Sorotipo 1	Vírus Caraparú-Like
Vírus Mucambo	Vírus Dengue Sorotipo 2	Vírus Marituba
Vírus Mayaro	Vírus Dengue Sorotipo 3	Vírus Murutucú
	Vírus Dengue Sorotipo 4	Vírus Oriboca
	Vírus da Febre Amarela	Vírus Guaroa
	Vírus da Febre Amarela Cepa Vacinal 17 D	Vírus Catú
	Vírus Rocio	Vírus Guamá
		Vírus Itaqui
		Vírus Oropouche
		Vírus Tacaiuma

Fonte: Adaptado de TRAVASSOS DA ROSA, 1998.

A Febre do Oropouche tem como vetor urbano o ceratopogonídeo *Culicoides paraenses*, o qual está distribuído pelas áreas de baixa altitude de todo continente Americano (FELLIPE-BAUER et al., 2003). O ciclo silvestre da doença envolve as preguiças, *Bradypus tridactylus*, como reservatórios, porém o vetor silvestre permanece desconhecido (BEDIN, 2007).

A Febre Amarela, doença autóctone da América Central trazida para o Brasil no século XVII (FLINT et al., 2000), apresenta um ciclo silvestre, o qual envolve macacos e mosquitos dos gêneros *Haemagogus* sp e *Sabethes* sp, e um ciclo urbano, restrito ao homem e ao *Aedes aegypti* (FIGUEIREDO, 1998; TUBOI, 2007).

No início do ano de 2008 foram notificados 65 casos com suspeita clínica de Febre Amarela Silvestre, na região Centro-Oeste e no Estado do Paraná, dos quais 38 foram confirmados laboratorialmente e 20 evoluíram para óbito (SVS/MS, 2008b). Diferentemente dos surtos epidêmicos ocorridos em Minas Gerais nos anos de 2001 e 2003, esses casos não configuraram uma epidemia, porém, na vigilância da Febre Amarela, os níveis endêmicos e o limite máximo esperado perdem relevância nas decisões sobre intervenção, pois a doença apresentou taxa de letalidade de 53% (CAMACHO, 2008; SVS/MS, 2008).

A forma urbana da doença não é relatada no Brasil desde 1942, apesar do *Ae. aegypti* encontrar-se amplamente distribuído pelo país. A vacina composta pela cepa atenuada e

altamente imunogênica do vírus 17 D tem sido a principal barreira contra o ressurgimento da doença nas cidades (FIGUEIREDO, 2007).

A Febre do Mayaro, doença comum na Amazônia, é a quarta arbovirose de importância em saúde pública, tem como agente etiológico um alfavírus, o vírus do Mayaro (BRONZONI et al., 2004). A Febre do Mayaro foi relacionada a pequenas epidemias em populações rurais da Amazônia e do Planalto Central, pois seu vetor, *Haemagogus janthinomys*, é essencialmente um mosquito silvestre (VASCONCELOS, 2001; FIGUEIREDO, 2007). Na região Amazônica, o vírus é endêmico e, pelo menos, quatro epidemias foram relatadas no Estado do Pará entre os anos de 1955 e 1991 (VASCONCELOS et al., 1998; COIMBRA et al., 2007). Duas outras epidemias foram registradas nos Estados de Goiás e Tocantins, nos anos de 1987 e 1991, respectivamente (VASCONCELOS et al., 1998). Em São Paulo, três casos alóctones da doença foram notificados em 2000 (COIMBRA et al., 2007).

O vírus do Rocio é um flavivírus que, nos anos de 1975 a 1978, foi responsável por grave epidemia de encefalite em 13 municípios do Vale do Ribeira e sete cidades da Baixada Santista no Estado de São Paulo (IVERSSON, 1980). Relataram-se cerca de mil casos da doença com taxa de mortalidade de 10% e 20% dos sobreviventes apresentaram sequelas neurológicas (BEDIN, 2007; FIGUEIREDO, 2007). O vírus do Rocio está associado com doença endêmica em áreas rurais, característica relacionada diretamente ao seu inseto vetor, mosquitos dos gêneros *Psorophora* sp e *Aedes scapularis*. Lopes e colaboradores (1978) isolaram o vírus de um Tico-tico, *Zonotrichia capensis*; entretanto estudos sorológicos demonstraram que outras aves silvestres podem estar envolvidas no ciclo do vírus (BEDIN, 2007).

Além dos arbovírus citados, pelo menos cinco outros flavivírus, sete alfavírus e 14 ortobunyavírus, associados a doenças em seres humanos, circulam pelo país e a maioria é transmitida por mosquitos (DE SOUZA-LOPES et al., 1978; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1998; FERNANDEZ et al., 2000; FIGUEIREDO, 2000; BRONZONI et al., 2004; BRONZONI et al., 2005; BEDIN, 2007).

As epidemias de arboviroses provocam impactos sociais e econômicos importantes, pois, durante os períodos de viremia e convalescência, há consequente diminuição da produtividade e aumento da ausência escolar, gerando perdas relevantes (VASCONCELOS, 1998). Além disso, não se pode desconsiderar a alta letalidade que algumas delas, como a Febre Amarela, apresentam, tampouco as sequelas observadas, principalmente, nos casos de encefalites como Rocio.

2.3 Arbovírus

O Catálogo Internacional dos Arbovírus em 2001 (KARABATSOS, 2001) registrou 534 vírus dos quais 134 causam doenças em humanos. A região Amazônica do Brasil é, provavelmente, a mais rica reserva de arbovírus do mundo, graças à diversidade de artrópodes e vertebrados terrestres e arbóreos, além da gama de condições ecológicas favoráveis (VASCONCELOS et al., 2001). No país, foram isolados e identificados, até o ano de 2007, 200 diferentes espécies de arbovírus, o que corresponde à, aproximadamente, 1/3 da estatística mundial (FIGUEIREDO, 2007).

O termo arbovírus deriva da expressão inglesa *arthropod-borne viruses*, e significa vírus transmitidos por artrópodes (FORATTINI, 1965; FORATTINI, 2002). A Organização Mundial de Saúde (WHO) em 1967, adotou o conceito de que são “vírus que se perpetuam na natureza, principalmente por propagação entre hospedeiros vertebrados susceptíveis e artrópodes hematófagos, ou pela transmissão transovariana ou venérea em artrópodes”. Este grupo inclui vírus de diferentes famílias, como Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Rhabdoviridae, Reoviridae e Asfarviridae, responsáveis por algumas das doenças humanas e veterinárias consideradas mais graves (WEAVER, 1997; MURPHY, 1999; BEDIN, 2007).

A família Asfarviridae, diferentemente das demais, contém o único arbovírus que tem DNA dupla fita como material genético, o vírus da Febre Suína Africana, o qual é transmitido, entre javalis, *Phacochoerus aethiopicus* e *Potamochoerus* sp, por carrapatos do complexo *Ornithodoros moubata* no ciclo silvestre. No ciclo doméstico, a transmissão entre suínos pode ocorrer por contato direto ou por carrapatos. A doença causa febre hemorrágica em animais susceptíveis e alcança altas taxas de mortalidade em alguns rebanhos (VIAL et al., 2007).

A perpetuação dos arbovírus na natureza ocorre graças à capacidade de se replicarem tanto em células de artrópodes quanto em células de vertebrados (MEZENCIO, 1990; RACZ, 2005). Os arbovírus multiplicam-se em células de artrópodes hematófagos e são transmitidos pela saliva para um vertebrado hospedeiro quando o vetor se alimenta. A replicação no animal hospedeiro provoca viremia, com título e duração suficientes para permitir a infecção de outro artrópode, que venha a se alimentar do mesmo hospedeiro (MORSE, 1993; TIMBURY, 1994; BROOKS et al., 2000; RACZ, 2005). No artrópode, o vírus replica-se principalmente nas glândulas salivares, causando uma infecção persistente e pode ser transmitido verticalmente (WEAVER, 1997; WEAVER et al., 2004). Num ciclo de infecção natural não ocorrem, aparentemente, efeitos prejudiciais tanto no artrópode e quanto no hospedeiro. Contudo, nos

ciclos da Dengue e da Febre Amarela Urbana, nos quais o homem é o principal hospedeiro vertebrado ocorre o desenvolvimento da doença (GUBLER, 2002).

A doença desenvolve-se mais comumente quando o hospedeiro natural é substituído por outro, isto é pelo homem ou outro animal doméstico. Contudo, quando o animal alternativo não é o de eleição da espécie do vetor hematófago ou quando do desenvolvimento de viremia com baixos títulos e curta duração, pode ocorrer um bloqueio na transmissão do agente viral. Além do mais, a doença pode vir a se tornar sério problema de saúde pública, com significantes taxas de morbidade e mortalidade, a exemplo das encefalites ou das febres hemorrágicas (BLAIR et al., 2000, WEAVER et al., 2004).

2.3. 1 *Flavivirus*

A família Flaviviridae é constituída por três gêneros, *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*, entretanto, apenas os flavivírus contêm representantes do grupo dos arbovírus. De acordo com os testes de classificação tradicionais, inibição da hemaglutinação (HI), fixação do complemento (FC) e neutralização (NT); os *Flavivirus* e os *Pestivirus* eram considerados membros da família Togaviridae. Posteriormente, com base em estudos genéticos, morfológicos e em características da replicação, esses vírus foram classificados como um grupo distinto (LINDENBACH et al., 2001). O gênero e a família Flaviviridae foram nomeados a partir do primeiro vírus humano identificado, o arbovírus causador da Febre Amarela. O termo *Flavus*, em latim, significa amarelo, em referência à icterícia apresentada pelo paciente em decorrência da grave disfunção hepática provocada pelo vírus (MURPHY et al., 1999; FLINT et al., 2000; LINDENBACH et al., 2001; TUBOI et al., 2007).

Os flavivírus possuem envoltório lipoproteico, morfologia esférica e têm entre 40 e 60 nm de diâmetro. Seu genoma é constituído por RNA linear de fita simples com polaridade positiva e tem cerca de 11 kilobases de tamanho. A extremidade 5' contém o 7-metilguanosina (*cap*), porém a porção terminal 3' não é poliadenilada (SHI et al., 1996; LINDENBACH et al., 2001). O genoma apresenta 10 genes dispostos em uma única *open reading frame* (ORF) que codificam as três proteínas estruturais; a nucleoproteína do capsídeo (C), a proteína de membrana (M), a glicoproteína de superfície (E) e as sete proteínas não estruturais; NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (BURKE et al., 2001; DYER et al., 2007).

A menor proteína estrutural é a C (PM 12-14 kDa) e cópias múltiplas desta proteína associam-se para compor o nucleocapsídeo icosaédrico. A proteína E, maior proteína

estrutural (PM 53-58 kDa) e a mais abundante do envelope, é responsável pelas propriedades biológicas principais do vírus como ligação aos receptores celulares, montagem e fusão celular além de possuir os epítomos que definem os sorotipos. A resposta imune contra a proteína E é a de maior duração (RICE et al., 1986; BURKE et al., 2001).

A proteína pré-M (PM 20-24 kDa) durante o brotamento é clivada originando a proteína M (PM 7-9 kDa) que, após integração com a proteína E no envelope, torna o vírus completo e infeccioso (ANTUÑANO et al., 2000; BURKE et al., 2001).

As sete proteínas não estruturais são obtidas a partir de três ou quatro clivagens realizadas por uma protease semelhante à tripsina, a qual está presente na porção N-terminal de NS3. As duas outras clivagens são feitas pela peptidase sinal celular. A proteína NS3 também funciona como helicase e protease, além de ser parte do complexo RNA polimerase (FRANCKI et al., 1991; MURPHY et al., 1999; BURKE et al., 2001).

A proteína NS5 tem atividade de polimerase e é responsável pela adição do *cap* ao RNA mensageiro. Apresenta sequências nucleotídicas bastante conservadas entre as espécies do gênero e tem sido utilizada em diferentes trabalhos para o desenho de *primers* para identificação de flavivírus (FULOP et al., 1993; BATISTA et al., 2001; BURKE et al., 2001; SCARAMOZZINO et al., 2001; BRONZONI, 2003; BRONZONI et al., 2005; SÁNCHEZ-SECO et al., 2005; DYER et al., 2007).

2.3.2 *Alphavirus*

A família Togaviridae é formada por dois gêneros: *Rubivirus* e *Alphavirus*. Este último agrupa cerca de 27 arbovírus, classificados em sete sorogrupos (BRONZONI et al., 2004). São vírus envelopados e esféricos, medindo entre 60 e 70 nm de diâmetro, cujo genoma é composto por RNA linear de fita simples com polaridade positiva e diferentemente do gênero *Flavivirus*, a extremidade 3' do RNA genômico é poliadenilado. As proteínas são codificadas por sete genes, sendo quatro não estruturais (NSP1, NSP2, NSP3 e NSP4) e duas ou três estruturais (glicoproteínas E1, E2 e E3, presente somente no vírus da Floresta de Semliki, do envelope e a proteína C do capsídeo). (STRAUSS et al., 1994; MURRAY et al., 2004).

Dois terços do genoma viral, a partir da terminação 5', codificam as quatro proteínas não estruturais em uma única poliproteína, a P1234, sintetizada por um mecanismo de leitura até o códon UGA de terminação. A síntese de P1234 parece ativar a NSP4, a qual é clivada primeiro, e o complexo P123/NSP4 sintetiza o RNA de polaridade negativa

complementar ao RNA genômico. Fatores do hospedeiro em conjunto com as proteínas não estruturais atuam na replicação viral. A poliproteína P123 é clivada entre a junção 1 e 2 para compor o complexo P1/P23/NSP4, capaz de sintetizar tanto o RNA fita negativa quanto o RNA genômico 49S. Por fim, ocorre a separação das proteínas NSP2 e NSP3 e o complexo de replicação passa a ser formado pelas proteínas não estruturais completamente processadas. As NSP's agora são capazes de sintetizar o RNA subgenômico 26S que contém os genes das proteínas estruturais.

A síntese do RNA de polaridade negativa cessa, após quatro horas de infecção, enquanto que a produção dos RNA genômico 49S e subgenômico 26S continuam durante o ciclo dos alfavírus na célula. As proteínas estruturais, também, são formadas a partir de uma poliproteína que, após clivagem, dá origem as duas ou três glicoproteínas do envelope, dependendo do vírus, e a proteína C do capsídeo. O mecanismo de síntese de RNA subgenômico garante a eficiência na síntese de vírions, pois a mesma fita pode servir como molde para a produção de várias proteínas estruturais, necessárias para a montagem da progênie viral (TOMAR et al., 2006).

2.3.3 *Orthobunyavirus*

A família Bunyaviridae foi estabelecida em 1975 e, atualmente, é composta por quatro gêneros de vírus que infectam animais; *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus* e *Phlebovirus*, e um gênero, *Tospovirus* que infectam plantas. A maioria de seus representantes foi isolada ou são transmitidos por artrópodes, à exceção dos hantavírus que fazem parte do grupo dos Robovírus, *Rodent Borne Viruses* (FIGUEIREDO, 1999; SCHMALJOHN et al., 2001).

Os vírus da família Bunyaviridae são esféricos, medem entre 80 e 120 nm, são envelopados e apresentam espículas na superfície. O genoma é constituído por três segmentos de RNA fita simples, denominados pequeno (S), médio (M) e grande (L). Os segmentos apresentam polaridade negativa, à exceção do segmento S no gênero *Phlebovirus* que é ambisense (FIGUEIREDO, 1999; MURRAY et al., 2004). Os segmentos de RNA genômicos apresentam formato circular, pois suas extremidades possuem sequências nucleotídicas complementares nas terminações, as quais pareiam de forma estável e não covalente. Estas sequências são conservadas entre os representantes de um mesmo gênero, porém não entre gêneros distintos (LOPEZ et al., 1995; SCHMALJOHN et al., 2001).

A proteína L é codificada no segmento de RNA de mesmo nome e tem a função de RNA polimerase dependente de RNA, importante na replicação e transcrição dos segmentos genômicos. O segmento M codifica uma poliproteína precursora que, após clivagem, dá origem as proteínas estruturais G1 e G2 do envelope e a proteína NSm, presente entre as proteínas estruturais somente nos *Orthobunyavirus* e *Phlebovirus* (HACKER et al., 1997; NUNES et al., 2005b). O segmento S codifica a nucleoproteína estrutural N e, em sobreposição de ORFs, a proteína NSm (NUNES et al., 2005b).

O material genético, ao ser liberado no citoplasma da célula, é transcrito pela polimerase viral e por fatores do hospedeiro, em cópias complementares de polaridade positiva. Ribossomos livres na célula traduzem os RNAm S e L, enquanto o RNAm M é traduzido no ergastoplasma, onde as proteínas nascentes do envelope sofrem glicosilação primária. Cópias do material genético são sintetizadas, tanto para futuro encapsidamento, como para molde do RNA complementar na síntese de proteínas. Os segmentos de RNA genômicos unem-se à proteína N para formarem nucleocapsídeos individuais de formato helicoidal.

Após a montagem, o brotamento ocorre na membrana do Aparelho de Golgi e as partículas maduras são liberadas da célula pela fusão das vesículas citoplasmáticas com a membrana plasmática (SCHMALJOHN et al., 2001).

O vírion maduro carrega consigo a polimerase (L), duas outras proteínas não estruturais, NSs e a NSm, envolvidas na replicação viral (ELLIOTT, 1989; TIMBURY, 1994; VASCONCELOS et al., 1998; MURRAY, 2004) e, pelo menos, um nucleocapsídeo de cada segmento (SCHMALJOHN et al., 2001).

2.4 Vetores

Mosquito e carrapatos são os principais vetores das arboviroses, entretanto outras espécies de artrópodes como flebotomíneos, simulídeos, ceratopogonídeos e cimiídeos, estão envolvidos, respectivamente, no ciclo de algumas doenças, a exemplo dos vírus Oriximiná (Bunyaviridae, *Phlebovirus*), da Estomatite Vesicular (Rhabdoviridae, *Vesiculovirus*), Oropouche (Bunyaviridae, *Orthobunyaviridae*) e o *Buggy Creek* (Togaviridae, *Alphavirus*).

Existem entre 14.000 e 15.000 espécies de artrópodes hematófagos e, entre os vetores transmissores de arbovírus que acometem humanos, a grande maioria pertence à ordem Diptera, sub-ordem Nematocera (FORATINI, 2002; KUNO et al., 2005a).

A ordem Diptera pertence à classe Insecta e agrupa aproximadamente 120.000 indivíduos que apresentam asas posteriores reduzidas, representadas por pequenas estruturas em forma de chave, denominadas halteres, e proeminentes asas dianteiras. A sub-ordem Nematocera engloba os dípteros que possuem antenas com mais de seis segmentos livremente articulados, como os mosquitos, família Culicidae; os borrachudos, família Simuliidae; os maruins, família Ceratopogonidae; e os flebotomíneos, família Psychodidae (FORATTINI, 1996; BARNES et al., 1996)

A transmissão do vírus da Febre Amarela por mosquitos foi proposta, em 1848, por Josiah Nott, nos Estados Unidos, e por Beauperthuy, na Venezuela, em 1853. Entretanto, somente em 1900, o major-médico Walter Reed e colaboradores comprovaram a teoria sugerida por Carlos Finlay, em 1881, sobre a transmissão da doença pelo *Ae. aegypti*, na época identificado como *Culex fasciatus* (FLINT et al., 2000). Desde então, o conhecimento dos vetores e principais hospedeiros têm sido essencial para a prevenção e o controle de arboviroses.

As arboviroses mantêm-se em ciclos, alguns complexos, envolvendo distintas espécies de artrópodes e vertebrados, que podem variar de acordo com as condições ecológicas e sociais de cada região. O *Ae. aegypti*, no Brasil, é o único vetor da Dengue e da Febre Amarela Urbana; porém, na África, populações silvestres de *Ae. aegypti* são preferencialmente zoofílicas, raramente atacam humanos e não desempenham papel importante na transmissão dessas doenças (KUNO et al., 2005a). Na África e na Ásia, o *Ae. albopictus* é vetor secundário da dengue, razão pela qual tem causado preocupação no Brasil, pois o mosquito encontra-se disseminado por quase todo país, é antropofílico e exibe comportamento peridomiciliar, apesar de já ser encontrado em áreas urbanas (CHIARAVALLOTTI NETO et al., 2002; FERREIRA FÉ et al., 2003; MARTINS et al., 2006).

Os mosquitos do complexo *Culex pipiens* apresentam populações ornitofílicas, enquanto outras são zoofílicas e/ou antropofílicas. Estes mosquitos são responsáveis pela transmissão de algumas arboviroses, entre as quais a Doença do Oeste do Nilo (SARDELLIS et al., 2002; ANDERSON et al., 2004; FONSECA et al., 2004), fato preocupante para cidades brasileiras onde os mosquitos estão amplamente disseminados e bem adaptados. O primeiro isolamento do vírus do Oeste do Nilo na América do Sul ocorreu em 2006, na Argentina, em três cavalos mortos por encefalite (MORALES et al., 2006).

O *Anopheles darlingi* é reconhecido como transmissor da Malária em todo país, entretanto os anofelinos podem atuar também, como vetores de arboviroses, a exemplo do alfavírus *O'nyong nyong* (DEGÁLLIER et al., 1994; NATAL, 1998; FORATTINI, 2002).

Algumas espécies podem passar a transmitir determinada arbovirose após alterações drásticas em seu *habitat*. A construção e enchimento da barragem de Tucuruí, Estado do Pará, levou a concentração de animais silvestres nas margens do lago ou nas ilhas formadas. Desta forma, os orthobunyavírus Xingu e Maguari que eram transmitidos por sabetíneos, passaram a ter anofelinos como vetores (DEGÁLLIER et al., 1994).

Algumas das arboviroses não têm seus ciclos estabelecidos. O vírus Tucunduba, por exemplo, foi isolado de diferentes espécies de mosquitos e de uma criança que apresentava febre e encefalite, porém seu reservatório não foi determinado (TRAVASSOS DA ROSA, 1998).

A transmissão biológica por vetores é vital para manutenção dos arbovírus na natureza. Fatores como especificidade entre vírus e hospedeiro, susceptibilidade do vertebrado à doença e características inerentes ao vetor, como zoofilia, capacidade e competência vetorial, são essenciais para seu favorecimento.

Entre os grupos de vetores de arboviroses, é interessante ressaltar que determinados grupos de artrópodes hematófagos não atuam como vetores biológicos de arbovírus, a exemplo das pulgas que, apesar do grande número de espécies, não foram relacionadas a nenhuma arbovirose. Carrapatos parecem estar envolvidos principalmente na transmissão de orthobunyavírus e reovírus, mas não de alfavírus. A transmissão de alfavírus por piolhos (Família Cimicidae), como os vírus *Buggy Creek* e o vírus *Fort Morgan*, foi relatada. Simulídeos parecem transmitir apenas o vírus da Estomatite Vesicular de New Jersey, gênero *Vesiculovirus*, embora o vírus da Encefalite Equina do Leste já tenha sido isolado nesses insetos, a transmissão biológica não foi confirmada. Os ceratopogonídeos, especificamente os *Culicoides* sp, também parecem ser bem seletos, transmitindo apenas os vírus das famílias Bunyaviridae, Reoviridae e Rhabdoviridae (KUNO et al., 2005a).

Há grupos de flavivírus que acometem vertebrados, cujos vetores não são conhecidos, e a transmissão direta é necessária para manutenção dos mesmos na natureza. Estes vírus, filogeneticamente, formam um grupo basal separado, sugerindo que a transmissão direta tenha precedido a vetorial, a exemplo, podemos citar os vírus Modoc, vírus Rio Bravo, vírus Apói e o vírus Tamana do morcego (KUNO, 2001).

A transmissão por contato direto do vírus do Oeste do Nilo entre grupos de gansos foi descrita por Austin et al. em 2004 e, o vírus da Febre Hemorrágica *Omsk*, um flavivírus transmitido por carrapatos dos gêneros *Dermacentor* sp e *Ixodes* sp, disseminou-se entre ratos almiscareiros, *Ondatra zibethica*, por meio de sua eliminação nas fezes e urina.

Outras formas de transmissão dos arbovírus foram descritas por Kuno e colaboradores (2005a), os quais relatam a infecção de mosquitos com os vírus da Encefalite Equina do Oeste e vírus da Febre do *Rift Valley* por meio da ingestão de água contaminada. Tal fato parece estar da mesma forma relacionado aos vírus da Febre do *Rift Valley*, da Febre Amarela e da Encefalite Japonesa, pois morcegos ao se alimentarem de insetos infectados, tornaram-se capazes de transmitir tais agentes.

A transmissão por aerossóis dos vírus da Encefalite Equina Venezuelana e do vírus da Dengue já foi relatada (KUNO, 2005b). Estes arbovírus são classificados como agentes nível de biossegurança 2 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006b); porém, em condições de multiplicação em cultura celular, onde títulos altos podem ser obtidos, há exigência de maior nível de biossegurança.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo a detecção de arbovírus de importância médica, *Flavivirus*, *Orthobunyavirus* e *Alphavirus*, por meio da reação de RT-PCR e *Duplex* RT-PCR nas espécies da fauna diptera nematocera do Estado de Rondônia, Brasil; bem como a caracterização molecular pela reação de sequenciamento de nucleotídeos, dos diferentes arbovírus identificados na Amazônia ocidental brasileira.

3.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a sensibilidade da técnica de RT-PCR e *Duplex* RT-PCR em *pools* de mosquitos adicionados de sobrenadante de cultura de células infectadas.
- Selecionar o método de extração de RNA e determinar a quantidade de mosquitos nos *pools* que garantam bons resultados.
- Detectar arbovírus em *pools* de mosquitos, utilizando as técnicas de RT-PCR e *Duplex* RT-PCR.
- Caracterização molecular e identificação dos arbovírus estudados a partir das sequências genômicas obtidas.
- Correlacionar os arbovírus detectados na fauna diptera nematocera do Estado de Rondônia, visando melhor conhecimento dos ciclos das arboviroses na região da Amazônia ocidental brasileira.

4 MATERIAL E MÉTODOS

De acordo com o Center for Disease Control (CDC)/National Institute of Health (NIH), grande parte dos arbovírus relacionados na *4th Edition of Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* são enquadrados como agentes acima do nível de biossegurança 2. Dessa forma, todo trabalho descrito foi realizado em laboratório nível de biossegurança 3+.

4.1 Áreas de coleta

A partir de estudos observacionais descritivos contemporâneos e prospectivos da fauna diptera nematocera em regiões pré-estabelecidas do Estado de Rondônia, as áreas foram selecionadas evidenciando os locais de ocorrência de arbovírus. As capturas foram realizadas nos municípios de Monte Negro e Buritis, no Parque Nacional dos Pacaás Novos, no Vale do Guaporé/Mamoré, na Usina Hidrelétrica de Samuel, localizada no município de Candeias do Jamari, e no rio Machado (Figura 1).

4.1.1 Descrição geral das regiões

4.1.2 Estado de Rondônia

- Localização: está entre os paralelos de 07° 58' e 13° 43' de latitude Sul e os meridianos de 59° 50' e 66° 48' de longitude oeste de *Greenwich*.
- Área: são 237.576,2 km², correspondendo a 6,16% da Região Norte e a 2,8% do território nacional.
- População: 1.562.417 habitantes, com densidade demográfica de 6,6 hab/km² e com taxa de crescimento anual de 2,2%.
- Clima: o clima do Estado de Rondônia é predominantemente equatorial e a variação da temperatura ocorre em função das chuvas e da altitude. As temperaturas médias anuais variam entre 24 °C e 26 °C, podendo as máximas oscilarem entre 28 °C e 33 °C e as mínimas entre 18 °C e 21 °C nas regiões de maior altitude, como no município de Vilhena. A

precipitação anual varia de 1.800 a 2.400 mm. A menor queda pluviométrica ocorre no trimestre de junho a agosto e a maior, no período entre dezembro a maio.

- Geografia: posição importante em relação aos aspectos fitogeográficos, situando-se no centro da bacia amazônica, em uma região de transição entre o domínio geomorfológico do Brasil Central, e o domínio geomorfológico Amazônico. A área congrega três importantes biomas, floresta Amazônica, Pantanal e Cerrado, apresentando grande biodiversidade de ecossistemas e espécies de fauna e flora (OLIVEIRA, 2002).

4.1.3 Município de Monte Negro

- Localização: está entre os paralelos 10° 15' 43,4'' de latitude sul e 63° 17' 49,2'' de longitude oeste de *Greenwich*.

- População: 12.627 habitantes, sendo 5.722 residentes na zona urbana. Segundo Camargo et al (2002), a população de Monte Negro apresenta taxa de analfabetismo de 23% na geração paterna e de 20% na materna. Na geração dos filhos, a taxa diminui para 6%. Em relação ao tipo de construção das residências, observa-se que 92% são de madeira, sendo 75% com assoalho do mesmo material. Somente 32% das casas possuem energia elétrica. A média de idade dos pais foi de $41,90 \pm 13,21$ e $36,30 \pm 13,35$ para as mães.

- Emancipação: o município emancipou-se da cidade de Ariquemes em 1992.

- Economia: baseada na derrubada/beneficiamento da madeira, o que gera 450 empregos diretos; o comércio local gera 1000 empregos diretos, totalizando 30% do ICMS do município; há também os cultivos de café, milho e arroz, e a pecuária com 90.000 cabeças de gado. Tal economia, associada aos tributos municipais e repasses de outras esferas, gera receita bruta mensal de R\$ 105.472,73 (Plano Municipal de Saúde de Monte Negro, 1996).

4.1.4 Parque Nacional dos Pacaás Novos

- Localização: região de reserva indígena, localizada na região central do estado.

- Área: 207.148,26 hectares.

- Características: região de mata nativa com rica biodiversidade de fauna e flora. Conserva suas características originais sem o impacto e consequências da urbanização.

4.1.5 Vale do Guaporé/Mamoré

- Localização: região de fronteira do Brasil com a Bolívia.
- Características: a região não dispõe de assistência médica regular, possui baixa densidade demográfica e apresenta áreas praticamente inexploradas da floresta amazônica.

4.1.6 Usina Hidrelétrica de Samuel

- Localização: município de Candeias do Jamari, região norte do Estado de Rondônia.
- Características: a construção da usina iniciou-se em 1982. Apresenta um potencial de 216 MW, abastecendo tanto a capital quanto os principais municípios do estado.

4.1.7 Rio Machado ou Jiparaná

O rio Machado é o principal afluente do rio Madeira nos limites de Rondônia, constituindo a segunda mais importante bacia hidrográfica do estado (OLIVEIRA, 2002). Diferentes comunidades residem ao longo do rio, como os povoados de Calama, localizado a 250 km de Porto Velho, e Demarcação, localizado a 275 km de Porto Velho. Estas comunidades apresentam baixa densidade demográfica, alta incidência de Malária e, praticamente, inexistência de atendimento médico às populações.

Figura 1: Mapa do Estado de Rondônia. Os pontos coloridos destacam os locais onde foram realizadas as coletas: Porto Velho, capital do estado; Município de Monte Negro; Município de Buritizópolis; Parque Nacional do Pacaás Novos; Vale dos rios Guaporé/Mamoré; Usina Hidrelétrica de Samuel; Município de Candeias do Jamari; Rio Machado ou Jiparaná e Calama.

FONTE: Modificado de MINISTÉRIO DOS TRANSPORTES (2008).

4.2 Tipos de armadilhas

As coletas ocorreram de forma diversificada em virtude de questões operacionais, tais como dificuldade de acesso, disponibilidade de tempo, armazenamento do material, entre outros. Foram utilizadas armadilhas noturnas de *Shannon*, e armadilhas noturnas CDC (*Center for Disease Control*, Atlanta, U.S.A.) em copas de árvores e em solo, nas regiões escolhidas. Além disso, armadilhas com isca humana e isca animal também foram utilizadas.

A armadilha noturna de *Shannon* (Figura 2) é uma tenda retangular de tecido branco, com cerca de dois a três metros de dimensões laterais. Apresenta abas na parte superior e uma parede interna que a divide em duas partes iguais. A armadilha foi amarrada em árvores e, no seu interior, colocou-se uma fonte luminosa. A luz atrai os insetos e, para escapar, a maioria dos insetos tende a subir, ficando presos na tenda. Os insetos foram capturados com aparelho

de sucção manual e/ ou aspirador elétrico (CONSOLI et al., 1998; MARCONDES, 2001b). A armadilha de *Shannon* foi utilizada por duas horas no período crepuscular (18:00 h-20:00 h).

A armadilha noturna CDC (Figura 3) é uma armadilha automática, baseada na atração exercida por fonte luminosa, na qual está instalada uma hélice cujo movimento aspira os mosquitos para um recipiente (CONSOLI et al., 1998; MARCONDES, 2001b). A armadilha CDC foi utilizada para captura de mosquitos no solo e na copa das árvores, tendo sido acionada a partir das 18:00 h e permanecendo ligada por 12 horas até o amanhecer.

A armadilha de isca humana utiliza os próprios operadores como atrativos para os dípteros. No momento que os espécimes pousam sobre a pele do indivíduo, os mesmos são aspirados com aparelho de sucção manual e/ou aspirador elétrico (FORATTINI, 2002). Esse procedimento foi utilizado em períodos de duas horas ao longo do dia; durante a manhã (06:00h-08:00h), à tarde (14:00h-16:00h) e no crepúsculo (18:00h-20:00h). A armadilha de isca animal substitui o operador por um animal, no caso um carneiro, e foi utilizada de maneira semelhante à humana.

Figura 2: Armadilha noturna de *Shannon*

Figura 3: Armadilha CDC

4.2.1 Captura dos dípteros

No município de Monte Negro as coletas, durante os anos de 2002 e 2003, foram semanais em três localidades:

- região urbana (setor 4)¹ e região de floresta amazônica peri-urbana (Linha C25)¹: em ambas as regiões, capturas com isca-humana, armadilha noturna de *Shannon* e CDC, tanto de solo quanto de copa de árvores, foram realizadas. Armadilha com isca animal foi utilizada apenas na região urbana (setor 4). Os horários, dias e localidade das coletas foram identificados nos rótulos dos tubos. As coordenadas locais, medidas de velocidade do vento, temperatura e umidade do ar *in loco* foram aferidas.
- margens do Rio Jamari: nos locais de floresta nativa às margens do rio, as capturas foram realizadas por 12 horas consecutivas utilizando captura por isca-humana, armadilhas CDC no solo e na copa das árvores.
- município de Buritis, adjacente a Monte Negro: as capturas foram realizadas, uma vez por mês, na região rural, localidade de Rio Alto, às margens do rio Candeias. A equipe de entomologia permaneceu dois dias realizando as coletas, utilizando as quatro formas de captura.

Na Usina Hidrelétrica de Samuel, município de Candeias do Jamari, as capturas foram realizadas durante três viagens ao local nos anos de 2004 e 2005, com intervalo de quatro meses entre elas. Em cada período, a equipe realizou coletas diárias durante três dias consecutivos, utilizando armadilhas de isca-humana e armadilhas noturnas de *Shannon* e CDC.

No vale do Guaporé/Mamoré foram realizadas capturas de dípteros ao longo destes dois rios, a cada 30 km de trecho navegado, totalizando 19 pontos de coleta. Os locais de captura foram demarcados com aparelho *Global Position System* (GPS). A equipe percorreu a fronteira do Brasil com a Bolívia, tomando como ponto de partida a cidade de Guajará Mirim (RO), às margens do rio Mamoré, e, como ponto final, a cidade de Costa Marques (RO), localizada a beira do rio Guaporé.

As expedições ao rio Machado e ao Parque Nacional Pacaás Novos ocorreram nos anos de 2002 e 2003 e utilizaram as quatro formas de captura, em pontos específicos, ao longo do rio e pelo parque.

1-Descrição do plano referencial de urbanização da cidade de Monte Negro. A cidade, assim como Porto Velho, foi dividida em linhas e setores.

4.3 Processamento das amostras

Os mosquitos coletados foram agrupados em *pools* por gênero, por espécie quando da possibilidade de classificação, e por local. Os *pools* foram identificados e acondicionados em nitrogênio líquido. Mosquitos *Aedes albopictus* cepa Rockefeller foram gentilmente cedidas pela Professora Doutora Margareth Capurro do Laboratório de Mosquitos Transgênicos, Instituto de Ciências Biomédicas II/USP para composição dos controles negativos.

Foram macerados, no máximo, 15 e, no mínimo, um mosquito, dependendo da quantidade de animais disponíveis em cada *pool*. A maceração foi realizada à temperatura ambiente (TA) em microtubos de 1,5 mL, utilizando pistilos de plástico e 1 mL de tampão salina fosfato (PBS), pH 7.8, acrescido de 4% de soro albumina bovina. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas à 2500 x g por 30 minutos à 4 °C para sedimentar a carcaça. O sobrenadante foi dividido em duas alíquotas de 500 µL, sendo uma para a extração do RNA e outra para posterior inoculação em cultura de células. À carcaça foram adicionados 200 µL do PBS para acondicionamento em ultracongelador a – 80 °C (HUANG et al., 2001).

4.4 Extração do RNA viral

O RNA foi extraído pelo kit *Virus SeqTM HIV Genotyping System (Applied Biosystems)*. As alíquotas de 500 µL do sobrenadante foram centrifugadas à 20870 x g por 1 hora à 4 °C. O sobrenadante foi removido, e 600 µL do tampão de lise viral foram adicionados ao sedimento. Após incubação, sob agitação, à TA por 10 minutos, houve o acréscimo de 600 µL de isopropanol absoluto. Seguiu-se nova centrifugação à 15000 x g por 15 minutos, cujo sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com etanol 70% e centrifugado a 15000 x g por 5 minutos. Posteriormente ao descarte do sobrenadante e secagem das amostras em concentrador, o sedimento foi ressuspensionado em 50 µL do diluente.

4.5 Transcrição reversa (RT)

A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando o *High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems)*. O cDNA foi transcrito a partir de 50 µL de RNA extraído, diluído em tampão contendo 50 mM de Tris-HCl [pH 8.3], 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂ (10 X RT Buffer–*Applied Biosystems*), 250 U de Transcriptase Reversa (*MultiScribe RT–*

Applied Biosystems), 50 pMol de *random primer* (10 X *Random primers-Applied Biosystems*), 250 mM de cada dNTP (25 X dNTP *mixture-Applied Biosystems*) e água ultra pura q.s.p. 100 µL. Posteriormente, a mistura foi colocada no termociclador programado para um ciclo composto por três etapas, sendo a primeira à 25 °C por 10 minutos, a segunda, 37 °C por 120 minutos e, finalmente, 4 °C por 5 minutos.

4.6 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

A amplificação foi efetuada a partir de 8 µL de cDNA diluído em tampão contendo 75 mM de Tris-HCl [pH 9,0], 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 20 mM (NH₄)₂SO₄ (*Reaction buffer-Biotoools*), 10 pMol de cada *primer*, 1 U de *Taq Polimerase (Biotoools DNA polymerase)* e água ultra pura q.s.p. 50 µL. A amplificação foi efetuada em termociclador programado com uma etapa de 94 °C por 5 minutos, seguida de 39 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 53 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e uma etapa final de 72 °C por 5 minutos. As amostras foram amplificadas em cinco diferentes misturas, cada uma contendo um par de *primers* (Quadro 2) (BRONZONI et al., 2003).

Quadro 2: Descrição dos diferentes pares de *primers* utilizados na reação de RT-PCR.

Mix	Gênero	Primer	Seqüência	Bibliografia	Amplicon (pb)
1	<i>Alphavirus</i>	sM ₂ W	YAG AGC DTT TTC GCA YST RGC HW	PFEFFER et al., 1997	400
		cM ₃ W	ACA TRA ANK GNG TNG TRT CRA ANC CDA YCC		
2	Beta-actina	Betaac-s1	GAGCGTGGCTACTCCTTCAC	ARAUJO, 2007	250
		Betaac-c1	AGTTTCGTGGATACCGCAAG		
3	<i>Flavivirus</i>	sFG ₁	GGT CTC CTC TAA CCT CTA G	FULOP et al., 1993	1000
		cFG ₂	GAG TGG ATG ACC ACG GAA GAC ATGC		
4	Oropouche	sOro	GTGGGGTCCAATTTGC	MORELI et al., 2001	300
		cORO	TGAACCCTATGCATCT		
5	<i>Orthobunyavirus</i>	sBunS	AGT AGT GTG CTC CAC		>700
		cBunC	AGT AGT ATA CTC CAC		

* “s” sense; “c” anti-sense

4.7 Duplex RT-PCR

A mistura de reação foi semelhante à utilizada para amplificação por RT-PCR, porém foram adicionados ambos os pares de *primers* para detecção dos gêneros *Alphavirus* e *Flavivirus* (BRONZONI et al., 2005) na concentração de 15 pMol. As amostras foram submetidas ao mesmo protocolo de ciclagem.

4.8 Semi Nested Multiplex PCR

A mistura de semi *Nested Multiplex* PCR consistiu de 1 µL do produto obtido na PCR diluído em tampão contendo 75 mM de Tris-HCl [pH 9,0], 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 20 mM (NH₄)₂SO₄ (*Reaction buffer–Biotools*), 15 pMol do *primer sense* gênero específico, 15 pMol de cada *primer* espécie específico (Quadro 3), 1 U de *Taq* Polimerase (Biotools DNA polymerase) e água MilliQ q.s.p. 50 µL. *Primers*, os quais possuíam amplicons com tamanhos próximos, foram adicionados em misturas separadas. A amplificação foi efetuada em termociclador *Mastercycler® Gradient* (Eppendorf) programado de uma etapa de 94 °C por 5 minutos, seguida de 25 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 53 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e uma etapa final de 72 °C por 5 minutos.

Quadro 3: *Primers* espécie-específicos para os gêneros *Alphavirus*^a e *Flavivirus*^b

<i>Primer</i>	Arbovírus	Sequência (5'-3')	Bibliografia	<i>Amplicon</i> (pb) *
sVEE ^a	Encefalite equina venezuelana	ACGGAGGTAGACCCATCCGA	BRONZONI et al., 2004	400
sEEE ^a	Encefalite equina do leste	CCACGGTACCGTTGCC		124
sWEE ^a	Encefalite equina do oeste	GGCGGCAGACCTGCTGGAA		208
sAura ^a	aurá	TCAATGCACCTTCGACCA		86
sMay ^a	mayaro	GGAAGTTGGCCAAGGC		270
cDen1 ^b	dengue 1	CGTTTTGCTCTTGTGTGCGC	BRONZONI et al., 2003	472
cDen2 ^b	dengue 2	GAACCAGTTTGGTTDRTTTCATCGCTGCC		316
cDen3 ^b	dengue 3	TTCCTCGTCCTCAACAGCAGCTCTCGCACT		659
cDen4 ^b	dengue 4	GCAATCGCTGAAGCCTTCTCCC		222
cSLE ^b	encefalite de Saint Louis	ATTCTTCTCTCAATCTCCGT		232
cBSQ ^b	bussuquara	AAGTGACACCTGTTTCAGGGTA		388
cILH ^b	ilhéus	TCCACCGCTGATCTGAGCCCCGTGA		474
cROC ^b	rocio	TCACTCTTCAGCCTTTTCG		230
cYF ^b	febre amarela	CTGTCTCAACCCTGCGTGYC		171

* Tamanho do amplicon resultante da amplificação com o *primer* gênero específico correspondente.

4.9 Detecção do produto amplificado

Os produtos amplificados foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA 0,5 M de pH 8.0. O gel foi corado com brometo de etídio e a visualização foi feita em luz ultravioleta.

4.10 Precipitação do DNA por acetato de sódio

Dez microlitros de água ultra pura e 5 µL de acetato de sódio 3 M pH 5.29, foram adicionados ao microtubo contendo 40 µL da amostra PCR-positiva. Em seguida, foram colocados 55 µL de etanol absoluto e a mistura foi agitada e acondicionada à – 20 °C por, no mínimo, 3 horas. Retirada do congelador, a amostra foi centrifugada à 14000 x g por 30 minutos à 4 °C, o sobrenadante descartado e o sedimento lavado com etanol a 70%. Seguiu-se nova centrifugação à 14000 x g por 10 minutos e descartou-se o sobrenadante. A amostra, após a secagem em concentrador por 30 minutos à 60 °C, foi ressuspensa em água ultra pura e guardada em congelador à – 20 °C.

4.11 Reação de sequenciamento

As fitas de DNA foram sequenciadas utilizando o kit *ABI PRISM Dye™ terminator sequencing kit (Big Dye - Applied Biosystems, EUA)*. Dois microlitros do produto precipitado do PCR foram adicionados a um microtubo contendo o *primer* específico a 3,2 pmol, 2 µL de *Big Dye*, 1 µL do tampão *save money* (Tris HCl 200 mM pH 9.0 e 5 mM MgCl₂) e água ultra pura q.s.p. 10 µL. Foram realizadas reações em duplicatas com os *primers sense* e *anti-sense* para confirmar a sequência de nucleotídeos. A reação foi realizada em termociclador *Mastercycler® Gradient (Eppendorf)* e compôs-se 25 ciclos de 10 segundos à 96 °C, 10 segundos à 50 °C e 4 minutos à 60 °C.

4.12 Purificação do produto de sequenciamento

Posteriormente à reação de sequenciamento, o produto obtido foi purificado pela adição de 60 µL de isopropanol absoluto à TA, e 30 µL de água ultra pura. As amostras foram mantidas ao abrigo da luz, à TA por 15 minutos. Em seguida, foram centrifugadas à 13000 x g

por 25 minutos e o sobrenadante desprezado. Cento e cinquenta microlitros de isopropanol 75% foram acrescentados ao sedimento, centrifugados a 13000 x g por 15 minutos, descartando-se, novamente, o sobrenadante. Após secagem em concentrador por 30 minutos à 60 °C, as amostras foram ressuspensas em solução de *Template Suppression Reagente* (TRS) (*Applied Biosystems*, EUA) e submetidas à eletroforese em polímero POP6, em seqüenciador automático. Para edição da sequência de nucleotídeos utilizou-se o programa *Sequence Navigator* versão 1.0 para *Power Macintosh* (*Applied Biosystems*).

4.13 Clonagem

A clonagem dos fragmentos PCR-positivos foi realizada utilizando o kit *TOPO TA Cloning* (*Invitrogen*). Quatro microlitros da amostra de PCR purificada foram misturados a 1 µL de solução salina (50 mM de NaCl e 2,5 mM de MgCl₂) e 1 µL do vetor TOPO. A mistura permaneceu à TA por 30 minutos e, em seguida, a transformação foi feita utilizando 50 µL da bactéria, quimicamente competente, *Escherichia coli* e três microlitros da ligação vetor e amostra de PCR. Após a eletroporação, o volume foi colocado em tubo contendo 250 µL de meio SOC (0,5% de extrato de levedura, 2% de triptona, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ e 20 mM de glicose) e mantido à 37 °C, sob agitação, por 1 h. Cinquenta microlitros da mistura foram transferidos e semeados em placas de *Petri* contendo meio ágar LB (*Lysogeny Broth*) com 50 µg/ mL de ampicilina e 40 mg/ mL de *Bluo Gal* (*Invitrogen*). As placas foram acondicionadas à 37 °C por 24 - 48 horas e, após visibilização, as colônias de interesse foram coletadas.

4.14 Controles virais

Os controles virais utilizados nos experimentos, amostras de arbovírus (Dengue 2, Mayaro e Oropouche) de três diferentes gêneros pertencentes às famílias Flaviviridae, Togaviridae e Bunyaviridae, respectivamente, foram gentilmente cedidos pelo Professor Doutor Luiz Tadeu Moraes Figueiredo da Unidade de Pesquisa em Virologia/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

4.15 Inoculação em culturas de células

Os controles virais e os sobrenadantes positivos dos *pools* de mosquitos foram inoculados em culturas de células de insetos C6/36 *Ae. albopictus* e de mamíferos, VERO. Anteriormente à inoculação, as amostras foram passadas em filtros de 0,02 µm e tratadas com 100 U/µL de penicilina/estreptomicina e Fungizon® 2%.

Culturas de células de mosquito, C6/36 *Aedes albopictus*, no estágio de recém-confluentes foram selecionadas para a infecção em separado com cada um dos sobrenadantes positivos. Removido o meio de crescimento, foi adicionado às células o meio Leibovitz-15 (L-15), desprovido de soro fetal, em quantidade suficiente para cobrir a monocamada. A seguir, foram adicionados cerca de 250 µL do sobrenadante por garrafa de 25 cm³. As culturas permaneceram em estufa à 28 °C, por 60 minutos, sob agitação em intervalos de 15 minutos. Após esse período foi efetuado o descarte do meio com a amostra, um novo volume de meio Leibovitz-15 contendo 10% de soro fetal bovino, foi adicionado e as culturas novamente colocadas em estufa à 28 °C. Após constatação do efeito citopático ou até o intervalo máximo de 14 dias, o sobrenadante coletado foi centrifugado para sedimentar as células e, em seguida, alíquotado em microtubos para acondicionamento em ultracongelador à -80 °C. O procedimento de inoculação em culturas de células VERO foi semelhante ao descrito acima, porém utilizando meio MEM e temperatura de incubação de 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂.

4.16 Titulação das amostras virais

A titulação das amostras virais foi feita pelo método de TCID_{50%} (*Tissue Culture Infectant Dose 50%*/Dose Infectante em cultura de tecido a 50%) e a determinação do título da suspensão viral pelo método de Hierholzer e Killington (1996). Diluições seriadas em meio MEM, de razão 10 (10⁻¹ a 10⁻¹⁰), das suspensões virais foram inoculadas em monocamadas de células VERO, adsorvidas em microplacas de 96 cavidades, no volume de 100 µL por cavidade. Foram utilizadas oito cavidades para cada diluição, incluindo o controle negativo, o qual continha apenas meio de cultura. As microplacas foram incubadas em estufa à 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ por, no máximo, 120 horas. As células foram observadas em microscópio diariamente, durante este período, para constatação do efeito citopático.

4.17 Controles positivos de mosquitos

Aos *pools* de mosquito controle de *Aedes albopictus*, foram adicionados 250 µL de suspensão dos controles virais sem diluição prévia ou, quando necessário, as suspensões foram diluídas em PBS albumina 4% anteriormente à maceração.

4.17.1 Infecção de mosquitos com o vírus Dengue sorotipo 2.

Aproximadamente 1 mL de sangue de camundongo sadio foi coletado e, após separação das fases líquida e sólida por centrifugação a 2000 x g por 5 minutos, o soro foi inativado por 1 hora à 56 °C e as hemácias lavadas com PBS. O sangue foi reconstituído e 100 µL da suspensão controle de vírus Dengue 2 foram adicionados. As fêmeas de *Ae. aegypti* foram alimentadas artificialmente, utilizando o sistema HemotekTM 5W1 *Membrane Feeding System*. O sangue infectado foi oferecido por, no mínimo, duas horas e, ao final do período, as fêmeas engurgitadas foram separadas e mantidas em copos plásticos em incubadora tipo B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*) à 28 °C com umidade relativa de 80%. O procedimento acima descrito foi realizado no Insetário de Segurança do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas II/ USP.

5 RESULTADOS

5.1 Seleção do método de extração

A comparação entre três diferentes métodos de extração, kit *Virus SeqTM HIV Genotyping System* (Applied Biosystems), Isoticianato de Guanidina (Trizol ®-Invitrogen) e Qiam *Viral RNA Kit* (QIAGEN Inc., USA), do RNA viral nos *pools* de 15 mosquitos adicionados dos controles virais, mostrou resultados qualitativamente semelhantes, conforme apresentado na figura 4. A seleção do kit *Virus SeqTM HIV Genotyping System* (Applied Biosystems) foi baseada na disponibilidade do material no laboratório.

A análise quantitativa do DNA presente nas amostras não foi realizada.

Figura 4: Comparação entre três diferentes métodos de extração em *pools* de 15 mosquitos adicionados das suspensões de vírus controles, Mayaro (10^{10} TCID_{50%} - amplicon de 400 pb), Dengue 2 (10^4 TCID_{50%} - amplicon de 1000 pb) e Oropouche (10^4 TCID_{50%} - amplicon de 300 pb). Colunas 1-3: extração com o kit *Virus SeqTM HIV Genotyping System* (Applied Biosystems); colunas 4-6: extração com Trizol ®-Invitrogen; colunas 7-9: extração com o Qiam *Viral RNA Kit* (QIAGEN Inc., USA).

5.2 Determinação da quantidade de mosquitos nos *pools*

Experimentos realizados utilizando cinco, 10, 15, e 20 mosquitos por *pool* demonstraram resultados semelhantes, diferindo apenas quanto à cor, ao tamanho do sedimento e quanto à transparência do sobrenadante. Nos *pools* contendo 50 mosquitos, o excesso de indivíduos pode ter causado a inibição da reação de RT-PCR (Figura 5).

Figura 5: Resultados de RT-PCR realizados em *pools* contendo 5, 10, 15 e 50 mosquitos adicionados com a amostra controle de vírus Mayaro pura (10^{10} TCID_{50%}). Gel de agarose corado com brometo de etídio. Coluna 1: *pool* com 15 mosquitos; coluna 2: *pool* com 10 mosquitos; coluna 3: *pool* com 5 mosquitos; colunas 4 e 5: reação usando *primers* de β -actina em *pool* com 20 mosquitos; coluna 6: controle viral positivo; coluna 7 e 8: controles negativos; coluna 9: *pool* com 50 mosquitos.

5.3 Reação de RT-PCR e *Duplex* RT-PCR em *pools* de mosquitos adicionados dos controles virais

Os controles virais foram detectados pela técnica de RT-PCR em todas as diluições do vírus Mayaro (Figura 6) e Oropouche, correspondendo a 10^4 e 10^1 TCID₅₀/mL (Quadro 4) respectivamente, entretanto o vírus Dengue 2 somente foi detectado até a diluição de 10^{-1} (Figura 6), ou seja, a 10^3 TCID₅₀/mL. Resultados semelhantes foram observados para a *Duplex* RT-PCR.

Quadro 4: Titulação dos controles virais positivos de Dengue 2, Mayaro e Oropouche pela técnica de TCID₅₀%.

Amostra	Dias de infecção	TCID ₅₀ %/mL
*Dengue 2 (1ª passagem em célula)	7	10^4
Dengue 2 (2ª passagem em célula)	7	10^6
Dengue 2 (3ª passagem em célula)	7	10^6
*Mayaro (1ª passagem em célula)	7	$> 10^{10}$
Mayaro (2ª passagem em célula)	7	10^{15}
Mayaro (3ª passagem em célula)	7	10^{17}
*Oropouche (1ª passagem em célula)	7	10^4
Oropouche (2ª passagem em célula)	7	10^5
Oropouche (3ª passagem em célula)	7	10^7

*= Amostras utilizadas no teste de sensibilidade.

Figura 6: RT-PCR realizada em *pools* de 15 mosquitos adicionados com as amostras de Dengue 2 (A) e Mayaro (B). Gel de agarose corado com brometo de etídio. Coluna 1A-amostra pura; coluna 2A-diluição 10^{-1} , coluna 3A-diluição 10^{-2} , coluna 4A-diluição 10^{-3} . Coluna 1B-diluição 10^{-3} ; coluna 2B-diluição 10^{-4} ; coluna 3B-diluição 10^{-5} ; coluna 4B, diluição 10^{-6} .

5.4 Sensibilidade da RT-PCR em mosquitos infectados

Pools de quinze mosquitos *Ae. Aegypti* contendo um, três, cinco, sete, nove, 13 e 15 mosquitos infectados com o vírus Dengue-2 foram macerados e submetidos à RT-PCR utilizando os *primers* específicos para o gênero *Flavivirus*. A detecção do vírus foi possível nos *pools* contendo acima de um mosquito infectados conforme demonstrado na figura 7.

Figura 7: RT-PCR realizada em *pools* de 15 mosquitos contendo espécimes infectados artificialmente com o vírus Dengue 2. Gel de agarose corado com brometo de etídio. Coluna 1: *pool* constituído por 15 mosquitos infectados; coluna 2: *pool* contendo 13 mosquitos infectados; coluna 3: *pool* contendo 7 mosquitos infectados; coluna 4: *pool* contendo 5 mosquitos infectados; coluna 5: *pool* contendo 3 mosquitos infectados; coluna 6: *pool* com apenas 1 mosquito infectado.

5.5 Coleta de dípteros

As capturas realizadas nos municípios de Monte Negro e Buritis, no Parque Nacional dos Pacaás Novos, no Vale do Guaporé/Mamoré, na Usina Hidrelétrica de Samuel e no rio Machado resultaram na coleta de 37.519 espécimes de dípteros pertencentes a 20 diferentes famílias e gêneros (Anexo 1). Pode-se observar que entre os espécimes coletados, além de indivíduos da sub-ordem Nematocera, outros representantes da ordem Diptera, como tabanídeos, estavam presentes (Quadro 5).

Os indivíduos coletados foram agrupados por gênero, família e local de coleta em, aproximadamente, 700 *pools* (Anexo 1).

Quadro 5: Total de 37.519 dípteros coletados nos municípios de Monte Negro e Buritis, no Parque Nacional dos Pacaás Novos, no Vale do Guaporé/Mamoré, na Usina Hidrelétrica de Samuel e nos rios Madeira e Machado.

Classificação	Quantidade de mosquitos coletados
<i>Anopheles</i> sp	8997
<i>Culex</i> sp	7864
<i>Culiseta</i> sp	12
<i>Coquillettidia</i> sp	2710
<i>Haemagogus</i> sp	226
<i>Psorophora</i> sp	2233
<i>Aedes</i> sp	1971
<i>Limatus</i> sp	67
<i>Sabethes</i> sp	18
<i>Trichoprosopon</i> sp	103

Classificação	Quantidade de mosquitos coletados
<i>Wyeomyia</i> sp	54
<i>Mansonia</i> sp	6469
<i>Uranotaenia</i> sp	15
<i>Aedeomyia</i> sp	23
<i>Shannoniana</i> sp	27
<i>Deinocerites</i> sp	208
Psychodidae	4820
Simulidae	828
Cerathopogonidae	735
Tabanidae	139

5.5.1 Espécimes analisados

Dentre o total de, aproximadamente, 700 *pools*, 450 foram submetidos às reações de RT-PCR e *Duplex* PCR para detecção de arbovírus. Os espécimes analisados pertenciam a 16 dos 20 gêneros coletados e entre os *pools* controles (Quadro 6; Anexo 1).

O gênero *Anopheles* sp e família Psychodidae somaram juntos aproximadamente 39% das amostras, estando os 14 demais gêneros distribuídos em 61% das amostras. *Culex* sp, *Mansonia* sp, *Aedes* sp e *Psorophora* sp perfizeram cerca de 27% desse total (Quadro 6).

Quadro 6: Distribuição dos 450 *pools* de dípteros processados pela técnica de RT-PCR e *Duplex*-RTPCR em gêneros e famílias.

Classificação	Quantidade de <i>pools</i>	%
<i>Psorophora</i> sp	33	7,3
<i>Anopheles</i> sp	95	21,1
<i>Culex</i> sp	55	12,2
<i>Uranotaenia</i> sp	2	0,4
<i>Aedes</i> sp	35	7,7
Simuliidae	15	3,3
Controle	40	8,8
Cerathopogonidae	15	3,3
Psychodidae	80	17,7
<i>Haemagogus</i> sp	8	1,7
<i>Aedeomyia</i> sp	6	1,3
<i>Trichoprosopon</i> sp	4	0,8
<i>Mansonia</i> sp	38	8,4
<i>Shannoniana</i> sp	4	0,8
<i>Coquillettidia</i> sp	12	2,6
<i>Deinocerites</i> sp	5	1,1
Tabanidae	3	0,6
TOTAL	450	100

5.6 Avaliação da técnica de extração e RT-PCR

A utilização de um par de *primers* para proteína celular constitutiva β -actina (ARAÚJO, 2007) como controle endógeno da reação, mostrou que o método de extração pelo kit Virus SeqTM HIV Genotyping System e a técnica de RT-PCR foram capazes de detectar o RNA de β -actina nos mosquitos em 66,8% das amostras analisadas (Quadro 7). Suspensões de vírus cultivadas em células de mamíferos geraram 10% de resultados negativos nos controles, pois, o *primer* utilizado foi confeccionado tendo como base a proteína β -actina de mosquitos *Ae. aegypti*.

Quadro 7: Quantidade de amostras processadas e de resultados positivos para reação controle usando *primers* para o gene que codifica a proteína celular constitutiva β -actina.

Classificação	Amostras Analisadas	Positivos para β -Actina	%
<i>Psorophora</i> sp	33	31	93,9
<i>Shannoniana</i> sp	4	4	100
<i>Mansonia</i> sp	38	34	89,4
<i>Trichoposopon</i> sp	4	2	50
<i>Aedeomyia</i> sp	6	3	50
<i>Haemagogus</i> sp	8	8	100
<i>Anopheles</i> sp	95	36	37,9
<i>Culex</i> sp	55	24	43,6
<i>Uranotaenia</i> sp	2	2	100
<i>Aedes</i> sp	35	34	97,14
<i>Coquilletidia</i> sp	12	10	83,3
<i>Deinocerites</i> sp	5	4	80
Psychodidae	80	51	63,75
Cerathopogonidae	15	10	66,6
Simuliidae	15	12	80
Tabanidae	3	0	0
Controles	40	36	90
Total	450	301	66,8

O quadro 7 demonstra variação na porcentagem de positivos de 37,9% a 100% entre os *pools* formados por indivíduos da sub-ordem Nematocera. Os menores valores foram observados em *pools* de *Anopheles* sp e de *Culex* sp e, possivelmente, conforme os dados expostos no quadro 8, a quantidade reduzida de mosquitos nos *pools* parece ter sido fator

limitante para a reação. A quantidade de mosquitos variou entre um e 15, sendo que a maioria dos *pools* com menos de três mosquitos pertencia a um dos gêneros em questão.

Os *pools* da sub ordem Brachycera, família Tabanidae também continham menos de três indivíduos, o que poderia explicar a falência da reação (Quadro 7).

Quadro 8: Resultados positivos e negativos apresentados, de acordo com a quantidade de mosquitos por *pool* em 450 amostras.

Mosquitos/ Pool	Número de Positivos	Número de Negativos	Total de Amostras
≤ 3	117	129	246
≥ 4 ≤ 6	53	9	62
≥ 7 ≤ 10	52	9	61
≥ 11 ≤ 15	70	11	81

5.7 Detecção dos arbovírus

No total de 450 amostras processadas, 0,66% dos *pools* foram positivos para *Flavivirus* e outros 0,66% positivos para o vírus Oropouche (Quadro 9). Entre os *pools* positivos para *Flavivirus*, dois pertenciam ao gênero *Anopheles* sp, tendo sido um coletado na região rural e o outro na região urbana de Monte Negro, e um ao gênero *Culex* sp, coletado, também, na região rural de Monte Negro (Quadro 9; Anexo 1).

Uma das amostras positivas para o vírus Oropouche pertencia ao gênero *Deinocerites* sp, um *pool* formado apenas por fêmeas e coletado nas margens do rio Mamoré. As outras duas amostras pertencentes ao gênero *Coquillettidia* sp também eram formadas apenas por fêmeas e foram coletadas na região de Surpresa, localizada nas margens do rio Guaporé (Quadro 9; Anexo 1).

Quadro 9: Relação dos gêneros de *pools* de mosquitos que apresentaram resultados positivos entre as 450 amostras analisadas.

Classificação	Número de amostras PCR positivas (porcentagem*)	
	Oropouche	Flavivirus
<i>Anopheles</i> sp	0 (0)	2 (0,44%)
<i>Culex</i> sp	0 (0)	1 (0,22%)
<i>Deinocerites</i> sp	1 (0,22%)	0 (0%)
<i>Coquillettidia</i> sp	2 (0,44%)	0 (0%)

As amostras positivas para *Flavivirus* foram submetidas à realização da Semi Nested Multiplex PCR para identificação específica dos vírus (Figura 8). Os resultados apresentados (Figura 8) indicaram a presença dos arbovírus Dengue 2 e Dengue 4 nos *pools*, entretanto, após a reação de sequenciamento de nucleotídeos e edição das sequências, verificou-se tratar do vírus Cacipacoré (Figuras 10 e 11).

Figura 8: Resultados da Semi Nested Multiplex RT-PCR para o gênero *Flavivirus*. Gel de agarose corado com brometo de etídio. Coluna 1, padrão de peso molecular de 100 pb; Colunas de 2-5: amostras 43A5, controle negativo, 54Cφ e 129A7. Notar a presença dos amplicons correspondentes aos vírus Dengue 2 (319 pb) e Dengue 4 (222 pb). A= *Anopheles* sp; C=*Culex* sp e N= *Psychodidae*.

Os *pools* de mosquitos PCR positivos para o vírus Oropouche, após a reação de RT-PCR, apresentaram bandas com cerca de 300 pb (Figura 9).

Figura 9: Resultados da RT-PCR para o vírus Oropouche. Gel de agarose corado com brometo de etídio. Coluna 1-2: amostras negativas; Colunas de 3-5, amostras 254Uφ, 267Eφ e 270Eφ; onde U=*Deinocerites* sp e E= *Coquillettidia* sp.

		Percent Identity				
		1	2	3	4	
Divergence	1		85.8	73.2	83.5	1
	2	17.7		85.4	81.1	2
	3	24.0	23.8		74.8	3
	4	17.7	19.8	23.0		4
		1	2	3	4	
						AF013367
						BR05_43A5
						BR05_54C
						BR05_129A7

Figura 11: Relações de identidade e divergência entre a amostra de vírus Cacipacoré AF013367 disponível no *GenBank* e as amostras BR02 129A7, BR02 43A5 e BR02 54Cφ isoladas em mosquitos *Anopheles* sp (A) e *Coquillettidia* sp (C).

As sequências das amostras isoladas em mosquitos foram alinhadas, pelo método *Clustal W*, com sequências de diferentes flavivírus que circulam no país, entre eles a referente ao gene da proteína NS5 do vírus Cacipacoré (AF013367.1), disponíveis no *Genbank* para obtenção da topologia da árvore.

A figura 12 demonstra que as amostras BR02 43A5, BR02 54Cφ e BR02 129A7, formaram um grupo *per si* de maior identidade com a amostra de vírus Cacipacoré do que com os outros flavivírus.

Figura 12: Topologia da árvore obtida pelo método de *Clustal W*. As sequências da proteína NS5 dos diferentes flavivírus adquiridas no *GeneBank* estão incluídas e identificadas pelos respectivos números e isolados. As amostras isoladas em mosquitos *Anopheles* sp (A) e *Culex* sp (C) estão representadas por BR02 129A7, BR02 43A5 e BR02 54Cφ.

5.8.2 Vírus Oropouche

Entre as amostras positivas para o vírus Oropouche, somente o *pool* 267Eφ foi clonado e sequenciado, conforme pode ser visto nas figuras 13 e 14. Após edição e análise do resultado, confirmou-se a presença do vírus com identidade máxima de 99%.

Figura 13: Eletroferograma do intervalo entre as posições 60 e 130 da sequência da amostra 267Eφ. Tamanho total da sequência 397 pb. E= *Coquillettidia* sp.


```

> gb|AF164532.1|AF164532 Oropouche virus strain BeAn19991 small segment nucleoprotein
gene, partial cds; and non-structural protein (NSs) gene, complete
cds
Length=693

Score = 549 bits (297), Expect = 9e-155
Identities = 299/300 (99%), Gaps = 0/300 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 79 GTGGGGTCCAATTTGCAATGGTTAATAACCATTTCACAGTTCAGTTCGAATCCAGTGC 138
      |||
Sbjct 197 GTGGGGTCCAATTTGCAATGGTTAATAACCATTTCACAGTTCAGTTCGAATCCAGTGC 256

Query 139 CGGACAACGGTCTTACCCTGCACCGTCTGTCTCAGGATACCTAGCGCGCTGGGACTTTACCC 198
      |||
Sbjct 257 CGGACAACGGTCTTACCCTGCACCGTCTGTCTCAGGATACCTAGCGCGCTGGGCGCTTTACCC 316

Query 199 AGATGCGATCACCATTAAAGCAAGCTGAGTTCAGAGCCACTGTAGTAGTGCCTTTGGCTG 258
      |||
Sbjct 317 AGATGCGATCACCATTAAAGCAAGCTGAGTTCAGAGCCACTGTAGTAGTGCCTTTGGCTG 376

Query 259 AGGTAAAGGGCTGTACTTGGGAATGATGGTGACGCAATGTACCTGGGGTTTGCTGCTGGTG 318
      |||
Sbjct 377 AGGTAAAGGGCTGTACTTGGGAATGATGGTGACGCAATGTACCTGGGGTTTGCTGCTGGTG 436

Query 319 CTGAGATGTTCTCTGCAAACATTCACTTTCTTCCCTTTGGTGATTGAGATGCATAGGGTTC 378
      |||
Sbjct 437 CTGAGATGTTCTCTGCAAACATTCACTTTCTTCCCTTTGGTGATTGAGATGCATAGGGTTC 496

```

Figura 14: Alinhamento de 297 nucleotídeos da amostra 267Eφ (Subject) com o segmento S da cepa BeAn 19991 do vírus Oropouche (Query-AF164532/AF164532) obtido no NCBI/*Blast.E=Coquillettidia*. Identidade = 99%.

A comparação da amostra brasileira (BR) do vírus Oropouche isolada no *pool* de mosquitos coletados no ano de 2002, BR02 267Eφ com sete outras sequências, do vírus Oropouche, disponíveis no *GenBank* demonstrou maior valor de identidade, 99,1%, com as sequências EF467370.1 e EF467369.1, ambas isoladas em Parauapebas, Estado do Pará (AZEVEDO et al., 2007) (Figura 15).

A maior relação de divergência, 2,3%, mostrou-se quando a sequência BR02 267Eφ foi comparada com a sequência do vírus isolada de humano em Belém, Estado do Pará, AY704564.1 (Figura 15).

		Percent Identity								
Divergence		1	2	3	4	5	6	7		
	1		99.1	98.6	99.1	99.5	99.5	99.1	1	EF467370.1
	2	0.9		97.7	98.2	98.6	98.6	98.2	2	BR02 267Eφ
	3	1.4	2.3		97.7	98.2	99.1	97.7	3	AY704564.1
	4	0.9	1.8	2.3		99.5	98.6	98.2	4	AY993909.1
	5	0.5	1.4	1.8	0.5		99.1	98.6	5	AY993911.1
	6	0.5	1.4	0.9	1.4	0.9		98.6	6	EF467369.1
	7	0.9	1.8	2.3	1.8	1.4	1.4		7	EU561644.1
		1	2	3	4	5	6	7		

Figura 15: Relações de identidade e divergência entre as amostras de vírus Oropouche disponíveis no *GenBank* e a amostra BR02 267Eφ isolada em mosquitos *Coquillettidia* sp.

A sequência da amostra de vírus Oropouche após alinhamento com sete outras disponíveis no *GenBank* e análise pela metodologia de Máxima Verossimilhança, modelo evolutivo F84, foi submetida a uma busca heurística com algoritmo TBR (bissecção de árvore - *tree bisection reconnection*) resultando em árvore de topologia não enraizada (Figura 16).

Figura 16: Topologia da árvore obtida pela metodologia de máxima verossimilhança entre sete outras sequências do segmento S do vírus Oropouche adquiridas no *GeneBank*, identificadas pelos respectivos números e isolados, AY993909.1 Be An 206119; .AY993911.1 Be An 208819; AY704564.1 Be H 543638; AY117135.3 Be An 626990; EF467369.1 PPS 523 H 669315; EF467370.1 PPS 522 H 669314 e EU561644.1 BR 2004 Acre27; e a sequência do vírus Oropouche isolada em mosquitos *Coquillettidia* sp (E), representada por BR02 267Eφ.

Os dois clados mostrados na topologia da árvore demonstram que, em um deles, a sequência do vírus Oropouche isolada em mosquitos (BR02 267Eφ) formou um grupo conjunto com sequências, as quais, em maioria, foram isoladas de pacientes (Figura 16). O segundo clado formou-se com as sequências isoladas em animais (NUNES et al., 2005).

5.9 Isolamento em cultura celular

As amostras positivas foram semeadas em culturas de células VERO e de insetos por, no mínimo, três vezes, na tentativa de isolar o agente viral. Apesar das monocamadas apresentarem características visuais semelhantes ao efeito citopático (Figura 15), a amplificação por RT-PCR e *Duplex* RT-PCR não confirmou os resultados anteriores.

Figura 17: Células C6/36 crescidas em meio LB-15 anteriormente (A) à infecção com a amostra 267Eφ, segunda passagem, (B) 10 dias após a infecção. Observar a retração celular, o descolamento da monocamada e alguns sincícios formados. Aumento 10x.

6 DISCUSSÃO

Nas últimas duas décadas, as técnicas de amplificação do ácido nucléico, particularmente a reação em cadeia pela polimerase (PCR), vêm sendo gradativamente aceitas e estabelecidas nos laboratórios clínicos e de pesquisa. Estas técnicas são, em geral, sensíveis, específicas e rápidas, exigindo menor tempo para a liberação do resultado, o que pode ser decisivo no tratamento de muitas doenças (HUANG et al., 2004; O'GUINN et al., 2004). Diferentes autores descreveram a técnica de RT-PCR e suas modificações para detecção de arbovírus em vários tipos de amostras (LANCIOTTI et al., 2000; HUANG et al., 2001; SCARAMOZZINO et al., 2001; BRONZONI et al., 2004; HUANG et al., 2004; O'GUINN et al., 2004; BRONZONI et al., 2005; SÁNCHEZ-SECO et al., 2006; CHAO et al., 2007; DYER et al., 2007; MOUREAU et al., 2008). A PCR também tem sido citada como ferramenta na prevenção de epidemias e controle de arboviroses, por meio da monitoração de vetores quanto à presença de arbovírus e outros patógenos (ANDERSON et al., 2004; SAMUEL et al., 2006).

A etapa de extração do RNA é primária e essencial para o funcionamento da reação de RT-PCR. Fatores que possam diminuir a eficácia do processo ou que degradem o RNA obtido devem ser minimizados e, para isso, o método de extração deve ser adequado ao tipo de amostra. De Paula e colaboradores (2001) concluíram que o melhor método de extração do vírus Dengue em amostras clínicas é o *Qiampr Viral RNA Kit* (QIAGEN Inc., USA), também utilizado por outros autores para extração de arbovírus em sobrenadantes de culturas celulares (SCARAMOZZINO et al., 2001; ANDERSON et al., 2004) e em *pools* de mosquitos (CHAO et al., 2007). A desvantagem referida ao método é o seu custo, em relação aos outros testados neste trabalho.

Todavia, os estudos de Kramer e colaboradores (2002) comprovaram o método do Isoticianato de Guanidina (Trizol®-Invitrogen) como mais sensível para extração do vírus da Encefalite Equina do Oeste e do vírus da Encefalite de *Saint Louis* em *pools* de mosquitos. O'Guinn e colaboradores (2004) e Feitosa (2006) utilizaram o mesmo método para extrair RNA dos vírus da Encefalite Equina do Leste e Dengue 2 em *pools* de mosquitos infectados.

Os três métodos testados neste trabalho foram de fácil execução e permitiram boa amplificação do DNA pesquisado sem apresentar diferenças qualitativamente visíveis, o que

permitiu a seleção do kit *Virus SeqTM HIV Genotyping System* (Applied Biosystems), mesmo não havendo trabalhos que relatem o uso deste na extração de vírus em *pools* de insetos.

O teste de sensibilidade utilizando *pools* de mosquitos controles adicionados de diferentes diluições dos controles virais, mostrou que a RT-PCR detectou os vírus Mayaro (10^{10} TCID₅₀/mL) e Oropouche (10^4 TCID₅₀/mL) até os níveis de 10^4 e 10^1 TCID₅₀/mL, respectivamente. Porém, o vírus Dengue 2 (10^4 TCID₅₀/mL) somente foi detectado até a diluição de 10^{-1} , o que correspondeu ao nível de 10^3 TCID₅₀/mL.

Tal resultado é semelhante ao obtido por Bronzoni (2003) que, utilizando a RT-PCR e a *Duplex* RT-PCR, detectou o vírus Mayaro ao nível de $10^{3,5}$ TCID₅₀/mL. Entretanto, a detecção do vírus da Febre Amarela pelo autor correspondeu ao nível de $10^{1,3}$ TCID₅₀/mL.

Scaramozzino et al. (2001) testaram seis diferentes pares de *primers* em técnicas de RT-PCR e verificaram que os *primers* de Fulop et al. (1993), utilizados neste trabalho, detectaram os diferentes flavivírus testados até a sensibilidade limite de 10^5 TCID₅₀/mL., exceto os vírus da Encefalite Japonesa, do Oeste do Nilo, *Wesselsbron* e Febre Amarela,

O gene constitutivo β -actina utilizado como controle endógeno da reação foi detectado, por um par de *primers*, em 66,8% das amostras pela técnica de RT-PCR. Entre os controles, os 10% de resultados negativos agrupam as amostras cultivadas em culturas de células de mamíferos e que foram somadas ao valor total. Pode-se inferir, de acordo com os resultados apresentados no Quadro 8, que a não detecção em 33,2% das amostras esteve relacionada à quantidade de mosquitos, inferior a três indivíduos, nos *pools*.

Hoffmann et al. (2004) atentaram para a necessidade de verificar da integridade do RNA viral antes de concluir que o *pool* de mosquitos é negativo e, para isso, os autores utilizaram um par de *primers* para o gene ribossomal 18S. Tamegão-Lopes et al. (2006) descreveram uma técnica de quantificação absoluta de carga proviral, por meio da reação de *Real Time* PCR com o sistema TaqMan®, utilizando a albumina como controle endógeno. Sanchez-Seco et al. (2005) construíram um controle interno em um plasmídeo contendo uma sequência do vírus da Febre Amarela, e sugeriram que esse tipo de controle seria mais adaptado do que controles celulares, uma vez que poderia ser utilizado em amostras livres de células.

O presente trabalho demonstrou que a reação de RT-PCR utilizando o par de *primers* de β -actina confeccionado a partir da sequência do gene de mosquitos *Aedes aegypti*, subordem Nematocera, detectou o RNA em indivíduos pertencentes a outras famílias, apresentando detecção de 67% em macerados de ceratopogonídeos, 64% em psicodídeos e 80% em simulídeos. Entre os culicídeos, a detecção em torno de 38% no gênero *Anopheles* sp,

e de 43,5%, em *Culex* sp foi relacionada principalmente à quantidade de mosquitos no *pool*, uma vez que a maioria continha entre um e três espécimes (Quadro 8).

O par de *primers*, de acordo com o NCBI/Primer-BLAST, apresentou alta especificidade com o gene de actina de *Drosophila* sp, sub-ordem Brachycera, infra-ordem Muscomorpha, entretanto a reação foi negativa nos *pools* de tabanídeos, pertencentes à mesma sub-ordem e infra-ordem. A quantidade de espécimes nos *pools* pode, da mesma forma, ter sido o fator limitante da reação.

A detecção do RNA viral em *pools* com mais de 20 mosquitos e adicionados de suspensões dos controles virais parece ter sido prejudicada, possivelmente pela maior quantidade de inibidores da PCR. O sistema imune dos insetos contém potenciais inibidores, a exemplo da cascata da profenoloxidase, proenzima inativa presente na hemolinfa da maioria dos insetos. Sugere-se que a enzima, quando ativa, fique aderida à superfície de agentes patogênicos ao inseto, promovendo o aumento de hemócitos ao redor e facilitando a remoção do mesmo por meio da formação de nódulos (SILVA, 2002). A fenoloxidase poderia atuar sobre a *Taq* polimerase, destruindo-a. Além disso, outros agentes quelantes presentes na hemolinfa podem capturar os íons Mg^{+2} , cofator necessário para a atividade da polimerase.

O excesso de carcaças tornou o sedimento e o sobrenadante escuros, além de aumentar o risco de contaminação cruzada entre as amostras devido ao grande número de escamas, asas e patas. O'Guinn et al. (2004), ao utilizarem a RT-PCR para identificação de patógenos veiculados por artrópodes, verificaram que a extração de macerados contendo até 50 mosquitos utilizando Trizol® resultava em um sobrenadante escuro e não conseguiram amplificar o material. É possível que os exoesqueletos também possam agir como inibidores físicos, impedindo a ação da polimerase ou o encontro dos *primers* com o alvo. No presente trabalho, o uso de *pools* contendo entre um e 15 mosquitos permitiram a obtenção de bons resultados.

Huang et al. (2001), utilizando macerados de mosquitos somente com tratamento por fervura, verificaram que a não ocorrência da inibição da reação de amplificação.

A infecção artificial dos mosquitos com o vírus Dengue permite que títulos em torno de 10^6 - 10^7 TCID₅₀/mL sejam alcançados em cerca de quatro ou cinco dias, dependendo da temperatura de incubação (DE PAULA et al., 2004). A RT-PCR e a *Duplex* RT-PCR testadas, nesse trabalho, não detectaram o RNA do vírus Dengue 2 em *pools* de 15 indivíduos contendo um mosquito infectado (Figura 7), ao contrário de alguns autores que, por meio de RT-PCR conseguiram detectar arbovírus presentes em *pools* de 50 indivíduos contendo apenas 1 ou 2

indivíduos positivos. (KUNO et al., 1996; LANCIOTTI et al., 2000; KRAMER, et al., 2002; SAMUEL et al., 2006; CHAO et al., 2007).

No total de 450 amostras processadas, 1,32% dos *pools* foram positivos (Quadro 9). Kramer e colaboradores (2002) relataram que em anos não epidêmicos, a exemplo do ano de 2000, o Programa de Vigilância de Arbovírus da Califórnia detectou 0,7% de positivos para o vírus da Encefalite de *Saint Louis* entre os 4156 *pools* testados. Em anos epidêmicos, os autores citaram uma positividade < 5%.

A taxa de infecção nas populações de mosquitos é baixa, em torno de 0,001%. Segundo Labruna (2007) (comunicação pessoal)², a taxa de infecção nas populações de carrapatos, infectados com rickétsias, oscila entre 0,01 a 1%. Leduc et al. (1988) afirmaram que a proporção de isolamento do vírus Oropouche em seu vetor urbano, em períodos epidêmicos, é de 1:12500.

A não detecção pode gerar problemas, principalmente em períodos que precedem às epidemias. Fatores como sensibilidade e especificidade da técnica, tamanho da amostra, taxas de infecção e níveis de significância estatísticos devem ser levados em consideração, pois afetam a detecção de arbovírus em mosquitos (GU et al., 2004).

Gu et al. (2004) mostraram que, devido aos baixos níveis de infecção dos mosquitos, é necessária a análise de grande número de amostras (≥ 1600 indivíduos) para uma probabilidade de infecção em torno de 0,8. Em períodos fora da estação de transmissão, a quantidade de amostras precisa ser maior, uma vez que a taxa de infecção tende a cair.

Assim sendo, a observação de resultados negativos pode ser problemática para a vigilância de arbovírus, pois o excesso de *pools* negativos pode encobrir os valores reais de infecção em uma população de mosquitos (HANLEY et al., 1983).

Neste trabalho, as coletas foram realizadas em diferentes períodos e locais. Segundo GU et al. (2004), para determinação da taxa de infecção, a vigilância de arbovírus não deve seguir parâmetros variados uma vez que a transmissão dos arbovírus é focal e exibe variabilidades temporal e espacial consideráveis. Dessa forma, agrupar amostras de diferentes locais distribuídos por extensa área, em grandes períodos de tempo, fornece pouca informação sobre a dinâmica de transmissão, além de confundir a estimativa da probabilidade de detecção e as taxas de infecção. Portanto, não podemos inferir a respeito da taxa de infecção de

2-LABRUNA, M.B. III Semana da Preventiva. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 26/11 a 30/11/2007.

mosquitos nas localidades pesquisadas, apenas se relata a presença de arbovírus que podem estar circulando e sendo subnotificados ou desconsiderados.

Entre o total de *pools* positivos, 0,66% foram específicos para o vírus Oropouche. O primeiro isolamento de Oropouche ocorreu em 1955, a partir do sangue de um trabalhador febril. Em conjunto, no ano de 1955, o vírus também foi isolado de um *pool* de mosquitos da espécie *Mansonia venezuelensis*, atualmente *Coquillettidia venezuelensis* (ANDERSON et al., 1961) porém, o papel deste como vetor silvestre da doença não foi esclarecido. Figueiredo (2007) discrimina como vetores silvestres as espécies *Aedes serratus* e *Culex quinquefasciatus*, e as preguiças como reservatório da doença, entretanto, mosquitos *Culex quinquefasciatus* exibem comportamento domiciliar e estão adaptados ao ambiente urbano, não se classificando como vetores silvestres.

Além disso, estudos realizados no início da década de 80 mostraram que a transmissão do vírus Oropouche, entre hamsters, pelo mosquito *C. quinquefasciatus* somente ocorria quando os níveis virêmicos eram extremamente altos, o que raramente acontece em pessoas infectadas (PINHEIRO et al., 1998). No meio urbano, o vetor reconhecido da doença é o ceratopogonídeo *Culicoides paraenses*, conhecido vulgarmente como maruim (MARCONDES et al., 2001).

Kuno et al. (2005a) relataram que ceratopogonídeos *Culicoides* sp são vetores de mais de 50 vírus das famílias Bunyaviridae, Rheoviridae e Rhabdoviridae, sendo que 45% dos vírus não foram isolados em outros artrópodos. Contudo, os resultados ora obtidos demonstram a presença do vírus Oropouche também em culicídeos.

A detecção do vírus Oropouche em *pools* de mosquitos do gênero *Coquillettidia* sp corroboram com os achados primários de Anderson et al. (1965) e é provável que estes mosquitos sejam realmente os responsáveis pela manutenção da doença no meio silvestre.

Mosquitos do gênero *Coquillettidia*, Tribo Mansoniini foram encontrados naturalmente infectados por diversos arbovírus, entre eles os vírus das Encefalites Equinas Venezuelana, do Oeste e do Leste. As formas imaturas deste grupo se fixam em plantas aquáticas, e, desta forma, seus criadouros são ricos em vegetação aquática flutuante, representada por remansos de rios e lagoas, locais em que as plantas chegam a cobrir a superfície da água. As fêmeas são hematófagas agressivas, insistentes e vorazes (FORATTINI, 2002), comportamento importante para a condição de vetor.

Ambos os *pools* de *Coquillettidia* sp positivos para o vírus Oropouche foram coletados na região de Surpresa, localizada na margem do rio Guaporé, com a utilização de isca humana e eram compostos apenas por fêmeas.

Os mosquitos do gênero *Deinocerites* sp são pouco conhecidos, porém, no Panamá, esses mosquitos mostraram-se naturalmente infectados pelo flavivírus causador da Encefalite de *Saint Louis* (GRAYSON, et al., 1967). A detecção do vírus Oropouche no *pool* analisado sugere que o vetor silvestre possa ser do gênero *Deinocerites* sp, entretanto são indivíduos com capacidade pequena de vôo, têm preferência para sugar animais de sangue frio e apresentam limitado volume do repasto sanguíneo. Portanto, segundo Foratini (2002), não desempenham papel epidemiológico importante como vetores.

Todavia, os resultados obtidos indicam a circulação do vírus Oropouche pelo estado, conforme *pool* coletado no rio Mamoré, utilizando armadilha de *Shannon* e constituído apenas por fêmeas.

A positividade de mosquitos para o vírus Oropouche observada neste trabalho, somada aos casos esporádicos ou epidemias auto-limitantes de Febre do Oropouche, descritos entre 1980 a 2005 por Azevedo et al. (2007), bem como as epidemias nas cidades de Ariquemes e Ouro Preto d'Oeste, referidas por Pinheiro et al. (1997), e o isolamento do vírus em um macaco na região Sudeste do país (NUNES et al., 2005a) sugerem a circulação endêmica do vírus e epidemias silenciosas podem estar ocorrendo nesses locais. Assim sendo, investigações epidemiológicas nessas populações auxiliariam a traçar o perfil da dispersão do vírus Oropouche.

A sequência do vírus Oropouche analisada foi agrupada em um clado com outras seqüências do vírus Oropouche, na maioria, isoladas de pacientes em epidemias ocorridas na região Norte do Brasil. A partir dos resultados das relações de identidade e divergência entre as amostras, pode-se sugerir que a variante carregada pelos mosquitos *Coquillettidia* sp tenha circulado durante as epidemias mais recentes da enfermidade no Pará, anos de 2003 e 2004. É possível que a variante tenha circulado pela região Norte no início da década, uma vez que, além das amostras do Estado do Pará e da amostra brasileira isolada em mosquitos no Estado de Rondônia, ano de 2002, a amostra EU561644.1 é originária do Estado do Acre, ano de 2004. A amostra AY117135.3, presente no clado formado foi a única isolada em animais silvestres. A circulação do vírus entre animais, ciclo enzoótico, pode estar sendo mantida por mosquitos de comportamento silvestre, a exemplo dos gêneros citados neste trabalho, enquanto que a transmissão urbana é realizada pelos ceratopogonídeos *Culicoides* sp.

O vírus Cacipacoré foi isolado de aves da região Amazônica (FIGUEIREDO et al., 1998) e seus vetores, reservatórios e até mesmo a doença, que pode causar em humanos, são desconhecidos. Batista (2007) descreveu o primeiro isolamento do vírus em seres humanos, em um paciente da cidade de Theobroma, Estado de Rondônia, que veio a óbito apresentando

co-infecção por *Leptospira* sp e o vírus Cacipacoré. Recentemente, um segundo caso da doença provocada pelo vírus Cacipacoré foi relatado na cidade de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo (NOGUEIRA, 2008)³.

Ambos os *pools* positivos de mosquitos *Anopheles* sp eram formados por fêmeas e foram coletados na região de Monte Negro, sendo um na área rural e outro na área urbana. Os anofelinos estão distribuídos pelo Estado de Rondônia, tendo sido o gênero mais numeroso na coleta (Quadro 5) bem como no processamento (Quadro 6). É o vetor das diferentes espécies de *Plasmodium* sp, agente etiológico da Malária, porém esses mosquitos podem veicular outros patógenos.

Na região do Vale do Ribeira, Natal et al. (1998) descreveram o isolamento de arbovírus em *Anopheles cruzii*. O vírus Guaroa, o qual é endêmico na região amazônica, foi ativamente transmitido por mosquitos *Anopheles* sp em Tucuruí, Estado do Pará, durante o enchimento da barragem (DEGALLIER et al., 1994). O alfavírus *O'nyong nyong* é o único vírus na África que tem como vetor primário mosquitos *Anopheles* sp. Além disso, a co-infecção de mosquitos por dois ou mais arbovírus já foi relatada (WHO, 1999).

Mosquitos do gênero *Anopheles* sp têm como criadouros coleções de água límpidas, com certa profundidade, sombreadas e dotadas de vegetação flutuante. O *Anopheles darlingi* é considerado um anofelino “fluvial”. As fêmeas são dependentes do teor de umidade e temperatura, tornando-se particularmente abundantes e exibindo acentuada endofilia, antropofilia e endofagia (FORATINI, 2002), comportamento importante no que se refere à condição de vetor biológico de doenças que afetam o homem.

A detecção do vírus Cacipacoré em mosquitos do gênero *Culex* pode ser bastante preocupante, já que esta espécie é antropofílica e domiciliada. Os representantes do gênero *Culex* sp desenvolvem-se no solo ou em recipientes, tanto naturais como artificiais. As larvas são encontradas em águas poluídas, ricas em matéria orgânica e em fermentação. Os adultos exibem hábitos noturnos e antropofilia considerável, embora se considere que a preferência destes mosquitos seja por aves (FORATTINI, 2002). O isolamento primário do vírus Cacipacoré em aves e os dados aqui apresentados reforçam a hipótese dos mosquitos *Culex* sp serem potenciais vetores do vírus Cacipacoré, pois os mesmos atuariam como “pontes” entre as aves e o homem. Situação semelhante ocorre com o vírus do Oeste do Nilo, o qual é vetorialmente transmitido por espécies do complexo *Culex pipiens* em partes da América do Norte (FONSECA et al., 2004) e tem as aves como reservatório.

3- NOGUEIRA, M. L. Ribeirão Preto, 2008.

A doença causada pelo vírus Cacipacoré pode estar sendo subnotificada ou confundida com outras, pois, além da maioria das arboviroses apresentarem manifestações clínicas semelhantes, o Quadro clínico da doença não é conhecido. A coleta desse *pool* ocorreu na região rural de Monte Negro, com a utilização de armadilhas CDC, e o mesmo era formado apenas por fêmeas.

As sequências obtidas nos mosquitos do vírus Cacipacoré formaram um grupo *per se*, sendo a amostra isolada na região urbana de Monte Negro em mosquitos *Anopheles* sp a mais divergente. Os dados sobre o vírus cacipacoré são escassos e a sequência utilizada no trabalho para fins de comparação (AF13367) foi isolada em aves. A ornitofilia em espécies de *Anopheles* sp e *Culex* sp é observada em graus distintos (GABALDON et al., 1977) e pode-se inferir que, tendo a variante carregada pelos mosquitos apresentado grau de identidade com o vírus isolado em aves, os mosquitos *Anopheles* sp seriam os responsáveis pela manutenção do ciclo enzoótico do vírus Cacipacoré, enquanto mosquitos *Culex* sp poderiam carrear o vírus nas cidades.

De acordo com a figura 12, as amostras isoladas neste trabalho assim como a sequência AF13367 formaram um grupo próximo do vírus Rocio. Batista (2007) relata que o paciente morto em Theobroma apresentava encefalite. É possível que o quadro clínico provocado pelo vírus Cacipacoré seja semelhante ao observado para o vírus Rocio.

O primeiro isolamento do vírus Rocio em um *pool* com 19 mosquitos da espécie *Psorophora ferox* continha duas fêmeas engurgitadas. Tal fato causou dúvidas quanto à capacidade vetorial do mosquito (NATAL et al., 1998), entretanto, atualmente, a espécie, em conjunto com *Aedes scapularis*, é considerada vetora da Febre do Rocio. Todavia, o primo isolamento de Oropouche em mosquitos *Coquillettidia venezuelensis* não discriminou a espécie como vetora, enquadrando somente os ceratopogonídeos como responsáveis pela transmissão da Febre do Oropouche.

A simples detecção do RNA viral não pode incriminar uma determinada espécie como vetora, pois o vírus pode ter sido detectado no trato digestivo e não em tecidos possíveis de multiplicação, o que é essencial para a transmissão. Como a metodologia do presente trabalho não efetuou a separação das fêmeas engurgitadas, anteriormente à maceração dos mosquitos, não se pode afirmar que os gêneros descritos sejam vetores. Evidências comportamentais e relatos anteriores da literatura reforçam a hipótese dessa condição, entretanto estudos relacionados à competência e à capacidade vetorial podem complementar e elucidar o papel dos mesmos na dinâmica das arboviroses.

Em laboratórios onde não há estrutura de insetário, a detecção viral em partes do corpo dos vetores que confirmem a circulação viral, como as patas e asas, podem ser alternativas interessantes. A inoculação intratorácica de mosquitos ou a infecção laboratorial, por via oral, podem auxiliar na verificação da competência do vetor.

A detecção dos arbovírus Oropouche e Cacipacoré em mosquitos alerta para a necessidade de mais estudos a respeito da condição vetorial não somente entre culicídeos, mas também entre as várias espécies de insetos hematófagos. Pode-se inferir, com base nos resultados apresentados, que mosquitos *Coquilletida* sp sejam responsáveis pela manutenção do vírus Oropouche no ciclo silvestre. O homem assume o papel de hospedeiro acidental quando, de alguma forma, desestabiliza esse ciclo e pode trazer a enfermidade para as cidades, onde o ceratopogonídeo *C. paraensis* passaria a transmitir o vírus.

Em relação ao vírus Cacipacoré, mosquitos *Anopheles* sp seriam os principais responsáveis pelo ciclo enzoótico enquanto mosquitos *Culex* sp assumiriam o papel de vetor urbano, ao sugarem diretamente o sangue de aves ou de pacientes que adquiriram a doença no meio silvestre.

O conhecimento dos vetores é de extrema importância para vigilância epidemiológica, principalmente no tocante à prevenção de surtos e epidemias, pois o controle das arboviroses visa, basicamente, o desenvolvimento de estratégias que promovam a redução das populações de vetores.

7 CONCLUSÕES

1. O kit *Virus SeqTM HIV Genotyping System* (Applied Biosystems) e as técnicas de RT-PCR e *Duplex* RT-PCR detectaram as suspensões dos vírus Mayaro, Oropouche e Dengue 2 adicionadas aos *pools* de 15 mosquitos até os níveis de 10^4 , 10^1 e 10^3 TCID₅₀/mL e o vírus Dengue 2 em *pools* de 15 contendo acima de três mosquitos infectados laboratorialmente por via oral.
2. A quantidade de mosquitos nos *pools* a serem analisados pelas técnicas deve ser maior que três e menor que quinze, a fim de se obter resultados seguros.
3. As técnicas de RT-PCR e *Duplex* RT-PCR detectaram o RNA do vírus Dengue 2 em *pools* de 15 mosquitos contendo acima de um indivíduo infectado.
4. A técnica de RT-PCR detectou o controle endógeno em 66,8% do total de amostras mesmo em indivíduos de outras famílias da sub-ordem Nematocera.
5. Entre os 450 *pools* de mosquitos analisados, 1,32% foram positivos sendo 0,66% para o vírus Oropouche e 0,66% para o gênero *Flavivirus*.
6. A caracterização molecular por meio da análise das sequências genômicas obtidas pela reação de sequenciamento de nucleotídeos confirmou os vírus Oropouche e Cacipacoré nas amostras positivas.
7. Três *pools* de mosquitos dos gêneros *Coquillettidia* sp e *Deinocerites* sp foram positivos para o vírus Oropouche e podem atuar como vetores no ciclo silvestre da doença.
8. Três *pools* de mosquitos dos gêneros *Anopheles* sp e *Culex* sp foram positivos para o vírus Cacipacoré e podem atuar como vetores da doença nas regiões urbana e peri-urbana da cidade de Monte Negro.

9. A sequência do vírus Oropouche isolado em mosquitos apresentou identidade de 99,1% com as sequências EF467370.1 e EF467369.1 do vírus Oropouche que circulou durante epidemia na cidade de Parauapebas, Pará.

10. A sequência do vírus Cacipacoré isolada em mosquitos do gênero *Culex* sp apresentou divergência em torno de 23,5% com as amostras isoladas de *Anopheles* sp. A sequência BR02 43A5 demonstrou maior identidade, 85,8%, com a sequência AF013367.1 disponível no *GenBank*.

11. As técnicas de RT-PCR e *Duplex* RT-PCR mostraram-se ferramentas adequadas para a detecção de arbovírus em *pools* de mosquitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ANDERSON, C. R.; SPENCE, L.; DOWNS, W. G.; AITKEN, T. H. G. Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 10, p.574-578,1961.

ANDERSON, J. F.; ANDREADIS, T. G.; MAIN, A. J; KLINE, D. L. Prevalence of west nile virus in tree canopy-inhabiting *Culex pipiens* and associated mosquitoes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 7, n. 1, p. 112-119, 2004.

ANTUÑANO, F. J. L; MOTA, J. Desarrollo de agentes imunizantes contra el dengue. **Rev. Panam. Salud Publica**, v.7, n. 5, p. 285-292, 2000.

ARAUJO, R. V. **Estudo dos efeitos da infecção por *Plasmodium gallinaceum* em processos fisiológicos de *Aedes aegypti***. 86 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

AUSTIN, R. J.; WHITING, T. L.; ANDERSON, R. A; DREBOT, M. A. An outbreak of west nile virus-associated disease in domestic geese (*Anser domesticus*) upon initial introduction to a geographic region, with evidence of bird to bird transmission. **Can. Vet. J.**, v. 45, p. 117–123, 2004.

AZEVEDO, R. S. S.; NUNES, M. R. T.; CHIANG, J. O.; BENSABATH, G.; VASCONCELOS, H. B.; PINTO, A. Y. N.; MARTINS, L. C.; MONTEIRO, H. A. O.; RODRIGUES, S. G; VASCONCELOS, P. F. C. Reemergence of Oropouche fever, Northern Brazil. **Emerg. Infec. Dis.**, v. 13, n. 6, p. 912-915, 2007.

BARNES, R. D; RUPERT, E. Insetos. In: **Zoologia dos invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Roca. 1996. Cap. 16, p.803-840.

BATISTA, W. C.; KASHIMA, S.; MARQUES, A. C; FIGUEIREDO, L. T. M. Phylogenetic analysis of brazilian *flavivirus* using nucleotide sequences of parts of NS5 gene and 3' non coding regions. **Virus Res.**, v. 75, p. 35-42, 2001.

* **De acordo com:**

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BATISTA, W. C. **Mapeamento das arboviroses no Estado de Rondônia**. 110 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2007.

BEDIN, F. Le Brésil, une terre d'élection pour les arboviroses? **Med. Trop.**, v. 67, p. 281-287, 2007.

BLAIR, C. D.; ADELMAN, Z. N; OLSON, K; . Molecular strategies for interrupting arthropod-borne virus transmission by mosquitoes. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, n. 4, p. 651-661, 2000.

BRONZONI, R. V. M. **Desenvolvimento de métodos *Multiplex-RT-Nested-PCR* para diagnóstico de arboviroses brasileiras**. 52 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

BRONZONI, R. V. M.; MORELI, M. L.; CRUZ, A. C. R.; FIGUEIREDO, L. T. M. Multiplex nested PCR for brazilian alphavirus diagnosis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 98, n. 8, p. 456-461, 2004.

BRONZONI, R. V. M.; BALEOTTI, F. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; NUNES, M.; FIGUEIREDO, L. T. M. Duplex reverse transcription-PCR followed by Nested PCR assays for detection and identification of brazilian alphaviruses and flaviviruses. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 2, p. 696-702, 2005.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, A. S. Doenças virais transmitidas por artrópodes e roedores. In: **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 375-393.

BURKE, D. S; MONATH, T. P. Flaviviruses. In: **Fields Virology**. 4 ed. New York: Lippincott Williams &Wilkins, 2001. Cap. 33, v. II, p. 852-921.

CAMACHO, L. A. B. Febre Amarela e saúde pública no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v.24, n. 3, p. 482-483, 2008.

CÂMARA, F. P.; THEOPHILO, R. L. G.; SANTOS, G. T.; PEREIRE, S. R. F. G.; CÂMARA, D. C. P; MATOS, R. R. C. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, n. 2, p. 192-196, 2007.

CAMARGO, L. M. A.; MOURA, M. M.; ENGRACIA, V.; PAGOTTO, R. C.; BASANO, S. A.; PEREIRA DA SILVA, L. H.; CAMARGO, E. P.; BEIGUELMAN, B.; KRIEGER, H. A rural community in Brazilian Western Amazonian Region: some demographic and epidemiological patterns. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 193-195, 2002.

CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC)/ NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (NIH). **Biosafety in microbiological and biomedical laboratories**. 4. ed. Washington, DC: US Government Printing Office, 1999. 258 p.

CHAO, D. Y.; DAVIS, B. S.; CHANG, G. J. Development of a multiplex real-time reverse transcriptase PCR assays for detecting eight medically important flaviviruses in mosquitoes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 2, p. 584-589, 2007.

CHIARAVALLOTI NETO, F.; DIBO, M. R.; BARBOSA, A. A. C.; BATTIGAGLIA, M. *Aedes albopictus* (S) na região de São José do Rio Preto, SP: estudo da sua infestação em área já ocupada pelo *Aedes aegypti* e discussão de seu papel como possível vetor de dengue de febre amarela. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, n. 4, p. 351-357, 2002.

COIMBRA, T. L. M.; SANTOS, C. L. S.; SUZUKI, A.; PETRELLA, S. M. C.; BISORDI, I.; NAGAMORI, A. H.; MARTI, A. T.; SANTOS, R. N.; FIALHO, D. M.; LAVIGNE, S.; BUZZAR, M. R.; ROCCO, I. M. Mayaro vírus: imported cases of human infection in São Paulo state, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 49, n. 4, p. 221-224, 2007.

DEGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C. O impacto das atividades humanas na transmissão dos arbovírus silvestres na Amazônia brasileira. **Contacto**, número especial, ano 6, 1994.

DE FIGUEIREDO, R. M. P.; THATCHER, B. D.; LIMA, M. L.; ALMEIDA, T. C.; ALECRIM, W. D.; GUERRA, M. V. F. Doenças exantemáticas e primeira epidemia de dengue ocorrida em Manaus, Amazonas, no período de 1998-1999. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 37, n. 6, p. 476-479, 2004.

DE FIGUEIREDO, R. M. P.; NAVECA, F. G.; BASTOS, M. S.; MELO, M. N.; VIANA, S. S.; MOURÃO, M. P. G.; COSTA, C. A.; FARIAS, P. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 14, n. 4, 2008.

DE PAULA, S. O.; NUNES, C., MATOS, R., DE OLIVEIRA, Z. M., LIMA, D. M., DA FONSECA B. A. Comparison of techniques for extracting viral RNA from isolation-negative serum for dengue diagnosis by polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods**, v. 98, n. 2, p. 119-125, 2001.

DE SOUZA-LOPES, O; DE ABREU, S. L. Isolation of Mucambo virus, a member of the Venezuelan equine encephalitis virus complex in the State of São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 20, n. 2, p. 82-86, 1978.

DIETZE, R. Dengue. In: **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. Cap. 22, p.183-188.

DYER, J.; CHISENHALL, D. M; MORES, C. N. A multiplex taqman assay for the detection of arthropod-borne flaviviruses. **J. Virol. Methods**, v. 145, p. 9-13, 2007.

ELLIOT, R. M. Nucleotide sequence analysis of the large (L) genomic RNA segment of Bunyamwera virus, the prototype of the family *Bunyaviridae*. **Virology**, v. 173, p. 426-436, 1989.

FEITOSA, F. M; **Expressão gênica em *Aedes aegypti* infectados por vírus Dengue ou *Plasmodium gallinaceum***. 96 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

FELIPPE-BAUER, M. L.; CÁCERES, A. G.; SILVA, C. S.; VALDERRAMA-BAZAN, W; GONZALES-PEREZ, A. Two new *Culicoides* of the *paraensis* species group (Diptera: Ceratopogonidae) from the Amazonian region of Peru. **Mem. Ins. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 8, p. 1051-1058, 2003.

FERREIRA FÉ, N.; BARBOSA, M. G. V. B.; ALECRIM, W. D; GUERRA, M. V. F. Registro da ocorrência de *Aedes albopictus* em área urbana do município de Manaus, Amazonas. **Rev. Saúde Pública**, v. 37, n. 5, p. 674-675, 2003.

FERNANDEZ, Z.; RICHARTZ, R.; TRAVASSOS DA ROSA, A; SOCCOL, V. T. Identificação do vírus causador de encefalomielite eqüina, Paraná, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 34, n. 3, p. 232-235, 2000.

FIGUEIREDO, L. T. M; BATISTA, W. C; NASSAR, E. S. Identification of brazilian flaviviruses by a simplified reverse transcription-polymerase chain reaction method using flavivirus universal primers. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, n. 3, p. 357-362, 1998.

FIGUEIREDO, L. T. M. Vírus Brasileiros da família Bunyaviridae. In: SIMPÓSIO DE VIROLOGIA MÉDICA, 1999, Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 1999. v. 32, p. 154-158.

FIGUEIREDO, L. T. M. The Brazilian flaviviruses. **Microbes Infect.**, v. 2, p. 1643-1619, 2000.

FIGUEIREDO, L. T. M.; FONSECA, B. A. L. Dengue. In: **Tratado de infectologia**. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 204-217.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, p. 224-229, 2007.

FLINT, S. J.; ENQUIST, L. W.; KRUG, R. M.; RACANIELLO, V. R.; SKALLA, A. M. The science of virology. In: **Virology Molecular Biology, Pathogenesis and control**. Washington, DC: ASM Press, 2000. Cap. 1. p. 2-23.

FONSECA, D. M.; KEYGHOBADI, N.; MALCOLM, C. A.; MEHMET, C.; SCHAFFNER, F.; MOGI, M.; FLEISCHER, R. C; WILKERSON, R. C; Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. **Science**, v. 303, p. 1535-1538, 2004.

FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica**. São Paulo: USP, 1965. v. 3, 416 p.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. São Paulo: Edusp, 1996. v. 1, p. 123-191.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. São Paulo: Edusp, 2002. v. 2, 860 p.

FRANCKI, R. I. B.; FAUQUET, C. M.; KNUDSON, D. L; BROWN, F. Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy Viruses. **Archives of Virology Supplementum 2**. New York: Springer-Verlag Wien, 1991. 450 p.

FULOP, L.; BARRETT, A. D. T.; PHILLPOTTS, R.; MARTIN, K.; LESLIE, D.; TITBALL, R. W. Rapid identification of flaviviruses based on conserved NS5 gene sequences. **J. Virol. Methods**, v. 44, p. 179-188, 1993.

GABALDON, A.; ULLOA, G.; PULIDO, J; SUTIL, E.; Espécies de la familia Culicidae que apresentam ornitofilia em Venezuela. **Boletín de la dirección de malariologia y saneamiento ambiental**, v. XVII, n. 1, p. 3-8, 1977.

GRAYSON, M. A.; SRIHONGSE, S.; GALINDO, P. Isolation of St. Louis encephalitis virus from *Deinocerites pseudes* in Panama. **Mosq. News**, v. 27, p. 204, 1967.

GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Arch. Med. Res.**, v. 33, p. 330-342, 2002.

GU W; NOVAK, R. J. Short Report: Detection probability of arboviruses infection in mosquitos populations. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 71, n. 5, p. 636-638, 2004.

HACKER, J. K.; HARDY, J. L. Adsorptive endocytosis of California encephalitis virus into mosquito and mammalian cells: a role for G1. **Virology**, v. 7, p. 235-240, 1997.

HANLEY, J. A; LIPPMAN-HAND A. If nothing goes wrong, is everything all right? Interpreting zero numerators. **JAMA**, v. 249, p. 1743-1745.

HIERHOLZER, J. C; KILLINGTON, R. A. Virus isolation and quantitation. In: **Virology Methods Manual**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 25-46.

HOFFMANN, P. R.; WOODROW, R. J.; CALIMLIM, P. S.; SCIULLI, R.; EFFLER, P. V.; MIYAMOTO, V.; IMRIE, A.; YANAGIHARA, R; NERURKAR, V. R. West Nile surveillance: a simple method for verifying the integrity of RNA in mosquitos (Diptera: Culicidae) pools. **J. Med. Entomol.**, v. 41, n. 4, p. 731-735, 2004.

HUANG, C.; SLATER, B.; CAMPBELL, W.; HOWARD, J; WHITE, D. Detection of arboviral RNA directly from mosquito homogenates by reverse-transcription-polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods**, v. 94, p. 121-128, 2001.

HUANG, C.; MORSE, D.; SLATER, B.; AMAND, M.; TOBIM, E.; SMITH, P.; DUPUIS, M.; HULL, R.; FERRERA, R.; ROSEM, B; GRADY, L. Multiple-year experience in the diagnosis of viral central nervous system infections with a panel of polymerase chain reaction assays for detection of 11 viruses. **CID**, v. 39, p. 630-635, 2004.

INSTITUTO EVANDRO CHAGAS. **Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas – SAARB**. Disponível em: <<http://www.iec.pa.gov.br/saarb.htm>>. Acesso em: 17 set. 2007.

IVERSSON, L. B. Aspectos da epidemia de encefalite por arbovírus na região do Vale do Ribeira, S. Paulo, Brasil, no período de 1975-1978. **Rev. Saúde Pública**, v. 14, p. 9-35, 1980.

KARABATSOS, N. International Catalogue of Arboviruses, including certain other viruses of vertebrates. **Am. Soc. Trop. Med. Hyg.** San Antonio, TX, USA: 1985. Atualização em 2001.

KRAMER, L. D.; WOLFE, T. M.; GREEN, J. E. N.; CHILES, R.; FALLAH, H.; FANG, Y.; REISEN, W. K. Detection of encephalitis viruses in mosquitoes (Diptera: Culicidae) and avian tissues. **J. Med Entomol.**, v. 39, n. 2, p. 312-323, 2002.

KUNIHOLM, M. H.; WOLFE, N. D.; HUANG, C. Y. H.; MPOUDI-NGOLE, E.; TAMOUFE, U.; BURKE, D. S.; GUBLER, D. J. Seroprevalence and distribution of *Flaviviridae*, *Togaviridae*, and *Bunyaviridae* arboviral infections in rural Cameroonian adults. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 74, n. 6, p. 1078-1083, 2006.

KUNO, G.; MITCHELL, C. J.; CHANG, G. J. J.; SMITH, G. C. Detection bunyaviruses of the bunyanwera and california serogroups by a PCR technique. **J. Clin. Microbiol.**, n. 34, p. 1184-1188, 1996.

KUNO, G. Transmission of arboviruses without involvement of arthropod vectors. **Acta Virol.**, v. 45, p.139–150, 2001.

KUNO, G.; GWONG-JEN, J. P. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, n. 4, p.608-637, 2005a.

KUNO, G. Letter to the editor: Dengue transmission without involvement of mosquito vector. **Clin. Infect. Dis.**, v. 40, p.774–775, 2005b.

LANCIOTTI, R. S.; KERST, A. J.; NASCI, R. S.; GODSEY, M. S.; MITCHELL, C. J.; SAVAGE, H. M.; KOMAR, N.; PANELLA, N. A.; ALLEN, B. C.; VOLPE, K.; DAVIS, B. S.; ROEHRIG, J. T. Rapid detection of west nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 11, p. 4066-4071, 2000.

LEDUC, J. W.; PINHEIRO, F. P. Oropouche fever. In: **The Arboviruses: Epidemiology and ecology**. Florida: Ed. CRC Press, 1988. v. IV, p. 1-14.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: **Fields Virology**. 4. ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap. 32, v. II, p. 810-851.

LOPES, O. S.; COIMBRA, T. L. M.; SACCHETTA, L. A.; CALISHER, C. H.; Emergence of a new arbovirus disease in Brazil: I. Isolation and characterization of the etiologic agent, Rocio virus. **Am. J. Epidemiol.**, v. 107, p. 444-449, 1978.

LOPEZ, N.; MULLER, R.; PREHAUD, C; BOULOY, M. The L protein of Rift Valley fever virus can rescue viral ribonucleoproteins and transcribe synthetic genome-like RNA molecules. **J. Virol.**, v. 69, p. 3972-3979, 1995.

LUNA, B. J. A. A emergência das doenças emergentes e as doenças infecciosas emergentes e reemergentes no Brasil. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 5, n. 3, p. 229-243, 2002.

MARCONDES, C. B. Ceratopogonídeos (Maruins). In: **Entomologia Médica e Veterinária**. São Paulo: Editora Atheneu, 2001. p.49-58.

MARTINS, V; P.; MARTINS, M. G.; ARAÚJO, J. M. P.; SILVA, L. O. R.; MONTEIRO, H. A. O.; CASTRO, F. C.; VASCONCELOS, P. F. C; GUEDES, M. I. F. Primeiro registro de *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* no Estado do Ceará, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 40, n. 4, p. 737-739, 2006.

MEZENCIO, J. M. S.; DE SOUZA, W.; FONSECA, M; REBELLO, M. A. Ultrastructural study of Mayaro virus in replication in BHK-21 cells. **Arch. Virol.**, v. 114, n. 3-4, p. 229-235, 1990.

MINISTÉRIO DOS TRANSPORTES. **Mapa de Rondônia**. Disponível em: <<http://www.mapas-brasil.com/rondonia.htm>>. Acesso em: 09 ago. 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. Departamento de Monitoramento e Avaliação da Gestão do SUS. **Painel de Indicadores do SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006a. p. 26-27, n. 1.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. **Classificação de risco dos agentes biológicos**. Brasília: Editora MS, 2006. 36 p.

MORALES, M.A.; BARRANDEGUY, M.; FABBRI, C.; GARCIA, J.B.; VISSANI, A.; TRONO, K.; GUTIERREZ, G; PIGRETTI, S; MENCHACA, H.; GARRIDO, N.; TAYLOR, N.; FERNANDEZ, F.; LEVIS, S; ENRÍA, D. West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. **Emerg. Infect Dis.**, v. 12, n. 10, p. 1559-1561, 2006.

MORELI, M. L.; AQUINO, V. H; FIGUEIREDO, L. T. M. Identification of Simbu, California and Bunyamwera serogroup bunyaviruses by nested RT-PCR. **Trans. R. Soc. Trop. Med. And Hyg.**, v. 95, p. 108-113, 2001.

MORSE, S. S. **Emerging Viruses**. New York: Oxford University Press, 1993. 317 p.

MOUREAU, S. G.; TEMMAM, J. P.; GONZALEZ, R. N.; GRARD, G; DE LAMBALLERIE, X. A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses. **Vector-borne Zoonotic Dis.**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2008.

MURPHY, F. A. New, emerging and reemerging infectious diseases. **Adv. Virus Res.**, v. 43, p. 1-52, 1988.

MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C; STUDDERT, M. J. In: **Veterinary Virology**. 3. ed. EUA: Academic Press, 1999. 629 p.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 762 p.

NATAL, D.; URBINATTI, P. R.; MARUCCI, D. Arbovirus vector ecology in the brazilian coastal range system. In: **An overview of arbovirology in Brazil and neighboring countries**. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998. p. 234-243.

NUNES, M. R. T.; MARTINS, L. C.; RODRIGUES, S. G.; CHIANG, J. O.; AZEVEDO, R. S. S.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A; VASCONCELOS, P. F. C. Oropouche virus isolation, Southeast Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 11, n. 10, p. 1610-1613, 2005a.

NUNES, M. R.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; WEAVER, S. C.; TESH, R. B; VASCONCELOS, P. F. C. Molecular epidemiology of group C viruses (*Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus*) isolated in the Americas. **J. Virol.**, v. 79, n. 16, p. 10561-10570, 2005b.

O'GUINN, M.; LEE, J. S.; KONDIG, J. P.; FERNANDEZ, R; CARBAJAL, F. Field detection of eastern equine encephalitis virus in the Amazon basin region of Peru using reverse transcription-polymerase chain reaction adapted for field identification of arthropod borne pathogens. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 70, n. 2, p. 164-171, 2004.

OLIVEIRA, A. O. **Geografia de Rondônia: Espaço & Produção**. Rondônia: Dinâmica Editora, 2002.

PFEFFER, M.; PROEBSTER, B.; KINNEY, R. M.; KAADEN, O. R. Genus-specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 57, p. 709-718, 1997.

PIGNATTI, M. G. Saúde e Ambiente: As doenças emergentes no Brasil. **Ambiente e Sociedade**, v. VII, n. 1, p. 133-148, 2003.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. Arboviroses. In: **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. Cap 19, p. 156-165.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C. Febre por Oropouche. In: **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico**. Belém: Editora Cejup, 1997. Cap. 18, p. 285-298.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F.C. An overview of oropouche fever epidemics in Brazil and neighbor countries. In: **An overview of arbovirology in Brazil and neighboring countries**. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998. p. 186-192.

RÁCZ, M. L. Doenças virais transmitidas por artrópodes e roedores. In: **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. Cap 97, p. 671-678.

RICE, C.; STRAUSS, E. G.; STRAUSS, J. H. Structure of the flavivirus genome. In: **The Togaviridae and Flaviviridae**. New York: Plenum, 1986. p. 279-327.

ROUQUARYROL, M. Z.; VERAS, F. M. F; FAÇANHA, M. C. Doenças transmissíveis e modos de transmissão. In: **Epidemiologia & Saúde**. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1999. 600 p.

SAMUEL, P. P.; TYAGI, B.K. Diagnostic methods for detection & isolation of dengue viruses from vector mosquitoes. **Indian J. Med. Res.**, v. 123, p. 615-628, 2006.

SANCHEZ-SECO, M. P.; ROSARIO, D.; DOMINGO, C.; HERNÁNDEZ, L.; VALDÉS, K.; GUZMÁN, M. G.; TENORIO, A. Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. **J. Virol. Methods**, v. 126, p. 101-109, 2005.

SANCHEZ-SECO, M. P.; ROSARIO, D.; HERNÁNDEZ, L.; DOMINGO, C.; VALDÉS, K.; GUZMÁN, M. G.; TENORIO, A. Detection and subtyping of dengue 1-4 and yellow fever viruses by means of a multiplex RT-nested-PCR using degenerated primers. **Trop. Med. Inter. Health**, v. 2, n. 9, p. 1432-1441, 2006.

SARDELIS, M. R.; TURELL, M. J.; O'GUINN, M. L.; ANDRE, R. G; ROBERTS, D. R. Vector competence of three north American strains of *Aedes albopictus* for west Nile virus. **J. Am. Mosq. Con. Assoc.**, v. 18, n. 4, p. 284-289, 2002.

SCARAMOZZINO, N.; CRANCE, J.; JOUAN, A.; DeBRIEL, D. A.; STOLL, F.; GARIN, D. Comparison of flaviviruses universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested RT-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 5, p. 1922-1927, 2001.

SCHMALJOHN, C. S.; HOOPER, J. W. Bunyaviridae: The viruses and their replication. In: **Fields, Virology**. 4. ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap. 48. v. II. p. 1293-1309.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Nota Técnica: Situação Epidemiológica da Dengue (2008)**. Disponível em: <http://www.combateadengue.com.br/arquivos/boletim_dengue_280308.pdf>. Acesso em: 11 set. 2008a.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação da Febre Amarela Silvestre no Brasil, 2007 e 2008. Boletim SVS**. Disponível em: <www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_svs_febre_amarela_130308.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2008b.

SHI, P. Y.; BRINTON, M. A.; VEAL, J. M.; ZHONG, Y. Y.; WILSON, W. D. Evidence for the existence of a pseudoknot structure at the 3' terminus of the *Flavivirus* genomic RNA. **Biochemistry**, v. 35, p. 42220-42230, 1996.

SHOPE, R. An history of arbovirology in Brazil: Belém, 1954-1965. In: **An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998. p. 13-18.

SILVA, C. C. A. Activation of prophenoloxidase and removal of *Bacillus subtilis* from the hemolymph of *Acheta domesticus* (L.) (Orthoptera: Gryllidae). **Neotrop. Entomol.**, v. 31, n. 3, p. 487-491, 2002.

STRAUSS, J. H; STRAUSS, E. G. The Alphaviruses: gene expression, replication and evolution. **Microbiol. Rev.**, p. 491-562, 1994.

TAMEGÃO-LOPES, B. P.; REZENDE, P. R.; MARADEI-PEREIRA, L. M. C.; LEMOS, J. A. R. Carga proviral do HTLV-1 e HTLV-2: um método simples através da PCR quantitativa em tempo real. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, n. 6, p. 548-552, 2006.

TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia. **Cad. Saúde Pública**, v. 17, p.99-102, 2001. Suppl. 1.

TIMBURY, M. C. **Medical Virology**. 10. ed. London: Churchill Livingstone, 1994. 176p.

TOSCANO, F. **Estados Brasileiros: Rondônia**. Disponível em: <www.portalbrasil.net/estados_ro.htm>. Acesso em: 18 nov. 2007.

TOMAR, S.; HARDY, R. W.; SMITH, J. L; KUHN, R. J. Catalytic core of alphavirus nonstructural protein nsp4 possesses terminal adenylyltransferase activity. **J. Virol.**, v. 80, n. 20, p. 9962-9969, 2006.

TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; PINHEIRO, F. P.; RODRIGUES, S. G.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; DIAS, L. B; CRUZ, A. C. R. Arboviruses isolated in the Evandro Chagas Institute, including some described for the first time in the Brazilian Amazon region, their known host, and their pathology for man. In: **An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998. p. 19-31.

TUBOI, S. H.; COSTA Z.G.; DA COSTA VASCONCELOS, P. F.; HATCH, D. Clinical and epidemiological characteristics of yellow fever in Brazil: analysis of reported cases 1998-2002. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**,v. 101, n. 2, p.169-175, 2007.

VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A; PINHEIRO, F. P.; SHOPE, R.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F.S.; RODRIGUES, S. G.; DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S. Arboviruses pathogenic for man in Brazil. In: **An overview of arbovirology in Brazil and neighboring countries**. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998. p.72-99.

VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; RODRIGUES, S. G.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; DÉGALLIER, N; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. **Cad. Saúde Pública**, v. 17, p. 155-164, 2001. Suppl. 1.

VIAL, L.; WIELAND, B.; JORI, F.; ETTER, E.; DIXON, L; ROGER, F. African swine fever virus DNA in soft ticks, Senegal. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 13, n. 12, p. 1928-1931. 2007.

WEAVER, S.C. Vector biology in arboviral pathogenesis. In: **Viral Pathogenesis**. New York: Lippincott Raven, 1997. Cap. 14. p. 329-352.

WEAVER, S. C; BARRETT, A. D. T. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. **Nat. Rev.**, v. 2, p. 789-801, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **2007: Number of Reported Cases of Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregion).** Week 52 (Update 5 March 2008). Disponível em: <<http://www.paho.org/common/Display.asp?Lang=E&RecID=10389>>. Acesso em: 24 mar. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Arboviruses and human disease.** Geneva: WHO, 1967. (W.H.O. Tech. Rep. Ser n. 369).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Strengthening implementation of the global strategy for dengue fever and dengue haemorrhagic fever, prevention and control.** Geneva: WHO, 1999. p. 18-20. (Report of the Informal Consultation).

ANEXO 1 – Tabela descritiva dos locais de coleta, data, armadilhas utilizadas e classificação dos mosquitos coletados.

Coleta/armadilha		Anopheles sp (A)	Toxorhynchites sp (B)	Culex sp ©	Culiseta sp (D)	Coquilletidia sp (E)	Haemagogus sp (F)	Psorophora sp (G)	Aedes sp (H)	Limatus sp (I)	Sabethes sp (J)	Trichoprosopon sp(K)	Wyeomyia sp(L)	Mansonia sp (M)	Psychodidae (N)	Tabanidae (O)	Cerathopogonidae (P)	Simulidae (Q)	Uranotaenia sp®	Aedeomyia sp (S)	Shannoniana sp (T)	Deinocerites sp (U)	Local de coleta/Data
1	Macho																						CABEÇA
Isca Humana (IH)	Fêmea				11		36	15	3														05/01/2002
	2	Macho																					MNR
1 H	Fêmea	5		7	1			5							83								08/01/2002
3	Macho																					0	L C 30
	1 H	Fêmea															17	4				0	10/01/2002
4	Macho																						MNU
1 H	Fêmea			23			1										1						10/01/2002
5	Macho																						AMORIM
	1 H	Fêmea					2																11/01/2002
6	Macho																						MNR
1 H	Fêmea	20		2				8	4						88								14/01/2002
7	Macho														1								MNR
	armadilha de Shannon (S)	Fêmea	3		3										2								14/01/2002
8	Macho																						MNR
Armadilha CDC (CDC)	Fêmea			4				1							1								14/01/2002
	9	Macho																					MNU
1 H	Fêmea			1													5						16/01/2002
10	Macho																						MNU
SHA	Fêmea			19															3				16/01/2002
11	Macho																						LC 30
1 H	Fêmea																103	37					17/01/2002
12	Macho																						SÃO GERAL.
1 H	Fêmea																15	14					18/01/2002
13	Macho																						CABEÇA
1 H	Fêmea	3					7	27	104														18/01/2002
14	Macho																						CABEÇA
CDC	Fêmea								2														19/01/2002
15	Macho																						CABEÇA
1 H	Fêmea							2	38														19/01/2002
16	Macho																						CABEÇA
	1 H	Fêmea						64	7														19/01/2002
17	Macho																						CABEÇA
1 H	Fêmea	1						30	5									3					19/01/2002
18	Macho																						CABEÇA
CDC C	Fêmea								1									4					20/01/2002
19	Macho																						CABEÇA
CDC S	Fêmea								16														20/01/2002

[illegible]

[illegible]

89	Macho																		CABEÇA
I H	Fêmea						6						1						23/03/2002
90	Macho																		CABEÇA
CDC C	Fêmea																		23/03/2002
91	Macho																		CABEÇA
CDC S	Fêmea																		23/03/2002
92	Macho																		CABEÇA
SHA	Fêmea	1		1			1												23/03/2002
93	Macho																		CABEÇA
I H	Fêmea	2		1			5	53					1						23/03/2002
94	Macho																		CABEÇA
I H	Fêmea						5	1											24/03/2002
95	Macho																		CABEÇA
I H	Fêmea	34																	24/03/2002
96	Macho																		MNR
SHA	Fêmea												1						25/03/2002
97	Macho																		MNR
I A	Fêmea	4				1		1											25/03/2002
98	Macho																		MNR
I H	Fêmea	14		1			3						24		4				25/03/2002
99	Macho												1						BUR 1
CDC S	Fêmea			2															29/03/2002
100	Macho																		BUR 1
CDC C	Fêmea												6						29/03/2002
101	Macho																		BUR 1
SHA	Fêmea	1		1															28/03/2002
102	Macho																		BUR 1
I H	Fêmea					5									1				28/03/2002
103	Macho																		BUR 1
I H	Fêmea											5							29/03/2002
104	Macho																		BUR 1
I H 2	Fêmea	4																	28/03/2002
105	Macho																		BUR 2
I H	Fêmea	13																	28/03/2002
106	Macho																		MNU 1
I H	Fêmea						1	1							20				27/03/2002
107	Macho																		MNU 1
SHA	Fêmea	1		2		3													27/03/2002
108	Macho																		MNR
CDC S	Fêmea																		01/04/2002
109	Macho																		MNR
CDC C	Fêmea	1		4															01/04/2002
110	Macho																		MNR
SHA	Fêmea			1								1							01/04/2002
111	Macho																		MNR
I H	Fêmea	2											1	19		2			01/02/2002

112	Macho																			MNR
I A	Fêmea	1											3							01/04/2002
113	Macho																			MNU 2
I H	Fêmea	7			4	5								4						04/04/2002
114	Macho																			MNU 2
SHA	Fêmea																			04/04/2002
115	Macho																			MNR
CDC S	Fêmea	1		2								1								08/04/2002
116	Macho																			MNR
CDC C	Fêmea	1																		08/04/2002
117	Macho																			MNR
SHA	Fêmea			1								4								08/04/2002
118	Macho																			MNR
I H	Fêmea	2		1		1		1				6							1	08/04/2002
119	Macho																			MNR
I A	Fêmea	1		3				1				1								08/04/2002
120	Macho																			MNU 1
SHA	Fêmea																			10/04/2002
121	Macho																			MNU 1
I H	Fêmea			1				2							1					10/04/2002
122	Macho																			SÃO GERALDO
I H	Fêmea														3	1				12/04/2002
123	Macho																			MNR
CDC S	Fêmea			2								4								15/04/2002
124	Macho											1								MNR
CDC C	Fêmea											1								15/04/2002
125	Macho																			MNR
SHA	Fêmea	1		1				1												15/04/2002
126	Macho																			MNR
I H	Fêmea	2		2				1			2		18							15/04/2002
127	Macho																			MNR
I A	Fêmea											1								15/04/2002
128	Macho																			MNU 2
SHA	Fêmea			1																18/04/2002
129	Macho																			MNU 2
I H	Fêmea	4					12							3						18/04/2002
130	Macho																			UHE SAM
CDC S	Fêmea	11		220								2								21/04/2002
131	Macho											1								UHE SAM
CDC C	Fêmea	24		304								1								21/04/2002
132	Macho																			UHE SAM
SHA	Fêmea	2		2			1					2								21/04/2002
133	Macho																			UHE SAM
I H	Fêmea	25		2		1		4	7			1								21/04/2002
134	Macho																			UHE SAM
I H	Fêmea	1						6												22/04/2002

[illegible]

[illegible]

182	Macho																				MNR
I A	Fêmea				1																20/05/2002
183	Macho												13								CABEÇA
CDC C	Fêmea												22								21/05/2002
184	Macho												23								CABEÇA
CDC S	Fêmea												14								21/05/2002
185	Macho																				CABEÇA
I H	Fêmea	232										10			23						21/05/2002
186	Macho																				CABEÇA
I H	Fêmea	1		1				1					1	11							21/05/2002
187	Macho																				PAC. TABOCA
I H	Fêmea	27		1			18	3				1		1	78			9			24/05/2002
188	Macho														7						PAC. TABOCA
SHA	Fêmea	11													36						24/05/2002
189	Macho														1						PAC. TABOCA
CDC S	Fêmea																				24/05/2002
190	Macho																				PAC. TABOCA
CDC C	Fêmea							1							2						24/05/2002
191	Macho																				PAC TABOCA
I H	Fêmea						1					1			14			4			25/05/2002
192	Macho														18						PAC. TABOCA
SHA	Fêmea	8													62						25/05/2002
193	Macho																				PAC. TABOCA
I H	Fêmea	6					21	2				1			69						25/05/2002
194	Macho														2						PAC. TABOCA
CDC S	Fêmea														1						25/05/2002
195	Macho																				PAC. TABOCA
CDC C	Fêmea														2						25/05/2002
196	Macho														6						MNR
CDC S	Fêmea			3											4						27/05/2002
197	Macho														5						MNR
CDC C	Fêmea														16						27/05/2002
198	Macho														1						MNR
SHA	Fêmea	11		2											13						27/05/2002
199	Macho																				MNR
I H	Fêmea	7						1						1	55						27/05/2002
200	Macho																				
I A	Fêmea	7		1											3						27/05/2002
201	Macho																				MNU 2
I H	Fêmea			1				1													29/05/2002
202	Macho														15						BUR 1
CDC S	Fêmea	3		2		1									14						29/05/2002
203	Macho														1						BUR 1
CDC C	Fêmea	4													2						29/05/2002
204	Macho																				BUR 1
SHA	Fêmea			9													6			2	29/05/2002

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

297	Macho																				GM 5
I H	Fêmea	5			7							72									04/07/2002
298	Macho																				DEOLINDA
I H	Fêmea	2		1	76		11					27									04/07/2002
299	Macho																				MNU 2
I H	Fêmea	1		4																	12/06/2002
300	Macho												89								CABEÇA
CDC S	Fêmea			1									41								13/06/2002
301	Macho																				UHE SAMUEL
I H	Fêmea																				09/07/2002
302	Macho																				UHE SAMUEL
SHA	Fêmea	7		8	1								5								09/07/2002
303	Macho																				UHE SAMUEL
I H	Fêmea	17		3	7		9														09/07/2002
304	Macho												1								UHE SAMUEL
CDC S	Fêmea	18		2									2								09/07/2002
305	Macho												2								UHE SAMUEL
CDC C	Fêmea	17										3	1								09/07/2002
306	Macho																				UHE SAMUEL
I H	Fêmea													1							10/07/2002
307	Macho																				UHE SAMUEL
I H	Fêmea	21			1	1	15			1		7	1								10/07/2002
308	Macho																				UHE SAMUEL
I H	Fêmea																				10/07/2002
309	Macho												1								UHE SAMUEL
CDC S	Fêmea	8		2									2								10/07/2002
310	Macho																				UHE SAMUEL
CDC C	Fêmea	12		1								11									10/07/2002
311	Macho																				UHE SAMUEL
I H	Fêmea	3													10						11/07/2002
312	Macho																				UHE SAMUEL
SHA	Fêmea	5					1						3								10/07/2002
313	Macho																				UHE SAMUEL
SHA	Fêmea										1										11/07/2002
314	Macho																				UHE SAMUEL
I H	Fêmea	35			5		14					13									11/07/2002
315	Macho																				UHE SAMUEL
CDC S	Fêmea	3										1									11/07/2002
316	Macho																				UHE SAMUEL
CDC C	Fêmea	4										1									11/07/2002
317	Macho																				UHE SAMUEL
I H	Fêmea					1															11/07/2002
318	Macho																				UHE SAMUEL
I H	Fêmea									1					1						12/07/2002
319	Macho																				MNR
CDC S	Fêmea			6	1																15/07/2002

[illegible]

[illegible]

[illegible]

389	Macho																			MNU 2
SHA	Fêmea																			28/08/2002
390	Macho																			BUR 1
I H	Fêmea						2		5											30/08/2002
391	Macho																			BUR 1
CDC S	Fêmea			1																29/08/2002
392	Macho																			BUR 1
CDC C	Fêmea																			29/08/2002
393	Macho																			BUR 1
I H	Fêmea	4		1															1	30/08/2002
394	Macho																			BUR 1
I H	Fêmea	23		18																30/08/2002
395	Macho			1																BUR 1
SHA	Fêmea			1								5								30/08/2002
396	Macho																			MNR
CDC C	Fêmea	6																		05/08/2002
397	Macho																			MNR
CDC S	Fêmea	3		4		1							1							05/08/2002
398	Macho																			MNR
SHA	Fêmea	1		2		2							1							05/08/2002
399	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea			15									2							01/08/2002
400	Macho																			MNR
I A	Fêmea	1		3		2		1												05/08/2002
401	Macho																			MNR
I A	Fêmea					1		4					3							22/08/2002
402	Macho																			BUR 1
I H	Fêmea								1	1				2					1	29/08/2002
403	Macho																			MNR
I H	Fêmea	3		2		11		7						3						02/09/2002
404	Macho			1																MNR
SHA	Fêmea	6		1		1														02/09/2002
405	Macho																			MNR
I A	Fêmea			1																02/09/2002
406	Macho																			MNR
CDC A	Fêmea			3																02/09/2002
407	Macho																			MNR
CDC S	Fêmea																			02/09/2002
408	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea	5											1	5						05/09/2002
409	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea			3										19						05/09/2002
410	Macho																			CABEÇA
CD C	Fêmea	1		1																05/09/2002
411	Macho																			MNR
CDC C	Fêmea	1		6				1						2	1					09/09/2002

412	Macho																			MNR
CDC S	Fêmea	4		63		3						1								09/09/2002
413	Macho																			MNR
I H	Fêmea	9		10		7		9												09/09/2002
414	Macho																			MNR
SHA	Fêmea	5				3														09/09/2002
415	Macho							1												BUR 1
SHA	Fêmea							7												10/09/2002
416	Macho																			BUR 1
I H	Fêmea							2		12	2							2		11/09/2002
417	Macho																			CABEÇA
CDC S	Fêmea																			05/09/2002
417	Macho																			BUR 1
I H	Fêmea																			10/09/2002
418	Macho																			BUR 1
CDC S	Fêmea																			10/09/2002
419	Macho																			BUR 1
CDC C	Fêmea																			10/09/2002
420	Macho																			BUR 1
I H	Fêmea	10				1		1												10/09/2002
421	Macho																			BUR 1
I H	Fêmea	5		1								1								10/09/2002
422	Macho																			MNU 2
I H	Fêmea	1				6		2												11/09/2002
423	Macho																			MNU 2
SHA	Fêmea																			11/09/2002
424	Macho																			CABEÇA
CDC S	Fêmea			1								1								123/9/02
425	Macho																			CABEÇA
CDC C	Fêmea			1								1								12/09/2002
426	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea	3		5				1	1					86						12/09/2002
427	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea	8										2	2		3					12/09/2002
428	Macho																			MNR
CDC S	Fêmea	5		16				2	1				1	1						16/09/2002
429	Macho																			MNR
CDC C	Fêmea	2		1										5						16/09/2002
430	Macho																			MNR
SHA	Fêmea	4		3		1		1				1								16/09/2002
431	Macho																			MNR
I H	Fêmea	39		7		6					1			7						16/09/2002
432	Macho																			MNU 1
SHA	Fêmea	1		1																18/09/2002
433	Macho																			MNU 1
I H	Fêmea			5																18/09/2002

[illegible]

[illegible]

480	Macho																			MNU 1
I H	Fêmea			1																16/10/2002
481	Macho																			CABEÇA
CDC S	Fêmea			8																17/10/2002
482	Macho																			CABEÇA
CDC C	Fêmea																			17/10/2002
483	Macho																			CABEÇA
SHA	Fêmea	1											4							17/10/2002
484	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea	3		1								1	1							17/10/2002
485	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea			1									20							17/10/2002
486	Macho																			MNR
I H	Fêmea	1		2		2							2							21/10/2002
487	Macho																			MNR
CDC S	Fêmea			9		1							8							21/10/2002
488	Macho																			MNR
SHA	Fêmea																			21/10/2002
489	Macho												1							MNR
CDC C	Fêmea	1		13		4		1					4				1			24/10/2002
490	Macho												11							CABEÇA
CDC S	Fêmea			8									10							24/10/2002
491	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea	1		17				2					1	4						24/10/2002
492	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea	9		2				1					3	2						24/10/2002
493	Macho																			MNR
CDC S	Fêmea			38		5							8							28/10/2002
494	Macho																			MNR
CDC C	Fêmea			62		3		1					4							28/10/2002
495	Macho	2																		MNR
SHA	Fêmea	3		5									1							28/10/2002
496	Macho																			MNR
I H	Fêmea	5		24		6		2					5							28/10/2002
497	Macho																			MNU 1
SHA	Fêmea	2		3				1												30/10/2002
498	Macho																			MNU 1
I H	Fêmea			14																30/10/2002
499	Macho												29							CABEÇA

[illegible]

[illegible]

549	Macho																		CABEÇA
CDC C	Fêmea	1		28								1							14/11/2002
550	Macho																		CABEÇA
I H	Fêmea	18		21															14/11/2002
551	Macho																		CABEÇA
I H	Fêmea			7			1	3					1						14/11/2002
552	Macho																		MNR
SHA	Fêmea	2		3				1						3					18/11/2002
553	Macho																		MNR
CDC C	Fêmea													5					18/11/2002
554	Macho																		MNR
CDC S	Fêmea	1		2				4							9				18/11/2002
555	Macho																		MNR
I H	Fêmea	4		10		5		37				2			3				18/11/2002
556	Macho																		BUR 2
I H	Fêmea									1						2			19/11/2002
557	Macho																		BUR 2
CDC S	Fêmea	3		17		1									33				19/11/2002
558	Macho																		BUR 2
CDC C	Fêmea			1											4				19/11/2002
559	Macho																		BUR 2
SHA	Fêmea	1		5		1													19/11/2002
560	Macho																		BUR 2
I H	Fêmea	8				1													19/11/2002
561	Macho																		BUR 2
I H	Fêmea	34						1								13			19/11/2002
562	Macho																		BUR 2
I H	Fêmea					1						4				1			20/11/2002
563	Macho																		MNU 2
SHA	Fêmea	2		1															20/11/2002
564	Macho																		MNU 2
I H	Fêmea	5		2		14													20/11/2002
565	Macho																		CABEÇA
CDC S	Fêmea			5				1							50				21/11/2002
566	Macho																		CABEÇA
CDC C	Fêmea			1							1				10				21/11/2002
567	Macho																		CABEÇA
SHA	Fêmea	1		1											2				21/11/2002
568	Macho																		CABEÇA
I H	Fêmea	1		1				1	7				1	7		9			21/11/2002
569	Macho																		

[illegible]

595	Macho																			BUR 2
CDC S	Fêmea			34																10/12/2002
596	Macho																			BUR 2
CDC C	Fêmea			32																10/12/2002
597	Macho																			BUR 2
I H	Fêmea			1		1	2	3		5					1					10/12/2002
598	Macho																			BUR 2
SHA	Fêmea	12		29																10/12/2002
599	Macho																			BUR 2
I H	Fêmea	34				2														10/12/2002
600	Macho																			BUR 2
I H	Fêmea	4																		10/12/2002
601	Macho																			BUR 2
I H	Fêmea								1	1		14		2	1					11/12/2002
602	Macho																			MNU 1
I H	Fêmea			31		1														12/12/2002
603	Macho																			MNU 1
SHA	Fêmea	3		8																12/12/2002
604	Macho																			CABEÇA
CDC S	Fêmea			13											2					12/12/2002
605	Macho																			CABEÇA
CDC C	Fêmea			9											1					12/12/2002
606	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea	7		3				1	3											12/12/2002
607	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea	1		6				1	35						4					12/12/2002
608	Macho																			MNR
CDC S	Fêmea			2											4					16/12/2002
609	Macho																			MNR
CDC C	Fêmea	1		1											3					16/12/2002
610	Macho																			MNR
SHA	Fêmea														1					16/12/2002
611	Macho																			MNR
I H	Fêmea	9				3		4							20					16/12/2002
612	Macho																			MNU 2
SHA	Fêmea	2		1		1														18/12/2002
613	Macho																			MNU 2
I H	Fêmea	4		1		58		1												18/12/2002
614	Macho																			MNR
CDC S	Fêmea	3		14																06/01/2003
615	Macho																			MNR
CDC C	Fêmea	1		2																06/01/2003
616	Macho																			MNR
SHA	Fêmea	4		2																06/01/2003
617	Macho																			MNR
I H	Fêmea	7		4				9	9			2			1					06/01/2003

618	Macho																			MNU 1
SHA	Fêmea																			08/01/2003
619	Macho																			MNU 1
I H	Fêmea				1		1										1			08/01/2003
620	Macho																			MNR
CDC S	Fêmea	3			1															13/01/2003
621	Macho																			MNR
CDC C	Fêmea	1		4																13/01/2003
622	Macho																			MNR
SHA	Fêmea			1																13/01/2002
623	Macho																			MNR
I H	Fêmea	13		4		1		7	1			1			2					13/01/2002
624	Macho																			BUR 2
CDC S	Fêmea			2				1							1					14/01/2002
625	Macho																			BUR 2
CDC C	Fêmea												1	2						14/01/2003
626	Macho	1																		BUR 2
SHA	Fêmea			2																14/01/2003
627	Macho																			BUR 2
I H	Fêmea			1					8											14/01/2003
628	Macho																			BUR 2
I H	Fêmea	39		1				2		1				1		23			2	14/01/2002
629	Macho																			BUR 2
I H	Fêmea	17																		14/01/2003
630	Macho											1								BUR 2
I H	Fêmea					2	2		1		1									15/01/2003
631	Macho																			MNU 2
I H	Fêmea	3		5		16														15/01/2003
632	Macho																			MNU 2
SHA	Fêmea																			15/01/2003
633	Macho														15					CABEÇA
CDC S	Fêmea			38				4							75					16/01/2003
634	Macho																			CABEÇA
CDC C	Fêmea			1				1	1						29					16/01/2003
635	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea	10				8		1							1					16/01/2003
636	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea			1		6	10	74							9					16/01/2003
637	Macho														2					MNR
CDC S	Fêmea			1											2					21/01/2003
638	Macho																			MNR
CDC C	Fêmea			4											4					21/01/2003
639	Macho																			MNR
SHA	Fêmea	1		7																21/01/2003
640	Macho																			MNR
I H	Fêmea	6		1		2		3	1			3			5					21/01/2003

[illegible]

664	Macho																		CABEÇA
CDC C	Fêmea	1		1									8						06/02/2003
665	Macho																		CABEÇA
I H	Fêmea	1				21	24	29			1		5						06/02/2003
665	Macho																		CABEÇA
I H	Fêmea	2				13						1	14						06/02/2003
666	Macho																		CABEÇA
I H	Fêmea	2				13						1	14						06/02/2003
667	Macho																		MNR
CDC S	Fêmea																		10/02/2003
668	Macho																		MNR
I H	Fêmea	9		3		8	3	2											10/02/2003
669	Macho																		MNR
CDC C	Fêmea			3			1					3							10/02/2003
670	Macho																		MNR
SHA	Fêmea																		10/02/2003
671	Macho																		MNU 2
I H	Fêmea	5		24		1	2												13/02/2003
672	Macho																		MNU 2
SHA	Fêmea																		13/02/2003
673	Macho																		BUR 2
SHA	Fêmea			8															12/02/2003
674	Macho												30						BUR 2
CDC S	Fêmea	2		14									25						12/02/2003
675	Macho																		BUR 2
I H	Fêmea	8		2			1								3				12/02/2003
676	Macho																		BUR 2
I H	Fêmea	22		4										62	1				12/02/2003
677	Macho																		BUR 2
I H	Fêmea			1		4		1											13/02/2003
678	Macho																		BUR 2
I H	Fêmea						4		1										10/02/2003
679	Macho																		CABEÇA
I H	Fêmea					1	18	11	19										13/02/2003
680	Macho																		CABEÇA
I H	Fêmea	13				17	4	5											13/02/2003
681	Macho																		CABEÇA
CDC C	Fêmea			46				2											13/02/2003
682	Macho																		CABEÇA
CDC S	Fêmea	3		10		1	13	5					15						13/02/2003
683	Macho																		

[illegible]

709	I H	710	SHA	711	I H	712	CDC S	713	CDC C	714	SHA	715	I H	716	CDC S	717	CDC C	718	I H	719	I H	720	CDC S	721	CDC C	722	SHA	723	I H	724	SHA	725	I H	726	CDC S	727	CDC C	728	I H	729	I H	730	I H	731	I H					
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea		
		1																																																

732	Macho																			BUR 2
SHA	Fêmea			5														1		24/03/2003
733	Macho																			BUR 2
I H	Fêmea					4		1												24/03/2003
734	Macho																			BUR 2
CDC C	Fêmea			12																24/03/2003
735	Macho																			BUR 2
CDC S	Fêmea			8																24/03/2003
736	Macho																			MNR
I H	Fêmea	3				2							4							25/03/2003
737	Macho																			MNR
SHA	Fêmea												1							25/03/2003
738	Macho																			MNR
CDC S	Fêmea			1			2													25/03/2003
739	Macho																			
CDC	Fêmea			17																26/03/2003
740	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea	3				5	8						2							27/03/2003
741	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea	3				2									5					27/03
742	Macho																			CABEÇA
CDC C	Fêmea			1																27/03/2003
743	Macho												36							CABEÇA
CDC S	Fêmea	2		2			1						9							27/03/2003
744	Macho																			MNR
CDC C	Fêmea			3																31/03/2003
745	Macho												8							MNR
CDC S	Fêmea	1		10									4							31/03/2003
746	Macho																			MNR
SHA	Fêmea			1									1							31/03/2003
747	Macho																			MNR
I H	Fêmea	4		2		4							11							31/03/2003
748	Macho																			MNU 2
SHA	Fêmea			1																01/04/2003
749	Macho																			MNU 2
I H	Fêmea	7				39														01/04/2003
750	Macho																			CABEÇA
CDC S	Fêmea	2																		03/04/2003
751	Macho												4							CABEÇA
CDC C	Fêmea			5			</													

755	Macho																	BUR 2
CDC C	Fêmea	1		6							1							07/04/2003
756	Macho																	BUR 2
I H	Fêmea	3			4	2	1			1		9						07/04/2003
757	Macho																	BUR 2
SHA	Fêmea			1											1			07/04/2003
758	Macho																	BUR 2
I H	Fêmea	17					2											07/04/2003
759	Macho																	BUR 2
I H	Fêmea	32					2							10	3			07/04/2003
760	Macho																	BUR 2
I H	Fêmea				2	1	4		8	1								07/04/2003
761	Macho																	MNR
CDC C	Fêmea			1								1						08/04/2003
762	Macho																	MNR
CDC S	Fêmea	1		8								8			1			08/04/2003
763	Macho																	MNR
I H	Fêmea			3		1		5	1			15						08/04/2003
764	Macho																	CABEÇA
CDC S	Fêmea	3		3			3											10/04/2003
765	Macho																	CABEÇA
CDC C	Fêmea	1		2			3											10/04/2003
766	Macho																	CABEÇA
I H	Fêmea																	10/04/2003
767	Macho																	CABEÇA
I H	Fêmea	34		2			9	2						35				10/04/2003
768	Macho																	MNU 1
I H	Fêmea			23			20											11/04/2003
769	Macho											2						MNR
CDC S	Fêmea			2			1					2						14/04/2003
770	Macho																	MNR
CDC C	Fêmea											3						14/04/2003
771	Macho																	MNR
I H	Fêmea	2		2			3					3						14/04/2003
772	Macho																	CABEÇA
CDC S	Fêmea	1		1														15/04/2003
773	Macho																	CABEÇA
CDC C	Fêmea						1					19						15/04/2003
774	Macho																	CABEÇA
I H	Fêmea	9					38					3						15/04/2003
775	Macho																	CABEÇA
I H	Fêmea	17					17	94				6						15/04/2003

778	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea	3					39							1						24/04/2003
779	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea						8	8												24/04/2003
780	Macho													6						CABEÇA
CDC S	Fêmea			7			1							68						24/04/2003
781	Macho																			CABEÇA
CDC C	Fêmea																			24/04/2003
782	Macho													14						CABEÇA
CDC S	Fêmea			1										3						01/05/2003
783	Macho													4						CABEÇA
CDC C	Fêmea													9						01/05/2003
784	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea	3					14													01/05/2003
785	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea	4					19	71												01/05/2003
786	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea	5					13	4												04/05/2003
787	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea	1					15	22												04/05/2003
788	Macho																			CABEÇA
CDC C	Fêmea																			04/05/2003
789	Macho													15						CABEÇA
CDC S	Fêmea			2				1						6						04/05/2003
790	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea	22		1			6													15/05/2003
791	Macho																			CABEÇA
CDC C	Fêmea						1							2						15/05/2003
792	Macho													16						CABEÇA
CDC S	Fêmea													9						15/05/2003
793	Macho																			BUR 2
I H	Fêmea	29																		19/05/2003
794	Macho																			BUR 2
I H	Fêmea						1													19/05/2003
795	Macho																			BUR 2
CDC C	Fêmea																			19/05/2003
796	Macho																			BUR 2
CDC S	Fêmea																			19/05/2003
797	Macho													34						CABEÇA
CDC S	Fêmea																			

824	Macho																			CABEÇA
CDC C	Fêmea																			03/06/2003
825	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea										1				1					03/06/2003
826	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea																			04/06/2003
827	Macho																			PIMENTEIRAS
CDC S	Fêmea	14		6		16														06/07/2003
828	Macho																			PIMENTEIRAS
CDC C	Fêmea	2		3														3		06/07/2003
829	Macho																			PIMENTEIRAS
I H	Fêmea	8				13					95									06/07/2003
830	Macho																			PIMENTEIRAS
I H	Fêmea														11					07/07/2003
831	Macho																			PIMENTEIRAS
I H	Fêmea	2				61		1			39									07/07/2003
832	Macho																			PIMENTEIRAS
I H	Fêmea	11		1							1									07/07/2003
833	Macho																			PIMENTEIRAS
CDC S	Fêmea	4		2		5		1			1									07/07/2003
834	Macho																			PIMENTEIRAS
CDC C	Fêmea	3		2																07/07/2003
835	Macho																			CABEÇA
CDC S	Fêmea			1																11/07/2003
836	Macho																			CABEÇA
CDC C	Fêmea																			11/07/2003
837	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea							1												11/07/2003
838	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea																			11/07/2003
839	Macho																			CABEÇA
CDC S	Fêmea																			16/07/2003
840	Macho																			CABEÇA
CDC C	Fêmea																			16/07/2003
841	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea							6												16/07/2003
842	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea																			16/07/2003
843	Macho																			CABEÇA
CDC S	Fêmea			3																22/07/2003
844	Macho																			CABEÇA
CDC C	Fêmea																			22/07/2003
845	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea							2			4									22/07/2003
846	Macho																			CABEÇA
I H	Fêmea																			22/07/2003

[illegible]

[illegible]

[illegible]