

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARACTERIZAÇÃO DE TRÊS NOVOS
AQUAREOVÍRUS ISOLADOS DE ANIMAIS
AQUÁTICOS**

AYMARA ALVES CORRÊA RANGEL

**Seropédica, Rio de Janeiro
Março de 1999**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**CARACTERIZAÇÃO DE TRÊS NOVOS
AQUAREOVÍRUS ISOLADOS DE ANIMAIS
AQUÁTICOS**

AYMARA ALVES CORRÊA RANGEL

Sob a Orientação do Prof. Dr. Francisco Benedito Rangel Filho

**Tese submetida como
requisito parcial para
obtenção do grau de
Magister Scientiae em
Medicina Veterinária.**

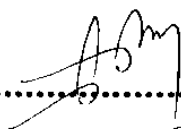
**Seropédica, Rio de Janeiro
Março de 1999**

CARACTERIZAÇÃO DE TRÊS NOVOS AQUAREOVÍRUS ISOLADOS DE ANIMAIS AQUÁTICOS

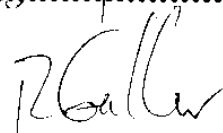
AYMARA ALVES CORRÊA RANGEL

Tese aprovada em 05/03/99.

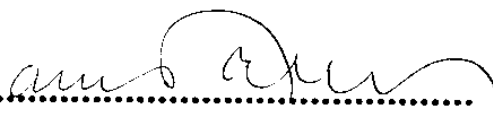
Francisco Benedito Rangel Filho

.....


Ricardo Galler

.....


Januário Bispo Cabral Neto

.....


Dedico este trabalho aos meus pais, Francisco e Wilma, que muito admiro e amo, pelo carinho, apoio diário e dedicação na minha formação profissional. A minha irmã, Moraima, pelo incentivo e o companheirismo de sempre. Aos meus amigos que estiveram presentes em todos os momentos, trazendo muita alegria a cada etapa realizada desta tese.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco Benedito Rangel Filho, orientador desta tese, pela confiança, amizade e incentivo durante cada etapa do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Siba K. Samal, co-orientador desta tese, pelo apoio e consideração em prontamente ceder o Laboratório de Biologia Molecular, do Avrum Gudelsky Veterinary Center - University of Maryland, EUA, assim como os recursos necessários e o seu tempo para a realização dos experimentos deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Frank M. Hetrick, colaborador, pela atenção e entusiasmo em acompanhar esta tese, desde a elaboração até a conclusão, viabilizando a realização de diversas etapas deste trabalho no Animal Health Diagnostic Laboratory - Maryland Department of Agriculture - University of Maryland, EUA.

Ao Dr. William D. Hueston, presidente do Department of Veterinary Medicine e ao Dr. James P. Davidson, diretor do Animal Health Diagnostic Laboratory, por me receberem na University of Maryland, demonstrando um grande respeito profissional e apoio ao intercâmbio científico entre o Brasil e os EUA.

Ao Daniel Rockemann, Lab. Scientist do Laboratório de Biologia Molecular do Avrum Gudelsky Veterinary Center, que auxiliou em vários experimentos realizados nesta tese e, acima de tudo, tornou-se um grande amigo.

Ao Dr. Jimmy C. M. Huang e à equipe do Animal Health Diagnostic Laboratory, pelo apoio durante as diversas etapas deste trabalho.

Ao Gerard H. Edwards, M.Sc., pelo profissionalismo e participação no emprego da microscopia eletrônica nesta tese.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular do Avrum Gudelsky Veterinary Center, onde tive a oportunidade de fazer excelentes amigos, que me receberam, no referido laboratório, com muita amizade e incentivo à realização deste projeto.

À equipe administrativa do Avrum Gudelsky Veterinary Center, em especial a Rosalind Pinkard e a Ireen Dryburgh-Barry, que fizeram da minha estada nesse centro de pesquisa uma grande alegria.

À equipe administrativa do Animal Health Diagnostic Laboratory, pela consideração e o interesse em ajudar a qualquer momento, visando ao meu bem estar.

Ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, representado pela Coordenadora Prof^a. Dra. Maria da Conceição Estelita Vianni, pela oportunidade que me foi concedida de ingresso e de aperfeiçoamento profissional.

Ao Prof. Dr. Francisco Gerson Araujo, Coordenador do Posto de Aquicultura, UFRRJ, pelas informações técnicas e financeiras da aquicultura brasileira.

Ao Prof. Dr. Abner Chiquieri, do Departamento de Letras e Ciências Sociais, do ICHS, UFRRJ, pela contribuição da melhor ortografia e sintaxe desta tese.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), que, através do decano de Pesquisa e Pós-Graduação, Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes, apoiou o desenvolvimento deste trabalho, principalmente com a associação da University of Maryland, EUA.

À Capes - Coordenadoria de Apoio à Pesquisa ao Ensino Superior, pela bolsa de estudos outorgada durante o curso.

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio à viagem aos EUA, incentivando a realização desta tese.

Enfim, a todos aqueles que não pude citar, mas que participaram deste aprendizado, auxiliando na minha formação profissional e pessoal, o meu sincero respeito e agradecimentos.

BIOGRAFIA DO AUTOR

AYMARA ALVES CORRÊA RANGEL, filha de Francisco Benedito Rangel Filho e Wilma Alves Corrêa Rangel, nasceu em 20 de novembro de 1971 no Rio de Janeiro, RJ.

Iniciou o 1º grau no Red Ceder School, East Lansing, Michigan, EUA, de 03 de janeiro de 1977 a 31 de maio de 1979, dando seqüência no Colégio Santos Anjos, RJ, Brasil, de março de 1980 a dezembro de 1982. Concluiu o 1º grau na Companhia de Santa Tereza de Jesus, de março de 1983 a dezembro de 1986. O 2º grau foi realizado no Instituto Guanabara Lt.^{da}, RJ, tendo sido iniciado em março de 1987 e concluído em dezembro de 1989.

Aprovada para o curso de Medicina Veterinária, do Instituto de Veterinária, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), pelo Vestibular de janeiro de 1990, ingressou no 1º semestre do mesmo ano. Durante períodos de férias da Universidade, realizou os seguintes treinamentos: a) em setembro de 1993, treinamento no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), RJ, onde se familiarizou com as técnicas associadas à Biologia Molecular no campo da Virologia, completando uma carga horária de 120 h, sob a responsabilidade do Dr. Ricardo Galler; b) de 10 de janeiro de 1994 a 25 de fevereiro de 1994, treinamento laboratorial no Laboratório de Diagnóstico e Referência do Centro Pan-Americano de Febre Aftosa, da OPAS/OMS, completando carga horária de

264 h, sob a supervisão do Dr. Magnus S. Söndahl. Concluiu a graduação em dezembro de 1994, colando grau em janeiro de 1995.

No período de 1º de março de 1995 a 30 de abril de 1996 realizou um estágio no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e em Bio-Manguinhos, na Fundação Instituto Oswaldo Cruz, tornando-se, em dezembro de 1995, bolsista do Programa Rhae, na categoria Desenvolvimento Tecnológico Industrial, nível 7G. Nesse período, dedicou-se ao aprendizado da tecnologia de DNA recombinante, além de técnicas de mutagênese e seqüenciamento nucleotídico, sob supervisão do Dr. Ricardo Galler. Ainda em 1996, no período de 2 de setembro a 31 de outubro, sob a orientação do Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, estagiou no Laboratório de Virologia e Imunologia Aplicadas, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo (USP), SP, onde adquiriu conhecimentos sobre ELISA, SDS-PAGE e cultivos de células.

Em dezembro de 1996 foi selecionada para o Mestrado em Medicina Veterinária, sob a orientação do Prof. Dr. Francisco Benedito Rangel Filho, na Área de Concentração de Medicina Veterinária Preventiva, do Instituto de Veterinária, da UFRRJ, iniciando em março de 1997.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	05
2.1 Histórico.....	05
2.2 Família <i>Reoviridae</i>	07
2.3 Características Gerais dos Aquareovírus.....	09
2.4 Distribuição dos Aquareovírus.....	11
2.5 Patogenicidade e Infecção Experimental dos Aquareovírus.....	13
2.6 Caracterização Sorológica dos Aquareovírus	16
2.7 Caracterização Molecular dos Aquareovírus	19
2.8 Caracterização Genética dos Aquareovírus	21
2.9 Diagnóstico da Infecção causada por Aquareovírus.....	22
2.10 Aquareovírus: características em comum com os membros da família <i>Reoviridae</i> , em especial com o gênero <i>Rotavirus</i>	24
2.11 Rotavírus: distribuição	25
2.12 Características Gerais dos Rotavírus	26
2.13 Organização do Genoma dos Rotavírus.....	27
2.14 Classificação Sorológica dos Rotavírus.....	28

3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Células e Vírus	29
3.2 Produção Viral	32
3.3 Lâminas para Microscopia Óptica	33
3.4 Purificação Viral	34
3.5 Microscopia Eletrônica	35
3.6 Extração do Ácido Nucléico (RNA).....	36
3.7 Preparação dos RNAs com Material Radioativo.....	36
3.8 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)	37
3.9 Transferência dos RNAs para as Membranas	37
3.10 Hibridização recíproca RNA-RNA “dot blot”	38
4. RESULTADOS.....	39
4.1 Produção Celular	39
4.2 Produção Viral.....	39
4.3 Lâminas para Microscopia Óptica.....	40
4.4 Microscopia Eletrônica	40
4.5 Análises Eletroforéticas dos segmentos RNAfd	45
4.6 Hibridização recíproca RNA-RNA “dot blot”	50
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÕES.....	58
7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	61
8. ANEXO	75

ÍNDICE DAS TABELAS

TABELA 1. Vírus de peixes classificados em famílias	08
TABELA 2. Gêneros que compõem a família <i>Reoviridae</i> e suas características.....	09
TABELA 3. Lista dos aquareovírus isolados dos peixes e moluscos até a presente data	12
TABELA 4. Principais Procedimentos Sorológicos utilizados no Diagnóstico Viroológico	17
TABELA 5. Aquareovírus com genogrupos definidos através da aplicação da técnica de hibridização recíproca RNA-RNA, até a presente data.....	23
TABELA 6. Origem dos vírus identificados como aquareovírus a partir da presente estudo	31
TABELA 7. Origem dos aquareovírus utilizados como padrão no presente estudo	32
TABELA 8. Genogrupos detectados de três aquareovírus isolados neste estudo, a partir da aplicação da técnica de hibridização recíproca RNA-RNA.....	52

ÍNDICE DAS FIGURAS

- FIGURA 1. BOD a 16 °C com estoque de cultura de células “Chinook Salmon Embryo” (CHSE-214) em frascos de 150 cm² 41
- FIGURA 2. Monocamada de células normais de “Chinook Salmon Embryo” (CHSE 214) em lâmina para Microscopia Óptica (100x), 24 h pós-incubação.. 42
- FIGURA 3. Destruição da monocamada de células CHSE-214 infectada com “grass carp aquareovirus” (GCV), em lâmina para Microscopia Óptica (40x), 24 h pós-inoculação 42
- FIGURA 4. Formação sincicial em células CHSE-214 infectadas com “Geoduck clams aquareovirus” (CLV), em lâmina para Microscopia Óptica (100x), 48 h pós-inoculação 43
- FIGURA 5. Formação sincicial em células CHSE-214 infectadas com “Atlantic herring aquareovirus” (HRV), em lâmina para Microscopia Óptica (100x). 48 h pós-inoculação 43
- FIGURA 6. Microscopia eletrônica de transmissão (contrastação negativa) do: A) GCV purificado; B) CLV purificado; C) HRV purificado. Vírus vazio (seta menor); vírus completo (seta maior). Barra $\equiv$ 100 nm 44

- FIGURA 7. Comparação auto-radiográfica entre o perfil eletroforético dos RNAsfd genômicos dos aquareovírus aqui isolados (GCV, CLV e HRV), o aquareovírus representante do genogrupo A (SBR) e o SA11. Os RNAsfd genômicos foram extraídos dos vírus purificados, marcados no terminal 3' com [5' - ^{32}P] pCp e submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida a 7,5%, com 1,2 mm de espessura e 25 cm de comprimento. A corrida eletroforética durou 16 h a 200V 47
- FIGURA 8. Comparação auto-radiográfica do perfil eletroforético do GCV, posteriormente confirmado como um novo genogrupo (G) pela aplicação da hibridização recíproca RNA-RNA, com o perfil eletroforético de cada aquareovírus representante dos genogrupos: A (SBR), B (LBS), C (GSV), D (CRV), E (TRV) e F (SCR). Os RNAsfd genômicos foram extraídos dos vírus purificados, marcados no terminal 3' com [5' - ^{32}P] pCp e submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida a 7,5%, com 1,2 mm de espessura e 25 cm de comprimento. A corrida eletroforética transcorreu durante a noite a 200V 48
- FIGURA 9. Comparação auto-radiográfica do perfil eletroforético entre duas amostras de CLV (1 e 2), com o perfil do SBR, evidenciando os segmentos genômicos RNAsfd 1, 2 e 3 do CLV (1 e 2). Os RNAsfd genômicos foram extraídos dos vírus purificados, marcados no terminal 3' com [5' - ^{32}P] pCp e submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida a 7,5%, com 1,2 mm de espessura e 45 cm de comprimento. A corrida eletroforética durou 45 h a 350V 49
- FIGURA 10. Hibridização recíproca RNA-RNA "dot blot" entre o GCV, CLV, HRV, SBR, LBS e SA11 (sondas). RNAsfd genômicos foram extraídos dos vírus purificados (GCV, CLV, HRV, SBR, LBS, GSV, CRV, TRV, SCR e SA11), desnaturados a 100 °C por 2 minutos e aplicados à Membrana de Hibridização (ONCOR). Cada sonda foi preparada através da marcação no terminal 3' com ^{32}P e hibridizada num "blot" contendo RNAs extraídos dos diferentes vírus. Todas as hibridizações foram obtidas sob condições de estringência média (hibridização a 52 °C, 50% formamida/ 6x SSC; lavagem a 62 °C, 0,1x SSC/ 0,1% SDS) 51

ÍNDICE DO ANEXO

8.1	Gel separador	75
8.2	Gel “stacking”	75
8.3	PBS	76
8.4	Solução de acrilamida e bisacrilamida a 30%.....	76
8.5	Solução estoque de SDS a 10%	76
8.6	Solução estoque 0,1x SSC / 0,1% SDS	77
8.7	Solução estoque 1x SSC / 0,1% SDS	77
8.8	Solução estoque (20x) de SSC	77
8.9	Solução estoque (5x) de tampão de corrida para SDS-PAGE	78
8.10	TE	78
8.11	Tris, 1,0 M	78
8.12	Tris-HCl, 1,0 M, pH 6,8.....	79
8.13	Tris-HCl, 1,0 M, pH 8,8.....	79

ABREVIATURAS

CHSE-214	“Chinook Salmon Embryo” - linhagem celular
CLV	“Geoduck clams aquareovirus”
CRV	“Channel catfish aquareovirus”
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNAc	Ácido Desoxirribonucleico clonado
ECP	Efeito citopático
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
EUA	Estados Unidos da América
GCV	“Grass carp aquareovirus”
GSV	“Golden shiner aquareovirus”
HRV	“Atlantic herring aquareovirus”
LBS	“Chinook salmon aquareovirus”
MMEE	Meio Mínimo Essencial de Eagle

nm	Nanômetros
pb	Pares de bases
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAfd	Ácido Ribonucléico fita dupla
RNAm	Ácido Ribonucléico mensageiro
RPC	República Popular da China
SA11	Rotavírus grupo A
SBR	“Striped bass aquareovirus”
SCR	“Chinook salmon aquareovirus”
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TRV	“Turbot aquareovirus”

RESUMO

A linhagem de células “Chinook Salmon Embryo” (CHSE-214) foi utilizada para a propagação dos vírus pesquisados nesta tese, GCV, CLV e HRV, assim como dos aquareovírus correspondentes aos genogrupos que não se encontravam previamente purificados no estoque laboratorial do Dr. Siba K. Samal. Esta etapa do trabalho, envolvendo a multiplicação destes vírus, viabilizou a análise da formação sincicial (ECP) característica do gênero *Aquareovirus*, da família *Reoviridae*.

Os produtos das purificações do GCV, CLV e HRV foram avaliados através da microscopia eletrônica de transmissão, por contrastação negativa, confirmando a morfologia desses espécimes como característica do gênero *Aquareovirus*.

A cepa SA11 (rotavírus grupo A) foi associada aos estudos do GCV, CLV e HRV, em conjunto com os seguintes aquareovírus representantes de cada genogrupo: SBR (genogrupo A), LBS (genogrupo B), GSV (genogrupo C), CRV (genogrupo D), TRV (genogrupo E) e SCR (genogrupo F), para a comparação entre estes aquareovírus e o rotavírus, em géis de eletroforese e técnicas de hibridização.

A relativa mobilidade dos 11 segmentos genômicos RNAfd dos vírus marcados no terminal 3' foi analisada através da eletroforese em gel de poliacrilamida. Este estudo revelou a semelhança eletroforética entre o CLV, o HRV e o SBR (genogrupo A) e a heterogeneidade entre o GCV e os demais vírus desta pesquisa.

A técnica de hibridização recíproca RNA-RNA "dot blot", sob condições de estringência média (pré-hibridização e hibridização a 52 °C, 50% formamida/ 6x SSC; lavagem a 62 °C, 0,1x SSC/ 0,1% SDS) viabilizou: a descoberta de um novo genogrupo dentro do gênero *Aquareovirus*, o genogrupo G, representado pelo GCV; a classificação do CLV e do HRV dentro do genogrupo A; a observação de uma relação genética entre o genogrupo A (SBR) e o B (LBS). A relação genética do rotavírus (SA11) com o GCV, CLV e o IIRV associada com os representantes dos genogrupos (A a F) foi também examinada através da hibridização recíproca RNA-RNA "dot blot", não tendo sido constatada qualquer associação genética do SA11 com os aquareovírus, sob estringência média.

SUMMARY

The Chinook Salmon Embryo cell line (CHSE-214) was used to propagate the viruses investigated in this thesis, GCV, CLV and HRV, as well as the aquareoviruses correspondents to the genogroups that were not found previously purified at Dr. Siba K. Samal laboratory stock. This step of the work, involving the growth of these viruses, made viable the analysis of the sincicial formation (CPE) characteristic of the genus *Aquareovirus*, in the family *Reoviridae*.

The products of the GCV, CLV and HRV purifications were evaluated by transmission electron microscopy negative staining, confirming the morphology of these specimens characteristic of the genus *Aquareovirus*.

The SA11 strain (group A rotavirus) was related to the studies of GCV, CLV and HRV, in association with the following aquareoviruses representatives of each genogroup: SBR (genogroup A), LBS (genogroup B), GSV (genogroup C), CRV (genogroup D), TRV (genogroup E) and SCR (genogroup F), for a comparison between the aquareoviruses and the rotavirus by gel eletrophoresis and hybridization techniques.

The relative mobility of the 11 dsRNA genomic segments of the viruses labeled at their 3' was analysed by polyacrylamide gel electrophoresis. This study revealed the electrophoretic similarity among CLV, HRV and SBR (genogroup A), and the heterogeneity among GCV and the others viruses from this research.

The reciprocal RNA-RNA dot blot hybridization technique, under medium stringency (prehybridization and hybridization at 52 °C, 50% formamide/ 6x SSC; wash at 62 °C, 0.1x SSC/ 0.1% SDS), permitted: the discovery of a new genogroup in the genus *Aquareovirus*, genogroup G, represented by GCV; the classification of CLV and HRV in the genogroup A; the observation of a genetic relationship between genogroup A (SBR) and genogroup B (LBS). The genetic relationship of the rotavirus SA11 with GCV, CLV and HRV, associated with the aquareoviruses representing the genogroups (A to F) was also examined by reciprocal RNA-RNA dot blot hybridization. No genetic association of the SA11 with the aquareoviruses was found under medium stringency.

1. INTRODUÇÃO

Historicamente, a Aquacultura data de 2000 a.C., na China, onde a incubação artificial e a criação de carpas tornaram-se atividades predominantes (AVAULT, 1987). Ao longo dos anos, esta atividade expandiu-se por diversos países do mundo, envolvendo a criação de um grande número de espécies de peixes, mariscos e crustáceos, tanto em água doce, quanto em água salgada. Atualmente, a produção global da Aquacultura representa 12% do total de peixes e mariscos consumidos, ou seja, 10 milhões de toneladas por ano (LUPIANI, 1994), sendo importante destacar que o continente asiático é o responsável por 85% da produção mundial relacionada à Aquacultura (AHNE, 1994). Para o ano 2000, estima-se um aumento no consumo mundial de peixes de aproximadamente 25% (KUBITZA, 1999).

A expansão da Aquacultura vem atendendo a um aumento da demanda populacional na busca por novas fontes de proteína, estando esta associada a uma produção com custos relativamente baixos (TRUST, 1986). Neste enfoque, o Brasil, que é um país de extenso litoral, apresentando uma diversidade de animais aquáticos, encontra-se também investindo na expansão da Aquacultura em seu território. Projetos de alta significado econômico e científico, como o Projeto Pacu e o Projeto Pintado (MT), visando a reprodução em cativeiro destas espécies, têm recebido milhões de reais em investimento por parte de grupos financiadores de grande porte. Atualmente, o consumo de peixes no Brasil encontra-se ao redor de 80.000 toneladas/ano, com um consumo médio *per capita* de 6

kg/ano. As perspectivas para 2010 envolvem um acréscimo deste consumo na ordem de 10 kg/ano por pessoa (KUBITZA, 1999). No entanto, para que este tipo de atividade preencha todas as exigências sanitárias, com níveis elevados de produção, há necessidade de se garantir a saúde dos animais envolvidos nesta criação, promovendo um controle de doenças infecciosas e parasitárias.

Características como a diversidade das espécies, assim como as criações em altas densidades, encontradas muitas vezes nas instalações de Aquacultura, são fatores que aumentam as chances da dispersão de agentes patogênicos, tais como: bactérias, parasitos e vírus. Estes últimos vêm assumindo uma posição de destaque no eixo internacional, principalmente no que se refere às perdas econômicas nas criações de peixes, caracterizadas pela redução na produção e na crescente mortandade.

No Brasil, similares perdas neste tipo de criação são encontradas, sem que nelas se tenham referências de análises virológicas. Além dos prejuízos econômicos, os riscos sanitários podem ser de diversas ordens, sendo agravados pela necessidade de estudos completos e bem definidos, que venham determinar a manifestação ou não de agentes virais nas espécies de animais envolvidos nos projetos de Aquacultura.

A preocupação com a rápida expansão da Aquacultura, permeando um comércio de exportações e importações de diversas espécies, muitas vezes não nativas aos locais de destino, vem sendo manifestada por vários países relacionados a esta atividade. Torna-se necessária total atenção às descobertas de novos patógenos, principalmente nas espécies que estão sendo importadas, para que as instalações receptoras sejam protegidas (LUPIANI, 1994).

Alguns países, entre eles os Estados Unidos da América, vêm promovendo diversas pesquisas no campo das viroses de peixes, crustáceos, moluscos e outro animais aquáticos, muitas vezes em associação com países europeus. No meio destes trabalhos, tem sido dado um maior enfoque ao gênero *Aquareovirus*, que representa a mais nova descoberta de importantes patógenos de animais aquáticos, classificados dentro da família *Reoviridae* (FRANCKI *et al.*, 1991).

Os aquareovírus têm sido isolados de uma grande variedade de peixes, moluscos e crustáceos. Apesar de muitos isolamentos terem sido feitos de animais aparentemente saudáveis, também existem aqueles que foram realizados a partir de peixes com sintomas de doenças hemorrágicas, hepatites e pancreatites (SUBRAMANIAN, 1997). Análises genéticas dos aquareovírus têm indicado a existência de uma grande variedade entre estes diferentes isolamentos. Um melhor conhecimento da biologia, genética e biologia molecular destes vírus, irá ajudar na compreensão da origem e do papel destes agentes patogênicos de animais aquáticos (LUPIANI *et al.*, 1995).

O impacto das pesquisas envolvendo os aquareovírus na indústria da Aquicultura, promoverá controles de doenças e o desenvolvimento de estratégias de vacinação, sendo trabalhos como estes incentivados por Universidades como a University of Maryland, E.U.A. Neste aspecto, o Brasil precisa ampliar as condições para o desenvolvimento de uma estrutura interna que passe a assimilar e produzir a tecnologia necessária para a implantação destes estudos no país. Tal realização, só será possível com o governo brasileiro apoiando os seus profissionais, capacitando-os a dialogarem e a interagirem com quem já domina esta tecnologia.

Visando justamente a dar início a este intercâmbio tecnológico entre o Brasil e países como os E.U.A., que vêm estabelecendo pesquisas no campo das Viroses de Animais Aquáticos, é que esta Tese de Mestrado foi elaborada e desenvolvida. Neste contexto, os objetivos que apóiam esta pesquisa baseiam-se nos seguintes tópicos:

- a) a introdução no País de novos conhecimentos científicos no campo das Viroses de Animais Aquáticos, mais especificamente os aquareovírus, viabilizando futuras pesquisas e aplicações tecnológicas que esclareçam as condições sanitárias das criações associadas à Aquicultura no Brasil;
- b) a familiarização dos procedimentos que envolvem o cultivo de células de peixes, assim como as técnicas de inoculação viral, purificação viral, extração do ácido nucleico das amostras purificadas, preparação de sondas e análises do RNA viral, através da aplicação da Eletroforese em gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) e da hibridização recíproca

RNA-RNA “dot blot”, visando à identificação dos aquareovirus e à classificação dos genogrupos das amostras virais aqui estudadas, dentro deste novo gênero;

- c) a interação com diversos profissionais e suas especialidades, enriquecendo este trabalho e viabilizando, como no caso da Microscopia Eletrônica, a visualização dos virus aqui pesquisados;
- d) a contribuição mútua entre países, como o Brasil, representado pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e os E. U.A., representados pela University of Maryland, na busca por novos estudos da variabilidade genética dos aquareovirus. Variabilidade esta investigada nesta tese, a partir da aplicação das técnicas de SDS-PAGE e de Hibridização recíproca RNA-RNA no estudo da relativa mobilidade dos 11 segmentos RNA fita dupla (RNAfd) do genoma de 9 cepas de aquareovirus, onde 6 cepas eram representantes de cada genogrupo (A a F) e 3 cepas correspondiam aos vírus a serem identificados e classificados, associando-os com 1 cepa de rotavírus. Tal fato possibilitou, além do alcance dos objetivos aqui mencionados, a descoberta de um novo genogrupo dentro do gênero *Aquareovirus*, o genogrupo G.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

O papel dos vírus como agentes infecciosos foi observado muito antes de ser reconhecida sua verdadeira natureza (DAVIS, 1980). Desde 1892, quando foram identificados pelo botânico russo Dimitri Ivanovski, na pesquisa da transmissão do mosaico do tabaco (doença contagiosa que ataca as folhas do fumo), os vírus se tornaram motivo permanente da discussão entre cientistas (SOARES, 1988). Ivanovski macerou, num prato, algumas plantas de tabaco doentes, recolheu a seiva e, após passar este material por um pano, conseguiu transmitir a doença a plantas saudáveis, administrando-lhes a seiva contaminada. Mesmo depois de um novo experimento, em que passou esta seiva por um filtro de porcelana que acreditava reter todos os microorganismos, constatou que o material ainda era infeccioso. No entanto, com base em teorias de pesquisadores como Louis Pasteur e Robert Koch, que atribuíram todas as doenças infecciosas aos “animálculos” de Leeuwenhoek, ou seja, às minúsculas criaturas que hoje em dia são conhecidas como bactérias, infelizmente Ivanovski presumiu que o mosaico do tabaco estivesse associado a uma infecção bacteriana (SCOTT, 1987).

Este caso, em particular, representa na realidade a falta de percepção do verdadeiro significado dos resultados obtidos nos experimentos, assim como a falta de um

espírito mais aberto a novas descobertas, pois, se Ivanovski prosseguisse as suas investigações, provavelmente verificaria que se tratava de um novo agente infeccioso, o vírus, podendo ser então lembrado como o único e indiscutível criador da Virologia. No entanto, o mérito da descoberta dos vírus é cada vez mais atribuído ao microbiólogo holandês Martinus Beijerinck, que procedeu às mesmas experiências que Ivanovski, com os mesmos resultados, mas que chegou a conclusões bem diferentes e que contribuíram para a História da Virologia (SCOTT, 1987).

O avanço das pesquisas foi marcado por cientistas como: os alemães Friedrich Loeffler e Paul Frosch, que além de descobrirem o agente infeccioso da Febre Aftosa, em 1898, também verificaram que este tinha particularidades semelhantes às do vírus do mosaico do tabaco; Ellerman e Bang, que, em 1908, descobriram a transmissão viral da leucose aviária, assim como Rous, em 1911, também constatou a transmissão viral de um sarcoma de galinha, ambas as pesquisas comprovando a capacidade dos vírus de produzirem tumores; Twort, na Inglaterra e D'Herelle, na França, que em pesquisas independentes descobriram os bacteriófagos, em 1917 (DAVIS, 1980); Knoll e Ruska, que, em 1932, inventaram o microscópio eletrônico, permitindo a observação das partículas virais; Enders, que, em 1949, desenvolveu a técnica de cultura de células, facilitando muito os estudos dos vírus (MOHANTY & DUTTA, 1981). Trabalhos como estes foram de grande importância para o desenvolvimento da Virologia como uma Ciência. Também contribuíram para a formação de novas gerações de cientistas que atualmente, ainda num mesmo espírito pioneiro dos seus antecessores, estão cada vez mais atuando em novos campos das viroses, como no caso das que estão relacionadas aos animais aquáticos.

Os estudos envolvendo os vírus de peixes possuem as referências mais antigas, datando de 1917, quando Weissenberg pesquisou as doenças linfocíticas e relacionou os vírus à causa da hipertrofia em células linfocíticas de peixes, dado este completamente comprovado somente 50 anos depois (WOLF, 1988). A continuidade destes estudos tem fornecido elementos para a classificação dos vírus de peixes em 12 famílias, onde a maioria destes agentes afetam vertebrados superiores (LUPIANI, 1994) (Tabela 1). No entanto, com os avanços dos trabalhos científicos abordando não só os peixes, mas

também outros animais aquáticos, principalmente por causa da diversificação nas criações no campo da Aquacultura, o que se verifica é que desde 1975 tem ocorrido um aumento no número de vírus descritos em animais aquáticos (HETRICK et al., 1992; HETRICK & HEDKICK, 1993). Nestes estudos, o interesse dos cientistas está sendo voltado para os vírus classificados dentro da família *Reoviridae* devido ao fato de que pouco ainda se sabe da biologia molecular destes e do papel como patógenos na Aquacultura (LUPIANI, 1994; SUBRAMANIAN, 1997).

2.2 Família *Reoviridae*

Membros da família *Reoviridae* têm sido isolados de mamíferos, aves, peixes, mariscos, crustáceos, insetos e plantas. Vírions, representantes desta família, apresentam: um diâmetro de 60-80 nm; simetria icosaédrica; uma série de camadas protéicas externas, assim como uma interna conhecida por core; não apresentam um envelope lipídico; peso molecular de aproximadamente 120×10^6 daltons. O genoma é composto por 10-12 segmentos de RNA fita dupla (RNAfd) e devido a esta natureza segmentada do genoma, membros desta família sofrem uma eficiente recombinação através de um rearranjo genético. No que se refere à replicação viral, esta ocorre no citoplasma, onde viroplasmas têm sido observados (LUPIANI et al., 1995).

Atualmente, a família *Reoviridae* contém oito diferentes gêneros e um grupo de reovírus de plantas ainda não classificado (FRANCKI et al., 1991) (Tabela 2). Os reovírus são classificados dentro de seus específicos gêneros de acordo com determinadas características, tais como: hospedeiro, número de segmentos do genoma e similaridades sorológica e molecular (LUPIANI, 1994; SUBRAMANIAN, 1997).

Tabela 1. Vírus de peixes classificados em famílias.

DNA

Herpesviridae

Channel catfish virus (CCV)
 Herpesvirus salmonis
 Oncorhynchus masou virus

Adenoviridae

Atlantic cod adenovirus

Iridoviridae

Lymphocystis virus
 Epizootic hematopoietic necrosis virus (EHNV)
 Eel iridovirus
 White sturgeon iridovirus
 Erythrocytic necrosis virus (ENV)

RNA

Rhabdoviridae

Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)
 Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV)
 Spring viremia of carp (SVCV)
 Hiramé rhabdovirus

Purumyxoviridae

Chinook salmon paramyxovirus
 Black sea bream paramyxovirus

Orthomyxoviridae

Eel orthomyxovirus-like agent

Birnaviridae

Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)

Reoviridae

Aquareoviruses

Retroviridae

Dermal sarcoma of walleye
 Lymphosarcoma of northern pike
 Swimbladder fibrosarcoma of Atlantic salmon

Picornaviridae

Barramundi picornavirus

Caliciviridae

Opaleye calicivirus

Coronaviridae

Common carp coronavirus

Adaptado de LUPIANI, 1994.

Tabela 2. Gêneros que compõem a família *Reoviridae* e suas características

GÊNERO	HOSPEDEIRO	SEGMENTOS GENÔMICOS
<i>Orthoreovirus</i>	Somente vertebrados	10
<i>Orbivirus</i>	Artrópodes e vertebrados	10
<i>Coltivirus</i>	Carrapatos, mosquitos e vertebrados	12
<i>Rotavirus</i>	Mamíferos e aves	11
<i>Aquareovirus</i>	Peixes e mariscos	11
<i>Cyporeovirus</i>	Insetos e crustáceos	10
<i>Phytoreovirus</i>	Plantas	12
<i>Fijivirus</i>	<i>Gramineae</i> e insetos	10
Reovírus de planta subgrupo 3	<i>Gramineae</i> e insetos	10

Adaptado de SUBRAMANIAN, 1997.

2.3 Características Gerais dos Aquareovírus

Durante a última década, inúmeros vírus pertencentes à família *Reoviridae* tem sido isolados de uma grande variedade de animais aquáticos, incluindo moluscos e crustáceos, assim como de diferentes áreas geográficas (LUPIANI *et al.*, 1995). Estes agentes, algumas vezes são isolados de animais aparentemente sadios submetidos a exames

de rotina (HETRICK et al, 1992) Os vírus são éter e clorofórmio-resistentes, possuem um diâmetro de 70-75 nm e um capsídeo com dupla camada, contendo um genoma composto por 11 segmentos de RNAfd. Quando propagado em linhagens de células de peixes, forma áreas de placas ou de sincício, como em um típico efeito citopático (WINTON et al., 1987, WINTON, 1989, SAMAL et al., 1991). Apesar de estes vírus possuírem algumas características que se assemelham as do gênero Rotavirus e Orthoreovirus, foram classificados dentro de um novo gênero, *Aquareovirus*, da família *Reoviridae* (FRANCKI et al, 1991). Esta nova classificação foi baseada no hospedeiro (peixe, molusco e crustáceo), na temperatura ideal de crescimento (entre 15 °C e 26 °C), na mobilidade eletroforética do RNA, na ausência de reações cruzadas com outros reovírus através de estudos de hibridização cruzada RNA-RNA e em resultados obtidos nos testes sorológicos (LUPIANI et al., 1995).

O primeiro aquareovírus descrito, o “golden shiner aquareovirus” (GSV), foi isolado em 1977 de uma criação de “golden shiner” (*Notemigonus crysoleucas*) no Arkansas, EUA (PLUMB et al., 1979). Em 1979, MEYERS reportou o isolamento do “American oyster aquareovirus” (13p2), realizado em 1977 de uma criação de “American oyster” (*Crassostrea virginica*) em Long Island, Nova York, EUA. O terceiro vírus deste gênero foi isolado em 1978 do “chum salmon” (*Oncorhynchus keta*), durante um exame de rotina aplicado em peixes (WINTON et al., 1981) e foi denominado “chum salmon aquareovirus” (CSV) Já em 1984, AMEND et al., comunicaram o isolamento do “channel catfish aquareovirus” (CRV), encontrado em populações de “channel catfish” (*Ictalurus punctatus*) de duas fazendas no sul da Califórnia, EUA Desde o isolamento destes quatro vírus, diversos vírus têm sido classificados dentro do gênero Aquareovirus (HETRICK et al., 1992) Apesar de a maioria destes vírus ter sido isolada de peixes aparentemente saudáveis, há casos como o do “grass carp aquareovirus” e do “black carp aquareovirus”, isolados por CHEN & JIANG (1984), que, na década de 70, na República Popular da China (RPC), causaram uma severa doença hemorrágica em 80% das populações de “grass carp” (*Ctenopharyngodon idella*) e “black carp” (*Mylodon nelsoni*).

Diante destes fatos, a atenção dos cientistas está-se voltando para estudos envolvendo os aquareovírus, refletindo com isso a necessidade de se conhecer melhor estes vírus. Estas pesquisas possibilitarão a compreensão da origem e do papel destes agentes como patógenos para os animais aquáticos.

2.4 Distribuição dos Aquareovírus

A maioria dos aquareovírus descritos até o presente momento foram isolados de peixes aparentemente saudáveis, durante exames laboratoriais de rotina (MEXERS, 1979; WINTON et al., 1981; AHNE & KOLBL, 1987; WINTON et al., 1989a; SAMAL et al., 1991). No entanto, alguns destes vírus foram isolados de peixes que também estavam infectados por bactérias (LUPIANI et al., 1989; BAYA et al., 1990) ou de populações de peixes que sofriam de forma crônica, apresentando altos índices de mortalidade (PLUMB et al., 1979; AMEND et al., 1984; CHEN & JIANG, 1984; HSU et al., 1989; MARSHALL et al., 1990; JIANG et al., 1991; VARNER & LEWIS, 1991) (Tabela 3).

Outros “reo-like” vírus têm sido descritos em diferentes populações de crustáceos com problemas de mortalidade (MARI & BONAMI, 1988; NASH & SHARIFF, 1988), sem que tenham sido isolados em linhagens de células. Tal fato caracteriza a falta de esclarecimentos quanto a inclusão destes dentro do gênero *Aquareovirus* (LUPIANI et al., 1995).

Tabela 3. Lista dos aquareovírus isolados de peixes e moluscos até a presente data.

VÍRUS	PEIXES E MOLUSCOS	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	REFERÊNCIA
Golden shiner (GSV)	<i>Notemigonus crysoleucas</i>	Arcansas, EUA	Plumb <i>et al.</i> , 1979
American oyster (13p2)	<i>Crassostrea virginica</i>	Nova York, EUA	Meyers, 1979
Chum salmon (CSV)	<i>Oncorhynchus keta</i>	Hokkaido, Japão	Winton <i>et al.</i> , 1981
Pacific oyster	<i>Crassostrea gigas</i>	Japão	Nagabayaski & Mori, 1983
Channel catfish (CRV)	<i>Ictalurus punctatus</i>	Califórnia	Amend <i>et al.</i> , 1984
Grass carp	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	China	Chen & Jiang, 1984
Tench	<i>Tinca tinca</i>	Alemanha	Ahne & Kölbl, 1987
Chub	<i>Leuciscus cephalus</i>	Alemanha	Ahne & Kölbl, 1987
Fancy carp	<i>Cyprinus carpio</i>	Japão	Sano & Fukuda, 1987
Japanese eel	<i>Anguilla japonica</i>	Japão	Sano & Fukuda, 1987
Hard clam	<i>Meretrix lusoria</i>	Taiwan	Hsu <i>et al.</i> , 1988
Masou salmon	<i>Oncorhynchus masou</i>	Japão	Yoshimizu <i>et al.</i> , 1988
Turbot (TRV)	<i>Scophthalmus maximus</i>	Galicia, Espanha	Lupiani <i>et al.</i> , 1989
Coho salmon (CSR)	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Oregon, EUA	Winton <i>et al.</i> , 1989 ^a
Coho salmon (ELC)	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Oregon, EUA	Winton <i>et al.</i> , 1989a
Chinook salmon (YRC)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Oregon, EUA	Winton <i>et al.</i> , 1989
Landlocked salmon (LSV)	<i>Oncorhynchus masou</i>	Taiwan	Hsu <i>et al.</i> , 1989
Black carp	<i>Mylopharyngodon piceus</i>	China	Jiang & Ahne, 1989
Striped bass (SBR)	<i>Morone saxatilis</i>	Maryland, EUA	Baya <i>et al.</i> , 1990
Smelt (SRV)	<i>Osmerus mordax</i>	New Brunswick, Canada	Marshall <i>et al.</i> , 1990
Atlantic salmon (HBR)	<i>Salmo salar</i>	Costa Atlântica, EUA	Samal <i>et al.</i> , 1991
Atlantic salmon (ASV)	<i>Salmo salar</i>	Canada	Samal <i>et al.</i> , 1991
Angelfish (AFR)	<i>Pomacanthus semicirculatus</i>	Texas, EUA	Varner & Lewis, 1991
Common carp	<i>Cyprinus carpio</i>	China	Jiang <i>et al.</i> , 1991
Grouper	<i>Plectropomus maculatus</i>	Singapura	Chew-lim <i>et al.</i> , 1992
Chinook salmon (DRC)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Washington, EUA	Lupiani, 1994
Coho salmon (SCS)	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Washington, EUA	Lupiani, 1994
Chinook salmon (LBS)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Washington, EUA	Lupiani, 1994
Chinook salmon (GRC)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Washington, EUA	Lupiani, 1994
Atlantic salmon (TSV)	<i>Salmo salar</i>	Tasmânia, Austrália	Lupiani, 1994
Chinook salmon (ICR)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Califórnia, EUA	Lupiani, 1994
Gilthead seabream (SBA)	<i>Sparus aurata</i>	Galicia, Espanha	Bandin <i>et al.</i> , 1995
Chinook salmon (WIR)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Washington, EUA	Subramanian, 1997
Chinook salmon (DRV)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Washington, EUA	Subramanian, 1997
Coho salmon (SSR)	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Washington, EUA	Subramanian, 1997
Chinook salmon (ISR)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Washington, EUA	Subramanian, 1997
Chinook salmon (LBR)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Washington, EUA	Subramanian, 1997
Chinook salmon (FCR)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Washington, EUA	Subramanian, 1997
Chinook salmon (WAR)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Washington, EUA	Subramanian, 1997
Chinook salmon (CCR)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Washington, EUA	Subramanian, 1997
Chinook salmon (HHR)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Washington, EUA	Subramanian, 1997
Atlantic salmon (ASR)	<i>Salmo salar</i>	Virginia Oeste, EUA	Subramanian, 1997
Chum salmon (PSR)	<i>Oncorhynchus keta</i>	Washington, EUA	Subramanian, 1997
Chinook salmon (SCR)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Alasca, EUA	Subramanian, 1997
Chinook salmon (IRV)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Washington, EUA	Subramanian, 1997
Chinook salmon (KPR)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Washington, EUA	Subramanian, 1997
Chinook salmon (MDR)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Washington, EUA	Subramanian, 1997
Chinook salmon (SOR)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Washington, EUA	Subramanian, 1997
Chinook salmon (HCR)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Washington, EUA	Subramanian, 1997
Guppy (GRC)	<i>Poecilia reticulata</i>	Singapura	Subramanian, 1997
Chinook salmon (ERV)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Washington, EUA	Subramanian, 1997
Chinook salmon (LCR)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Washington, EUA	Subramanian, 1997
Chinook salmon (NCR)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Dakota do Norte, EUA	Subramanian, 1997
Smelt (SRV)	<i>Osmerus mordax</i>	Virginia Oeste, EUA	Subramanian, 1997

Adaptado de LUPIANI, 1994; SUBRAMANIAN, 1997.

2.5 Patogenicidade e Infecção Experimental dos Aquareovírus

O desenvolvimento dos estudos envolvendo os aquareovírus vem sendo marcado por algumas pesquisas que visam a avaliação do potencial patogênico destes agentes. Os resultados destes trabalhos têm demonstrado que a patogenicidade varia de acordo com cepas dos aquareovírus e que a idade e as espécies de peixes infectados também são importantes nesta análise (LUPIANI et al., 1995).

MEYERS, em 1980, descreveu a infecção experimental da “American oyster” (*Crassostrea virginica*) e do “bluegill” (*Lepomis macrochirus*) “fingerlings” com 13p2 aquareovírus que foi isolado do “American oyster”. A exposição das ostras a água contendo 13p2 não resultou em mortalidade significativa, assim como não ocorreu nem aumento na titulação viral, nem lesões histopatológicas durante um período de 45 dias pós-inoculação. No entanto, no caso do “bluegill”, em que se realizou a inoculação intraperitoneal do 13p2, os resultados demonstraram um índice de 44% de mortalidade que foi associado a uma hepatite multifocal difusa. Em adição a estes estudos envolvendo o 13p2, foi feita a análise deste aquareovírus quanto a patogenicidade em “rainbow trout” (*Oncorhynchus mykiss*), que apesar de não ter causado mortalidade produziu uma doença subclínica em 56% dos adultos e em 65% dos “fingerlings”. Ocorreu também um aumento da titulação viral, produção de anticorpos neutralizantes e hepatite granulomatosa reticuloendotelial multifocal (MEYERS, 1983). Outras pesquisas com 13p2 envolveram a inoculação em “golden shiner” (*Notemigonus crysoleucas*) e apresentaram núcleos picnóticos no fígado, assim como lesões no baço (BRADY & PLUMB, 1991).

No caso do “channel catfish aquareovirus” (CRV), a infecção experimental deste vírus no “channel catfish” (*Pseudocatharus*) indicou que pode replicar por períodos extensos, mas com baixa virulência (AMEND et al., 1984).

O “golden shiner aquareovirus” (GSV) apresentou uma patogenicidade média no hospedeiro natural “golden shiner” (*Notemigonus crysoleucas*), em estudos realizados por BRADY & PLUMB (1991). Em outras análises do GSV, este vírus foi

utilizado para inoculação no “grass carp” (*Ctenopharyngodon idella*) não havendo casos de mortalidade e nem lesões histológicas (HEDRICK et al., 1989).

A infecção experimental do “chum salmon aquareovirus”(CSV) em “rainbow trout”, “chum salmon” (*Oncorhynchus keta*), “chinook salmon” (*Oncorhynchus tshawytscha*) “konkanee salmon” (*Oncorhynchus nerka*) , reportada por WINTON et al., (1989b), não causou mortalidade significativa, sendo que aqueles que morreram não apresentaram lesões internas ou externas. Histologicamente, foi observada no “chum” e “chinook salmon” uma hepatite focal necrosante. Estudos mais recentes, realizados por LAPATRA & HEDRICK (1995), mostraram que o CSV era patogênico para “rainbow trout”. Num primeiro experimento, foram observadas exoftalmia e distensão abdominal. Análises histológicas mostraram a presença de uma severa necrose multifocal no fígado, sem afetar o rim. No segundo experimento, assim como no terceiro, houve um índice de 14% de mortalidade. O último experimento apresentou necrose difusa do endotélio dos sinusóides do rim e depleção de células hematopoiéticas, detectada durante os períodos mais severos da hepatonecrose. A recuperação destes animais foi gradual.

Estudos semelhantes foram realizados utilizando “rainbow trout” e “coho salmon” (*Oncorhynchus kisutch*) para análises da patogenicidade do “coho salmon aquareovirus” (CSR) (WINTON et al., 1989b). Apesar de não terem ocorrido problemas de mortalidade durante o experimento, foi detectada hepatite necrosante focal 3 semanas pós-inoculação e estas lesões permaneceram até 11ª semana.

Outro trabalho buscando a compreensão do grau de patogenicidade que envolve os aquareovírus foi o realizado por JIANG & AHNE, em 1989, onde o “grass carp aquareovirus” e o “black carp aquareovirus” foram analisados nos peixes “grass carp” (*Ctenopharyngodon idella*) e “black carp” (*Melopharyngodon dybowskyi*). Ambas as espécies de carpas inoculadas com estes vírus apresentaram sinais típicos da doença hemorrágica que, desde a década de 70, vinha causando problemas nas criações de carpas na República Popular da China (RPC) (CHEN & JIANG, 1984). Experimentalmente, o “grass carp aquareovirus” produziu 80% de mortalidade em ambas as espécies de carpas, sendo que no caso do “black carp aquareovirus”, houve 67% e 95% de mortalidade em “grass carp” e

“black carp”, respectivamente. Devido a dispersão desta doença na China, causando severas perdas econômicas, uma vacina inativada de tecidos infectados (fígado, baço e rins) foi testada. Esta vacina injetável, induziu a uma boa resposta imune, tendo sido testada por alguns criadores de carpas que informaram que mais de 70% dos “fingerlings” ficaram protegidos (GAO, 1979) Em outras análises, os aquareovírus isolados da “common carp” (*Cyprinus carpio*) mostraram ser avirulentos a “common carp”, “bighead carp” e “silver carp” (JIANG et al., 1991).

A patogenicidade dos aquareovírus isolados do “tench” (*Tinca tinca*) do “chub” (*Leuciscus cephalus*) foi estudada em “common carp”, “roach” (*Rutilus rutilus*) “redfin” (*Scardinius erythrophthalmus*) Nenhum dos peixes mostrou qualquer sinal de doença e os vírus não foram reisolados (AHNE & KOLBL, 1989).

VARNER & LEWIS (1991) reportaram que “angelfish” marinhos sadios (*Pomacanthus semicirculatus*) expostos ao “angelfish aquareovirus” (AFR) desenvolveram lesões similares aquelas associadas com síndrome de erosão da linha lateral e cabeça (HLLE syndrome). No entanto, a inoculação intraperitoneal do “angelfish” com AFR não resultou em qualquer lesão externa, interna ou histopatológica.

CHEW-LIM et al. (1991) descreveram a infecção experimental do “red grouper” (*Heterostichus rostratus*) e do “greasy grouper” (*Epinephelus tauvina*) com o “grouper aquareovirus”. Nenhuma mortalidade foi constatada, o peixe permaneceu sadio durante o experimento e o vírus foi isolado de ambas as espécies no 4º, 7º e 14º dias pós-inoculação. No 70º dia, nenhum vírus foi reisolado de quaisquer dos órgãos.

Recentemente, RIVAS et al (1995) relataram infecção experimental em “rainbow trout” (*Oncorhynchus mykiss*) e “turbot” (*Scophthalmus maximus*) com “turbot aquareovirus” (TRV). Nenhuma truta (“rainbow trout”) morreu durante o experimento, assim como também não foram observadas lesões externas. Os resultados indicaram que o vírus se disseminou rapidamente pelo animal infectado, tendo sido reisolado de diferentes órgãos (fígado, rins, baço, intestino, cérebro e guelras) até 15 dias pós-inoculação. Entretanto, nenhum vírus foi detectado 20 dias pós-inoculação. No caso do “turbot”, o TRV pôde ser detectado na maioria dos tecidos, onde replicou em baixos níveis. Além disso, a

infecção experimental do “turbot” sob condições estressantes e/ou infecção simultânea com uma bactéria aumentou a replicação do TRV nos tecidos do peixe e fez com que o vírus passasse a ser secretado mais eficientemente.

A infecção experimental do “striped bass” (*Morone saxatilis*) com “striped bass aquareovirus” (SBR) não resultou em mortalidade ou sinais clínicos da doença. No entanto, o vírus pôde ser encontrado em órgãos internos até 3 meses pós-inoculação (HETRICK & BAYA, comunicação pessoal, 1997).

Alguns aquareovírus estão associados a casos de animais aparentemente saudáveis e que revelaram numa análise post-mortem, lesões patológicas em diferentes órgãos. Tal fato denota uma infecção clínica inaparente que pode estar associada a uma resistência do hospedeiro ao vírus ou a um ambiente estressante, resultando, com o tempo, na morte dos peixes. A continuidade deste processo levará ao retardo do crescimento do animal, afetando a produção (LUPIANI, 1994). Torna-se necessário incentivar estes estudos, visando a futuras aplicações de estratégias de diagnóstico e controle.

2.6 Caracterização Sorológica dos Aquareovírus

Os testes sorológicos são baseados na reação entre antígenos e anticorpos, sendo utilizados tanto para detectar anticorpos ou para detectar antígenos (VERSTEEG, 1985). Na Virologia, as reações sorológicas são aplicadas para exames das seguintes questões: diagnóstico de viroses, ou seja, identificação do vírus, inclusive quando o isolamento deste agente não é mais possível; divisão dos vírus em grupos, ou seja, pesquisa de um relacionamento antigênico entre diferentes vírus; comprovação dos diferentes componentes da partícula vírica; comprovação de proteína não-viral em preparações de vírus (purificação); determinação do estado de imunidade do animal (MAYR & GUERREIRO, 1981).

Existem várias técnicas sorológicas disponíveis (Tabela 4), sendo que algumas são mais apropriadas a determinadas famílias de vírus. Cada laboratório faz a sua escolha do procedimento mais favorável e que será utilizado seguindo certas considerações:

sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, rapidez, conveniência e custo (FENNER *et al.*, 1987a).

Tabela 4. Principais Procedimentos Sorológicos utilizados no Diagnóstico Viroológico.

TÉCNICA	PRINCÍPIO
Neutralização Viral	Anticorpo neutraliza a infectividade do vírus; inibe citopatologia, reduz placas ou protege animais.
Inibição da hemaglutinação	Anticorpo inibe hemaglutinação viral.
Fixação de Complemento	Complexo antígeno-anticorpo se liga ao complemento, que a partir deste momento fica inviável para a lise das hemácias de carneiro hemólise-sensibilizadas.
Microscopia Imunoeletrônica	Agregados de virions e de anticorpos são visíveis através da microscopia eletrônica.
Imunofluorescência	Anticorpo marcado com fluorocromo se liga ao antígeno intracelular; fluoresce por Microscopia Ultrafluorescente (UV).
Imunoperoxidase	Anticorpo marcado por peroxidase se liga ao antígeno intracelular; o precipitado colorido forma-se com a adição de substrato.
Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	Anticorpo enzimático marcado (ou antígeno) se liga ao antígeno (ou anticorpo); substrato muda de cor.
Radioimunoensaio	Anticorpo radioativamente marcado (ou antígeno) se liga ao antígeno (ou anticorpo), e.g., ligado à fase sólida.
Imunodifusão	Anticorpos e antígenos solúveis produzem linhas visíveis de precipitado no gel.

Adaptado de FENNER *et al.*, 1987a.

Uma série de estudos têm sido relatados na literatura, onde testes de sorologia-cruzada estão sendo feitos usando anti-soro gerado contra um dos agentes. No caso dos vírus dos animais aquáticos, HEDRICK et al (1984), compararam CRV, GSV e CSV utilizando testes de neutralização-cruzada e constataram que o CRV era claramente distinto dos outros dois vírus. Baixos níveis de neutralização-cruzada entre os três agentes, indicaram que estes vírus compartilham alguns antígenos em comum. Entretanto, estes vírus podem ser considerados 3 sorotipos diferentes entre os aquareovírus. Por outro lado, BRADY & PLUMB (1988) estudaram a relação antigênica entre 13p2, GSV, CRV e CSV, utilizando neutralização-cruzada. Constataram que 13p2, GSV e CSV tinham relação entre si e o CRV estava relacionado ao GSV, mas não aos outros dois vírus.

AHNE & KOLBL (1987) produziram anti-soro contra o “tench aquareovirus”, isolado do “tench” (*Tinca tinca*) que neutralizou tanto o “tench aquareovirus” como o “chub aquareovirus”, isolado do “chub” (*Leuciscus cephalus*), numa mesma titulação, enquanto os títulos correspondentes a neutralização para o GSV e o CSV foram menores e nenhuma neutralização do CRV foi detectada. WINTON (1989b) demonstrou que o “coho salmon aquareovirus” (CSR), isolado do “coho salmon” (*Oncorhynchus kisutch*) era antigenicamente distinto do CSV, pois o anti-soro para CSV não neutralizou o CSR.

A relação antigênica entre: o “striped bass aquareovirus” (SBR), isolado do “striped bass” (*Morone saxatilis*), HBR e o ASV, isolados do “Atlantic salmon” (*Salmo salar*); o “smelt aquareovirus” (SRV), isolado do “smelt” (*Osmerus mordax*) e o “turbot aquareovirus” (TRV), isolado do “turbot” (*Scophthalmus maximus*) mostrou mais um tanto alto grau de neutralização-cruzada entre SBR, HBR, ASV e SRV tão menos do que com TRV. Resultados similares foram obtidos através de ensaios cruzados de “immunodot”, mas não por “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” cruzados (ELISA) (DOPAZO et al., 1992)

A relação antigênica dos aquareovírus com outros vírus também tem sido estudada. Estudos de neutralização do 13p2 (MEYERS, 1979), GSV (SCHWEDLER & PLUMB, 1980), CSV (WINTON et al., 1981) e TRV (LUPIANI et al., 1989) com o anti-

soro do vírus da infecção pancreática necrosante (IPNV) indicaram que estes vírus não possuíam relação. Similarmente, testes de neutralização e imunofluorescência do CRV com o “channel catfish herpesvírus” não indicaram relação entre estes dois vírus (AMEND et al., 1984). Além disso, teste de neutralização do 13p2 com antissoro específico para o reovírus de felino tipo 3 e o reovírus de canino tipo 1 não indicaram relação antigênica. Outros trabalhos, envolvendo análises com imunoprecipitação cruzada e imunofluorescência cruzada do SBR e SA11 (rotavírus de símio), não indicaram relação antigênica entre estes dois vírus (SAMAL et al., 1990).

2.7 Caracterização Molecular dos Aquareovírus

A relativa mobilidade dos segmentos RNAfd dos membros da família *Reoviridae* em eletroforese em gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) tem sido usada para distinguir cepas virais (RAMIG et al., 1977; HRDY et al., 1979; RODGER & HOLMES, 1979; ESPEJO et al., 1980; RODGER et al., 1981), sendo também uma ferramenta útil para os estudos da epidemiologia molecular destes vírus (ESTES et al., 1984). Portanto, a caracterização inicial, no nível molecular, da maioria dos aquareovírus foi limitada ao estudo e comparação dos eletroferotipos dos diferentes isolamentos (LUPIANI et al., 1995).

O primeiro aquareovírus caracterizado foi o CSV (WINTON et al., 1983). Através de análises do genoma do CSV, aplicando SDS-PAGE, foi constatado um genoma com 11 segmentos de RNAfd, assim como em outras pesquisas que utilizaram a mesma técnica, foi feita a identificação das proteínas estruturais deste vírus. Estudos similares, envolveram o genoma do CRV (HEDRICK et al., 1984) que também apresentou 11 segmentos de RNAfd. Além disso, WINTON et al., (1987) realizaram a primeira comparação molecular entre aquareovírus, onde RNA e modelos protéicos do GSV, CRV, CSV e 13p2 foram comparados lado a lado usando SDS-PAGE. Os 4 vírus apresentaram

um genoma composto por 11 segmentos de RNAfd, onde cada um indicou um único eletroferotipo.

AHNE & KÖLBL, em 1987, compararam o eletroferotipo do "tench aquareovirus" e do "chub aquareovirus" com o do GSV e do CSV. SDS-PAGE mostrou 11 segmentos de RNAfd com um modelo eletroforetico único. No entanto, o eletroferotipo do "tench aquareovirus" demonstrou uma semelhança maior com o do GSV do que com o do CSV, enquanto o eletroferotipo do "chub aquareovirus" apresentou uma semelhança maior com o do CSV do que com o do GSV.

A aplicação do SDS-PAGE para análises do RNA do "grass carp aquareovirus" e do "black carp aquareovirus" revelou a presença de 11 segmentos do RNAfd (JIANG & AHNE, 1989). Contudo, a relativa mobilidade do material genético destes vírus no gel não foi comparada com a dos outros aquareovírus.

WINTON et al. (1989a) estudaram a mobilidade eletroforética dos segmentos do RNA de dois vírus isolados do "coho salmon", através do SDS-PAGE. O genoma dos dois vírus apresentou 11 segmentos RNAfd com similares, mas eletroferotipos não idênticos.

Outros estudos utilizando SDS-PAGE procuraram analisar os seguintes aspectos: a mobilidade eletroforética do "landlocked salmon aquareovirus" (LSV), isolado do "landlocked salmon" (*Oncorhynchus nasau*) comparando com a de outros aquareovírus e constatando que o genoma do LSV é composto por 11 segmentos RNAfd, com uma relativa mobilidade diferente da apresentada pelos vírus CSV, GSV e CRV (HSU et al., 1989); a natureza do genoma do "smelt aquareovirus" (SRV), isolado do "landlocked rainbow smelt" (*Osmerus mordax*), associando esta análise ao uso do marcador ³H-uridina, onde os RNAs genômicos mostraram ser fita dupla devido a resistência ao tratamento com RNase I (MARSHALL et al., 1990); as proteínas virais do SBR, ASV e TRV, onde cada vírus apresentou 5 proteínas estruturais (SAMAL et al., 1991).

SAMAL et al. (1990) realizaram um dos estudos mais completos sobre a caracterização do SBR. A eletroforese do RNA marcado com [³H] undina indicou a presença de 11 segmentos. Além disso, este vírus apresentou resistência ao tratamento com

RNase A sob alta concentração de sal e sensibilidade sob baixas condições de sal, demonstrando que os 11 segmentos eram RNAfd. Proteínas do SBR, SA11 e reovírus tipo 1 também foram examinadas através do SDS-PAGE, indicando que o SBR possui 5 proteínas estruturais. Associando-se a estes estudos, SUBRAMANIAN et al. (1994) determinaram a distribuição do código genético e dos polipeptídeos do SBR, onde foram identificados 12 proteínas, sendo 7 estruturais (VP1 a VP7) e 5 não-estruturais (NS97, NS39, NS29, NS28 e NS15).

2.8 Caracterização Genética dos Aquareovírus

Muito pouco ainda se sabe a respeito da relação genética entre os aquareovírus ou entre estes e outros membros da família *Reoviridae* (LUPIANI, 1994), apesar do empenho de alguns cientistas em obterem estas respostas através de suas pesquisas. Diante disto, é importante notar que apesar de a diversidade genética entre os aquareovírus isolados ser indicada pelo polimorfismo dos modelos eletroforéticos, a extensão da relação entre os isolamentos não pode ser determinada usando SDS-PAGE (WALKER et al., 1980, FLORES et al., 1982). A comparação mais direta da sequência nucleotídica, pode ser obtida testando a habilidade individual dos segmentos genômicos através da hibridização de uns com os outros. Portanto, pesquisas envolvendo a hibridização recíproca RNA-RNA têm mostrado grande utilidade nos estudos da relação genética entre cepas de rotavírus (FLORES et al., 1982, NAKAGOMI & NAKAGOMI, 1989, NAKAGOMI et al., 1989), orbivírus (BODKIN & KNUDSON, 1986, KOWALIK & LI, 1987) e reovírus (BODKIN & KNUDSON, 1985a).

SAMAL et al (1990) investigaram pela primeira vez a relação genética entre um aquareovírus (SBR) e outros membros da família *Reoviridae* (reovírus tipo 1 e SA11 rotavírus de símio), através da hibridização recíproca RNA-RNA “dot blot”. A hibridização foi realizada a 52 °C com formamida a 50% e a 15%. Em ambos os casos, cada

vírus sornente hibridizou com o próprio e não com o RNA dos outros dois vírus, não indicando nenhuma relação genética entre o SBR e o reovírus tipo 1 ou SA11 (rotavírus grupo A de mamífero).

Usando a hibridização recíproca RNA-RNA "dot blot" sob condições de estringência alta (pré-hibridização e hibridização a 52 °C; lavagem a 72 °C), média (pré-hibridização e hibridização a 52 °C; lavagem a 62 °C) e baixa (pré-hibridização e hibridização a 42 °C; lavagem a 52 °C), 6 diferentes grupos genéticos (genogrupos) foram estabelecidos (designados A a F) entre os 42 aquareovírus isolados (LUPIANI et al., 1993a; SUBRAMANIAN, 1997). O genogrupo A foi representado por 18 destes vírus, o genogrupo B por 19, os genogrupos C, D e E por 1, cada um e o genogrupo F por 2 (Tabela 5). Nenhuma relação genética foi observada entre estes aquareovírus e os rotavírus de mamífero dos grupos A e C. A maioria dos vírus isolados hibridizou tanto com o genogrupo A, quanto com o B e a hibridização RNA-RNA entre os genogrupos A e B mostrou que o segmento 10 do genoma, o qual codifica a principal proteína do capsídeo externo, era o gene mais variável.

2.9 Diagnóstico da Infecção causada por Aquareovírus

O papel dos aquareovírus como patógenos para seus hospedeiros naturais ainda é pouco conhecido. Sendo assim, a melhor medida de controle adotada contra as infecções causadas por estes vírus é aquela que envolve um trabalho de prevenção, onde o objetivo é não facilitar a introdução do vírus nas culturas de peixes e de outros animais aquáticos. Este controle pode ser feito através do exame dos estoques de ovos, na busca pela presença de vírus, removendo os contaminados e inviabilizando a chance dos ovos e dos peixes de se tornarem um veículo de dispersão do vírus, quando forem transferidos para outros criadouros. No entanto, para que estes testes sejam eficazes no diagnóstico, há necessidade de procedimentos rápidos de identificação do vírus (LUPIANI et al., 1995).

Atualmente, não existe à disposição um teste de diagnóstico específico que detecte a infecção no peixe causada pelo aquareovírus. A maioria destes vírus demora a multiplicar-se quando primeiro isolados em cultura de tecidos, prejudicando o isolamento do vírus. Justamente por isso, tornam-se necessários métodos rápidos e sensíveis para a detecção da infecção do peixe por aquareovírus.

Tabela 5. Aquareovírus com genogrupos definidos através da aplicação da técnica de hibridização recíproca RNA-RNA, até a presente data.

GENOGRUPOS					
A	B	C	D	E	F
SBR	CSR	GSV	CRV	TRV	PSR SCR
HBR	YRC				
SRV ¹	ELC				
ASV	SCS				
CSV	LBS				
MSV	GRC				
AFR	ICR				
13p2	WIR				
TSV	DRV				
DRC	SSR				
FCR	IRV				
ERV	KPR				
SOR	ISR				
HER	LBR				
GRV	MDR				
NCR	WAR				
ASR	CCR				
SRV ²	HCR				
	LCR				

Adaptado de LUPIANI, 1994; SUBRAMANIAN, 1997.

SRV¹ = amostra oriunda do Canadá (MARSHALL *et al.*, 1990)

SRV² = amostra oriunda dos EUA (SUBRAMANIAN, 1997)

Técnicas de hibridização do ácido nucléico têm sido empregadas com sucesso para a identificação de vírus de diferentes animais e dos seres humanos (KULSKI & NORVAL, 1985; VISCIDI & YOLKEN, 1987; RIMSTAD et al., 1990; DOPAZO et al., 1994). Neste enfoque, LUPIANI et al. (1993b) desenvolveram sondas de ácido nucléico para detectar e identificar o TRV. Esta pesquisa envolveu a clonagem do genoma total do TRV num plasmídeo e a identificação dos clones que foi determinada por análises de "Northern blot". Um clone DNAC foi usado para a detecção do TRV em células CHSE-214 infectadas. O clone DNAC hibridizou somente com o RNA do TRV e, portanto, estava hábil para diferenciar o TRV (aquareovírus do genogrupo E) dos outros 4 aquareovírus pertencentes ao genogrupo A (SBR, HBR, SRV e ASV). Num estudo semelhante, SUBRAMANIAN et al. (1993) desenvolveram a "Wucleic Acid Hybridization Assay", para detectar o RNA do SBR em culturas de células e tecidos infectados. Tais pesquisas são importantes e deve ser dada continuidade a elas para que se possa desenvolver novos "Wucleic Acid Hybridization Assay" para a detecção dos aquareovírus.

2.10 Aquareovírus: características em comum com os membros da família *Reoviridae*, em especial com o gênero *Rotavirus*

Os aquareovírus, dentre todos os membros da família *Reoviridae*, compartilham características em comum com os gêneros *Rotavirus* e *Orthoreovirus*. Assim como os rotavírus, os aquareovírus possuem um genoma composto por 11 segmentos de RNAfd (WINTON et al., 1987). SAMAL et al. (1990), examinaram a relação antigênica e genética de um aquareovírus (SBR) com um reovírus de mamífero e um rotavírus. O SBR era bem diferente dos gêneros *Obi vi rus*, *Fi ji vi rus* e *Phyt oreo vi*, pertencentes à família *Reo vi ri dae* em morfologia e características físicas e químicas. Morfologicamente, o SBR tinha claramente definida a estrutura de um duplo capsídeo similar aos vírus membros do gênero *Ro ta vi rus*. Como outros rotavírus, o SBR apresentou um genoma com 11 segmentos

RNAfd, mas ao analisar os perfís eletroforéticos do RNA e das proteínas do SBR, notou-se que eram bem diferentes do apresentado pelos reovírus tipo 1 e rotavírus (SAII). SUBRAMANIAN et al. (1994) constataram que a proteína externa mais importante dos aquareovírus era glicosilada, assim como a dos rotavírus.

Os resultados dos estudos envolvendo a estrutura tri-dimensional dos aquareovírus, usando criomicrografia eletrônica e análises de imagens computadorizadas, mostraram que a estrutura dos aquareovírus apresenta uma forte semelhança com uma partícula subviral intermediária de reovírus de mamífero. Os aquareovírus exibem algumas características gerais encontradas em outro membro da família Reoviridae, como uma camada protéica icosaédrica externa, envolvendo uma camada protéica interna que aloja o genoma, demonstrando forte semelhança com o reovírus de mamífero. Semelhanças estruturais indicam a possibilidade de uma relação evolucionária próxima entre os aquareovírus e os orthoreovírus (SHAW et al., 1996).

É importante observar que diante das características em comum entre os aquareovírus e os rotavírus, sendo estas em maior número do que as relacionadas com os outros membros da família *Reoviridae* assim como todo o conhecimento que se tem a respeito da biologia molecular dos rotavírus, as técnicas utilizadas para os estudos dos rotavírus também deverão ser de grande utilidade para futuros trabalhos com os aquareovírus, num nível molecular (LUPIANI, 1994).

2.11 Rotavírus: distribuição

Os rotavírus são a principal causa da diarreia de criações intensivas em fazendas espalhadas pelo mundo (FENNER, 1987b). Historicamente, foram inicialmente associados a casos de gastroenterites em animais por volta da década de 60 (ADAMS & KRAFT, 1963; MALHERBE et al., 1963). Somente em 1973 foram identificados como agentes patogênicos para o homem, estando associados a diarreia em bebês e crianças

(BISHOP et al., 1973; FLEWETT et al., 1973). De acordo com os resultados das investigações de muitos autores, este grupo de vírus, proposto pela Equipe de Trabalho sobre Reovírus (LUPIANI, 1994; SUBRAMANIAN, 1997) foi classificado como gênero Rotavirus (do Latim *rota* = roda), na família *Reoviridae* (BEER, 1988).

Atualmente, com todos os estudos envolvendo os rotavírus como responsáveis pela diarreia aguda infantil, estes vírus têm sido relacionados a uma série de espécies, incluindo o homem, gado, porcos, cavalos, coelhos, camundongos, cães, gatos e pássaros (KAPIKIAN & CHANOCK, 1985).

2.12 Características Gerais dos Rotavírus

O gênero Rotavirus caracteriza-se por suas partículas virais apresentarem uma estrutura icosaédrica, diâmetro entre 65 e 75 nm, duplo capsídeo protéico, não-envelopado e a presença de todas as enzimas necessárias para a produção do RNA mensageiro (ESTES, 1990). Embora as partículas virais maduras não sejam envelopadas, a morfogênese viral envolve a formação de partículas envelopadas transitórias, a partir do brotamento para dentro do retículo endoplasmático (DUBOIS-DALCQ et al., 1984). O genoma é composto por 11 segmentos de RNAfd, onde cada segmento codifica pelo menos para uma proteína. Estes segmentos de RNA, quando purificados, não são infecciosos. Há uma alta frequência de rearranjo de genes (ESTES, 1990). O genoma codifica 6 proteínas estruturais, encontradas nas partículas virais e 5 proteínas não estruturais, encontradas somente em células infectadas (LUPIANI, 1994). Quanto a replicação viral, esta ocorre no citoplasma e os vírus são liberados através da lise celular (ESTES, 1990).

Outros aspectos dos rotavírus também são relevantes para caracterizá-los, como no caso da resistência que apresentam a inativação por éter (MALHERBE & STRICKLAND-CHOMLEY, 1967; WELCH & THOMPSON, 1972; BISHAI et al., 1978; ESTES et al., 1979; IHARA et al., 1983; CASTRUCCI et al., 1985), sendo que a

resistência ao clorofórmio é variável (MALHERBE & STRICKLAND-CHOMLEY, 1967; WELCH & THOMPSON, 1972; BISHAI et al, 1978; ESTES et al., 1979; CASTRUCCI et al., 1985). São vírus lábeis a 50 °C na presença de cloreto de magnésio (WELCH & THOMPSON, 1972; ESTES et al., 1979; CASTRUCCI et al., 1985), sendo, no entanto, estáveis na presença de sulfato de magnésio (ESTES et al., 1979).

2.13 Organização do Genoma dos Rotavírus

O genoma dos rotavírus é constituído por 11 segmentos RNAfd (NEWMAN et al., 1975; RODGER et al., 1975), onde a fita positiva de cada segmento é “capped” no terminal 5’ e este “cap” é seguido por uma região “5’non-translated”, um “open reading frame” e uma região “3’non-translated” que termina numa citidina (McCRAE & McCORQUODALE, 1983). O tamanho dos segmentos do rotavírus de símio SA11 varia do mais comprido, com 3.302 pb (segmento 11) ao menor com 667 pb (segmento 11), onde o total de 18.556 pb corresponde ao genoma inteiro. A exceção é o segmento 10 que codifica para 2 proteínas, enquanto cada um dos outros segmentos codifica apenas para 1 proteína (McCRAE & McCORQUODALE, 1982). São 6 as proteínas estruturais: VP1, VP2, W3, VP4, VP6 e VP7, estando organizadas numa tripla camada protéica e 5 proteínas não-estruturais: NSP1 (NS53), NSP2 (NS35), NSP3 (NS34), NSP4 (NS28) e NSP5 (NS26), que são codificadas pelo genoma (ESTES, 1994).

No caso das proteínas estruturais, VP1 e VP3 juntas ao RNA viral constituem o “subcore”, localizado no interior da partícula; VP2 circunda o “subcore” formando o core, VP6 forma a camada intermediária; VP7 que é uma glicoproteína, forma a camada mais externa, de onde as espículas formadas pelo VP4 são projetadas para fora (ESTES, 1994). Funcionalmente, VP1 e VP3 constituem o “RNA dependent RNA polymerase” (VALENZUELA et al., 1991); VP2 é requisitada para a síntese do RNA (PIZARRO et al., 1991); VP4 (hemaglutinina viral), quando clivado em VP5 e VP8, resulta no aumento da infectividade viral (ESPEJO et al., 1981); VP6 é a proteína imunogênica

(ESTES et al., 1987) e VP7 é o mais importante antígeno neutralizante (KALICA et al., 1981)

Os estudos relacionados as proteínas não-estruturais verificaram que: NSP1 (NS53) está provavelmente associada aos arranjos dos segmentos RNA do genoma, enquanto NSP2 (NS35) está provavelmente envolvida na replicação do RNA; NSP3 (NS34) provavelmente é uma proteína ligeiramente ácida (HELMBERGER-JONES & PATTON, 1986); NSP4 (NS28) é uma integrante da membrana protéica do retículo endoplasmático (ERICSON et al., 1982), sendo um fator importante na morfogênese viral (ERICSON et al., 1983); NSP5 (NS26) é uma fosfoproteína (WELCH et al., 1989) que, devido ao seu potencial mononucleotídico de ligação seqüencial, sugere um envolvimento na replicação do RNA.

2.14 Classificação Sorológica dos Rotavírus

Rotavírus são classificados sorologicamente em sorogrupos que contêm vírus que compartilham antígenos em comum, detectados pela imunofluorescência, ELISA ou pela imunomicroscopia eletrônica. Os rotavírus foram classificados em pelo menos 6 sorogrupos: A a F (PEDLEY et al., 1983), que apresentam diferenças bem claras com relação a epidemiologia da doença, a patologia viral e ao eletroferotipo do RNA (ZIZZIS & LAMBERT, 1975; RODGER et al., 1981). Os rotavírus pertencentes aos sorogrupos A, B e C têm sido encontrados tanto em animais, quanto no homem, enquanto os dos sorogrupos D, E e F têm sido descritos somente em animais.

Os grupos de rotavírus são divididos em sorotipos através do teste de neutralização, onde as cepas de origem humana e animal podem estar associadas ao mesmo sorotipo. Dois antígenos neutralizantes mais importantes, VP4 e VP7, foram detectados nos rotavírus. A classificação dos diferentes sorotipos é baseada no sistema binário: sorotipos que possuem antígenos heterólogos de neutralização (HOSHINO et al., 1985). Portanto, a classificação dos diferentes sorotipos é baseada no sistema binário: sorotipos correspondentes ao VP4 são denominados P (protease) e aqueles associados ao VP7 são denominados G (glicoproteína). Pelo menos 14G e 17P sorotipos já foram descritos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Células e Vinis

Na presente Tese foi utilizada a linhagem de células “Chinook Salmon Embryo” (CHSE-214) para a propagação dos vírus envolvidos neste trabalho. As células foram cultivadas em Meio Mínimo Essencial de Eagle (MMEE - Sigma), suplementadas com penicilina (1µg /ml), estreptomicina (100 µg /ml), fungizona (1 µg /ml) e soro fetal bovino (SFB) a 10%, em garrafas plásticas de 150 cm² (CORNING), segundo metodologia adotada pelo Dr. Frank M. Hetrick, do Animal Health Diagnostic Laboratory. As células CHSE-214 foram incubadas a 16 °C numa atmosfera úmida de 5% de CO₂. Em poucos dias, a monocamada de células CHSE-214 estava pronta, quando então algumas garrafas contendo estas células foram destinadas a manutenção da linhagem celular e outras a inoculação dos vírus, tanto os aquareovírus representantes dos genogrupos e que não se encontravam previamente purificados no estoque laboratorial, como os vírus a serem pesquisados (GCV, CLV e HRV). No caso das garrafas destinadas a continuidade celular, contendo a monocamada de células CHSE-214, o trabalho envolveu a passagem das células para outras garrafas, normalmente 1:3 dependendo das condições da monocamada.

Nove cepas virais foram estudadas nesta Tese, das quais 3 corresponderam as amostras virais a serem pesquisadas e 6 foram escolhidas como representantes de cada um dos genogrupos existentes dentro do gênero *Aquareovirus* (A a F).

No Tabela 6, encontram-se listadas as 3 amostras virais analisadas neste trabalho. O “grass carp aquareovirus” (GCV), oriundo do “grass carp” (*Ctenopharyngodon idella*) foi inicialmente pesquisado por CHEN & JIANG (1984) como o agente responsável pela doença hemorrágica em carpas na RPC (década de 70), sendo identificado como um aquareovírus. No entanto, até a presente data, este vírus ainda não tinha sido classificado num genogrupo pertencente ao gênero *Aquareovirus*. Amostras deste vírus do estoque laboratorial do Dr. Frank M. Hetrick, no Animal Health Diagnostic Laboratory - Maryland Department of Agriculture, EUA, foram trabalhadas com a finalidade principal de determinar o genogrupo (co-orientação do Dr. Siba K. Samal, do Laboratório de Biologia Molecular do Avrum Gudelsky Veterinary Center da University of Maryland, EUA). As outras duas amostras virais pesquisadas, o CLV, oriundo do “Geoduck clams” e o HRV, oriundo do “Atlantic herring”, foram fornecidas pelo Alaska Department of Fish Pathology Laboratory, CFMD Division, EUA a University of Maryland. Junto com estas amostras vieram também os respectivos relatórios mencionando que as características citopáticas, bioquímicas e morfológicas de ambos os vírus eram típicas do gênero *Aquareovirus*, sendo então necessária a confirmação desta possível identificação através do isolamento, além de análises eletroforéticas e a classificação num genogrupo pela aplicação da técnica de hibridização RNA-RNA.

No Tabela 7 estão listadas as 6 cepas virais que foram utilizadas para representarem cada genogrupo (A a F), pertencentes ao gênero *Aquareovirus*. Todos estes aquareovirus encontravam-se no estoque laboratorial do Dr. Siba K. Samal e do Dr. Frank M. Hetrick, sendo que, no caso do SBR (genogrupo A) e do LBS (genogrupo B), já se encontravam purificados a partir de pesquisas anteriores (LUPIANI, 1994). Entretanto, quanto a origem do fornecimento de cada amostra, foi diferente: o SBR, isolado do “striped bass” e o TRV, isolado do “turbot”, pertenciam a viroteca do Dr. Siba K. Samal; o LBS, isolado do “chinook salmon”, foi fornecido pelo Dr. J. R. Winton (National Fisheries

Research Center, Seattle, Washington, EUA); o GSV, isolado do “golden shiner” e o CRV, isolado do “catfish”, foram fornecidos pelo Dr. R. P. Hedrick (School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, California, EUA); o SCR, isolado do “chinook salmon”, foi fornecido pelo Dr. Jill Follett (Alasca, EUA). No caso do SBR e do LBS, não houve necessidade de cultivá-los em CHSE-214, pois já se encontravam purificados, o que não ocorreu com os outros aquareovírus que tiveram que ser cultivados em células para posterior purificação viral.

Tabela 6. Origem dos vírus identificados como aquareovírus a partir do presente estudo.

VÍRUS ISOLADO	HOSPEDEIRO		LOCAL	ANO
	ESPÉCIE	NOME COMUM		
GCV	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Grass carp	RPC, China	1984
CLV	<i>Panope abrupta</i>	Geoduck clams	Alasca, EUA	1997
HRV	<i>Clupea harengus</i>	Atlantic herring	Massachusetts, EUA	1997

A cepa SA11 (rotavírus grupo A), utilizada nas análises do GCV, CLV e HRV, em conjunto com SBR, LBS, GSV, CRV, TRV E SCR, como forma de comparação entre aquareovírus e rotavírus, encontrava-se no estoque do laboratório do Dr. Siba K. Samal previamente purificada (LUPIANI, 1994), onde foi inicialmente propagada em células MA-104 segundo ESTES *et al.*, (1981). O fornecimento original foi cedido pelo Dr. R. F. Ramig (Baylor College of Medicine, Houston, Texas, EUA).

Tabela 7. Origem dos aquareovírus utilizados como padrão no presente estudo.

VÍRUS ISOLADO	HOSPEDEIRO		LOCAL	ANO
	ESPÉCIE	NOME COMUM		
SBR	<i>Morone saxatilis</i>	Striped bass	Maryland, EUA	1990
LBS	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Chinook salmon	Washington, EUA	1990
GSV	<i>Notemigonus crysoleucas</i>	Golden shiner	Arcansas, EUA	1979
CRV	<i>Ictalurus punctatus</i>	Channel catfish	Califórnia, EUA	1984
TRV	<i>Scophthalmus maximus</i>	Turbot	Galicia, Espanha	1989
SCR	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Chinook salmon	Alasca, EUA	1995

Adaptada de LUPIANI, 1994; SUBRAMANIAN, 1997.

3.2 Produção Viral

Após a formação das monocamadas (CHSE-214), o meio de crescimento (MMEE - 10% SFB) foi trocado pelo meio de manutenção (MMEE - 2% SFB), quando então estas garrafas de 150 cm² foram removidas do setor de cultivo celular para um setor do Laboratório de Virologia destinado a trabalhos relacionados à inoculação dos vírus. Neste setor do Laboratório de Virologia, cada garrafa com CHSE-214 (MMEE - 2% SFB) foi identificada com o nome do vírus a ser inoculado e a data da inoculação. As inoculações foram feitas a partir de 100 µL (50.000 a 100.000 TCID₅₀/ 150 cm² de área de cultivo celular) das seguintes amostras virais: GCV, CLV, HRV e os representantes dos genogrupos C (GSV), D (CRV), E (TRV) e F (SCR), mantendo-se uma garrafa separada para servir de controle celular. Estas garrafas, mais o controle, foram incubados a 16 °C para exames diários até a visualização do efeito citopático característico dos aquareovírus (sincício).

Quando a formação sincicial atingiu 100% das células CHSE-214, novas garrafas contendo CHSE-214 (MMEE - 2% SFB) foram inoculadas, cada uma com 100 µL do material viral produzido na garrafa original, ou seja: no caso dos vírus GCV, CLV e HRV cada um teve o respectivo material inoculado em mais 9 garrafas com CHSE-214, perfazendo um total de 10 garrafas (contando com a original); no caso dos aquareovírus representantes dos genogrupos C (GSV), D (CRV), E (TRV) e F (SCR), pois os genogrupos A (SBR) e B (LBS) já se encontravam previamente purificados, de cada garrafa original foram inoculadas 5 garrafas contendo CHSE-214 (MMEE - 2% SFB), formando um total de 6 garrafas de cada um destes aquareovírus. Conseqüentemente, após um novo período de incubação a 16 °C, cada vírus ficou representado por um número alto de garrafas, com uma elevada produção viral e prontas para serem preparados para a purificação viral.

Quanto a cepa SA11 (rotavírus grupo A), como mencionado anteriormente, por se encontrar previamente purificada (LUPIANI, 1994) e num volume suficiente para os experimentos aqui propostos, não foi necessário propagá-la em células MA- 104.

3.3 Lâminas para Microscopia Óptica

Paralelamente a todos estes trabalhos envolvendo o cultivo dos aquareovírus em células CHSE-214 nas garrafas de 150 cm², foram preparadas lâminas para a Microscopia Óptica (LAB-TEK, CHAMBER SLIDE™ NUNC) para registro fotográfico sincicial característico do GCV, CLV e HRV. Tecnicamente, em cada câmara das lâminas foi aplicado 1mL de suspensão de células CHSE-214 (MMEE - 10% SFB) e em 24 h estavam prontas para as inoculações, ou seja, um total de três lâminas com 2 câmaras em cada (contendo a camada celular), onde uma foi utilizada para controle e a outra para a inoculação. Na câmara destinada a inoculação foram aplicados 100µL da amostra viral, respectiva a identificação de cada lâmina (GCV, CLV e HRV), sendo posteriormente

incubados a 16 °C. Após a visualização da formação sincicial (ECP), estas foram coradas por hematoxilina-eosina, viabilizando a fotomicrografia e conservação destes materiais.

3.4 Purificação Viral

A Purificação Viral dos representantes dos genogrupos A (SBR) e B (LBS), conforme mencionado anteriormente, já havia sido realizada. Para a purificação dos 4 genogrupos, C (GSV), D (CRV), E (TRV) e F (SCR), partiu-se das 6 garrafas de cada um desses aquareovírus representantes dos genogrupos, assim como das 10 garrafas de cada um dos 3 vírus (GCV, CLV e HRV) a serem pesquisados. Estando estes materiais num elevado nível de produção viral, foi realizada a colheita das células CHSE-214 infectadas e, na sequência, a aplicação da metodologia modificada de purificação viral de SMITH et al., (1969). No caso do SA11, este rotavírus já se encontrava purificado.

Após a colheita das células infectadas, cada vírus ficou representado por uma garrafa (150 cm²) contendo o resultado das células infectadas de todas as garrafas associadas ao respectivo vírus. A partir dos resultantes das células infectadas, cada um foi ressuspenso no próprio meio, por pipetagem automática, numa média de 30 vezes, lisando-se as células mecanicamente. A seguir, cada material foi centrifugado (BECKMAN - GPKR CENTFUFUGE) a 913 x g por 20 minutos a 0 °C, os sobrenadantes formados foram separados em frascos identificados com o nome do respectivo vírus e estocados a 4 °C. Enquanto isso, o "pellet" que ficou de cada um foi ressuspenso em PBS, tratado com 1% de NP40 (NONIDET P40) e conservado no gelo por 30 minutos. Após este período, estes materiais foram novamente centrifugados a 913 x g por 20 minutos a 0 °C os sobrenadantes coletados separadamente e incubados durante a noite em tubos identificados com o nome do respectivo vírus e da data.

A continuidade deste processo envolveu a sedimentação de cada vírus em sucrose a 15%, a partir dos respectivos sobrenadante coletado inicialmente e sobrenadante

tratado com NP 40 1%, quando, então, cada material foi centrifugado (BECKMAN - XL80 ULTAGENTRIFUGE) durante 5 h a $8,644 \times g$ a 4°C (rotor SW28). Enquanto isso, o gradiente para cada vírus foi preparado utilizando sucrose a 15% e a 50%, sendo posteriormente mantidos no gelo. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e os “pellets” ficaram secando um pouco. A cada um foi adicionado 1 mL de PBS para ressuspendê-los. No topo de cada um dos respectivos gradientes, associados a um vírus, foi aplicado o material viral correspondente e que havia sido ressuspenso em PBS, sendo então centrifugados a $111,132 \times g$ por 50 minutos a 4°C (rotor SW41).

Ao término da centrifugação, foi possível visualizar em cada gradiente uma banda representante da área de maior concentração viral. Esta área foi coletada e aplicada num tubo, devidamente identificado com o nome do vírus correspondente, contendo PBS. Após a mistura feita (cuidadosamente) nos tubos, foi realizada a centrifugação de cada a $9,781 \times g$ por 17:30 h a 4°C (rotor SW41). A etapa final da Purificação Viral envolveu o descarte dos sobrenadantes, a secagem dos “pellets” e a ressuspensão destes em $100\mu\text{L}$ de PBS. Cada material viral foi transferido para um tubo de “Eppendorf” identificado de acordo com o nome do respectivo vírus e mantido a 4°C para o uso no processo de Extração do RNA.

3.5 Microscopia Eletrônica

Os produtos finais, resultantes da purificação do GCV, do CLV e do HRV foram submetidos a Microscopia Eletrônica de Transmissão, após contraste negativo. Buscando-se avaliar a integridade viral e obter mais uma fonte de confirmação de se tratarem de aquareovírus, as amostras virais de cada purificação foram coradas com 3% de ácido fosfotúngstico em grade de carbon-formvar. A análise foi feita num Microscópio Eletrônico JEM- 1200 EX 11.

3.6 Extração do Ácido Nucléico (RNA)

Após o processo de purificação viral com estocagem consecutiva das amostras a 4 °C, incluindo o SBR (genogrupo A), LBS (genogrupo B) e o SA11 rotavírus, foram trabalhadas para a obtenção dos RNAs genômicos. Inicialmente foi feita a digestão dos vírus purificados com Proteinase K, durante 1 h a 37 °C. Em seqüência: extração dos ácidos nucleicos a 37 °C através do uso do Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (GIBCO BRL ULTRAPURE/ 25:24: 1, v/v; pH 8,05-8,35), seguida de centrifugação (CENTRIFUGE 5415 C - EPPENDORF) para utilização da fase aquosa e aplicação do Clorofórmio a 100% nesta fase; nova centrifugação e utilização da fase aquosa para a precipitação com etanol a 100% e cloreto de sódio 5M, mantendo as amostras posteriormente a -20 °C durante 1 h. Em seguida, os materiais foram lavados com etanol a 70% e finalmente os “pellets” foram ressuspensos em água miliQ. para os RNAs que seriam marcados com material radioativo e em TE (10mM Tris [pH 7,4], 1mM EDTA) para os que não seriam, sendo os materiais conservados a -20 °C, de acordo com o procedimento de rotina do laboratório do Dr. Siba K. Samal.

3.7 Preparação dos RNAs com Material Radioativo

Alíquotas dos RNAs genômicos, extraídas de cada vírus purificado e conservadas a -20 °C (GCV, CLV, HRV, SBR, LBS, GSV, CRV, TRV, SCR e SA11), foram separadas para serem marcadas radioativamente, sendo, então, aplicadas nas análises eletroforéticas (SDS-PAGE) e no processo de hibridização, como sondas. Cada alíquota foi trabalhada com DMSO (Dimetil Sulfóxido - Sigma), marcada no terminal 3' com 50 µCi de 3'-5'- citidina [5'-³²P] bifosfato (NEWTM Life Science Products, Inc.) e T4 RNA ligase

(New England, BioLabs, Inc.), sendo mantidas a 4 °C durante 16 h (ENGLAND & UHLENBECK, 1978).

3.8 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel SDS-poliacrilamida para a separação dos RNAs genômicos, marcados no terminal 3' com ^{32}P , seguiu a metodologia adotada por LAEMMLT (1970): gel de corrida 7,5% (30% acrilamida / 1% bisacrilamida, 10% SDS, 1,0 M Tris-HCl [pH 8,8], TMED, 10% de Persulfato de amônia), gel de "stacking" 5% (30% acrilamida / 1% bisacrilamida, 10% SDS, 1,0 M Tris-HCl [pH 6,8], TMED, 10% de Persulfato de amônia) e tampão de corrida (25mM Tris, 192 mM Glicina, acrescida de 0,1% de SDS [pH 8,3]).

Estas análises eletroforéticas envolvendo os vírus GCV, CLV, HRV, SBR, LBS, GSV, CRV, TRV, SCR e SA11 foram feitas em géis de poliacrilamida 7,5% com 1,2 mm de espessura e 25 a 45 cm de comprimento. A voltagem variou de 200V a 350V, assim como o tempo de duração de cada corrida eletroforética, de 16 a 45 h. Em seqüência, foi feita a secagem dos géis a 80 °C por 2 h num sistema a vácuo (HOEFER / SLAB GEL DRYER - SE 1160). As bandas de RNAfd marcadas com ^{32}P no terminal 3' foram visualizados através da auto-radiografia, com exposição do filme (KODAK / X - OMATTM) de 2:30 a 6 h.

3.9 Transferência dos RNAs para as Membranas

Alíquotas dos RNAsfd genômicos, extraídos de cada vírus purificado (GCV, CLV, HRV, SBR, LBS, GSV, CRV, TRV, SCR e SA11) e conservados a -20 °C,

foram desnaturadas a 100 °C por 2 minutos, sendo resfriadas rapidamente no gelo para posterior aplicação na técnica de hibridização RNA-RNA “dot blot”. Estas amostras de RNA desnaturadas (aproximadamente 100 ng) foram aplicadas a Membranas de Hibridização (ONCOR) tratadas com 1x SSC, usando um “microsample filtration manifold” (MINIFOLD I - SCHLEICHER & SCHUELL). Em seqüência, as membranas devidamente identificadas passaram por um processo de “cross-link” (UV STRART LINKES) durante 30 segundos, estando então prontas para a etapa de pré-hibridização, segundo metodologia adotada pelo Dr. Siba K. Samal.

3.10 Hibridização recíproca RNA-RNA “dot blot”

A técnica de hibridização recíproca RNA-RNA “dot blot” foi aplicada segundo metodologia adotada pelo Dr. Siba K. Samal. As membranas, contendo RNAs genômicos desnaturados, foram pré-hibridizadas com tampão contendo 50% Formamida e 6x SSC (HYBRISOL I, ONCOR) a 52 °C, por se tratar de estringência média, durante 2 h. As sondas RNAfd, marcadas no terminal 3’ com 32P, representantes dos vírus GCV, CLV, HRV, SBR, LBS e SA11 foram desnaturadas a 100 °C por 5 minutos, resfriadas em gelo e cada uma foi adicionada a respectiva membrana pré-hibridizada, correspondente a identificação do vírus. A hibridização destas membranas foi realizada a 52 °C (estringência média) na presença de 50% Formamida e 6x SSC, durante a noite (BODKIN & KNUDSON, 1985b). Na seqüência, as membranas foram colocadas em 1x SSC/ 0,1% SDS durante 15 minutos, em temperatura ambiente, no agitador, sendo posteriormente retiradas desta solução e lavadas em 0,1x SSC/ 0,1% SDS durante 1 h a 62 °C (estringência média). A seguir, as membranas foram colocadas sobre um filtro 3MM (Fisher Scientific Company Newark), dentro de um saco plástico selado e expostas a filme de raio-X durante a noite. Após a revelação (Kodak Diagnostic Imaging - MA35A / X-OMAT Processor), foi feita a leitura dos resultados.

4. RESULTADOS

4.1 Produção Celular

A cultura de células “Chinook Salmon Embryo” (CHSE-2 14), cultivada em garrafas plásticas de 150 cm² contendo o meio de crescimento (MMEE - 10% SFB), levou em média 2 a 3 dias para a formação da monocamada em condições ideais. Algumas garrafas foram destinadas a inoculação viral, enquanto outras, a manutenção da linhagem celular. Desta forma, além de se obter os resultados esperados com a aplicação da metodologia de cultivo celular adotada pelo Dr. Frank M. Hetrick, foi também possível manter um estoque celular para os devidos experimentos relacionados a esta Tese (Figura 1).

4.2 Produção Viral

Cada garrafa de 150 cm², contendo monocamada de células CHSE-214 (MMEE- 2% SFB) e inoculada com um dos vírus deste estudo (GCV, CLV, HRV, GSV, CRV, TRV e SCR) apresentou diferentes tempos para a formação do efeito citopático

equivalente a 80-90%, pós-inoculação. No caso do GCV, em 4 dias, o efeito citopático já era visível, evoluindo rapidamente para a destruição da monocamada; o CLV e o HRV levaram uma média de 5 dias para apresentar um efeito citopático de 80-90%; com relação aos aquareovírus representantes dos genogrupos (GSV, CRV, TRV e SCR), a média foi de 5 a 7 dias, sendo então encaminhados a etapa da purificação viral.

4.3 Lâminas para Microscopia Óptica

As células CHSE-214 cresceram nas câmaras das lâminas para a Microscopia Óptica (Figura 2), quando então foram inoculadas com os vírus GCV, CLV e HRV. O tempo de formação do efeito citopático variou dependendo do vírus: o GCV levou basicamente 24h, destruindo a monocamada rapidamente e dificultando a fotografia do efeito citopático (Figura 3); o CLV e o HRV apresentaram formação sincicial em 48 h (Figuras 4 e 5).

4.4 Microscopia Eletrônica

As análises realizadas através da Microscopia Eletrônica de transmissão, por contrastação negativa, a partir de amostras do GCV, do CLV e do HRV purificadas, revelaram partículas virais com simetria icosaédrica e uma estrutura com duplo capsídeo. O diâmetro dos vírions foi de aproximadamente 70-75 nm, tendo sido visualizados tanto vírus completos, quanto vazios, ou seja, sem ácido nucléico (Figura 6).



Figura 1 – BOD a 16 °C com estoque de cultura de células ‘Chinook Salmon Embryo’ (CHSE-214) em frascos de 150 cm².

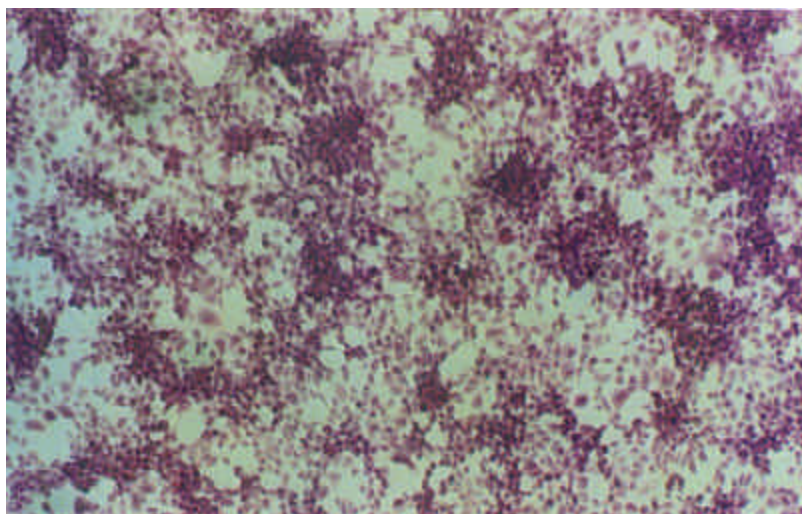


Figura 2 – Monocamada de células normais de “Chinook Salmon Embryo” (CHSE-214) em lâmina para Microscopia Óptica (100x), 24 h pós-incubação.

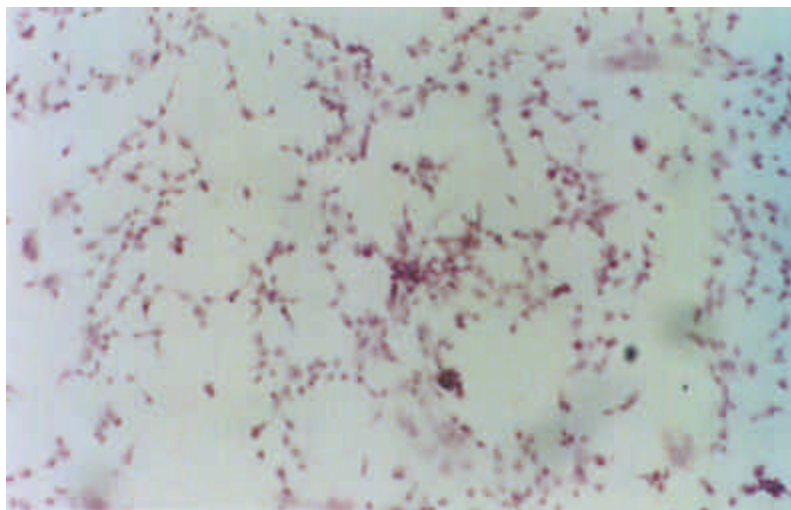


Figura 3 – Destruição da monocamada de células CHSE-214 infectada com “grass carp aquareovirus” (GCV), em lâmina para Microscopia Óptica (40x), 24 h pós-inoculação.

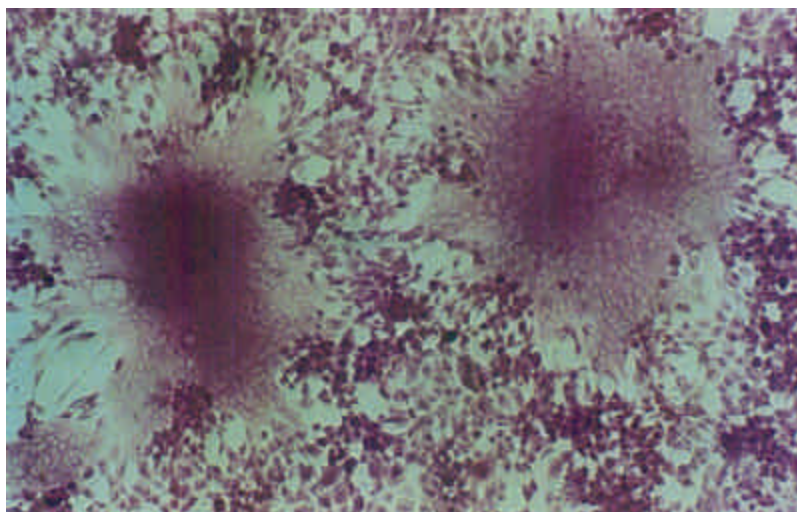


Figura 4 – Formação sincicial em células CHSE-214 infectadas com “Geoduck clams aquareovirus” (CLV), em lâmina para Microscopia Óptica (100x), 48 h pós-incubação.

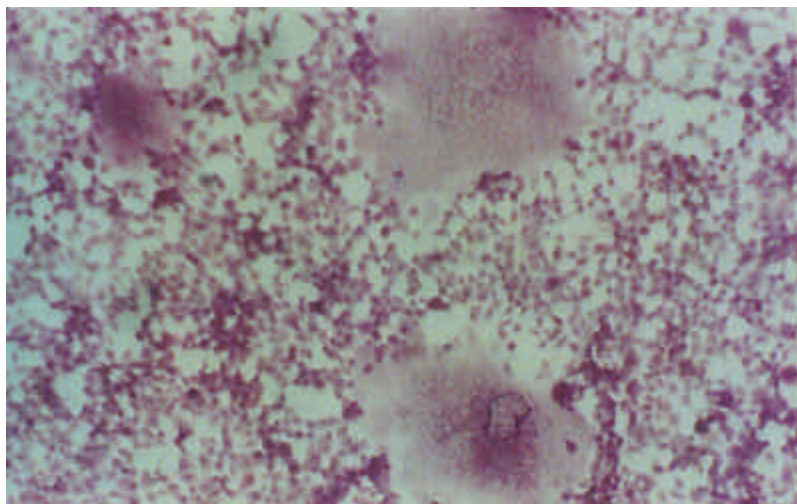


Figura 5 – Formação sincicial em células CHSE-214 infectadas com “Atlantic herring aquareovirus” (HRV), em lâmina para Microscopia Óptica (100x), 48 h pós-inoculação.

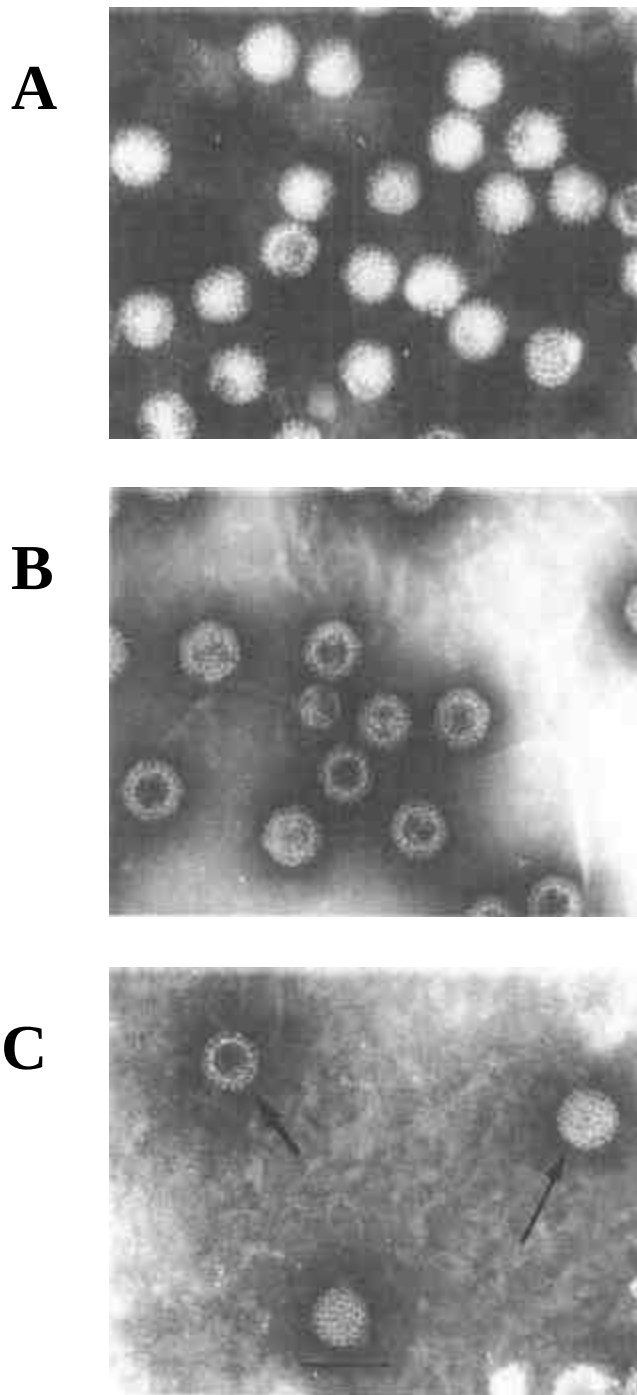


Figura 6 – Microscopia eletrônica de transmissão (contrastação negativa) do: A) GCV purificado; B) CLV purificado; C) HRV purificado. Vírus vazio (seta menor); vírus completo (seta maior). Barra $\cong$ 100 nm.

4.5 Análises Eletroforéticas dos segmentos RNAfd

A migração dos modelos dos RNAfd genômicos dos aquareovírus aqui isolados (GCV, CLV e HRV), assim como a do aquareovírus representante do genogrupo A (SBR) e do SA11 (rotavírus grupo A), encontra-se na Figura 7. Neste gel, constatou-se que o GCV, o CLV e o HRV, assim como o SBR, apresentam os 11 segmentos RNMfd característicos dos aquareovírus, ou seja, 3 tipos de classes de segmentos. Estas classes se definem por apresentarem 3 segmentos de alto peso molecular (1 a 3), 3 segmentos de médio peso molecular (4 a 6) e 5 segmentos menores (7 a 11). Além disso, foi constatado que: o GCV possui um perfil eletroforético diferente dos demais, apesar de estar dentro dos padrões eletroforéticos dos aquareovírus; o CLV e o HRV possuem um modelo eletroforético semelhante entre si e com o SBR (genogrupo A); todos diferem do SA11. Estes resultados apresentados pelos aquareovírus CLV e HRV sugerem que possivelmente pertençam ao genogrupo A, só sendo confirmado através da hibridização recíproca RNA-RNA “dot blot”.

A Figura 8 apresenta claramente a ausência de qualquer correlação do perfil eletroforético do GCV com qualquer um dos modelos eletroforéticos dos representantes dos genogrupos dentro do gênero Aquareovirus: A (SBR), B (LBS), C (GSV), D (CRV), E (TRV) e F (SCR), sugerindo a possibilidade de se tratar de um novo genogrupo (genogrupo G), posteriormente analisado através da hibridização recíproca RNA-RNA “dot blot”.

A Figura 9 corresponde a comparação entre 2 amostras de CLV (1 e 2) com o modelo eletroforético do SBR, onde se procurou evidenciar o 2º e o 3º segmentos do CLV. Além disto, neste contexto é importante esclarecer que, ao se analisar o modelo eletroforético apresentado pelo CLV, para a surpresa de todos os envolvidos nesta pesquisa, foi observado um “aparente 12º segmento RNAfd” (Figuras 7 e 9). Apesar de não haver tempo hábil para a realização de um “Plaque Purification” do CLV e novos SDS-PAGE, que seriam os procedimentos indicados para este caso, foram feitas importantes observações por parte do Dr. Siba K. Samal, que procurou elucidar a ocorrência deste fato com base nos

conhecimentos associados ao gênero Aquareovirus Diante disto, o que se esclarece é que o CLV aqui pesquisado possui realmente 11 segmentos RNAfd e não 12, estando a amostra viral provavelmente representada por 2 populações do mesmo aquareovírus (CLV), onde uma difere da outra, justamente no 11º segmento, apresentando diferentes pesos moleculares. Possivelmente um caso de mutação, levando a diminuição do peso molecular deste último segmento numa das populações.

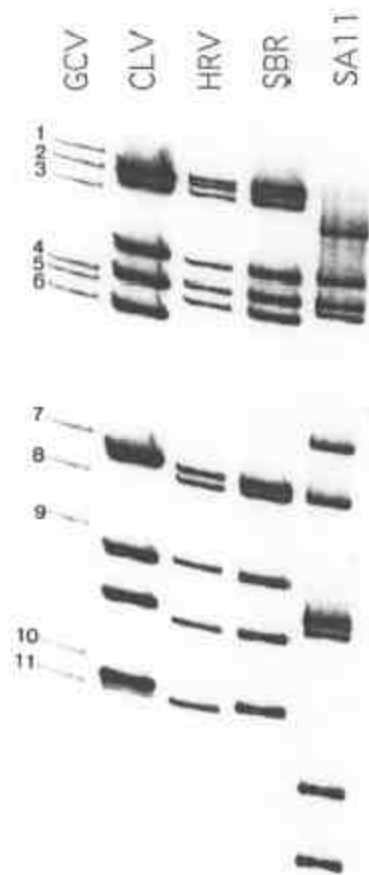


Figura 7 – Comparação auto-radiográfica entre o perfil eletroforético dos RNAsfd genômicos dos aquareovírus aqui isolados (GCV, CLV e HRV), o aquareovírus representante do genogrupo A (SBR) e o SA11. Os RNAsfd genômicos foram extraídos dos vírus purificados, marcados no terminal 3' com [5'-³²P] pCp e submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida a 7,5%, com 1,2 mm de espessura e 25 cm de comprimento. A corrida eletroforética durou 16 h a 200V.



Figura 8 – Comparação auto-radiográfica do perfil eletroforético do GCV, posteriormente confirmado com um genogrupo (G) pela aplicação da hibridização recíproca RNA-RNA, com o perfil eletroforético de cada aquareovírus representante dos genogrupos: A (SBR), B (LBS), C (GSV), D (CRV), E (TRV) e F (SCR). Os RNAsfd genômicos foram extraídos dos vírus purificados, marcados no terminal 3' com [5'-³²P] pCp e submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida a 7,5%, com 1,2 mm de espessura e 25 cm de comprimento. A corrida eletroforética transcorreu durante a noite a 200V.

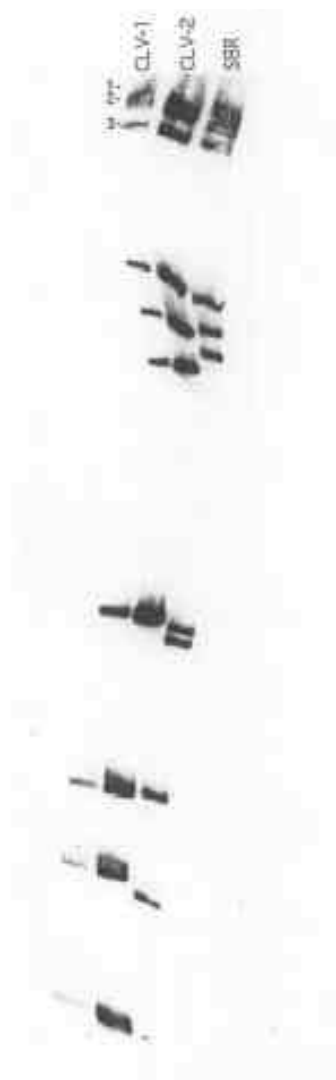


Figura 9 – Comparação auto-radiográfica do perfil eletroforético entre duas amostras de CLV (1 e 2), com o perfil do SBR, evidenciando os segmentos genômicos RNAsfd 1, 2 e 3 do CLV (1 e 2). Os RNAsfd genômicos foram extraídos dos vírus purificados, marcados no terminal 3' com [5'-³²P] pCp e submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida a 7,5%, com 1,2 mm de espessura e 45 cm de comprimento. A corrida eletroforética durou 45 h a 350V.

4.6 Hibridização recíproca RNA-RNA “dot blot”

A relação genética entre os 3 aquareovírus aqui pesquisados (GCV, CLV e HRV), os aquareovírus representantes dos genogrupos A (SBR), B (LBS), C (GSV), D (CRV), E (TRV) e F (SCR) e o SA11 (rotavírus grupo A), foi estudada através da hibridização recíproca RNA-RNA “dot blot” sob condições médias de estringência (pré-hibridização e hibridização a 52 °C, 50% formamida/ 6x SSC; lavagem a 62 °C, 0,1x SSC/ 0,1% SDS). Os resultados destes estudos de hibridização estão presentes na Figura 10. Quando o GCV foi usado como sonda, detectou-se um forte sinal de hibridização somente com o próprio GCV, não havendo nenhum sinal com os aquareovírus representantes dos genogrupos (A a F), indicando que o GCV é um novo genogrupo dentro do gênero *Aquareovirus* (Tabela 8). No caso do CLV, do HRV e do SBR (genogrupo A) utilizados como sondas, os sinais de hibridização foram detectados de um com o outro, além do sinal com o próprio vírus, indicando que o CLV e o HRV pertencem ao genogrupo A (Tabela 8), correspondente ao representante SBR. O LBS (genogrupo B), utilizado também como sonda, apresentou um sinal de hibridização bem forte com o próprio LBS, sendo detectado sinais bem fracos com o SBR (genogrupo A), o CLV e o HRV (Figura 10).

O Rotavírus é o outro único gênero da família *Reoviridae* que tem o genoma composto por 11 segmentos de RNAfd. Devido a esta característica em comum com o gênero *Aquareovirus* foi utilizado o RNAfd da cepa SA11 (rotavírus grupo A) como um controle na hibridização “dot blot”. O estudo da relação genética entre a cepa SA11 e os aquareovírus aqui pesquisados (GCV, CLV e HRV), através da hibridização recíproca RNA-RNA “dot blot”, demonstrou que o SA11 só hibridiza com o próprio, confirmando não haver qualquer relação genética entre o rotavírus grupo A (SA11) e os aquareovírus (Figura 10).

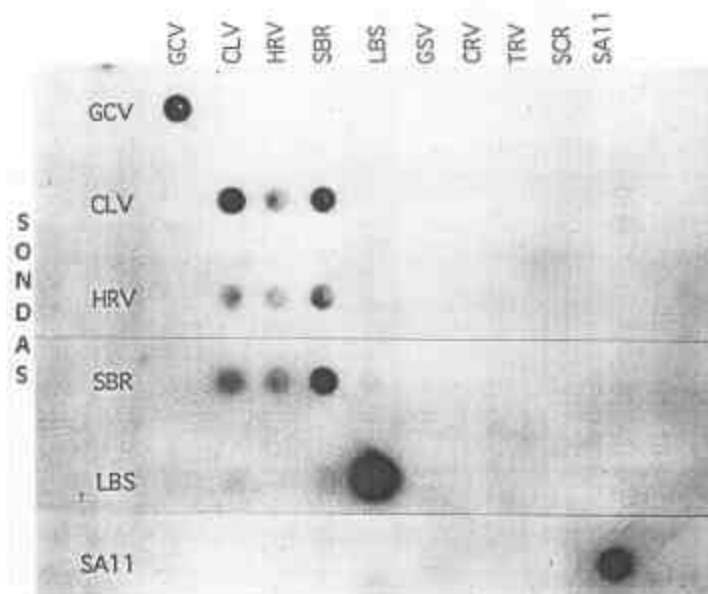


Figura 10 – Hibridização recíproca RNA-RNA “dot blot” entre o GCV, CLV, HRV, SBR, LBS e SA11 (sondas). RNAsfd genômicos foram extraídos dos vírus purificados (GCV, CLV, HRV, SBR, LBS, GSV, CRV, TRV, SCR e SA11), desnaturados a 100 °C por 2 minutos e aplicados à Membrana de Hibridização (ONCOR). Cada sonda foi preparada através da marcação no terminal 3’ com ^{32}P e hibridizada num “blot” contendo RNAs extraídos dos diferentes vírus. Todas as hidridizações foram obtidas sob condições de estringência média (hibridização a 52 °C, 50% formamida/ 6x SSC; lavagem a 62 °C, 0,1xSSC/ 0,1% SDS).

Com base nestes estudos, um novo genogrupo foi estabelecido: o genogrupo G, representado pelo GCV e determinou-se que os aquareovírus CLV e HRV pertencem ao genogrupo A.

Tabela 8. Genogrupos detectados de três aquareovírus isolados neste estudo, a partir da aplicação da técnica de hibridização recíproca RNA-RNA.

GENOGRUPOS						
A	B	C	D	E	F	G
CLV						GCV
HRV						

5. DISCUSSÃO

Os aquareovírus, membros da família *Reoviridae* (FRANCKI et al., 1991) têm sido isolados de uma grande variedade de animais aquáticos de diversas áreas geográficas (LUPIANI et al., 1995), despertando o interesse dos cientistas no estudo destes vírus. No entanto, no Brasil não existem referências de pesquisas que envolvam análises dos vírus que afetam os animais aquáticos. Diante disto, torna-se necessário dar início a estes estudos, principalmente com a introdução, no Brasil, da Aquacultura e de todos os compromissos comerciais de importação e exportação que estão vinculados a esta atividade. Neste contexto, as exigências sanitárias que envolvem os animais aquáticos passam também a visar as análises virológicas destes animais. Buscando justamente preencher estas novas necessidades sanitárias com relação as criações e ao comércio de animais aquáticos é que foram feitos os estudos contidos nesta Tese, direcionados as análises de alguns vírus (aquareovírus) de animais aquáticos, com aplicação da Biologia Molecular.

Apesar de todo o conhecimento que se tem da biologia molecular dos outros membros da família *Reoviridae* mesmo diante do grande número de aquareovírus que já foram isolados, ainda não existe um estudo sistemático que determine a relação genética entre estes vírus (LUPIANI, 1994; SUBRAMANIAN, 1997). Estudos aplicando a hibridização recíproca RNA-RNA têm sido usados para agrupar geneticamente rotavírus

(NAKOGOMI et al., 1989), reovírus (BODKIN & KNUDSON, 1985a) e orbivírus (KOWALIK & LI, 1987). Mais recentemente, LUPIANI et al. (1993a) e SUBRAMANIAN (1997) analisaram a relação genética entre diversos aquareovírus, isolados de diferentes partes do mundo, através da aplicação da hibridização recíproca RNA-RNA, obtendo excelentes resultados. Seguindo esta metodologia, as pesquisas desta Tese relatam o estudo de 3 aquareovírus, confirmando a identificação destes dentro do gênero *Aquareovirus*, analisando os modelos eletroforéticos e a diversidade genética, incluindo a determinação de um novo grupo genético (genogrupo) dentro do gênero *Aquareovirus*.

Os vírus pesquisados neste trabalho, GCV, CLV e HRV, isolados respectivamente do “grass carp”, “Geoduck clams” e “Atlantic herring”, apresentaram durante a microscopia eletrônica: simetria icosaédrica, não envelopados, diâmetro de 70-75 nm e duplo capsídeo, assim como no cultivo celular (CHSE-214), formação sincicial, correspondendo a forma de multiplicação dos vírus pertencentes ao gênero *Aquareovirus*, segundo a literatura (WINTON et al., 1987).

As variações nas migrações dos modelos eletroforéticos dos RNAs dos aquareovírus refletem variação no genotipo e indicam uma ampla diversidade no gênero *Aquareovirus* (HRDY et al., 1979; RODGER & HOLMES, 1979). Nesta Tese, 2 diferentes modelos eletroforéticos foram detectados entre 3 aquareovírus isolados (GCV, CLV e HRV). No entanto, por se tratarem de apenas 3 amostras de aquareovírus, ou seja, um número muito pequeno de amostras, não foi possível determinar, conforme literatura (LUPIANI, 1994; SUBRAMANIAN, 1997), estudos de comparação envolvendo a espécie e a área geográfica com o perfil eletroforético

No caso do modelo eletroforético do GCV, não se constatou nenhuma semelhança com os modelos eletroforéticos do CLV e do HRV, assim como não ocorreu semelhança com nenhum dos genogrupos: SBR (genogrupo A), LBS (genogrupo B), GSV (genogrupo C), CRV (genogrupo D), TRV (genogrupo E) e SCR (genogrupo F). O mesmo foi observado com relação ao SA11 (rotavírus grupo A) em comparação com o GCV, CLV e o HRV, ou seja, não se constatou semelhança dos modelos eletroforéticos apresentados pelos aquareovírus com o SA11, conforme a literatura consultada (SAMAL, 1990).

Contudo, mesmo com os estudos desenvolvidos por (1994), SUBRAMANIAN (1997) e agora com este novo trabalho, é importante que sejam feitas mais pesquisas que esclareçam indagações, como por exemplo: será que os aquareovírus que apresentam o mesmo modelo eletroforético, tendo sido isolados da mesma área geográfica e num mesmo período, são reisolados da mesma linhagem ou representam linhagens diferentes?

Outro aspecto relevante ao estudo eletroforético (SDS-PAGE) dos vírus aqui isolados, especificamente no caso do CLV, foi a visualização de um “aparente 12º segmento genômico” que poderia vir a contrariar a classificação deste vírus dentro do gênero *Aquareovirus*, composto por 11 segmentos genômicos RNAfd. No entanto, não se trata de um 12º segmento, pois segundo os conhecimentos associados aos aquareovírus, o que provavelmente ocorreu com a amostra do CLV foi um caso de mutação, sendo então representada por 2 populações que diferem uma da outra no peso molecular do 11º segmento genômico. Não se trata de uma contaminação da amostra do aquareovírus (CLV) com outro vírus de gênero diferente, fato este anteriormente relatado nas pesquisas de SUBRAMANIAN (1997), pois em todos os estudos feitos com aquareovírus até a presente data não existem relatos e nem a possibilidade de, num caso de contaminação, os 10 segmentos genômicos de cada vírus envolvido se sobreporem e somente o 11º segmento de cada divergirem em peso molecular. No caso da hipótese de se tratar de 2 aquareovírus com classificações diferentes (o CLV com outro aquareovírus), as chances são menores do que a ocorrência da mutação, pelos mesmos motivos anteriormente mencionados. A aplicação do “Plaque Purification”, que não foi realizado devido a falta de tempo hábil (prazo de 3 meses de permanência nos EUA), possivelmente confirmaria estas colocações.

Apesar de a diversidade genética entre os aquareovírus isolados ser indicada pelo polimorfismo dos modelos eletroforéticos, a extensão destas relações não pode ser determinada usando esta técnica (SDS-PAGE) (WALKER et al., 1980; FLORES et al., 1982). A forma mais direta de comparação da seqüência nucleotídica pode ser obtida testando o grau de hibridização dos segmentos genômicos em hibridizarem entre si. Neste contexto, a aplicação da hibridização recíproca RNA-RNA tem demonstrado excelentes resultados nas análises da relação genética, tanto entre cepas dos rotavírus (FLORES et al.,

1982, NAKAGOMI & NAKAGOMI, 1989, NAKAGOMI et al., 1989), quanto dos orbivírus (BODKIN & KNUDSON, 1986, KOWALIK & LI, 1987) e dos reovírus (BODKIN & KNUDSON, 1985a) Baseado nesta literatura, foi determinado o genogrupo do GCV, do CLV e do HRV, através dos resultados obtidos com a hibridização recíproca RNA-RNA “dot blot” (estringência média) destes vírus em associação com os representantes de cada genogrupo (A a F), assim como também foi feita a análise genética destes em relação ao SA11 (rotavírus grupo A). O CLV e o HRV pertencem ao genogrupo A e o GCV corresponde a um novo genogrupo que denominamos de G, de acordo com a seqüência da nomenclatura adotada por LUPIANI (1994) e SUBRAMANIAN (1997) quando estes grupos de aquareovírus foram designados de A a F através da aplicação da hibridização recíproca RNA-RNA “dot blot”.

Os genogrupos A e B, aqui representados respectivamente pelos aquareovírus SBR e LBS, mostraram hibridização cruzada sob condições de estringência média Estes resultados, apoiados pela literatura (LUPIANI, 1994, SUBRAMANIAN, 1997), sugerem que os vírus pertencentes aos genogrupos A e B provavelmente têm origem de uma fonte ancestral em comum, sendo a diversidade genética possivelmente explicada por fatores de rearranjo genético (“shift”) e pontos de mutação (“drift”) Contudo, há necessidade de se pesquisar estas possibilidades, trazendo informações e esclarecimentos futuros dentro destes aspectos.

A relação genética entre os aquareovírus e o rotavírus grupo A (SA11) foi também estudada através da hibridização RNA-RNA e assim como na literatura (SAMAL et al., 1990, LUPIANI, 1993a, SUBRAMANIAN, 1997), mais uma vez não foi constatada qualquer relação genética entre os aquareovírus e os rotavírus Estes resultados reforçam a classificação destes vírus “reo-like” dentro do gênero Aquareovirus na família Reoviridae, além da diversidade existente neste gênero, relatada anteriormente por LUPIANI (1993a) e SUBRAMANIAN (1997) Diante disto, é importante que novos estudos envolvendo os aquareovírus, tanto em nível biológico, quanto sorológico, sejam feitos, para aumentar a compreensão destes vírus, assim como dos genogrupos a que pertencem Desta forma, será

adquirido o conhecimento necessário para adotar medidas sanitárias adequadas a proteção das criações de animais aquáticos e do comércio com que esta atividade se relaciona.

6. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos neste trabalho foi possível chegar as seguintes conclusões:

- a) O trabalho de produção viral, envolvendo as células CHSE-214, foi de grande importância para: a familiarização com os estudos associados as células de peixes, utilizadas para a produção viral; o conhecimento da evolução e da formação sincicial (ECP) correspondente ao gênero *Aquareovirus*, principalmente com relação as características específicas deste crescimento viral respectivo ao GCV, CLV e HRV. Neste contexto, o uso das lâminas para Microscopia Óptica facilitou a fotomicrografia da formação sincicial dos mesmos;
- b) O emprego da microscopia eletrônica de transmissão, por contrastação negativa, possibilitou a análise das amostras purificadas do GCV, do CLV e do HRV, através da visualização das partículas virais e consequente confirmação da morfologia destes vírus dentro do gênero *Aquareovirus*;
- c) O uso da marcação no terminal 3' com o ^{32}P dos RNAs genômicos viabilizou o emprego de uma menor quantidade de material viral nas análises eletroforéticas em géis de poliacrilamida, o que não teria sido possível no caso do emprego do brometo de etídio ou da coloração por prata, que requerem uma maior quantidade de material viral nas análises do SDS-PAGE. Esta medida foi adotada devido a falta de tempo hábil para uma elevada produção viral a partir das células CHSE-214 e que fornecesse através da purificação

- viral uma grande quantidade de material viral, conseqüentemente foi possível garantir material viral suficiente para os estudos das etapas seguintes;
- d) O emprego da eletroforese em géis de poliacrilamida 7,5% (SDS-PAGE) permitiu a análise específica dos RNAsfd. Através desta técnica foi possível verificar que: 1) o GCV, o CLV e o HRV apresentam 11 segmentos genômicos característicos dos aquareovírus; 2) o GCV possui um modelo eletroforético diferente do CLV, do HRV e dos representantes dos genogrupos do gênero *Aquareovirus* (A a F), assim como do SA11 (rotavírus grupo A); 3) o CLV e o HRV possuem um modelo eletroforético semelhante entre si e correspondente ao SBR (genogrupo A), diferindo dos demais. No caso específico do CLV, observou-se uma “espécie de 12º segmento genômico” que de acordo com os conhecimentos associados aos aquareovírus esta observação inicial foi descartada, apesar de não ter sido viável a aplicação do "Plaque Purification". Diante das características associadas aos aquareovírus em que o CLV se enquadra bem, este fato foi esclarecido pela provável presença de 2 populações do próprio CLV representando a amostra deste vírus, diferindo estas no peso molecular do 11º segmento de cada. A ocorrência deste caso possivelmente está relacionado a uma mutação e não a um processo de contaminação;
- e) A aplicação da técnica de hibridização recíproca RNA-RNA “dot blot”, sob estridência média, permitiu a determinação do genogrupo do CLV e do HRV, correspondentes ao genogrupo A, assim como a descoberta de um novo genogrupo respectivo ao GCV, ou seja, o genogrupo G. Além destes importantes resultados, também foi constatada a ausência de uma relação genética entre os aquareovírus e os rotavírus, onde o SA11, empregado como controle na hibridização RNA-RNA “dot blot”, hibridizou somente com o próprio SA11, assim como a existência de uma relação genética entre o genogrupo A e o B, verificada pela hibridização cruzada sob condições de estridência média;

f) Os resultados e as análises feitas a partir desta Tese trouxeram novas informações a respeito do gênero Aquareovirus e beneficiou além do Brasil, em especial o Instituto de Veterinária da UFRRJ, com a abertura para um novo campo dentro das viroses, como também os EUA, com estes novos dados científicos. Outras pesquisas em associação com os EUA, que detêm a tecnologia e o conhecimento no que se refere aos vírus de animais aquáticos, poderão ser feitas futuramente. Diante disto, é importante mencionar que estudos como este ressaltam a necessidade de se iniciar estas pesquisas no Brasil, através do incentivo do governo para a implantação de laboratórios capacitados para análises destes vírus em animais aquáticos. Desta maneira, será possível garantir, de forma completa, a qualidade sanitária dos animais aquáticos envolvidos nas atividades da Aquacultura, assim como o comércio de importação (consumo interno) e exportação destes animais.

7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- ADAMS, W. R. and KRAFT, L. M. Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. Science, 141: 359-360, 1963.
- AHNE, W. Viral Infections of Aquatic Animals with Special Reference to Asian Aquaculture. Annual Review of Fish Diseases, 4: 375-388, 1994.
- AHNE, W. and KÖLBL, O. Occurrence of reoviruses in European cyprinid fishes (*Tinca tinca* Lin.; *Leuciscus cephalus* Lin.). Journal of Applied Ichthyology, 3: 139-141, 1987.
- AHNE, W. and KÖLBL, O. Some properties of reoviruses isolated from tench (*Tinca tinca*) and chub (*Leuciscus cephalus*). In: AHNE, W. and KURSTAK, E. (eds.), Viruses of lower vertebrates, Springer-Verlag, Berlin, 1989, p. 250-256.
- AMEND, D. F., McDOWELL, T. and HEDRICK, R. P. Characteristics of a previously unidentified virus from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 41: 807-811, 1984.
- AVAULT, J. Aquaculture. In: Lackey R. T. and Nielsen L. (Eds.), Fisheries management. Blackwell Scientific Publishers, Boston, 1987, p. 379-411.

- BAYA, A.; TORANZO, A. E.; NUÑEZ, S.; BARJA, J. L. and IETRICK, F. M. Association of a *Moraxella* sp. and reo-like virus with mortalities of striped bass, *Morone saxatilis*. In: PERKINS, F. O. and CHENG, T. C. (eds.), Pathology in Marine Science. Academic Press, New York, 1990, p. 91-99.
- BEER, J. Doenças Infecciosas em Animais Domésticos: Vírus, Clamídias, Rickéttsias e Microplasmose. São Paulo: Roca, 1988, p. 74-77.
- BISHAI, F. R.; BLASKOVIC, P. and GOODWIN, D. Physicochemical properties of Nebraska calf diarrhea virus hemagglutin. Can. J. Microbiol., 24: 1425, 1978.
- BISHOP, R. F.; DAVIDSON, G. P.; HOLMES, I. H. and RUCK, B. J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. Lancet, 2: 1281-1283, 1973.
- BODKIN, D. K. and KNUDSON, D. L. Assessment of sequence relatedness of double-stranded RNA genes by RNA-RNA blot hybridization. Journal of Virological Methods, 10: 45-52, 1985a.
- BODKIN, D. K. and KNUDSON, D. L. Genetic relatedness of palyam serogroup viruses by RNA-RNA blot hybridization. Journal of General Virology, 67: 683-691, 1986.
- BODKIN, D. K. and KNUDSON, D. L. Sequence relatedness of Palyam virus gene to cognate of Palyam serogroup viruses by RNA-RNA blot hybridization. Virology, 143: 55-62, 1985b.
- BRADY, Y. J. and PLUMB, J. A. Replication of four aquatic reoviruses in experimentally infected golden shiners (*Notemigonus crysoleucas*). Journal of Wildlife Diseases, 27: 463-466, 1991.
- BRADY, Y. J. and PLUMB, J. A. Serological comparison of golden shiner, chum salmon virus, reovirus 13p2 and catfish reovirus. Journal of Fish Diseases, 11: 441-443, 1988.

- CASTRUCCI, G.; FERRARI, M.; FRIGERI, F.; CILLI, V.; PERUCCA, L. and DONELLI, G. Isolation and characterization of cytopathic strains of rotavirus from rabbits. Archives of Virology, 83: 99, 1985.
- CHEN, B-S. and JIANG, Y. Morphological and physico-chemical characterization of the hemorrhagic virus of grass carp. Kexue Tongboa, 29: 832-835, 1984.
- CHEW-LIM, M.; CHONG, S. Y.; NGOH, G. H. and NG, M. K. Experimental reovirus infection of two species of groupers, *Plectropomus malacatus* and *Epinephelus tauvina*. Singapour Veterinary Journal, 15: 75-79, 1991.
- DAVIS, B. D. Microbiologia. 2. ed. São Paulo: Harper & Row do Brasil Ltda, 4: 1227, 1980.
- DOPAZO, C. P.; HETRICK, F. M. and SAMAL, S. K. Use of cDNA probes for diagnosis of infectious pancreatic necrosis virus. Journal of Fish Diseases, 17: 1-16, 1994.
- DOPAZO, C. P.; TORANZO, A. E.; SAMAL, S. K.; ROBERSON, B. S.; BAYA, A. and HETRICK, F. M. Antigenic relationships among rotaviruses isolated from fish. Journal of Fish Diseases, 15: 27-36, 1992.
- DUBOIS-DALCQ, M.; HOLMES, K. V. and RENTIER, B. Assembly of enveloped RNA viruses. Springer-Verlag, New York, 1984.
- ENGLAND, T. E. and UHLENBECK, O. C. 3'terminal labelling of RNA with T4 RNA ligase. Nature, London, 275: 560-561, 1978.
- ERICSON, B. L. ; GRAHAM, D. Y.; MASON, B. B. and ESTES, M. K. Identification, synthesis and modifications of simian rotavirus SA11 polypeptides in infected cells. Journal of Virology, 42: 825-839, 1982.

- ERICSON, B. L.; GRAHAM, D. Y.; MASON, B. B.; HANSSEN, H. H. and ESTES, M. K. Two types of glycoprotein precursor are produced by the simian rotavirus SA11. Virology, 127: 320-332, 1983.
- ESPEJO, R. T.; LÓPEZ, S. and ARIAS, C. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effects of trypsin. Journal of Virology, 37: 156-160, 1981.
- ESPEJO, R. T.; MUÑOZ, O.; SERAFIN, F. and ROMERO, P. Shift in the prevalent human rotavirus detected by ribonucleic acid segment differences. Infection and Immunity, 27: 351-354, 1980.
- ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: B.N. Fields and D. M. Knipe (eds.), Fields Virology. Raven Press, New York, 1990, p. 1329-1352.
- ESTES, M. K. Rotaviruses: Molecular Biology. In: R. G. Webster and A. Granoff (eds), Encyclopedia of Virology. Academic Press, London, 1994, p. 1282-1290.
- ESTES, M. K.; CRAWFORD, S. E.; PEÑARANDA, M. E. PETRIE, B. L.; BURNS, J. W.; CHAN, W.-K.; ERICSON, B.; SMITH, G. E. and SUMMERS, M. D. Synthesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expression system. Journal of Virology, 61: 1488-1494, 1987.
- ESTES, M. K.; GRAHAM, D. Y. and DIMITROV, D. H. The molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis. In: Melnick J. L. (ed.), Progress in Medical Virology. Karger, Basel, 1984, p.1-22.
- ESTES, M. K.; GRAHAM, D. Y. and MASON, B. B. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. Journal of Virology, 39: 879-888, 1981.
- ESTES, M. K.; GRAHAM, D. Y.; SMITH, E. M. and GERBA, C. P. Rotavirus stability and inactivation. Journal of General Virology, 43: 403, 1979.

- FENNER, F.; BACHMANN, P. A.; GIBBS, E. P.; MURPHY, F. A.; STUDDERT, M. J. and WHITE, D. O. Veterinary Virology. Academic Press Inc. Ltd., London, 1987a, p. 245-250.
- FENNER, F.; BACHMANN, P. A.; GIBBS, E. P.; MURPHY, F. A.; STUDDERT, M. J. and WHITE, D. O. Veterinary Virology. Academic Press Inc. Ltd., London, 1987b, p. 590-593.
- FLEWET, T. H.; BRYDEN, A. S. and DAVIES, H. Virus particles in gastroenteritis. Lancet, 2: 1497, 1973.
- FLORES, J.; PÉREZ, I.; WHITE, L.; PÉREZ, M.; KALICA, A. R.; MARQUINA, R.; WYATT, R. G.; KAPIKIAN, A. Z. and CHANOCK, R. M. Genetic relatedness among human rotaviruses as determined by RNA hybridization. Infection and Immunity, 37: 648-655, 1982.
- FRANCKI, R. I. B.; FAUQUET, C. M.; KNUDSON, D. L. and BROWN, F. (eds.). Classification and nomenclature of viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer, Wien, New York. Archives of Virology, 2 (Supl): 186-199, 1991.
- GAO, H. A study on inactivated vaccine for the hemorrhagic disease of grass carp. Fish Disease of China, 1979, p. 10-13.
- HEDRICK, R. P.; GROFF, J. M.; McDOWELL, T. and WINGFIELD, W. H. Characteristics of reoviruses isolated from cyprinid fishes in California, USA. In: AHNE, W. and KURSTAK, E. (eds.), Viruses of lower vertebrates. Springer-Verlag, Berlin, 1989, p. 241-251.
- HEDRICK, R. P.; ROSEMARK, R.; AROSTEIN, D.; WINTON, J. R.; McDOWELL, T. and AMEND, D.F. Characteristics of a new reovirus from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Journal of General Virology, 65: 1527-1534, 1984.

- HELMEMBERGER-JONES, M. and PATTON, J. T. Characterization of subviral particles in cells infected with simian rotavirus SA11. Virology, 155: 655-665, 1986.
- HETRICK, F. M. and HEDRICK, R. P. New viruses described in finfish from 1988-1992. Annual Review of Fish Diseases, 3: 187-207, 1993.
- HETRICK, F. M.; SAMAL, S. K.; LUPIANI, B.; DOPAZO, C. P.; SUBRAMANIAN, K. and MOHANTY, S. B. Members of the family *Reoviridae* found in aquatic animals. Proceedings of the OJI Internatinal Symposium on Salmonid Diseases. Hokkaido University Press, Sapporo Japan, 1992, p. 33-40.
- HOSHINO, Y. SERENO, M. M.; MIDTHUN, K.; FLORES, J.; KAPIKIAN, A. Z. and CHANOCK, R. M. Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. Proceedings of the National Academy of Science USA, 82: 8701-8704, 1985.
- HRDY, D. B.; ROSEN, L. and FIELDS, B. N. Polymorphism of the migration of double stranded RNA genome segments of reovirus isolates from human, cattle and mice. Journal of Virology, 31: 104-111, 1979.
- HSU, Y.-L.; CHEN, B.-S. and WU, J.-L. Characteristics of a new reo-like virus isolated from landlocked salmon (*Oncorhynchus mason Brevoort*). Fish Pathology, 24: 37-45, 1989.
- IHARA, T.; SAMEJIMA, T.; KUWAHARA, H. and TAJIMA, M. Isolation of new serotypes of bovine rotavirus. Archives of Virology, 78: 145, 1983.
- JIANG, Y. and AHNE, W. Some properties of the etiological agent of the hemorrhagic disease of grass carp and black carp. In: AHNE, W. and KURSTAK, E. (eds.), Viruses of lower vertebrates. Springer-Verlag, Berlin, 1989, p. 227-239.

- JIANG, Y.; AIHNE, W.; LI, Y. and OGAWA, M. Isolation of an aquareovirus from common carp (*Cyprinus carpio*) in the P. R. China. Proceedings Second International Symposium on Virus of Lower Vertebrates. Oregon State University, Corvallis, USA, 1991, p. 287-292.
- KALICA, A. R.; GREENBERG, H. B.; WATT, R. G.; FLORES, J.; SERENO, M. M.; KAPIKIAN, A. Z. and CHANOCK, R. M. Genes of human (strain WA) and bovine (strain UK) rotaviruses that code for neutralization and subgroup antigens. Virology, 112: 385-390, 1981.
- KAPIKIAN, A. Z. and CHANOCK, R. M. Rotaviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; CHANOCK, R.M.; MELNICK, J. L.; ROIZMAN, B. and SHOPE, R. E. (eds.). Virology, Raven Press, New York, 1985, p. 863-906.
- KOWALIK, T. F. and LI, J. K. K. The genetic relatedness of United States prototype bluetongue viruses by RNA-RNA hybridization. Virology, 158: 276-284, 1987.
- KUBITZA, F. Panorama de Aquicultura, 9 (5): 44-45, 1999.
- KULSKI, J. K. and NORVAL, M. Nucleic acid probes in diagnosis of viral diseases of man. Archives of Virology, 83: 3-15, 1985.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, London, 227: 680-685, 1970.
- LA PATRA, S. E. and HEDRICK, R. P. Pathogenesis of selected aquareovirus isolates in rainbow trout. American Fisheries Society Fish Health, section Newsletter, 23: 3-4, 1995.
- LUPIANI, B. M. Genetic and Biochemical Analysis of Aquareoviruses. 1994. Thesis (Doctor of Philosophy) - Faculty of the Graduate School, University of Maryland, 1994.

- LUPIANI, B.; DOPAZO, C. P.; LEDO, A.; FOUZ, B.; BARJA, J. L.; HETRICK, F. M. and TORANZO, A. E. New syndrome of bacterial and viral etiology in cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Journal of Aquatic Animal Health, 1: 197-204, 1989.
- LUPIANI, B.; HETRICK, F. M. and SAMAL, S. K. Genetic analysis of aquareoviruses using reciprocal RNA-RNA hybridization. Virology, 197: 475-479, 1993a.
- LUPIANI, B.; SUBRAMANIAN, K.; HETRICK, F. M. and SAMAL, S. K. A genetic probe for the identification of the turbot aquareovirus in infected cell cultures. Diseases of Aquatic Organisms, 15: 187-192, 1993b.
- LUPIANI, B. M.; SUBRAMANIAN, K. and SAMAL, S. K. Aquareoviruses. Annual Review of Fish Diseases, 5: 175-208, 1995.
- MALHERBE, H. H.; HARWIN, R. and ULRICH, M. The citopathic effect of vervet monkey viruses. South African Medical Journal, 37: 407-411, 1963.
- MALHERBE, H. H. and STRICKLAND-CHOMLEY, M. Simian virus SA11 and the related O agent. Arch. Gesamte Virusforsch, 22: 238, 1967.
- MARI, J. and BONAMI, J-R. W2 virus infection of the crustacean *Carcinus mediterraneus*: a reovirus disease. Journal of General Virology, 69: 561-571, 1988.
- MARSHALL, S. H.; SAMAL, S. K.; McPHILLIPS, T. H.; MOORE, A. R. and HETRICK, F. M. Isolation of a rotavirus from smelt, *Osmerus mordax* (Mitchell). Journal of Fish Diseases, 13: 87-91, 1990.
- MAYR, A. and GUERREIRO, M. G. Virologia Veterinária. 2. ed. Porto Alegre - R.S.: Sulina, 1981, p. 220-248.
- McCRAE, M. A. and McCORQUODALE, J. G. The molecular biology of rotaviruses. II. Identification of the protein-coding assignments of calf rotavirus genome RNA species. Virology, 117: 435-443, 1982.

- McCRAE, M. A. and McCORQUODALE, J. G. The molecular biology of rotaviruses. V. Terminal structure of RNA species. Virology, 126: 204-212, 1983.
- MEYERS, T. R. A reo-like virus isolated from juvenile American oysters (*Crassostrea virginica*). Journal of General Virology, 43: 203-212, 1979.
- MEYERS, T. R. Experimental pathogenicity of reovirus 13p2 for juvenil American oysters *Crassotrea virginica* (Gmelin) and bluegill fingerlings *Lepomis macrochirus* (Rafinesque). Journal of Fish Diseases, 3: 187-201, 1980.
- MEYERS, T. R. Serological and histopathological responses of rainbow trout, *Salmon giardneri* Richardson, to experimental infection with 13p2 reovirus. Journal of Fish Diseases, 6: 277-292, 1983.
- MOHANTY, S. B. and DUTTA, S. K. Veterinary Virology. Lea & Febiger, Philadelphia, P. A., 1981, p. 3-4.
- NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T.; AKATANI, K. and IKEGAMI, N. Identification of rotavirus genogroup by RNA-RNA hybridization. Molecular and Celular Probes, 3: 251-261, 1989.
- NAKAGOMI, T. and NAKAGOMI, O. RNA-RNA hybridization identifies a human rotavirus that is genetically related to feline rotavirus. Journal of Virology, 63: 1431-1434, 1989.
- NASH, M. and SHARIFF, M. A reo-like virus observed in the tiger prawn, *Panaeus monodon* Frabicius, from Malaysia. Journal of Fish Diseases, 11: 531-535, 1988.
- NEWMAN, J. F. E.; BROWN, F.; BRIDGER, J. C. and WOODE, G. N. Characterization of a rotavirus. Nature, London, 285: 631-633, 1975.

- PEDLEY, S.; BRIDGER, J. C.; BROW, J. F. and McCRAE, M. A. Molecular characterization of rotaviruses with distinct group antigens. Journal General Virology, 64: 2093-2101, 1983.
- PIZARRO, J. L.; SANDINO, A. M.; PIZARRO, J. M.; FERNÁNDEZ, J. and SPENCER, E. Characterization of rotavirus guanylyltransferase activity associated with polypeptide VP3. Journal of General Virology, 72: 325-332, 1991.
- PLUMB, J. A.; BOWSER, P. R.; GRIZZLE, J. M. and MITCHELL, A. J. Fish viruses: a double-stranded RNA icosahedral virus from a North American Cyprinid. Journal of Fisheries Research Board of Canada, 36: 1390-1394, 1979.
- RAMIG, R. F.; CROSS, R. K. and FIELDS, B. N. Genome RNAs and polypeptides of reovirus serotypes 1, 2 and 3. Virology, 22: 726-733, 1977.
- RIMSTAD, E.; KRONA, R.; HORNES, E.; OLVISK, O. and HYLLSETH, B. Detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) RNA by hybridization with an oligonucleotide DNA probe. Veterinary Microbiology, 23: 211-219, 1990.
- RIVAS, C.; CEPEDA, C.; BANDIN, I.; DOPAZO, C. P. and BARJA, J. L. Inability of the turbot aquareovirus to replicate in rainbow trout. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 15: 20-22, 1995.
- RODGER, S. M.; BISHOP, R. F.; BIRCH, C.; McLEAN, B. and HOLMES, I. H. Molecular epidemiology of human rotaviruses in Melbourne, Australia, from 1973 to 1979. as determined by eletrophoresis of genome ribonucleic acid. Journal of Clinical Microbiology, 13: 272-278, 1981.
- RODGER, S. M. and HOLMES, I. H. Comparison of the genomes of simian, bovine and human rotaviruses by gel eletrophoresis and detection of genomic variation among bovine isolates. Journal of Virology, 30: 839- 846, 1979.

- RODGER, S. M.; SCHNAGL, R. D. and HOLMES, I. H. Biochemical and biophysical characteristics of diarrhea viruses of human and calf origin. Journal of Virology, 16: 1229-1235, 1975.
- SAMAL, S. K.; DOPAZO, C. P.; McPHILLIPS, T. H.; BAYA, A.; MOHANTY, S. B. and HETRICK, F. M. Molecular characterization of a rotavirus-like virus isolated from striped bass (*Morone saxatilis*). Journal of Virology, 64: 52335-5240, 1990.
- SAMAL, S. K.; DOPAZO, C. P.; SUBRAMANIAN, K.; LUPIANI, B.; MOHANTY, S. B. and HETRICK, F. M. Heterogeneity in the genome RNAs and polypeptides of five members of a novel group of rota-like viruses isolated from aquatic animals. Journal of General Virology, 72: 181-184, 1991.
- SCOTT, A. Piratas da Célula. 2. ed. Lisboa: Universo da Ciência- edições 70, 1987, p. 15-21.
- SCHWEDLER, T. E. and PLUMB, J. A. Fish viruses: serologic comparison of the golden shiner and infectious pancreatic necroses viruses. Journal of Wildlife Diseases, 16: 597-599, 1980.
- SHAW, A. L.; SAMAL, S. K.; SUBRAMANIAN, K. and PRASAD, B. V. V. The structure of aquareovirus shows how the different geometries of the two layers of the capsid are reconciled to provide symmetrical interactions and stabilization. Research Article Aquareovirus Structure, 4 (8): 957-967, 1996.
- SMITH, R. E.; ZWEERINK, H. J. and JOKLIK, W. K. Polypeptide component of virions, top component and cores of *Reovirus* Type 3. Virology, 39: 791-810, 1969.
- SOARES, J. L. Biologia. São Paulo: Scipione, 1: 36-37, 1988.

- SUBRAMANIAN, K. Molecular Characterization of the Polypeptides of an Aquareovirus. 1997. Thesis (Doctor of Philosophy) - Faculty of the Graduate School, University of Maryland, 1997.
- SUBRAMANIAN, K.; LUPIANI, B.; HETRICK, F. M. and SAMAL, S. K. Detection of aquareovirus RNA in fish tissues by nucleic acid hybridization with cloned cDNA probe. Journal of Clinical Microbiology, 31: 1612-1614, 1993.
- SUBRAMANIAN, K.; McPHILLIPS, T. H. and SAMAL, S. K. Characterization of the polypeptides and determination of genome coding assignments of an aquareovirus. Virology, 205: 75-81, 1994.
- TRUST, T. J. Pathogenesis of Infectious Diseases of Fish. Annual Review Microbiol., 40: 479-502, 1986.
- VALENZUELA, S.; PIZARRO, J.; SANDINO, A. M.; VASQUEZ, M.; FERNÁNDEZ, J.; HERNANDEZ, O.; PATTON, J. and SPENCER, E. Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP. Identification of the viral RNA polymerase. Journal of Virology, 65: 3964-3967, 1991.
- VARNER, P. W. and LEWIS, D. H. Characterization of a virus associated with head and lateral line erosion syndrome in marine angelfish. Journal of Aquatic Animal Health, 3: 198-205, 1991.
- VERSTEEG, J. A Colour Atlas of Virology. Wolfe Medical Publications Ltd., London, 1985, p. 188-229.
- VISCIDI, R. P. and YOLKEN, R. G. Advances in the use of nucleic acid probes in diagnosis of viral diseases of man. Archives of Virology, 97: 151-165, 1987.

- WALKER, P. J.; MANSBRIDGE, J. N. and GORMAN, B. M. Genetic analysis of orbiviruses by using T1 oligonucleotide fingerprints. Journal of Virology, 34: 583-591, 1980.
- WELCH, A. B. and THOMPSON, T. L. Physicochemical characterization of a neonatal calf diarrhea virus. Can. J. Microbiol., 37: 295, 1972.
- WELCH, S.-K.; CRAWFORD, S. E. and ESTES, M. K. The rotavirus SA11 genome segment 11 protein is a monstructural phosphoprotein. Journal of Virology, 63: 3974-3982, 1989.
- WINTON, J. R. Picornaviruses and reoviruses of fishes. In: W. Ahne & E. Kurstak (eds.), Viruses of lower vertebrates. Springer-Verlag, Berlin, 1989, p. 217-226.
- WINTON, J. R.; ARAKAWAC, K.; LANNAN, C. N. and FRYER, J. L. Isolation of a reovirus from coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Oregon, USA. In: AHNE, W. and KURSTAK, E. (eds.), Viruses of lower vertebrates. Springer-Verlag, Berlin, 1989a, p.257-269.
- WINTON, J. R.; LANNAN, C. N. and FRYER, J. L. Further characterization of a new reovirus of poikilothermic vertebrates. In: COMPRAS, R. W. and BISHOP, D. H. L. (eds.), Double stranded RNA viruses. Elsevier, New York, 1983, p. 231-236.
- WINTON, J. R.; LANNAN, C. N.; FRYER, J. L.; HEDRICK, R. P.; MEYERS, T. R.; PLUMB, J. A. and YAMAMOTO, T. Morphological and biochemical properties of four members of a novel group of reoviruses isolated from aquatic animals. Journal of General Virology, 68: 353-364, 1987.
- WINTON, J. R.; LANNAN, C. N.; FRYER, J. L. and KIMURA, T. Isolation of a new reovirus from chum salmon in Japan. Fish Pathology, 15: 155-162, 1981.

- WINTON, J. R.; LANNAN, C. N.; YOSHIMIZU, M. and KIMURA, T. Response of salmonid fish to artificial infection with chum salmon virus. In: AHNE, W. and KURSTAK, E. (eds.), Viruses of lower vertebrates. Springer-Verlag, Berlin, 1989b, p. 270-272.
- WOLF, K. Fish Viruses and Fish Viral Diseases. Cornell University Press, Ithaca, New York, 1988, p. 1-17.
- ZIZZIS, G. and LAMBERT, J. P. Different serotypes of human rotaviruses. Lancet. 1: 38-39, 1975.

ANEXO

8.1 GEL SEPARADOR A 7,5%

Acrilamida/ bis. a 30%	15,0 mL
1.0 M Tris-HCl, pH 8,8	22,6 mL
SDS 10%	0,60 mL
H ₂ O destilada	16,8 mL
TEMED	40,0 µL
Persulfato de amônia a 10%	200,0 µL

8.2 GEL “STACKING” A 5%

Acrilamida/ bis. a 30%	1,70 mL
1.0 M Tris-HCl, pH 6,8	1,30 mL
SDS 10%	0,10 mL
H ₂ O destilada	7,0 mL
TEMED	5,0 µL
Persulfato de amônia a 10%	50,0 µL

8.3 PBS (TAMPÃO SALINA FOSFATO), pH 7,4 - 7,5; 0,15 M

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2,9 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,0mL
Ajustar o pH 7,4	

8.4 SOLUÇÃO DE ACRILAMIDA E BISACRILAMIDA A 30%

Acrilamida	29,2 g
Bisacrilamida	0,8 g
H ₂ O destilada q.s.p.	100,0 mL

Filtrar e armazenar a 4 °C ao abrigo da luz. Esta solução é estável por um mês.

8.5 SOLUÇÃO ESTOQUE DE SDS A 10%

SDS	10,0 g
H ₂ O destilada q.s.p.	100,0 mL

Dissolver o SDS em H₂O, com agitador suave e ajustar para 100,0 mL.

8.6 SOLUÇÃO ESTOQUE 0,1x SSC / 0,1% SDS

20x SSC	5,0 mL
SDS 10%	10,0 mL
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,0mL

8.7 SOLUÇÃO ESTOQUE 1x SSC / 0,1% SDS

20x SSC	50,0 mL
SDS 10%	10,0 mL
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,0mL

8.8 SOLUÇÃO ESTOQUE (20x) DE SSC

NaCl	175,3 g
Citrato de Sódio	88,2 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,0mL

Dissolver o NaCl e o Citrato de Sódio em H₂O, com agitação suave. Ajustar o pH para 7,0 com HCl 10 N e o volume para 1000,0 mL. Estocar a 4 °C.

8.9 SOLUÇÃO ESTOQUE (5x) DE TAMPÃO DE CORRIDA PARA SDS-PAGE

Tris	15,0 g
Glicina	72,0 g
SDS a 10%	50,0 mL
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,0mL

Armazenar a 4 °C. Aquecer a 37 °C antes de usar, caso ocorra precipitação.

8.10 TE (TAMPÃO 10 mM TRIS [pH 7,4] / 1,0 mM EDTA)

1,0 M Tris, pH 7,4	10,0 mL
500 mM EDTA	2,0 mL
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,0mL.

8.11 TRIS, 1,0 M

Tris	12,10 g
H ₂ O destilada	100,0 mL.

Dissolver em aproximadamente 60,0 mL. Ajustar para 100,0 mL após dissolução.
Armazenar a 4 °C.

8.12 TRIS-HCl, 1,0 M, pH 6,8

Tris	60,55 g
H ₂ O destilada q.s.p.	500,0 mL
Titular o pH para 6,8 com HCl 6N. Armazenar a 4 °C ao abrigo da luz.	

8.13 TRIS-HCl, 1,0 M, pH 8,8

Tris	62,55 g
H ₂ O destilada q.s.p.	500,0 mL
Titular o pH para 8,8 com HCl 6N. Armazenar a 4 °C ao abrigo da luz.	