

Replicação de vírus Oropouche em macrófagos

Oropouche virus replication in macrophages

Alcir Humberto Rodrigues¹

Eurico de Arruda Neto²

Rodrigo Ivo Marques dos Santos³

Resumo

O vírus Oropouche (ORO) pertence à família Bunyaviridae, gênero *Orthobunyavirus*, sorogrupo Simbu, e é a segunda causa mais freqüente de arbovirose febril no Brasil, depois da dengue. Estima-se que mais de meio milhão de casos de febre do Oropouche tenham ocorrido no Brasil nos últimos 30 anos. Com o aquecimento global do planeta, desmatamentos e conseqüente redistribuição de insetos vetores e animais reservatórios, há risco de disseminação de vírus Oropouche para outras regiões do Brasil e da América do Sul. Para descrever a patogenia da infecção por Oropouche, o objetivo deste trabalho foi identificar a ocorrência de replicação de vírus Oropouche em macrófagos de hamster *in vitro*. Neste experimento utilizou-se hamsters (*Mesocricetus auratus*) como fonte para obtenção de macrófagos peritoniais. Realizou-se estimulação/ativação (cavidade abdominal), sacrifício (48 horas), lavagem da cavidade abdominal e punção. Posteriormente, efetuou-se a cultura celular e infecção com vírus Oropouche da cepa de referência BeAn19991. Amostras foram coletadas em diversos tempos, semeadas em cultura de células Vero em diluições seriadas decimais. A leitura, pós-semeadura, foi verificada através de efeito citopático. Os resultados evidenciam que houve replicação do vírus Oropouche em macrófagos, concordando com outros estudos nos quais vários tipos de vírus são capazes de se replicar em macrófagos, inclusive da mesma família do Oropouche. Entretanto tais estudos foram apenas demonstrativos e não quantitativos. Apenas um estudo, também em *in vitro*, demonstrou a replicação do vírus Oropouche em células Hela, no qual foi obtido o

1 M. Sc.; Cirurgião- Dentista; e-mail: ahrodrig@rbp.fmrp.usp.br

2 Dr.; Médico; Prof. da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo-FMRP/USP; e-mail: aeneto@fmrp.usp.br

3 M. Sc.; Biólogo; Doutorando do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP); e-mail: risantos@rbp.fmrp.usp.br

título de $10^{7.5}$ TCID₅₀. O presente estudo obteve um título de $10^{5.5}$ TCID₅₀, demonstrando uma menor eficiência quando comparado ao estudo anterior.

Palavras-chave: vírus Oropouche; macrófagos; patogênese viral.

Abstract

The Oropouche virus (ORO) belong to the family Bunyaviridae, genus *Orthobunyavirus*, serogroup Simbu, and is the second most frequent cause of arboviral febrile illness in Brazil, after dengue. Over 0.5 million cases of ORO fever happened in Brazil in the past 30 years. With the global warming, deforestation and redistribution of vectors and reservoir animals, have increased the risk of ORO virus dissemination to others areas of South America. For description ORO pathogenesis infection the purpose of this work was to identify *in vitro* the occurrence of Oropouche virus replication in macrophages. In this study to make used syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) as a source of peritoneal macrophages. Activation/stimulation was done (abdominal cavity), sacrifice (48 hours), peritoneal washing was performed and puncture. Cells recovered from the peritoneal lavage were layered and infected with ORO strain BeAn19991. Samples were collected at different times, sowed onto monolayer of Vero cells at serial decimal dilutions. Virus growth was detected by cytophatic effect. The results give evidence of ORO virus replication in macrophages, in accordance with others studies to which some types of virus are capable of reply in macrophages, also of the same family of ORO virus. However such studies had been only demonstrative and not quantitative. But a study, also *in vitro*, demonstrated ORO virus replication in HeLa cells in witch was obtained titers $10^{7.5}$ TCID₅₀. The present study obtained titers $10^{5.5}$ TCID₅₀ demonstrating a lesser efficiency when compared with the previous study.

Key words: Oropouche virus; macrophages; viral pathogenesis.

Introdução

Vírus da família Bunyaviridae ocupam destacada posição entre os agentes causadores de doenças infecciosas emergentes (GUBLER, 1998). Entre os membros dessa família destacam-se os Hantavírus (causadores de doenças febris e severas síndromes pulmonares com

hipotensão) e o arbovírus Oropouche, importante causa de doença febril em nosso país (GUBLER, 1998; SCHMALJOHN; HOOPER, 2001). O vírus Oropouche se evidencia pelo elevado número de casos de infecção aguda febril. Ressalta-se que o vírus é responsável pela segunda causa mais freqüente de arbovirose urbana no Brasil, depois da dengue, bem

como seu potencial de disseminação para áreas urbanas infestadas pelo inseto vetor (PINHEIRO et al. 1997; SCHMALJOHN; HOOPER, 2001).

A febre do Oropouche é freqüentemente destacada como um exemplo de zoonose viral emergente, cuja freqüência tem crescido em decorrência do desmatamento e da criação de novas fronteiras agropecuárias (GIBBONS, 1993; MURPHY, 1998). Estima-se em mais de meio milhão o número de casos ocorridos no Brasil nos últimos 30 anos (PINHEIRO et al. 1997). O verdadeiro impacto do vírus Oropouche na Amazônia deve ser maior, pois, o caráter inespecífico da doença febril pode levar a subestimar sua freqüência. Inquéritos sorológicos efetuados em períodos não epidêmicos têm revelado freqüências de soropositividade para Oropouche entre 0 e 10,7% em diferentes sub-populações amazônicas (PINHEIRO et al. 1997).

Na região Sudeste também foram notadas evidências de circulação do vírus Oropouche. Para conhecer os níveis de anticorpos para arbovírus realizaram-se, na cidade e região de Ribeirão Preto, testes sorológicos de inibição de hemaglutinação, neutralização e fixação do complemento. Os resultados demonstraram a presença de anticorpos contra Oropouche, ainda que com baixa incidência de 1% (FIGUEIREDO; TRAVASSOS DA ROSA; FIORRILO, 1986). Em 2001, o vírus Oropouche da cepa de referência BeAN 626998 foi isolado de uma amostra do fígado de um macaco encontrado morto no estado de Minas Gerais (NUNES et al. 2005).

O vírus Oropouche ocorre na natureza em dois ciclos distintos:

silvestre e urbano. O ciclo silvestre silencioso é responsável pela manutenção do vírus e vários achados apontam preguiças e macacos como seus principais hospedeiros vertebrados, embora certas espécies de aves silvestres possam ser hospedeiros alternativos. Pouco se conhece, entretanto, quanto aos transmissores desse arbovírus em ambiente silvestre. No ciclo urbano, são assinaladas duas espécies de insetos como vetores do vírus Oropouche: o maruim *Culicoides paraensis* é o vetor primário e o mosquito *Culex p. quinquefasciatus* é o vetor secundário. Estudos efetuados com hamsters demonstraram que maruins são mais eficazes na transmissão. A prova decisiva do papel do *C. paraensis* como vetor urbano do vírus Oropouche foi obtida no Instituto Evandro Chagas (Belém-PA) pela transmissão do agente de homem para hamster através da picada do maruim. Ficou assim demonstrado, pela primeira vez no mundo, que maruins podem atuar como transmissores de arboviroses humanas de importância em saúde pública (PINHEIRO et al. 1982). O elo entre o ciclo silvestre e o urbano parece ser o próprio homem que, após contrair a infecção em áreas florestais enzoóticas, regressa em estado virêmico à cidade e infecta o *C. paraensis*. (TRAVASSOS DA ROSA, 1998).

Pouco se conhece sobre a patogênese da febre do Oropouche. Sabe-se que o agente produz uma infecção sistêmica em humanos, com fase virêmica. A confirmação da infecção por vírus Oropouche é feita por isolamento viral do sangue do paciente ou realizando testes sorológicos específicos para o vírus (PINHEIRO; TRAVASSOS DA

ROSA; VASCONCELOS, 1994). A fim de isolar o vírus, as amostras de sangue precisam ser obtidas durante os primeiros cinco dias da doença, de preferência nos dois primeiros, quando a viremia é máxima. O vírus pode ser isolado do soro de pacientes por meio de inoculações intracerebral ou intraperitoneal em camundongos recém-nascidos (1 a 3 dias) ou em hamsters jovens (2 a 3 semanas). Isolados virais podem ser obtidos em diferentes culturas de células, tais como Vero e BHK-21. O vírus isolado tem sido identificado por reação de fixação de complemento ou neutralização, usando fluido ascítico ou anti-soro específico para Oropouche.

O sorodiagnóstico é feito pela detecção de anticorpo em amostras de soros pareadas, obtidas durante a fase aguda e de convalescença da doença, usando inibição de hemaglutinação, fixação de complemento ou neutralização. Uma análise positiva de captura de anticorpo IgM, por reação enzimática (*MAC-ELISA*) sobre uma única amostra de soro, fornece diagnóstico presuntivo de infecção recente, particularmente na presença de quadro clínico compatível com a doença; o teste usualmente é positivo após o quinto dia da doença (PINHEIRO; TRAVASSOS DA ROSA; VASCONCELOS, 1998).

Outro método de imunoenensaio enzimático (ELISA), utilizando uma proteína recombinante do nucleocapsídeo do vírus Oropouche, foi desenvolvido para facilitar a detecção do vírus. Este antígeno apresenta características de alta sensibilidade e especificidade em substituição ao vírus completo, facilitando o manejo e diminuindo riscos

de contaminação e infecção (SAEED et al. 2000).

Além dos testes citados, atualmente existem os testes moleculares, mais rápidos e sensíveis. Além da RT-Nested-PCR (MORELI et al. 2002), há um método de RT-PCR ainda mais sensível que apresenta níveis de detecção em torno de 10^4 a 10^1 partículas virais, podendo ser usado já no primeiro dia de doença (WEIDMANN et al. 2003).

Modelos experimentais são essenciais para estudar mecanismos patogênicos de infecções. A inoculação de camundongos, com vírus Oropouche, tem sido realizada para fins de isolamento, mas há poucos estudos experimentais de patogênese. Camundongos recém-nascidos, inoculados pela via intracebral, desenvolvem sinais de encefalite focal 24 a 48 horas após a inoculação (ARAÚJO et al. 1979). Um importante estudo experimental foi realizado por Araújo e colaboradores (ARAÚJO et al. 1978) que inocularam de hamster pela via intracerebral, demonstrando o viscerotropismo do vírus Oropouche.

Experimentos em hamsters jovens inoculados por via intracerebral com Oropouche demonstraram que o vírus possui propriedades hepatovisceotrópicas, com necrose isolada de hepatócitos ou necrose focal, e envolvimento de células de Kupffer, exibindo hiperplasia reativa. Os animais invariavelmente sucumbem à infecção (ARAÚJO et al. 1978). Tais achados não foram verificados no modelo em camundongo (DIAS apud ARAÚJO et al. 1978).

Conhecendo o relato prévio de Araújo e colaboradores (ARAÚJO et

al. 1978), foi realizada a caracterização de um modelo experimental de infecção subcutânea por vírus Oropouche em hamster (*Mesocricetus auratus*) (RODRIGUES, 2004).

Com base no modelo experimental, desenvolvido em hamster, a partir da infecção subcutânea na coxa, apontou-se a possibilidade de o vírus se disseminar para o fígado e cérebro por via hematológica, utilizando os macrófagos como vetores. Desta forma o presente estudo visou verificar a ocorrência de replicação de vírus Oropouche em macrófagos.

Objetivo

Identificar a ocorrência de replicação de vírus Oropouche em macrófagos de hamster *in vitro*.

Método

1 - Obtenção e quantificação das células

Neste experimento utilizou-se hamsters sírios (*M. auratus*) como fonte para obtenção de macrófagos peritoniais. Com seringa e agulha descartáveis esterilizadas, foi introduzida uma quantidade de 3 ml de Tioglicolato de Sódio a 3% (Difco Laboratories, USA) na cavidade abdominal de cada animal. Aguardou-se um período de 48 horas para estimulação/ativação dos macrófagos. Após este período os animais foram sacrificados e colocados em um suporte, onde ficaram imobilizados pelas patas com o abdômen voltado para cima. Feito a anti-sepsia com álcool iodado a 0,3%, o peritônio dos hamsters foi exposto, realizando-se um corte com tesoura de ponta fina, aproximadamente de 2 cm

e depois a pele distendida suavemente, com auxílio de duas pinças. A seguir, com seringa e agulha descartáveis, introduziu-se na cavidade abdominal dos hamsters 5 mL de RPMI-1640 (Gibco-USA). Após massagem digital o conteúdo foi puncionado (pressão negativa), através da mesma seringa e agulha. Após remoção da agulha o conteúdo de todos os animais (em torno de 25 mL) foi depositado vagarosamente em um tubo de 50 mL (Corning Incorporated, NY 14831, USA). O lavado peritoneal foi, então centrifugado sob refrigeração (22°C) à 1000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. A *pellet* de células foi ressuspensa utilizando 25 mL de meio de cultura RPMI -1640 (Gibco-USA) com 3% de soro fetal bovino (Gibco - USA). Da suspensão celular 10µl foram removidos e introduzidos na câmara de cristal de Neubauer (Boeco, Germany) para contagem celular sob microscópio óptico invertido (Olympus CX31, Japan), utilizando a objetiva de 40X de aumento. As células obtidas foram quantificadas e a viabilidade avaliada usando Trypan Blue (Gibco-BRL)

Preparo da Cultura de Células

Para cultura de célula foi utilizada uma placa de cultura de tecidos estéreis (Corning Incorporated, NY 14931, USA) de 24 poços (24 wells). Cada poço mede 1.9 cm² (15.6 mm de diâmetro) e acomoda aproximadamente 10⁵ células/cm² de uma cultura de células 100% confluenta. Utilizou-se 1 mL da suspensão celular para semear cada poço. Seguida a semeadura, a placa foi colocada em incubadora a 37°C contendo uma tensão

de 5,0% de CO₂ e umidade de 95% por 24 horas. Após a incubação (para adesão das células), o sobrenadante foi removido e os poços lavados cuidadosamente com 1 mL solução tamponada de fosfato - PBS, pH 7,4 (Gibco). Este procedimento foi repetido mais duas vezes para remover completamente as células que não aderiram à placa.

Infecção da Cultura de Células

Cada poço foi infectado com 10µl do inóculo contendo 10^{5,25} TCID₅₀/100µL de vírus Oropouche da cepa de referência BeAn19991, amplificado em cérebro de camundongo suíço. Foi utilizado aproximadamente o M.O.I. (Multiple infection of cell monolayers after inoculation) (HAHON, 1967) de 0,1 vírus por célula. Após a inoculação a placa foi incubada em câmara fria a 4°C, por duas horas, para adsorção do vírus pela célula. A seguir cada poço foi lavado cuidadosamente, por duas vezes, com 1 mL solução tamponada de fosfato - PBS, pH 7,4 (Gibco), para eliminar os vírus que não foram adsorvidos pelas células. Após as lavagens foram adicionados a cada poço 500µl de meio de cultura RPMI -1640 (Gibco), com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e a placa foi incubada a 37°C em estufa contendo uma tensão de 5,0% de CO₂ e umidade de 95%.

Coletas

As coletas foram realizadas nos tempos 2, 3, 18, 24, 48 e 65 horas pós-infecção. Primeiramente foi coletado o sobrenadante e, depois, com auxílio de uma ponteira estéril (200µl - Eppendorf -

USA), uma raspagem cuidadosa foi feita para descolamento das células e estas foram ressuspensas com 200 µl de meio de cultura RPMI -1640 (Gibco) com 3% de soro fetal bovino (Gibco). As duas amostras (sobrenadante e célula) foram congeladas em freezer a -70°C, para posterior quantificação viral. As coletas foram feitas em triplicatas.

Quantificação de Vírus

Posteriormente, essas amostras (sobrenadante e célula) foram descongeladas, filtradas em poros de 0.22µm (Millipore.CO.USA) para eliminação de debris celulares, e semeadas em placa para cultura de tecidos estéreis (Corning Incorporated, NY 14931, USA) de 96 orifícios (96 wells), contendo células Vero (células de rim de macaco verde africano). Utilizou-se 100µl das amostras, em diluições seriadas decimais (TCID₅₀) (REED; MUENCH, 1938). Seguida a semeadura, a placa foi colocada em incubadora a 37°C contendo uma tensão de 5,0% de CO₂ e umidade de 95%. A leitura foi realizada nos tempos: 24, 48 e 72 horas pós-semeadura através de efeito citopático.

Resultados

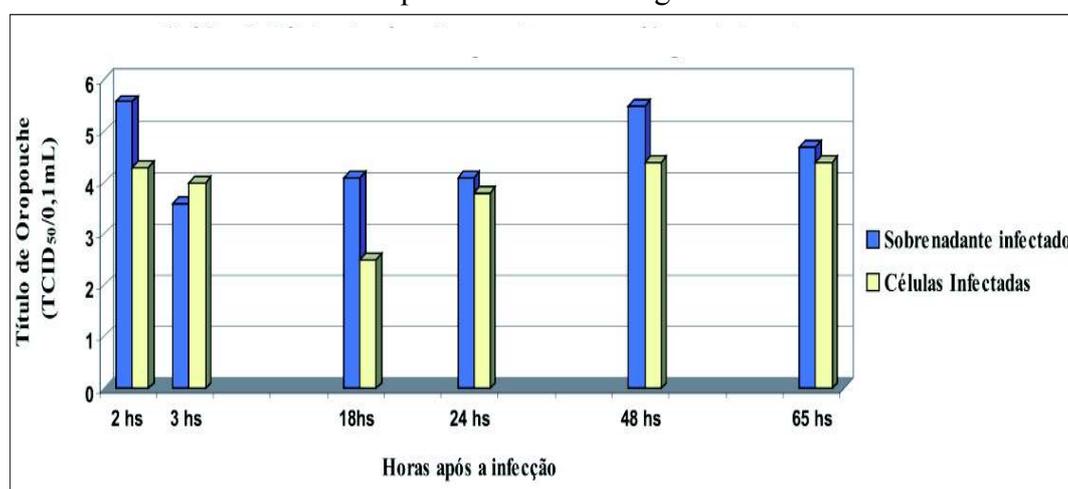
A contagem de células, utilizando a câmara de Neubauer, resultou em uma estimativa de 5,0 x 10⁷ células na suspensão de macrófagos, isto é, no lavado peritoneal. Depois de 24 horas de incubação da placa de cultura, após a lavagem dos poços com PBS para remover os macrófagos não aderidos, estimou-se a permanência de 5,0 x 10⁴ células por poço.

No gráfico 1 tem-se no período de duas horas pós-infecção o título aproximado de $10^{6.5}$ TCID₅₀/100μL no sobrenadante e $10^{4.2}$ TCID₅₀/100μL nas células. Já nos seguintes períodos de 3, 18 e 24 horas ocorre uma diminuição desse título. No entanto, esses valores voltam a crescer no período de 48 horas, demonstrando que houve uma recuperação do título observado no período de duas horas pós-infecção.

MARKER et al. 1979; READING; MILLER; ANDERS, 2000) e outros *in vivo* (ANDERSON JR et al. 1990; TESH et al. 2005; XIAO et al. 2005; XIAO et al. 2001), concordando com os resultados do presente estudo, demonstrando a capacidade do vírus Oropouche em infectar macrófagos.

O evento de eclipse viral clássico ocorre após a adsorção dos vírus pelas células. É um período de latência nos

Gráfico 1. Título de vírus Oropouche em macrófagos de hamster



Discussão

O modelo experimental em hamster também foi utilizado em trabalhos semelhantes (TESH et al. 2005; XIAO et al. 2001), inclusive em infecção causada por vírus da mesma família do Oropouche, o *Punta Toro vírus* (ANDERSON JR et al. 1990).

Diversos vírus são capazes de infectar macrófagos (ANDERSON JR et al. 1990; MARKER et al. 1979; READING, MILLER e ANDERS (2000); TESH et al. 2005; XIAO et al. 2001; XIAO et al. 2005) alguns *in vitro* (GAVRILOVSKAYA et al. 1999;

quais os vírus estão se ajustando e se preparando para se multiplicar. Nesse período ocorre recuperação parcial ou não recuperação de vírus infectivos (BEDSON, 1956). O gráfico 1 mostra uma curva de replicação viral, com um período de “eclipse” por volta de dezoito horas após a infecção, e um aumento de aproximadamente dois “logs” na progênie viral, após 48 horas de infecção.

Os resultados demonstraram que houve replicação do vírus Oropouche em macrófagos, apesar da baixa eficiência, se comparada a outras células, como as células Hela nas quais se obteve o título de $10^{7.5}$ TCID₅₀/100μL (SANTOS,

2003), frente ao título de $10^{5.5}$ TCID₅₀ encontrado em neste estudo.

Rodrigues (2004) verificou a presença de antígeno viral no fígado e no cérebro de hamsters infectados na coxa, através de injeção subcutânea, após o 4º dia de infecção. Desta forma, sugere-se que o vírus poderia utilizar duas vias na sua disseminação, sendo essas a via neural

e hematológica. Os macrófagos seriam as células vetores do vírus Oropouche na via hematológica. Os resultados do presente estudo demonstram que os macrófagos podem, possivelmente, participar como vetores na disseminação da infecção viral em hamster. Para comprovação de tal hipótese aponta-se a necessidade de novos estudos.

Referências

ANDERSON JR., G.W.; SLAYTER, M.V.; HALL, W.; PETERS, C.J. Pathogenesis of a phleboviral infection (Punta Toro virus) in golden Syrian hamsters. *Arch Virol*, v.114, p. 203-212, 1990.

ARAÚJO, R.; DIAS, L.B.; ARAÚJO, M.T.F.; PINHEIRO, F.; OLIVA, F.P. Alterações ultra-estruturais no fígado de hamster após inoculação experimental com arbovírus Oropouche (tipo BEAN 19991). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.20, p.45-54, 1978.

ARAÚJO, R.; PINHEIRO, F.P.; ARAÚJO, M.T.; DIAS, L.B. Patogenia das lesões hepáticas na infecção experimental com o vírus Oropouche (BeAn 19991): análise comparativa das curvas virêmica e de infectividade com as alterações ultra-estruturais. *Hiléia Méd. Belém*, v.1, p.7-12, 1979.

BEDSON, S. P. The Mode of Virus Multiplication and the Susceptibility of these Agents to the Antibiotics. *J Clin Pathol*, v.9, n. 2, p.83-93, 1956.

FIGUEIREDO, L.T.M.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; FIORRILO, M.A. Níveis de anticorpos para arbovírus em indivíduos da região de Ribeirão Preto, SP (Brasil). *Rev Saúde Pub*, v.20, n.3, p.204-211, 1986.

GAVRILOVSKAYA, I.N.; BROWN, E.J.; GINSBERG, M.H.; MACKOW, E.R. Cellular entry of Hantavirus which hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by β_3 -integrins. *J. Virol.*, v.73, n.5, p.3951-3959, 1999.

GIBBONS, A. Where are “new” diseases born? *Science*, v.261, p.680-681, 1993.

GUBLER, D.J. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg. Infect. Dis.*, v.4, n.3, p.442-450, 1998.

HAHON, N.; Multiple Infection of Cell Monolayers by Virus Mixtures. *Appl. Microbiol.*; v.15, n. 2, p. 458-459, 1967.

MARKER, S.C.; JAHRLING, P.B. Correlation Between Virus-Cell Receptor Properties of Alphaviruses *in vitro* and Virulence *in vivo*. *Arch Virol*. v.62, p.53-62,1979.

MORELI, M.L.; AQUINO, V.H.; CRUZ, A.C.R.; FIGUEIREDO, L.T.M. Diagnosis of Oropouche Virus Infection by RT-Nested-PCR. *J. Med. Virol.* v.66, p.139-142, 2002.

MURPHY, F.A. Emerging zoonosis. *Emerg. Infect. Dis.*, v.4, p.429-435, 1998.

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

PINHEIRO, F.P.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; GOMES, M.L.C.; LEDUC, J.W.; HOCK, A.L. Transmission of Oropouche virus from man to hamster by the midge *Culicoides paraensis*. *Science*, v.215, p.1251-1253, 1982.

PINHEIRO, F.P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P.A.; VASCONCELOS, P.F.C. Arboviral zoonoses of Central and South America. Part G. Oropouche fever. In: Beran, G.W. *Handbook of zoonoses*. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 214-217.

PINHEIRO, F.P.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.C. Febre por Oropouche. In: LEÃO, R.N.Q. *Doenças infecciosas e parasitárias*. Enfoque amazônico. Belém: CEJUP, 1997. p.285-298.

PINHEIRO, F.P.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.C. An overview of Oropouche fever epidemics in Brazil and neighbour countries. In: TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. *An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries*, 1998, p.186-192.

READING, P.C.; MILLER, J.L.; ANDERS, E.M. Involvement of the Mannose Receptor in Infection of Macrophages by Influenza Virus. *J. Virol*, v.74, p. 5190-5197, 2000.

REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.*, v.27, p.493-497, 1938.

RODRIGUES, A.H. *Desenvolvimento de um modelo experimental de infecção subcutânea por vírus oropouche em hamster*. Ribeirão Preto, 2004. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

SAEED, M. F.; WANG, H.; NUNES, M.; VASCONCELOS, P. F.; WEAVER, S. C.; SHOPE, R. E.; WATTS, D. M.; TESH, R. B.; BARRETT, A.D. Nucleotide sequences and phylogeny of the nucleocapsid gene of Oropouche virus. *J. Gen. Virol.*, v.81, p.743-748, 2000.

SANTOS, R.I.M. *Vírus oropouche: estudo do mecanismo de entrada de células HeLa I e C6/36*, 2003. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SCHMALJOHN, C.S.; HOOPER, J.W. Bunyaviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, B.; et al. *Fundamental virology*. Philadelphia: Lipincott-Williams ; Wilkins, 2001. p.1581-1602.

TESH, R.B.; SIIRIN, M.; GUZMAN, H.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; WU, X.; DUAN, T.; LEI, H.; NUNES, M.R.T.; XIAO, S. Persistent West Nile Virus Infection in the Golden Hamster: Studies on Its Mechanism and Possible Implications for Other Flavivirus Infections. *J. Infect. Dis.*, v.95, p.287-295, 2005.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. Oropouche. *Médicos*, v.1, p.64-67, 1998.

XIAO, S.; ZHANG, H.; YANG, Y.; TESH, R.B. Pirital virus (arenaviridae) infection in the syrian golden hamster, *Mesocricetus auratus*: a new animal model for arenaviral Hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.64, n.3, 4, p.111-118, 2001.

XIAO, S.; SBRANA, E.; WATTS, D.M.; SIIRIN, M.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; TESH, R.B. Experimental Infection of Prairie Dogs with Monkeypox Virus. *Emerg. Infect. Dis.*, v.11, n.4, p.539-545, 2005.

WEIDMANN, M.; RUDAZ, V.; NUNES, M.R.T.; VASCONCELOS, P.F.C.; HUFERT, F.T. Rapid detection of human pathogenic orthobunyaviruses. *J. Clin. Microbiol.* v.41, n.7, p. 3299-3305, 2003.