

## CARACTERIZAÇÃO DO VÍRUS TIMBÓ (BeAn 41.787), UM NOVO MEMBRO DO GRUPO DOS RHABDOVÍRUS. CONTRIBUIÇÃO DO ESTUDO ULTRA-ESTRUTURAL DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL AO CONHECIMENTO DA MORFOLOGIA E MORFOGÊNESE

Ronaldo de ARAUJO (1), Marialva T. F. de ARAUJO (2), Francisco P. PINHEIRO (3) e Leonidas B. DIAS (4)

### RESUMO

A inoculação experimental de camundongos albinos recém-nascidos por via intra-cerebral com o vírus Timbó (BeAn 41.787) permitiu documentar pela primeira vez a partícula deste vírus e catalogá-lo no Grupo dos Rhabdovirus. O vírion tem o formato típico de bala de revólver ("bullet shape") desse grupo taxonômico, com faces paralelas e com raras partículas cônicas, envelope com projeções de superfície, pequenas ou ausentes, mede em média 259 nm de comprimento, possui um núcleo capsídio de 51 nm e forma-se por brotamento na camada externa da membrana nuclear, em vesículas do retículo endoplasmático e na membrana citoplasmática de neurônios, acumulando-se em mui pequena quantidade nas vesículas e no espaço intercelular.

### INTRODUÇÃO

O vírus Timbó (BeAn 41.787) foi isolado pela primeira vez a 27 de abril de 1962 no Instituto Evandro Chagas, Belém, Brasil, de um "pool" de coração e fígado de um lagarto Ameiva ameiva capturado na floresta da Embrapa, situada nas vizinhanças de Belém por CAUSEY & col.<sup>3</sup> Estudos serológicos (PINHEIRO)<sup>7</sup> situam este vírus juntamente com o vírus Chaco, em um grupo denominado de grupo Timbó.

O presente trabalho relata os achados do estudo da infecção experimental relacionados com a sugestão de que este vírus possa pertencer ao grupo dos Rhabdovirus, devido a suas relações serológicas com o vírus Chaco.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram inoculados trinta e seis camundongos albinos recém-nascidos por via intracerebral, com 0,02 ml de uma suspensão de tecido cerebral de camundongos previamente inoculados com o vírus Timbó (BeAn 41.787), do estoque do Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará. As inoculações foram executadas no Instituto Evandro Chagas e correspondem ao Registro de Inoculação n.º 24 do Laboratório de Microscopia Eletrônica do NPRH da UFPA. Foram sacrificados por decaptação 3 animais por dia, do 1.º ao 5.º dia após a inoculação: no 6.º dia após a inoculação os animais morreram espontaneamente.

Trabalho executado no Núcleo de Patologia Regional e Higiene da Universidade Federal do Pará (NPRH) e Instituto Evandro Chagas (IEC) da Fundação Serviços Especiais de Saúde Pública (FSESP). Integrante de pesquisa conjunta com o Instituto de Medicina Tropical de Hamburgo, Alemanha, segundo convênio CNPq-KFA. Realizado com apoio de CNPq (Projeto SIP/02-006 do Programa dos Trópicos Úmidos do CNPq).

- (1) Patologista Chefe da Seção de Microscopia Eletrônica do NPRH-UFPA
- (2) Patologista Chefe do Laboratório de Microscopia Eletrônica do NPRH-UFPA
- (3) Virologista Chefe da Seção de Virologia do Instituto Evandro Chagas (IEC) da Fundação Serviços Especiais de Saúde Pública (FSESP)
- (4) Patologista Chefe da Seção de Experimentação Animal do NPRH-UFPA.

Para o estudo em microscopia eletrônica foram retirados imediatamente após a decapitação fragmentos cúbicos de 1 mm de extensão em cada bordo, da porção média do cérebro de dois dos três camundongos sacrificados, mantendo-se os fragmentos, durante sua manipulação, imersos no líquido fixador constituído de aldeído glutárico a 2% em tampão fosfato com pH 7,2. Após lavagem no tampão os fragmentos foram pós-fixados em tetra-óxido de ósmio a 2% por uma hora, desidratados em alcoois de concentração crescente e incluídos em Epon. Os cortes ultra-finos foram contrastados com hidróxido de chumbo e acetato de uranila e examinados e fotografados em microscópio Siemens Elmiskop 101. Foram examinados, portanto, um total de 10 animais, 2 para cada dia; o terceiro animal sacrificado conjuntamente em cada dia foi utilizado apenas para estudo de microscopia óptica.

Como controle foram utilizados camundongos albinos recém-nascidos não inoculados com

o vírus Timbó, também da criação do Instituto Evandro Chagas, processados de idêntica maneira. Em nenhum deles foram encontradas partículas viróticas.

## RESULTADOS

As partículas viróticas completas são encontradas em neurônios, no material dos animais sacrificados no 3.º dia após a inoculação. Elas têm o formato típico de "bala de revólver" dos Rhabdovirus e estão situadas: 1. em áreas de dilatação do espaço perinuclear; 2. em vesículas citoplasmáticas associadas ao retículo endoplasmático; 3. na membrana citoplasmática e, 4. em número muito menor, no espaço intercelular. O maior número delas está situado nas vesículas citoplasmáticas.

As únicas alterações celulares diretamente relacionadas com a presença do vírus são a presença de enormes vesículas citoplasmáticas e a dilatação do espaço perinuclear.

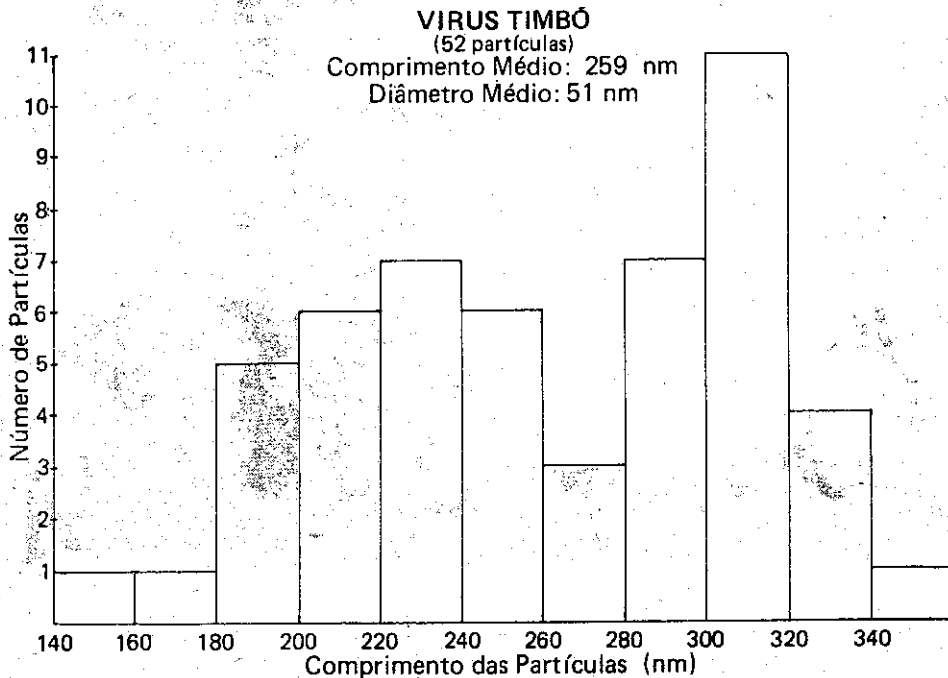


Fig. 1 — Distribuição do comprimento de 52 partículas do vírus Timbó (BeAn 41.787). Mensurações efetuadas em cortes ultra-finos de cérebro de camundongos experimentalmente infectados, apenas em partículas apanhadas «in totum» nos cortes.

O vírion apresenta faces paralelas (Fig. 2 e 3) exceto em duas electromicrografias (Fig. 3A e 3C) onde é possível perceber formato dis-

cretamente cônico. O envelope, nos cortes bem orientados, é contínuo com as membranas limitantes ou está ligado a elas por delicados fi-

lamentos filiformes (Fig. 3B). As projeções de superfície são inaparentes nas partículas situadas dentro de vesículas e bem evidentes nas acumuladas no interstício. Os limites do env-

lope são bem definidos porém com baixa eletrondensidade, o que os torna pouco evidentes ao exame com os menores aumentos.

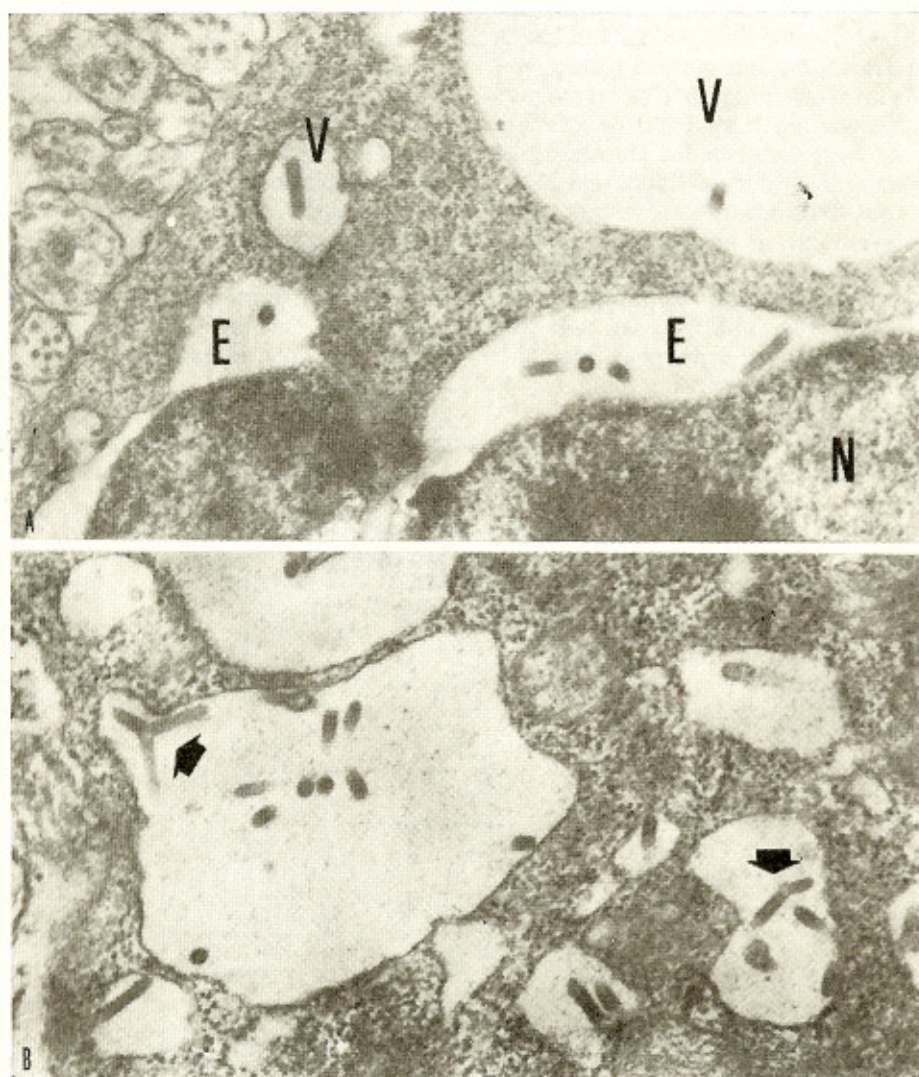


Fig. 2 — A) Partículas do vírus Timbó em espaço perinuclear (E) dilatado em volta de núcleo (N) de neurônio. Notar a presença de grandes vesículas intra-citoplasmáticas (V) também contendo partículas. Aumento final: 34.000 X. B) Partículas do vírus Timbó em vesículas de retículo endoplasmático. Notar as figuras em «V» ou em «Y» (setas) de partículas unidas pela base. Aumento final: 46.000 X.

O cerne ("core") do virion exibe alternância regular de áreas de menor, com áreas de maior eletrondensidade, com aspecto catenular nos grandes aumentos (Fig. 3B).

As mensurações efetuadas em 52 partículas viróticas (Fig. 1) mostram um comprimento médio de 259 nm, com uma variação entre 141-345 nm e o núcleo capsídico com um diâmetro

médio de 51 nm, com uma variação entre 30-72 nm. Foram medidas apenas as partículas apanhadas integralmente nos cortes. Dezesseis das

partículas medidas (30,7%) têm tamanho situado entre 290-320 nm.

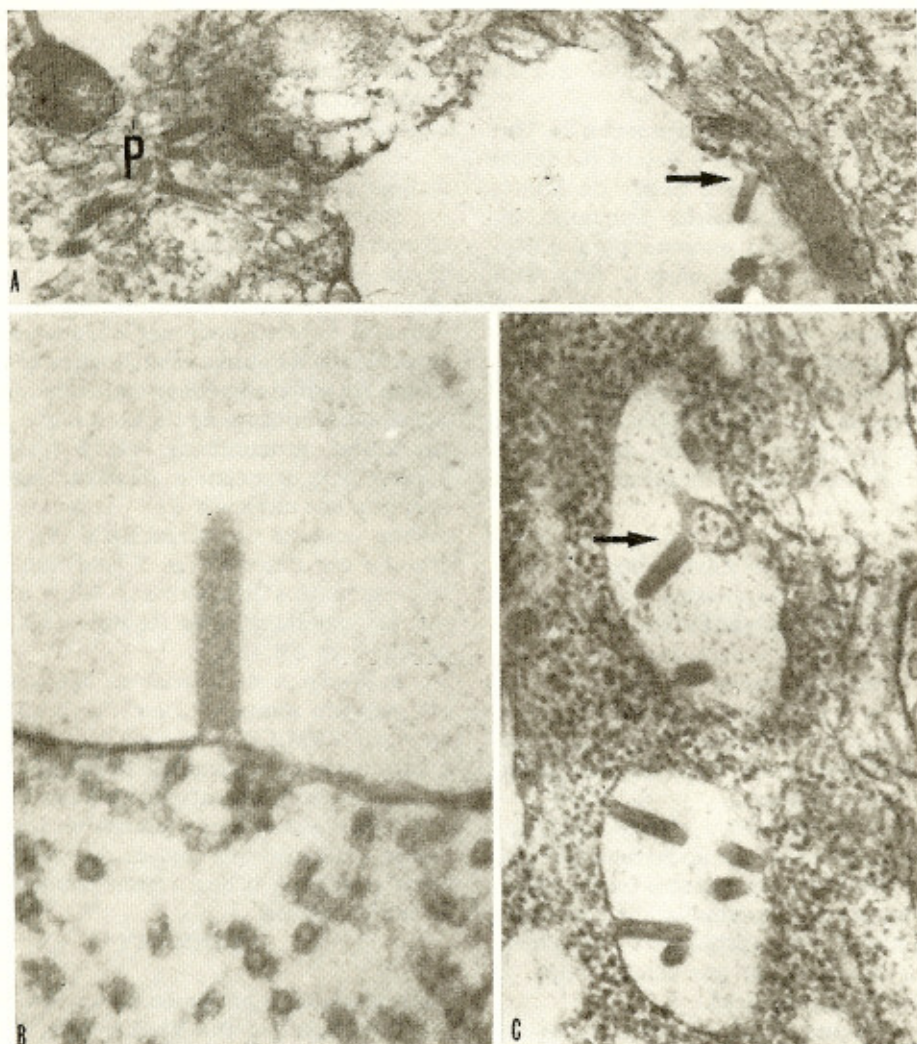


Fig. 3 — A) Partículas do vírus Timbó no interstício (P) e em vesícula intra-citoplasmática, esta com formato cônico (seta). Aumento final: 35.300 X. B) Grande aumento de uma partícula mostrando sua união à membrana da vesícula intra-citoplasmática por delicados filamentos. Aumento final: 105.000 X. C) Partículas em brotamento em vesículas intra-citoplasmáticas de neurônios, uma delas (seta) de formato cônico. Aumento final: 54.400 X.

#### COMENTÁRIOS

Nesta primeira documentação das partículas do vírus Timbó o estudo de sua morfologia e morfogênese mostra todas as características gerais necessárias para colocá-lo no grupo dos

Rhabdovirus, confirmando as sugestões dos estudos serológicos efetuados anteriormente.

Quanto à morfogênese, o vírus Timbó parece partilhar tanto das características da imensa maioria dos Rhabdovirus de origem animal (que se formam por brotamento a par-

tir da membrana citoplasmática) como das características das duas exceções à esta regra (o vírus da raiva e o vírus Klamath que tem brotamento intracelular) (MURPHY & col.)<sup>6</sup>, pois foi possível identificar brotamento em ambas as localizações citadas com predomínio do número de partículas com brotamento intracelular.

Outra característica morfogenética do Timbó comum com o Klamath é o fato de ambos apresentarem brotamento a partir da lamela externa da membrana nuclear. Enquanto, entretanto isto constitui a exceção para o Klamath (MURPHY & col.)<sup>6</sup>, para o vírus Timbó é bem expressivo o número de partículas situadas em espaço perinuclear dilatado. Deve-se acrescentar ainda que muitas das vesículas citoplasmáticas que mostram brotamento de partículas, dada sua proximidade com o núcleo, podem constituir projeções deste espaço perinuclear dilatado que a incidência do corte isola no seio do citoplasma.

A citopatologia das células que mostram partículas viróticas em brotamento é dominada pela presença de enormes vesículas intracitoplasmáticas originadas ou em retículo endoplasmático ou do espaço perinuclear dilatado. Não foram detectadas inclusões viróticas ("virus matrix") às proximidades destas vesículas. Estes achados superpõem-se aos descritos por KARABATSOS & col.<sup>4</sup> em material infectado com o vírus Kwatta.

O local de acúmulo dos vírions não pode ser definido com clareza em nosso material pois em todos os cortes há um número muito pequeno de partículas documentadas; há, entretanto, predominância das partículas — geralmente em número não maior que cinco — nas vesículas intra-citoplasmáticas.

As mensurações do vírion do vírus Timbó permite catalogá-lo entre os Rhabdovirus de maior dimensão: a média que encontramos (259 nm) é idêntica à descrita por KARABATSOS & col.<sup>4</sup> para o vírus Navarro, sendo entretanto a variação do tamanho do vírus Timbó (141-345 nm) bem maior. O fato de que mais do que 30% das partículas mensuradas têm um comprimento que excede 290 nm confirma o grande tamanho deste vírus. O núcleo-capsídio tem em média 51 nm e também apresenta uma ampla variação de sua espessura (30-72 nm). Só foram medidas partículas apanhadas "in totum" nos cortes, isto é, aquelas nas quais foi

possível identificar a extremidade convexa e a extremidade plana. Não foi executado controle especial dos aumentos indicados pelo microscópio: apenas os ajustes de centragem habituais.

O envelope do vírus Timbó não difere marcadamente dos outros Rhabdovirus conhecidos: a pouca precisão do contorno pode ser devida à falta de impregnação. Já projeções de superfície estão predominantemente ausentes.

O cerne virótico também segue as características gerais do grupo dos Rhabdovirus.

Dois características morfológicas do Timbó merecem destaque: a frequência da presença de partículas unidas por sua extremidade plana e a de partículas de contorno cônico. O primeiro aspecto pode ser encontrado na documentação de outros Rhabdovirus e é naturalmente interpretado como consequência do destaque concomitante de partículas que brotaram em íntima proximidade: ela é referida aqui apenas pela frequência relativamente grande com que encontramos três partículas com filamentos comuns na extremidade (Fig. 3A e 3C) criando um desenho em Y que não visualizamos em outros Rhabdovirus (Piry e Mosquero) já estudados pela equipe (ARAUJO<sup>1</sup> e ARAUJO & col.<sup>2</sup>).

A presença de partículas cônicas, embora em pequeno número (2 em 52), lembra o descrito por KEMP & col.<sup>5</sup> para o vírus Kotonkan e naturalmente o vírus da febre efêmera bovina. Sua frequência entretanto é muito pequena e a base (extremidade plana) é apenas levemente maior do que aquela das partículas de lados paralelos, o que sugere tratar-se apenas de um artefacto.

#### SUMMARY

**Characterization of Timbo Virus (BeAn 41787), a new member of the Rhabdovirus Group. Ultrastructural study of morphology and morphogenesis in experimentally infected mouse brain.**

Timbo Virus particles were first visualized by thin section electron microscopy in the brain of experimentally inoculated Swiss albino mice. It was found to be bullet-shaped, with structural details similar to other viruses of the Rhabdovirus group, but also budding from intracytoplasmic membranes, with little frank cytopathology and without prominent virus matrix. Budding was also prominent upon the outer lamella of the nuclear membrane and

---

ARAUJO, R. de; ARAUJO, M. T. F. de; PINHEIRO, F. P. & DIAS, L. B. — Caracterização do vírus Timbó (BeAn 41.787), um novo membro do Grupo dos Rhabdovirus. Contribuição do estudo ultra-estrutural da infecção experimental ao conhecimento da morfologia e morfogênese. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 21:172-177, 1979.

---

was not infrequent from plasma membranes. Few particles were found accumulating in cytoplasmic vesicles and even less in intercellular space. Grossly distended cytoplasmic cisternae lined with ribosomes were the dominant cytopathology. The virion has a mean length of 259 nm, and a nucleocapsid of 51 nm, with large variation in size.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAUJO, M. T. F. — Comunicação pessoal.
2. ARAUJO, R.; DIAS, L. B.; ARAUJO, M. T. F.; PINHEIRO, F. & MOUTINHO, E. R. C. — Miocardite experimental em camundongos albinos por vírus Piry (BeAn 24.232). *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 20: 102-111, 1978.
3. CAUSEY, O. R.; SHOPE, R. E. & BENSABATH, G. — Marco, Timbo and Chaco, newly recognized arboviruses from lizards of Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 15: 239-243, 1966.
4. KARABATSOS, N.; LIPMAN, M. B.; GARRISON, M. S. & MONGILLO, C. A. — The morphology,

morphogenesis and serological characterization of the Rhabdoviruses Navarro, Kwatta, and Mossuril. *J. Gen. Virol.* 21: 429-433, 1973.

5. KEMP, G. E.; LEE, V. H.; MOORE, D. L.; SHOPE, R. E.; CAUSEY, O. R. & MURPHY, F. A. — Kotonkan, a new Rhabdovirus related to Mokola virus of the rabies serogroup. *Amer. J. Epidemiol.* 98: 43-49, 1973.
6. MURPHY, F. A.; JOHNSON, H. N.; HARRISON, A. K. & SHOPE, R. E. — Ultrastructural characterization of a new member of the Rhabdovirus Group — Klamath virus. *Arch. F. ges. Virusforsch.* 37: 323-331, 1972.
7. PINHEIRO, F. P. — Comunicação pessoal.

---

Recebido para publicação em 20/10/1978.

---

Dedicado ao Prof. Dr. Dietrich Peters, Chefe da Seção de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de Hamburgo, no ano de sua aposentadoria.