

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
TESE DE DOUTORADO

CARLA DO AMARAL PINTO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS
ORTHOBUNYAVIRUS DO GRUPO C**

Orientador: Prof. Paulo César Peregrino Ferreira

Belo Horizonte

Agosto – 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
TESE DE DOUTORADO

CARLA DO AMARAL PINTO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS
ORTHOBUNYAVIRUS DO GRUPO C**

Tese apresentada ao programa de pósgraduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Microbiologia, área de concentração: Virologia.

Orientador: Prof. Paulo César Peregrino Ferreira

Belo Horizonte

Agosto – 2015

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABELAS	4
I – INTRODUÇÃO	5
1.1 – Arbovírus	6
1.1.1 – Histórico e definições	6
1.1.2 – Arboviroses.....	7
1.1.3 – Ecologia	9
1.1.4 - Epidemiologia e emergência dos arbovírus	11
1.2 - A Família Bunyaviridae	14
1.2.1 - Estrutura e genoma dos vírus	16
1.2.2 - Multiplicação Viral	22
1.3 - Gênero Orthobunyavirus	26
1.3.1 - <i>Orthobunyavirus</i> do grupo C	29
1.3.2 – Caraparu, Apeu e Itaqui.....	34
II - RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	36
III – OBJETIVOS	39
3.1 - Objetivo geral:	40
3.2 - Objetivos específicos:.....	40
3.2.1- Caracterização molecular do Caraparu:	40
3.2.2- Caracterização molecular do Apeu:	40
3.2.3 – Caracterização molecular do Itaqui	41
3.2.4 – Padronização da PCR para identificar os <i>Orthobunyavirus</i> do grupo C CARV, APEUV e ITQV	41
IV MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 – Células.....	43
4.1.1 – Células Vero	43
4.1.2 - Meios de cultivo	43
4.2 - Amostras virais	44
4.2.1 - Origem.....	44
4.2.2 - Produção dos estoques virais	44
4.3 - Titulação dos estoques virais	44
4.3.1 - Titulação dos vírus pelo método de Dulbecco	44
4.3.2 – Titulação do vírus pelo método de TCID50	45
4.4- Sequenciamento dos vírus Caraparu, Apeu e Itaqui	45
4.4.1 - Extração do RNA viral dos vírus Caraparu, Apeu e Itaqui.....	45
4.4.2 - Amplificação do segmento genômico	45
4.4.3 - Condições das amplificações	47
4.4.4 - Ligação dos produtos de PCR ao vetor pGEM-T	48
4.4.5 - Transformação bacteriana por choque térmico	48
4.4.6 - Triagem das colônias por PCR.....	49
4.4.7 - Obtenção do plasmídeo para sequenciamento	49
4.4.8 – Sequenciamento.....	49
4.4.9 - Análise das sequências.....	50
4.4.10 – Inferências filogenéticas	50

4.5 PCR convencional para detecção dos Orthobunyavirus do grupo C CARV, APEUV e ITQV	52
4.5.1 Região Alvo e Iniciadores	52
4.5.2 Extração do RNA viral	52
4.5.3 Condição das amplificações	52
V RESULTADOS	53
5.1 Caracterização Molecular do segmento L para os vírus Caraparu, Apeu e Itaqui	54
5.1.1 Amplificação do segmento L dos vírus Caraparu, Apeu e Itaqui e obtenção das sequências consenso	54
5.1.2 Análise das sequências genômicas	57
5.1.3 Análise dos percentuais de identidade.....	68
5.1.4 Análises Filogenéticas	72
5.2 Caracterização Molecular do segmento M para os vírus Caraparu, Apeu e Itaqui	74
5.2.1 Amplificação do segmento M dos vírus Caraparu, Apeu e Itaqui e obtenção das sequências consenso	74
5.2.2 Análise dos percentuais de identidade.....	77
5.2.3 Inferências Filogenéticas	80
5.3 PCR convencional para detecção de CARV, APEUV e ITQV	82
VI DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	84
VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
VIII ANEXOS	97
8.1 Produção Bibliográfica.....	98
8.2 Apresentação de Trabalhos.....	100
8.3 Eventos.....	100

RESUMO

Os vírus Caraparu (CARV), Apeu (APEUV) e Itaqui (ITQV) são arbovírus do sorogrupo C pertencentes ao gênero *Orthobunyavirus* da família *Bunyaviridae*. Estes vírus foram isolados pela primeira vez na Amazônia brasileira na década de 50 e a sua infecção em seres humanos é caracterizada por febre alta, mialgia e fotofobia, com 4-5 dias de duração. O genoma dos membros do sorogrupo C é constituídos por três segmentos de RNA de fita simples de polaridade negativa denominados S (~1000 pb), M (~4500 pb) e L (~7000 pb). Estes vírus apresentam potencial de emergência como patógenos humanos. Contudo, estudos envolvendo os *Orthobunyavirus* do grupo C são escassos e suas características moleculares são pouco conhecidas, o que dificulta sua identificação e correta classificação. Até o momento, apenas sequências genômicas parciais para APEUV e ITQV foram caracterizadas e as relações genéticas entre estes vírus são ainda muito pouco conhecidas. O objetivo deste trabalho é realizar a caracterização molecular dos vírus do grupo C CARV, APEUV e ITQV através do sequenciamento dos seus segmentos genômicos e utilizar os dados obtidos para desenvolver um ensaio de PCR que permita identificar e diferenciar estas três amostras virais. Foi possível concluir o sequenciamento do segmento L de CARV e APEUV e obter sequências parciais para os segmentos M e L do ITQV e segmento M de CARV e APEUV. A caracterização do segmento L do APEUV revelou que a RdRp deste membro do sorogrupo C possui todas as regiões conservadas anteriormente descritas para os *Orthobunyavirus*, como as regiões 3 e 4, além do domínio “cap-snatching” originalmente descrito para o vírus Influenza. As análises revelaram que as relações genéticas existentes entre as três amostras do sorogrupo C (CARV, APEUV e ITQV) são diferentes quando os segmentos L e M são analisados. Os dados obtidos para a RdRp das três amostras analisadas sugerem que o segmento L de CARV e ITQV possuem uma origem em comum, a qual não é compartilhada pelo segmento L do APEUV. Por outro lado, os dados obtidos para a poliproteína sugerem uma origem em comum para o segmento M de CARV e APEUV, a qual não seria compartilhada pelo segmento M do ITQV. Visto que o ICTV utiliza como critério de espécie as reações cruzadas nas provas sorológicas que reconhecem as glicoproteínas de superfície, uma classificação baseada na sequência da RdRp, sendo esta a proteína mais conservada e melhor caracterizada dentro do gênero *Orthobunyavirus*, seria mais adequada.

ABSTRACT

1
2
3 Caraparu (CARV), Apeu (APEUV) and Itaqi (ITQV) are group C arboviruses,
4 member of Bunyaviridae family and Orthobunyavirus genus. These viruses were first
5 isolated in the Brazilian Amazon in the 50s and their human disease is characterized by
6 high fever, muscular pain and photophobia, during 4-5 days. The orthobunyaviruses'
7 genome is composed of three segments of single-stranded negative-sense RNA named S
8 (~1000 bp), M (~4500 bp) and L (~7000 bp). Group C viruses are potential emergent
9 human pathogens. However, studies involving these viruses are rare and their molecular
10 characteristics are poorly known, which complicates their correct identification and
11 classification. To date, only partial genomic sequences for APEUV and ITQV were
12 characterized and the genetic relationships between them are still poorly known. The
13 aim of this work is to perform the molecular characterization of the group C arboviruses
14 CARV, APEUV and ITQV sequencing their genome segments and use the data to
15 develop a PCR assay to identify and differentiate these three viral strains. It was
16 possible to complete the L segment sequencing for CARV and APEUV and obtain
17 partial sequences for ITQV M and L segments and CARV and APEUV M segment. The
18 characterization of APEUV L segment revealed that the RdRp of this serogroup C
19 member has all conserved regions described for Orthobunyavirus like regions 3 and 4,
20 besides the "cap-snatching" domain originally described for influenza virus. The data
21 show that genetic relationships among the three serogroup C strains (CARV, APEUV
22 and ITQV) are different when the L and M segments are analyzed. The RdRp analysis
23 suggests that CARV and ITQV L segment have a common origin, which is not shared
24 by APEUV L segment. Moreover, polyprotein analysis suggests a common origin for
25 CARV and APEUV M segment, which would not be shared by ITQV M segment. Since
26 the ICTV uses the cross-reactivity in serological tests which recognize the surface
27 glycoproteins as criterion to defining species, a classification based on RdRp sequence,
28 which is the most conserved and best characterized protein within the Orthobunyavirus
29 genus, would be more appropriate.

1

2

3

LISTA DE FIGURAS

4	Figura 1. Ciclo biológico dos arbovírus.....	9
5	Figura 2. Representação esquemática da partícula viral família <i>Bunyaviridae</i>	17
6	Figura 3. Genoma de cada um dos gêneros da família <i>Bunyaviridae</i>	18
7	Figura 4. Modelos de estratégias de expressão gênica utilizadas pela família Bunya.....	22
8	Figura 5. Ciclo de multiplicação dos vírus da família <i>Bunyaviridae</i>	24
9	Figura 6. Relações sorológicas entre os <i>Orthobunyavirus</i> do grupo C.....	32
10	Figura 7. Esquema utilizado para amplificar o segmento L do CARV.....	55
11	Figura 8. Esquema utilizado para amplificar o segmento L do APEUV.....	56
12	Figura 9. Esquema utilizado para amplificar o segmento L do ITQV.....	57
13	Figura 10. Alinhamento da seqüência de aminoácidos inferida	59
14	Figura 11. Alinhamento da seqüência de aa do segmento L do APEUV	62
15	Figura 12. Alinhamento da seqüência de aa do segmento L do APEUV	63
16	Figura 13. Alinhamento da região N-terminal da seqüência do segmento L	65
17	Figura 14. Alinhamento da seqüência de aa inferidos a partir da região entre 1469.....	67
18	Figura 15. Árvore filogenética das amostras CARV BeAn3994, APEUV	71
19	Figura 16. Esquema utilizado para amplificar o segmento M do CARV.....	74
20	Figura 17. Esquema utilizado para amplificar o segmento M do APEUV.....	75
21	Figura 18. Esquema utilizado para amplificar o segmento M do ITQV.....	76
22	Figura 19. Árvore filogenética das amostras CARV BeAn3994.....	80
23	Figura 20. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR.....	82

1

2

LISTA DE TABELAS

3

4	<u>Tabela 1</u> : Classificação da Família <i>Bunyaviridae</i>	16
5	<u>Tabela 2</u> : Iniciadores utilizados para amplificar os segmentos genômicos.....	46
6	<u>Tabela 3</u> : Pares de iniciadores utilizados para amplificar os segmentos L e M.....	52
7	<u>Tabela 4</u> : Percentual de identidade de aminoácidos da RdRp entre CARV.....	60
8	<u>Tabela 5</u> : Percentual de identidade de nt e aa do segmento L dos membros.....	68
9	<u>Tabela 6</u> : Percentual de identidade de nt e aa para o segmento L.....	69
10	<u>Tabela 7</u> : Percentual de identidade de nt e aa para o segmento M.....	78

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13

I – INTRODUÇÃO

1

2 **1.1 – Arbovírus**

3 **1.1.1 – Histórico e definições**

4 O estudo dos arbovírus teve início na década de quarenta do século XX quando Hamon
5 e colaboradores começaram a estudar um grupo particular de vírus caracterizados pela
6 sua transmissão por artrópodes e por causar, ocasionalmente, encefalites, que foram
7 denominadas encefalites virais originadas de artrópodes (“arthropods borne viral
8 encephalitis”). Esse grupo incluía os vírus da encefalite de Saint Louis e Japonesa e das
9 encefalites equinas do leste e do oeste, transmitidos por mosquitos, e o vírus da
10 encefalite Russa, transmitido por carrapatos.

11 Em 1954, Casals & Brown, através de testes de inibição da hemaglutinação, dividiram
12 os arbovírus até então conhecidos em dois sorogrupos: sorogrupo A (gênero Alphavirus
13 pertencente à família *Togaviridae*) e sorogrupo B (membros da família *Flaviviridae*)
14 que foram denominados arbovírus pela abreviatura da expressão “**arthropods borne**
15 **animal virus**”. Em 1961, Casals & Whitman compararam amostras virais isoladas de
16 macacos sentinelas expostos na Floresta Oriboca, localizada à 20 Km de Belém/PA,
17 com arbovírus dos dois sorogrupos (A e B) identificados anteriormente. Este estudo foi
18 realizado no laboratório de Virologia da Fundação Rockefeller em Nova York e
19 evidenciou que os novos arbovírus eram completamente distintos daqueles classificados
20 nos dois sorogrupos até então descritos e as novas amostras virais foram então
21 classificados em um novo sorogrupo, o qual foi denominado sorogrupo C.

22 Os arbovírus foram inicialmente classificados por sorologia, principalmente por ensaios
23 de neutralização (NT), inibição da hemaglutinação (IH) e fixação do complemento
24 (FC). Posteriormente, essa classificação foi confirmada por análises moleculares e
25 morfogênese para fins taxonômicos (BEATY *et al.*, 1995). Os arbovírus compreendem
26 um conjunto de mais de 500 espécies, das quais a maior parte pertence às famílias
27 *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*), *Flaviviridae* (gênero *Flavivirus*), *Bunyaviridae*
28 (gêneros *Orthobunyavirus*, *Nairovirus* e *Phlebovirus*), *Reoviridae* (gênero *Orbivirus*) e
29 *Rhabdoviridae* (gênero *Vesiculovirus*). Há ainda alguns arbovírus pertencentes a outras

1 famílias como *Orthomyxoviridae* (gênero *Thogotovirus*) e *Asfarviridae* (gênero *Asfarvirus*)
2 (MELLOR, 2000; HOLLIDGE *et al.* 2011).

3 Em 1954, foi criado o Laboratório de Vírus de Belém com o apoio do Serviço Especial
4 de Saúde Pública do Brasil, hoje Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) e da
5 Fundação Rockefeller. A criação do laboratório teve por objetivo isolar e estudar os
6 “arthropods borne viruses” na região Amazônica. Esses estudos constituíam parte de um
7 programa da Fundação Rockefeller, espalhado por todo o mundo, em cooperação com
8 organismos governamentais, no Brasil, no Egito, na Índia, na África do Sul e em
9 Trinidad (CAUSEY *et al.*, 1961).

10 O Instituto Adolf Lutz (IAL) também vem conduzindo na região da Mata Atlântica no
11 Estado de São Paulo, desde 1961, um programa de vigilância para arbovírus. O objetivo
12 desse estudo é identificar hospedeiros e vetores de arbovírus, e a circulação desses vírus
13 na população humana (IVERSON, 1994). O IAL, que inicialmente contava com a
14 colaboração do Instituto Evandro Chagas (IEC) do Pará e do Center for Disease Control
15 (CDC) (Division for Vector-Borne Infectious Diseases), atualmente é um Centro
16 Colaborador da Organização Pan-Americana de Saúde - OPS na área dos arbovírus
17 (<http://www.ial.sp.gov.br/>, visualizado em 18maio2015).

18 Os arbovírus são classificados como agentes virais que são capazes de infectar
19 artrópodes hematófagos pela ingestão de sangue de vertebrados contaminados. Eles se
20 multiplicam nos tecidos dos artrópodes e são transmitidos pela picada para outro
21 vertebrado suscetível. É necessário que ocorra a multiplicação do vírus no organismo do
22 artrópode para que esse seja classificado como um arbovírus (MELLOR, 2000).

23 **1.1.2 – Arboviroses**

24 As arboviroses são doenças causadas pelos arbovírus, através da sua transmissão entre
25 artrópodes hematófagos e hospedeiros vertebrados suscetíveis. A transmissão também
26 pode ocorrer entre hospedeiros artrópodes, através da via transovariana e,
27 possivelmente, da via sexual. A maior parte dessas doenças é classificada como
28 zoonoses e é mantida no meio silvestre em ciclos envolvendo vetores e hospedeiros que
29 habitam esse ambiente (AZEVEDO *et al.*, 2007a). Por isso, os arbovírus estão mais
30 associados a infecções de pessoas que mantêm contato estreito com ambientes

1 silvestres. No entanto, algumas arboviroses causam epidemias em áreas urbanas, o que
2 as torna um problema de saúde pública, como ocorre no Brasil com a dengue e na
3 região amazônica com a febre do Oropouche.

4 Após a transmissão, o vírus localiza-se nos gânglios linfáticos regionais da área da pele
5 picada pelo artrópode vetor infectado. Em seguida, o vírus alcança a corrente sanguínea
6 via circulação linfática, o que leva a sua disseminação pelos tecidos do hospedeiro. O
7 vírus se multiplica nesses locais e é lançado novamente na circulação sanguínea, o que
8 determina a viremia que corresponde ao período febril. A infecção pode regredir nessa
9 fase, ou mesmo ser assintomática. Em alguns casos, no entanto, o paciente pode
10 apresentar manifestações exantemáticas, neurológicas ou hemorrágicas (LEÃO *et al.*,
11 1997; AZEVEDO *et al.*, 2007a).

12 Apesar da maior parte das infecções por arbovírus em humanos ser assintomática ou
13 resultar em manifestações semelhantes a uma infecção branda por Influenza, alguns
14 arbovírus podem causar doenças respiratórias, artrite, doença febril, encefalites,
15 síndromes hemorrágicas, choque, podendo até mesmo levar à morte. Em geral, as
16 manifestações clínicas das arboviroses podem ser divididas em quatro categorias:
17 síndrome febril, síndrome febril exantemática, febre hemorrágica e encefalite. O quadro
18 clínico determinado por uma espécie de arbovírus é dependente de diversos fatores
19 como a amostra do vírus e fatores do hospedeiro, como idade e estado imunológico
20 (HOLLIDGE *et al.*, 2011; LEÃO *et al.*, 1997; MELLOR, 2000; NALCA *et al.*, 2003;
21 NUNES *et al.*, 2007).

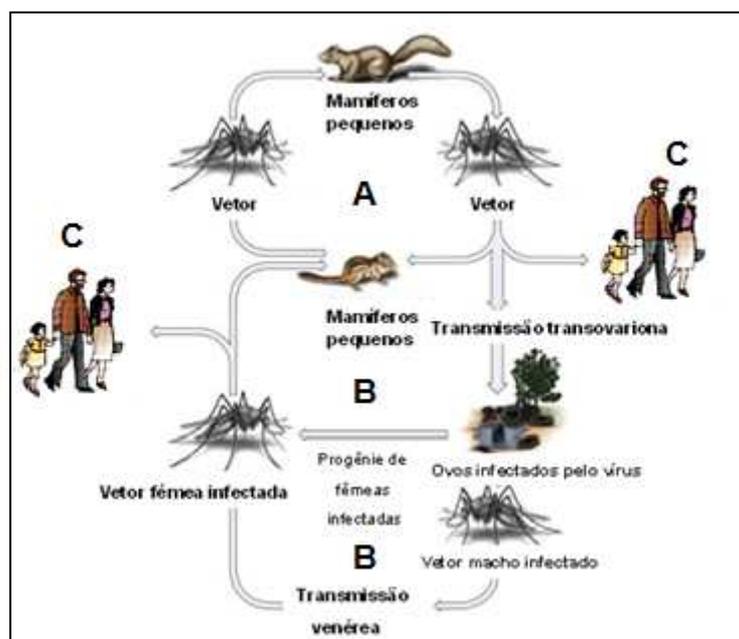
22 O tratamento das arboviroses consiste em medidas para controle dos sintomas e para
23 manutenção do estado geral do paciente. Não existem protocolos de tratamento com
24 drogas antivirais bem estabelecidos contra esses agentes. Com exceção de dengue e
25 febre amarela, as medidas profiláticas no Brasil são escassas e as medidas individuais
26 constituem as únicas possíveis, já que para a maior parte das arboviroses não se dispõe
27 de vacinas e o combate aos vetores, especialmente em áreas silvestres, na maior parte
28 das vezes é inviável (AZEVEDO *et al.*, 2007a).

1

2 1.1.3 – Ecologia

3 Os arbovírus são mantidos na natureza em ciclos complexos envolvendo vetores
4 artrópodes hematófagos, principalmente mosquitos, carrapatos, flebotomíneos
5 (*Phlebotomus*, *Sergentomya* e *Lutzomya*), maruins ou mosquito pólvora (*Culicoides*),
6 percevejos (*Oeciacus*) e possivelmente ácaros. Esses vetores, após serem infectados,
7 transmitem esses microorganismos ao se alimentarem do sangue dos hospedeiros
8 vertebrados, especialmente aves e mamíferos roedores. O ciclo se fecha quando novos
9 artrópodes são infectados ao se alimentarem do sangue de vertebrados que apresentam
10 viremia. A transmissão vertical, através da via transovariana, também pode ocorrer. Por
11 definição, para ser classificado como um arbovírus, o vírus precisa se multiplicar no
12 organismo do artrópode vetor antes que ocorra a transmissão para novos vertebrados
13 suscetíveis. Este mecanismo de transmissão, característico dos arbovírus, difere da
14 transmissão mecânica através do aparelho bucal contaminado do artrópode logo após o
15 repasto sanguíneo no hospedeiro infectado. (FIGURA 1) (BEATY *et al.*, 1995;
16 FIGUEIREDO, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2001; WEAVER, 1997).

17



18

19 **Figura 1. Ciclo biológico dos arbovírus.** A – Ciclo de amplificação em mamíferos, no qual a fêmea infectada poderá transmitir o vírus a pequenos mamíferos que desenvolvem uma viremia alta e curta, podendo levar à infecção de artrópodes hematófagos. B – Ciclo reservatório, no qual ocorre a transmissão transovariana e venérea. C – infecção humana acidental. Fonte: adaptado de <http://www.microbeworld.org>

1

2 Notavelmente, os arbovírus têm a capacidade de infectar uma ampla gama de
3 hospedeiros vertebrados, o que é importante para sua manutenção e amplificação na
4 natureza. Alguns hospedeiros vertebrados (aves e roedores) são considerados, em alguns
5 casos, amplificadores do ciclo, pois desenvolvem viremias com título e duração
6 suficientes para infectar novos artrópodes. Esses são de particular interesse, pois
7 contribuem para a disseminação dos arbovírus, o que pode favorecer a emergência de
8 algumas arbovirose. Apesar de apresentarem uma alta viremia, estes hospedeiros
9 amplificadores do ciclo tipicamente não desenvolvem sinais da doença. As arbovirose
10 são, em sua maioria, zoonoses que dependem de espécies animais para se manterem na
11 natureza. Os seres humanos são, na maior parte dos casos, hospedeiros terminais ou
12 acidentais, não sendo necessários para a manutenção dos ciclos ecológicos desses vírus.
13 Ao contrário do que normalmente é observado para os hospedeiros amplificadores, os
14 seres humanos e outros hospedeiros terminais podem desenvolver sinais e sintomas das
15 arbovirose. No entanto, alguns arbovírus podem ser capazes de se adaptar a ciclos
16 epidêmicos urbanos, nos quais o ser humano passa a atuar como hospedeiro
17 amplificador do ciclo. Ciclos epidêmicos urbanos ocorrem ou já foram descritos para
18 alguns vírus como dengue, febre amarela e chikungunya (GUBLER, 2002; HOLLIDGE
19 *et al.*, 2011; VASCONCELOS *et al.*, 2001, WEAVER *et al.*, 2010).

20 Os arbovírus têm distribuição mundial e são encontrados principalmente nas áreas
21 tropicais do globo, onde as condições climáticas são favoráveis para a manutenção dos
22 ciclos biológicos desses agentes. Vale ressaltar que o Brasil é um país de clima tropical,
23 de grande extensão e, apesar da alta taxa de desmatamento, ainda tem cerca de um terço
24 de seu território recoberto por florestas e outros ecossistemas naturais. Esses fatores
25 fornecem condições ideais para a manutenção de vários arbovírus, que são mantidos
26 numa grande variedade de ciclos zoonóticos. De fato, mais de 200 espécies distintas de
27 arbovírus foram isoladas no Brasil, e cerca de 40 dessas causam doença em humanos
28 (FIGUEIREDO, 2007).

29 O risco de emergência de novas arbovirose no Brasil é atribuído à existência de
30 grandes cidades, densamente povoadas e infestadas por mosquitos como os do gênero
31 *Culex* e o *Aedes aegypti* que são altamente antropofílicos. Seres humanos ou animais
32 infectados podem ser introduzidos nos centros urbanos e levar consigo os arbovírus

1 provenientes de cenários ecoepidemiológicos onde essas zoonoses ocorrem. Os seres
2 humanos podem ser infectados quando ingressam em ambientes silvestres devido a suas
3 atividades ocupacionais (seringueiros, madeireiros, agricultores, etc.) ou de lazer
4 (ecoturismo, pesca, arvorismo, etc.) e levar os arbovírus para as áreas urbanas. Ao
5 introduzir os arbovírus nas regiões urbanas, podem ser estabelecidos ciclos de
6 transmissão das arbovirose, desde que vetores competentes estejam presentes
7 (FIGUEIREDO, 2007).

8 **1.1.4 - Epidemiologia e emergência dos arbovírus**

9 As doenças causadas por arbovírus estão entre as mais importantes doenças infecciosas
10 emergentes, sendo consideradas como um problema de saúde pública. As arbovirose
11 representaram aproximadamente 30% de todas as doenças infecciosas emergentes no
12 início do século XXI. Os arbovírus são taxonomicamente distintos, pertencendo a 8
13 famílias e 14 gêneros. Atualmente, mais de 500 vírus estão registrados no “Catálogo
14 Internacional de Arbovírus e Alguns outros Vírus de Vertebrados” dos quais mais de
15 130 são conhecidos por causarem doenças em seres humanos e 40 por infectarem
16 animais. Os arbovírus causadores de doenças humanas mais importantes pertencem às
17 famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae* e *Bunyaviridae* (JONES *et al.*, 2008; NALCA *et al.*,
18 2003).

19 Estudos conduzidos na Amazônia desde a década de 50 pelo Instituto Evandro Chagas
20 (IEC) permitiram o isolamento de 195 espécies diferentes de arbovírus, dentre as quais
21 34 são conhecidas por serem patogênicos para o ser humano. Isso reflete a grande
22 diversidade de espécies de artrópodes e vertebrados existentes nessa região, além da
23 grande variedade de condições ecológicas. Infecções humanas por 30 desses agentes já
24 foram demonstradas mediante o isolamento do agente do sangue de doentes. Os
25 arbovírus encontrados na Amazônia são distribuídos em 21 grupos sorológicos e, cerca
26 de dois terços desses foram isolados nessa região antes que o fossem em qualquer outra
27 parte do mundo. Muitos desses vírus jamais foram encontrados em outras regiões do
28 globo (AZEVEDO *et al.*, 2007a; VASCONCELOS *et al.*, 2001).

29 As arbovirose podem ser epidemiologicamente classificadas como enzoóticas, quando
30 envolvem casos esporádicos ou intermitentes, ou epizoóticas, quando envolvem surtos

1 significantes (VASCONCELOS *et al.*, 2001). Infecções por arbovírus mantidos em
2 ciclos enzoóticos são geralmente causadas pela entrada de humanos ou animais no ciclo
3 natural. Por outro lado, o estabelecimento de ciclos epizoóticos é o resultado da
4 introdução de um arbovírus numa população de vertebrados suscetíveis associada a uma
5 população de vetores competentes (VASCONCELOS *et al.*, 2001).

6 Alguns desses vírus são importantes problemas de saúde pública por causarem
7 encefalites graves, como as encefalites causadas pelo vírus La Crosse, vírus das
8 encefalites equinas do leste e do oeste (EEE e EEW), vírus da encefalite de St. Louis e
9 da encefalite Japonesa, que podem até mesmo levar a morte, ou por estarem envolvidos
10 em epidemias como o vírus da dengue, da febre amarela e o vírus Oropouche. A febre
11 do Oropouche é considerada a arbovirose que mais acomete o homem na Amazônia
12 depois da dengue. Estudos soropidemiológicos realizados no Brasil e nas Américas
13 indicam várias epidemias entre 1961 e 2007, com aproximadamente 357 mil infectados.
14 No entanto, esses dados podem estar subestimados, acreditando-se que mais de meio
15 milhão de pessoas tenham sido infectados pelo vírus Oropouche na Amazônia brasileira
16 desde a década de 60 (NUNES *et al.*, 2007).

17 As arboviroses são sazonais, dependendo direta ou indiretamente da estação do ano em
18 que o artrópode se alimenta de sangue. Os principais fatores que influenciam o modo
19 como cada arbovirose é transmitida (região geográfica, período do ano e população
20 acometida) são os fatores climáticos (regime de chuvas, temperaturas), a competência
21 do vetor para transmitir determinado vírus, o período de incubação intrínseca (período
22 de desenvolvimento no hospedeiro vertebrado) e extrínseca (período de
23 desenvolvimento no vetor), a densidade de vetores em determinada região, o transporte
24 de vírus a lugares distantes e o estado imunológico de uma dada população (SHOPE,
25 1993).

26 Duas formas de transmissão dependentes do clima são descritas para os arbovírus. Nas
27 regiões tropicais, o vírus circula durante todo o ano, ocasionalmente apresentando um
28 pico sazonal. No entanto, em climas temperados os vírus são transmitidos entre vetores
29 e hospedeiros apenas durante os meses mais quentes e as arboviroses são ausentes
30 durante os meses frios. Porém, mesmo durante as estações frias, os arbovírus são
31 mantidos na natureza em ovos do artrópode vetor, o que garante o restabelecimento do
32 ciclo do vírus quando as temperaturas se tornam mais elevadas. Um aumento da duração

1 dos períodos mais quentes fornece condições para uma ampliação da população de
2 vetores e, conseqüentemente contribui para uma maior circulação dos arbovírus
3 (HOLLIDGE *et al.*, 2010; HOLLIDGE *et al.*, 2011).

4 A emergência e re-emergência das arbovirose podem estar relacionadas à evolução e
5 adaptação das espécies. Porém, alterações produzidas no meio ambiente pelo homem
6 podem contribuir para a ocorrência desse fenômeno. O manejo inadequado do meio
7 ambiente pode romper o seu equilíbrio, levando ao aumento da incidência de certas
8 doenças e da emergência de outras. Além do desequilíbrio ecológico, o manejo do meio
9 ambiente pelo homem aumenta as chances de contato com os artrópodes vetores, seja
10 pela introdução desses no ambiente urbano ou pelo contato estreito do homem com o
11 ambiente silvestre e, conseqüentemente, com os vetores aí presentes. Algumas
12 atividades humanas que podem influenciar a emergência das arbovirose são: aumento
13 do trânsito de plantas, humanos, artrópodes e outros animais entre diferentes regiões,
14 aumento das atividades de lazer de campo, atividades militares em áreas de florestas,
15 programas de controle de artrópodes reduzidos ou inexistentes, desmatamento,
16 reflorestamento, urbanização crescente, expansão agrícola, crescimento populacional e
17 mudanças climáticas. (FIGUEIREDO, 2007; GOULD *et al.*, 2006; HOLLIDGE *et al.*,
18 2010; HOLLIDGE *et al.*, 2011; VASCONCELOS *et al.*, 2001; WEAVER *et al.*, 2010).

19 A elevada incidência das arbovirose na Amazônia brasileira certamente decorre das
20 condições ecológicas favoráveis que a região oferece para o estabelecimento e
21 manutenção desses agentes: alta diversidade e densidade de artrópodes hematófagos e
22 de vertebrados silvestres que são fundamentais para a manutenção do ciclo desses vírus
23 (PINHEIRO *et al.*, 1983).

24 O vírus Chikungunya é um alphavirus re-emergente que vem sendo um desafio de saúde
25 pública para países tropicais e subtropicais. Este vírus foi detectado pela primeira vez no
26 Brasil em setembro de 2014 no estado do Amapá, e em 18 de outubro deste mesmo ano
27 682 casos autóctones haviam sido notificados ao Ministério da Saúde. Estudos
28 epidemiológicos e moleculares demonstraram que as amostras isoladas no Brasil
29 pertencem a pelo menos dois genótipos distintos, os quais provavelmente foram
30 introduzidos no país por rotas diferentes. Como o vírus Chikungunya compartilha os
31 mesmos vetores (*Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*) com o vírus da dengue, sugere-se que o
32 Chikungunya possa se tornar endêmico em várias regiões do país, com picos de

1 transmissão ocorrendo entre janeiro e abril (NUNES *et al.*, 2015; VEGA-RÚA, *et al.*,
2 2014).

3 Cerca de seis meses após a primeira notificação de casos de febre do Chikungunya no
4 país, um novo arbovírus (Zika vírus), também transmitidos por mosquitos do gênero
5 *Aedes*, emergiu no Brasil, conforme confirmado no mês de maio do presente ano pelo
6 Ministério da Saúde. O Instituto Evandro Chagas atestou como positivos os 16 casos
7 suspeitos identificados nos estados da Bahia e Rio Grande do Norte
8 (portalsaude.saude.gov.br, visualizado em 18maio2015). A emergência destes dois
9 arbovírus em um curto espaço de tempo acende um sinal de alerta para a possibilidade
10 de emergência de outras arboviroses, principalmente aquelas potencialmente
11 transmitidas por mosquitos do gênero *Aedes*.

12 A emergência e re-emergência dos vírus da família *Bunyaviridae* têm sido influenciadas
13 pelos fatores citados acima (NICHOL *et al.*, 2000; GONZALEZ-SCARANO *et al.*,
14 2005). Quatro dos cinco gêneros desta família incluem agentes causadores de grave
15 febre hemorrágica para as quais medidas preventivas e terapêuticas não estão
16 disponíveis, estes vírus são classificados como patógenos de nível de biossegurança 3
17 ou 4. Além disso, alguns bunyavirus são classificados como patógenos emergentes
18 devido ao aumento de sua incidência em novos hospedeiros e localização geográfica
19 (WALTER & BARR, 2011).

20 **1.2 - A Família *Bunyaviridae***

21 A família *Bunyaviridae* foi formalmente estabelecida no ano de 1975 e é composta por
22 uma variedade de vírus que compartilham características morfológicas, bioquímicas e
23 sorológicas. O vírus Bunyawera (BUNV) é o protótipo da família *Bunyaviridae* e
24 também do gênero *Orthobunyavirus* e foi originalmente isolado em 1943 de um
25 mosquito do gênero *Aedes* em Uganda (SCHMALJOHN & NICHOL, 2007).

26 Essa família é constituída por mais de 300 espécies de vírus distribuídas em quatro
27 gêneros cujos membros causam infecções em animais (*Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*,
28 *Nairoviros* e *Hantavirus*) e um gênero com espécies que infectam plantas (*Tospovirus*).
29 Embora compartilhem inúmeras características bioquímicas e sorológicas, os vírus
30 dessa família apresentam muitas divergências em aspectos biológicos, como

1 hospedeiros e vetores infectados, e aspectos moleculares, como estratégias de
2 transcrição e replicação do genoma (ELLIOTT, 1990).

3 Membros da família *Bunyaviridae* podem ocasionar doenças de gravidade média a alta,
4 variando desde doença febril inespecífica e encefalites até febre hemorrágica. Os vírus
5 desta família são reconhecidos como ameaças crescentes à saúde humana e, por isso,
6 são considerados vírus emergentes que têm causado epidemias em todo o mundo
7 (ELLIOTT, 1990; HOLLIDGE *et al.*, 2011). Como exemplo, temos os vírus La Crosse,
8 Rift Valey fever e Sin Nombre que causam doenças graves em humanos como
9 encefalite e febre hemorrágica (BOWEN *et al.*, 2001; SCHMALJOHN & NICHOL,
10 2007). Em 2012, um surto de hantavirose ocasionada pelo vírus Sin Nobre em um
11 parque no estado da Califórnia (EUA) resultou em três mortes entre dez casos
12 confirmados (CDC, 2012).

13 A maior parte dos bunyavirus (gêneros *Orthobunyavirus*, *Nairovirus* e *Phlebovirus*) é
14 transmitida através de vetores artrópodes e, por isso, é classificada como arbovírus. Os
15 membros destes três gêneros são mantidos na natureza através de ciclos envolvendo
16 artrópodes hematófagos, incluindo mosquitos, flebótomos, carrapatos e maruins, e
17 hospedeiros vertebrados suscetíveis (TABELA 1). Estudos *in vivo* demonstraram que o
18 resultado do ciclo de infecção dos bunyavirus no vetor é consideravelmente diferente do
19 ciclo que ocorre no hospedeiro vertebrado, sendo predominante persistente ao invés de
20 lítico, e com prolongada liberação de vírus por várias semanas após a infecção
21 (WALTER & BARR, 2011).

22 Os membros do gênero *Hantavirus* não são classificados como arbovírus uma vez que
23 estes são transmitidos através de secreções de roedores infectados e mantidos por
24 infecções persistentes em roedores (WEBER *et al.*, 2002). A infecção destes roedores
25 pode persistir por muitos anos sem que estes animais apresentem quaisquer sinais da
26 doença. Os vírus são liberados na saliva, urina e fezes, e o contato com este material
27 permite a transmissão horizontal dos hantavírus entre os roedores. O contato do homem
28 com aerossóis infectados provenientes de fezes e urina de roedores determina a
29 ocorrência de uma infecção que pode se apresentar como febre hemorrágica com
30 síndrome renal ou como síndrome pulmonar por hantavirus, e esta última resulta em
31 50% de morte dos indivíduos acometidos (KHAN *et al.*, 1996, WALTER & BARR,
32 2011).

1 De maneira semelhante ao que ocorre para membros de outras famílias de vírus que
 2 infectam plantas (*Geminiviridae*, *Caulimoviridae*, *Potyviridae* e *Closteroviridae*), os
 3 membros do gênero *Tospovirus* são transmitidos por artrópodes. No entanto, pelo fato
 4 de não infectarem vertebrados, estes vírus de plantas transmitidos por artrópodes não
 5 são classificados como arbovírus (HOLLIDGE *et al.*, 2011). Alguns *Tospovirus* vêm
 6 emergindo e re-emergindo como importantes ameaças para diversas culturas utilizadas
 7 como fontes globais de alimentos. Este fenômeno parece estar relacionado à expansão
 8 geográfica do principal vetor envolvido na transmissão dos *Tospovirus* (*Frankliniella*
 9 *occidentalis*) (PAPPU, *et al.*, 2009, WALTER & BARR, 2011).

10

11 **Tabela 1: Classificação da Família *Bunyaviridae***

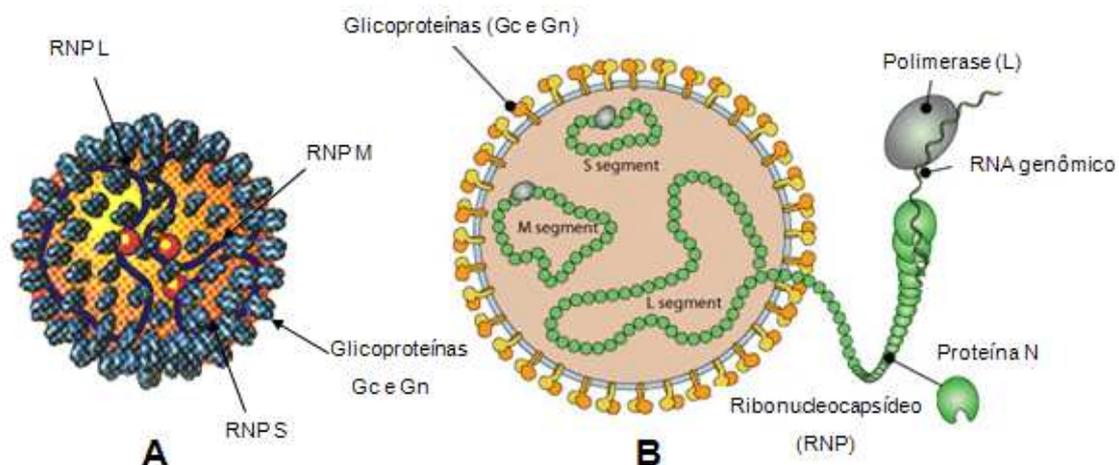
GÊNERO	EX. ESPÉCIES	HOSPEDEIRO	TRANSMISSÃO
<i>Orthobunyavirus</i>	Bunyawera, Lacrosse, California encefalitis, Oropouche, vírus do grupo C	Animais	Artrópode
<i>Phlebovirus</i>	Rift Valey fever	Animais	Artrópode
<i>Nairovirus</i>	Crimean-Congo hemorrhagic, Dugbe	Animais	Artrópode
<i>Hantavirus</i>	Hantaan, Sin Nombre	Animais	Secreção de roedores
<i>Tospovirus</i>	TSWV, PBNV	Plantas	Artrópode

12

13 1.2.1 - Estrutura e genoma dos vírus

14 A família *Bunyaviridae* é constituída por vírus envelopados que medem
 15 aproximadamente 80-120 nm. A partícula viral é em geral esférica, mas pode ter forma
 16 alongada (gênero *Hantavirus*). O envelope possui projeções de 5 – 10 nm constituídas
 17 pelas duas glicoproteínas que atravessam a bicamada lipídica, denominadas
 18 glicoproteína C (Gc ou G1) e glicoproteína N (Gn ou G2) que formam as espículas

1 virais. O genoma dos bunyavirus é constituído por três segmentos de RNA de fita
2 simples, de polaridade negativa, denominados de acordo com seu tamanho: L (“Large”),
3 M (“Medium”) e S (“Small”). Os segmentos encontram-se circularizados devido a
4 complementariedade existente entre sequências de cerca de quinze nucleotídeos das
5 regiões não traduzidas (NTRs) presentes nas extremidades 3’ e 5’. Essas seqüências são
6 altamente conservadas entre membros de um mesmo gênero, mas diferem entre
7 membros de gêneros diferentes e possuem sinais de ativação que estão envolvidos na
8 síntese de RNA e montagem das partículas virais (SCHMALJOHN & NICHOL, 2007,
9 WALTER & BARR, 2011). Cada um dos segmentos de RNA é envolvido pela
10 nucleoproteína denominada proteína N, e em associação com a RNA polimerase
11 dependente de RNA (RdRp), ou proteína L, esses elementos formam uma
12 ribonucleoproteína (RNP) de forma helicoidal. Ao contrário da maioria dos vírus de
13 RNA de fita negativa, os membros dessa família não possuem proteína de matriz, o que
14 sugere a existência de uma interação direta entre as RNP e as glicoproteínas do
15 envelope. A nucleoproteína (N) e as glicoproteínas (Gn e Gc) de envelope possuem
16 determinantes antigênicos grupo específicos que são empregados em testes sorológicos
17 para classificar os vírus dentro de gêneros e sorogrupos (FIGURA 2) (SCHMALJOHN
18 & NICHOL, 2007).



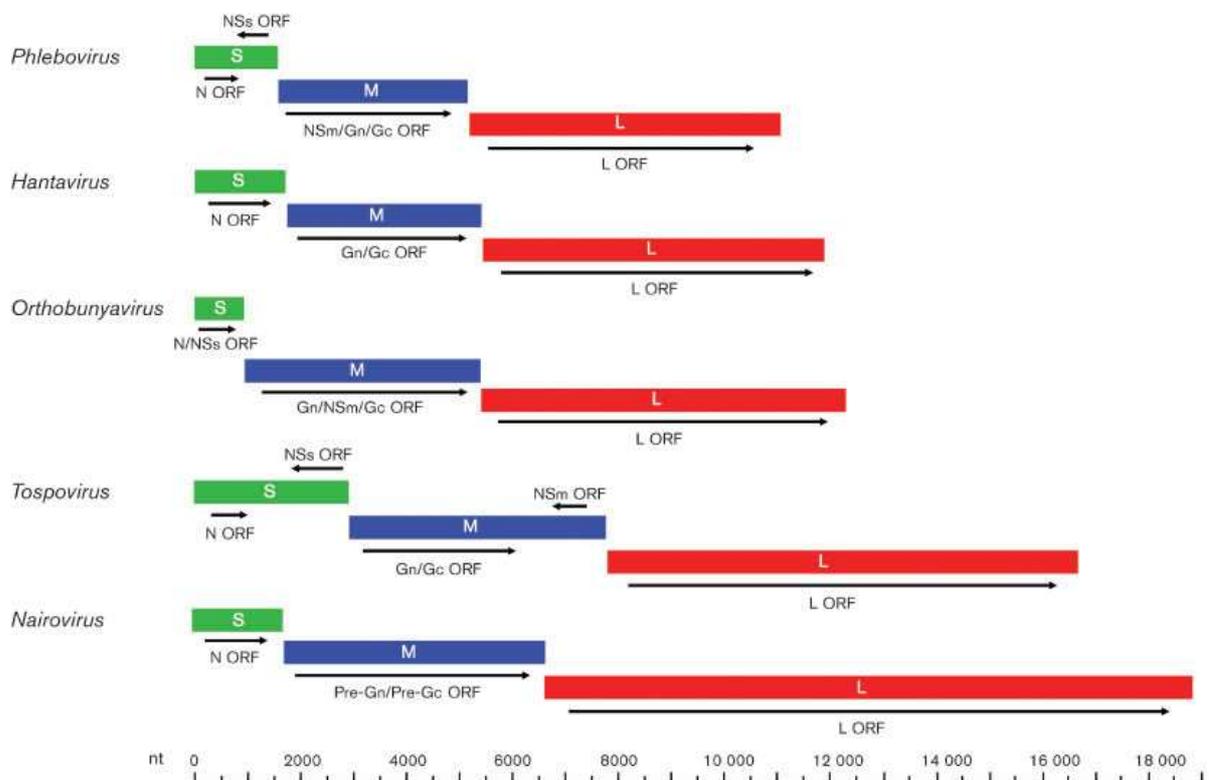
19

20 **Figura 2. Representação esquemática da partícula viral da família *Bunyviridae*.** A – visão
21 externa do envelope viral com as glicoproteínas de membranas Gc e Gn, e as três
22 ribonucleoproteínas (RNP) L, M e S no seu interior. B – representação de um corte da partícula
viral com suas três ribonucleoproteínas, compostos pela polimerase (L), proteína N e RNA
genômico. Fontes: adaptado de <http://web.telia.com>; <http://education.expasy.org>

22

1 O genoma dos bunyavirus codifica quatro proteínas estruturais que são comuns a todos
 2 os membros da família. O segmento L codifica a proteína L ou RdRp, que é responsável
 3 pela replicação e transcrição do genoma viral. O segmento M codifica as duas
 4 glicoproteínas do envelope, Gc (G1) e Gn (G2). Esse segmento inicialmente codifica
 5 uma poliproteína que posteriormente é clivada por proteases do hospedeiro. O
 6 segmento S codifica a proteína do nucleocapsídeo ou proteína N. Vírus dos gêneros
 7 *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* e *Tospovirus* produzem também duas proteínas não
 8 estruturais: NSm (codificada pelo segmento M) e NSs (codificada pelo segmento S)
 9 (FIGURA 3) (ELLIOTT, 1990; BEATY *et al.*, 1995; WEBER *et al.*, 2002;
 10 SCHMALJOHN & NICHOL, 2007).

11



12

13

14 **Figura 3. Genoma de cada um dos gêneros da família *Bunyviridae*.** Segmento L: origina a proteína
 15 L ou RNA polimerase dependente de RNA. Segmento M: origina as glicoproteínas Gc e Gn, e a
 16 proteína não estrutural NSm apenas para os Gêneros *Phlebovirus*, *Orthobunyavirus* e *Tospovirus*.
 17 Segmento S: origina a proteína N e a proteína não estrutural NSs (apenas gêneros *Phlebovirus*,
Orthobunyavirus e *Tospovirus*). *Orthobunyavirus*, *Hantavirus* e *Nairovirus* utilizam estratégia
 codificadora de senso negativo, enquanto *Phlebovirus* e *Tospovirus* estratégia ambisenso. O tamanho
 do genoma completo e de cada um dos segmentos para os diferentes gêneros pode ser estimado
 através da escala representada. Fonte: WALTER & BARR, 2011.

17

1 O segmento S dos *Orthobunyavirus* codifica as proteínas N e NSs em janelas abertas de
2 leitura (ORF) sobrepostas. Apenas um RNA mensageiro (RNAm) originado do
3 segmento S é identificado, o que sugere que N e NSs são gerados por reconhecimento
4 ribossomal de diferentes códons de iniciação nas distintas ORFs. Os membros dos
5 gêneros *Phlebovirus* e *Tospovirus* utilizam uma estratégia ambisenso para codificar a
6 proteína não estrutural NSs e a proteína estrutural N (FIGURA 3). Para esses vírus, a
7 proteína N é produzida a partir de um RNAm subgenômico complementar ao RNA viral
8 (RNA_v) e NSs é produzida a partir de um RNAm subgenômico de mesma polaridade do
9 RNA_v (FIGURA 4) (ELLIOTT, 1997; BEATY *et al.*, 1988; WEBER *et al.*, 2002;
10 SCHMALJOHN & NICHOL, 2007). A proteína N é o produto viral de maior
11 abundância nas células infectadas, sendo o antígeno reconhecido durante as provas de
12 fixação do complemento (FC). Seu principal papel é formar os nucleocapsídeos
13 helicoidais ao se enovelar a cada segmento de RNA viral e proteger o genoma da
14 degradação por RNAses, além de controlar a atividade da polimerase durante a
15 transcrição e replicação. Além disso, a proteína N precisa estar ligada às fitas de RNA
16 que constituem o genoma viral para que o empacotamento destas fitas e montagem das
17 partículas virais ocorram de forma correta. Desta forma, a interação “proteína N/RNA”
18 é crítica para a viabilidade do vírus (SCHMALJOHN & NICHOL, 2007; WALTER &
19 BARR, 2011; ZHENG & TAO, 2013).

20 A proteína NSs atua como um fator de virulência necessário para suprimir a transcrição
21 celular, inibindo tanto a produção de IFNs quanto a resposta celular aos IFNs. Foi
22 demonstrado para o vírus La crosse (LACV) que a NSs é capaz de suprimir a atividade
23 dos IFNs através do bloqueio da expressão gênica dependente de RNA-polimerase II
24 (RNA-pol II). A NSs atua como um importante fator de virulência para o LACV ao
25 inibir a expressão dos IFNs através da indução da degradação proteossomal da
26 subunidade RPB1 da RNA-pol II (VERBRUGGEN *et al.*, 2011). Para o vírus
27 Bunyamwera (BUNV) foi demonstrado que a NSs reduz a expressão de IFNs ao inibir a
28 fosforilação do domínio C-terminal da subunidade RPB1 da RNA-pol II, o que impede
29 a alongação das cadeias de RNA, ocasionando uma infrarregulação da síntese dos
30 RNAm celulares de forma inespecífica (THOMAS *et al.*, 2004). Além de interferir na
31 resposta antiviral celular mediada por IFNs, a NSs também é capaz de suprimir a
32 produção de RNA de interferência (RNAi), que seria um possível mecanismo de
33 inibição da multiplicação dos bunyavirus. Por fim, essa proteína não estrutural pode

1 regular a função da RdRp viral (CHEN *et al.*, 2010; WEBER *et al.*, 2002). Estudos
2 demonstraram que os vírus pertencentes a três dos dezoito sorogrupos do gênero
3 *Orthobunyavirus* (Anopheles A, Anopheles B e Tete) não codificam a NSs
4 (MOHAMED *et al.*, 2009).

5 O segmento M codifica, numa única janela aberta de leitura, uma poliproteína que é
6 posteriormente clivada nas proteínas estruturais Gc e Gn e na proteína não estrutural
7 NSm, sendo esta última apenas para *Phlebovirus* e *Orthobunyavirus*. Os *Tospovirus*
8 utilizam uma estratégia ambisenso para codificar os produtos do segmento M, sendo as
9 glicoproteínas Gc e Gn codificadas por um RNAm complementar ao RNAv e a proteína
10 NSm codificada por um RNAm de mesma polaridade do RNAv (FIGURAS 3 e 4)
11 (SCHMALJOHN & NICHOL, 2007). Estudos demonstraram a importância da NSm
12 para a montagem das partículas do vírus Bunyamwera. No entanto, a função desta
13 proteína não estrutural é ainda muito pouco conhecida para a maior parte dos vírus desta
14 família (SHI *et al.*, 2006).

15 As glicoproteínas de membrana desempenham importante papel na adsorção viral à
16 célula hospedeira. É conhecido que Gc é a principal responsável pela adsorção às
17 células de vertebrados, enquanto Gn estaria envolvida na adsorção às células dos
18 hospedeiros invertebrados (artrópodes). No entanto, é provável que haja o requerimento
19 das duas glicoproteínas em ambos os casos devido à necessidade de se manter uma
20 conformação adequada que é mediada pela dimerização entre Gc e Gn. As
21 glicoproteínas também desempenham importante papel na fusão do envelope viral à
22 membrana do endossomo após endocitose da partícula viral pela célula. A acidificação
23 da vesícula endossomal acarreta mudanças conformacionais na glicoproteína Gc que
24 expõe domínios hidrofóbicos, o que promove a liberação do genoma viral e da
25 polimerase no interior do citoplasma. Por fim, as glicoproteínas de membrana induzem
26 a formação de anticorpos neutralizantes que reconhecem especialmente Gc, o que
27 resulta numa efetiva imunidade humoral. As glicoproteínas possuem determinantes
28 antigênicos grupo-específicos que são reconhecidos nos testes de neutralização e
29 inibição da hemaglutinação (SCHMALJOHN & NICHOL, 2007).

30 Por fim, o segmento L codifica através de uma única janela aberta de leitura, a RdRp ou
31 proteína L responsável pela transcrição e replicação do genoma. Há evidências que
32 sugerem o papel da proteína L em propriedades biológicas dos vírus, como virulência e

1 espectro de hospedeiros (ELLIOTT, 1990; SCHMALJOHN & NICHOL, 2007). A
2 RdRp é a proteína mais conservada e mais caracterizada para os membros da família
3 *Bunyaviridae*. Esta proteína pode ser dividida em quatro regiões denominadas regiões 1,
4 2, 3 e 4. As regiões 1 e 2 estão localizadas próximo à extremidade N-terminal, são
5 ligadas por regiões variáveis e são conservadas entre as famílias *Bunyaviridae* e
6 *Arenaviridae*. A região 3 está localizada no centro da proteína e constitui o denominado
7 “módulo da polimerase”, sendo este formado pelo pré-motivo A e pelos motivos A, B,
8 C, D e E. Esta região possui aminoácidos que são conservados entre as RdRp de
9 membros de diversas famílias virais. A região 4 foi mais recentemente identificada para
10 a RdRp da família *Bunyaviridae* e está localizada após a região 3. Esta região possui
11 quatro resíduos de aminoácidos conservados: G (Gly - posição 1271), Y (Tyr - posição
12 1292), G (Gly - posição 1320) e G (Gly - posição 1333) (POCH *et al.*, 1989; MULLER
13 *et al.*, 1994; ROBERTS *et al.*, 1995; AQUINO *et al.*, 2003).

14

15 A extremidade N-terminal da RdRp do vírus La crosse possui um domínio com
16 atividade de endonuclease para fragmentos de RNA contendo Cap. Esse domínio possui
17 características estruturais e bioquímicas muito semelhantes ao domínio N-terminal da
18 subunidade PA da polimerase do vírus influenza. Análises do genoma demonstraram
19 que um domínio endonuclease homólogo está presente na proteína L de vírus
20 pertencentes a quatro gêneros da família *Bunyaviridae* (*Orthobunyavirus*, *Tospovirus*,
21 *Phlebovirus* e *Hantavirus*). Para o gênero *Nairovirus* o domínio endonuclease não foi
22 identificado, pois a sua localização na sequência da RdRp é incerta. O domínio
23 endonuclease seria responsável por clivar RNAs mensageiros celulares, originando
24 pequenos fragmentos de RNA ligados a um Cap em sua extremidade 5' (mecanismo
25 “cap-snatching”). A presença deste domínio seria fundamental para a transcrição dos
26 RNAm virais pela RdRp, visto que a síntese dos RNAm virais é dependente de
27 fragmentos de RNA ligados a Cap (REGUERA *et al.*, 2010).

28

29

30

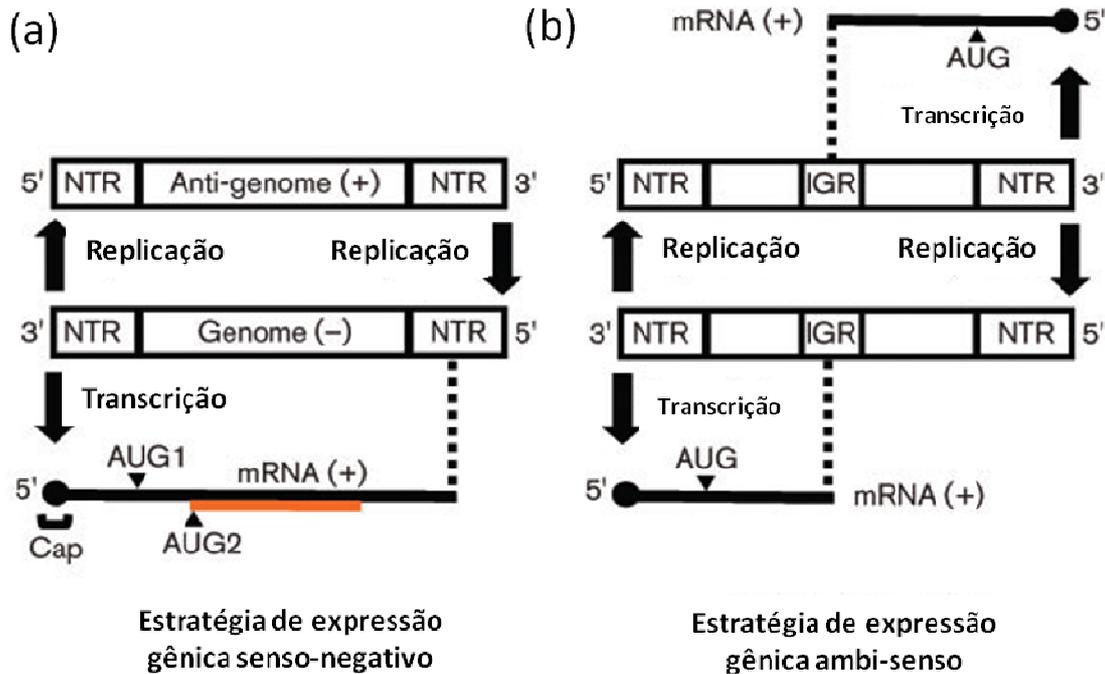


Figura 4. Modelos de estratégias de expressão gênica utilizadas pela família *Bunyaviridae*. (a) Bunyavirus que apresentam uma estratégia de expressão gênica senso-negativo possuem segmentos de RNA genômico que contêm uma única unidade transcrional flanqueada por NTRs. O anti-genoma de senso positivo correspondente ao genoma é transcrionalmente silencioso. No caso do segmento S, essa unidade transcrional é constituída de ORFs sobrepostas acessadas a partir de diferentes códons de iniciação. (b) Bunyavirus que apresentam uma estratégia de expressão gênica ambisenso são capazes de expressar RNAm a partir das fitas de RNA tanto do genoma quanto do anti-genoma, com sinais de terminação de transcrição posicionados em uma região intergênica (IGR) central. Fonte: adaptado de WALTER e BARR, 2011.

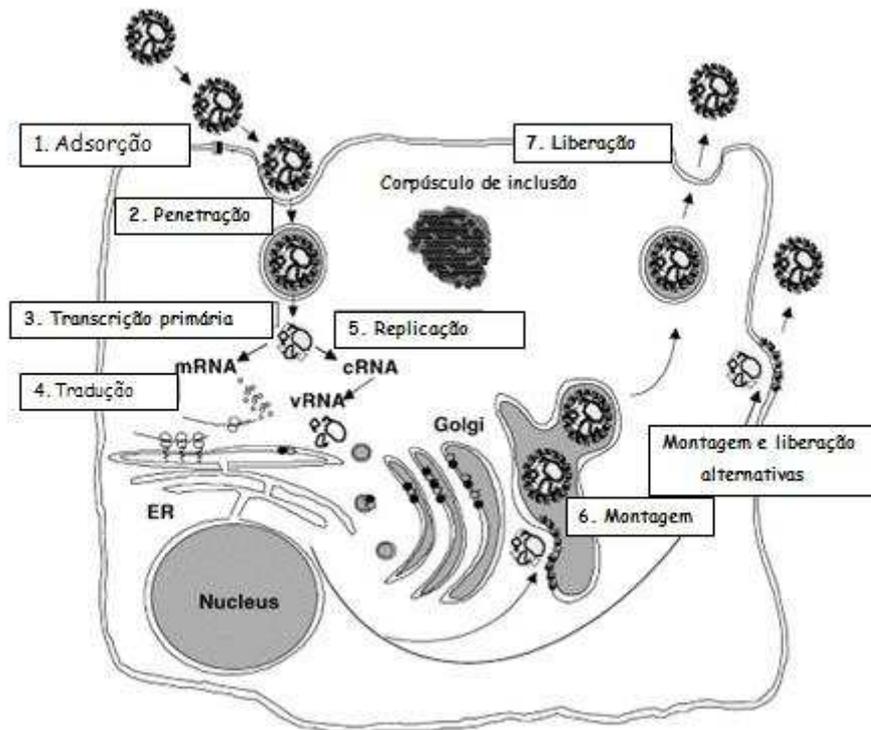
1.2.2 - Multiplicação Viral

O ciclo de multiplicação viral dos bunyavirus ocorre integralmente no citoplasma (FIGURA 5). O primeiro passo envolve a adsorção da partícula viral à membrana celular através da interação entre receptores celulares de superfície e as glicoproteínas virais Gc e Gn. Independente do tipo de célula em que a adsorção ocorra (hospedeiro vertebrado ou invertebrado) as duas glicoproteínas são necessárias para a adsorção, devido à conformação resultante da sua dimerização. Para a maior parte dos bunyavirus, os receptores celulares aos quais as glicoproteínas se ligam ainda não foram identificados (SCHMALJOHN & NICHOL, 2007). Para os membros do gênero *Hantavirus* os receptores celulares aos quais as glicoproteínas se ligam são $\beta 3$ integrinas humanas presentes na superfície de células endoteliais e plaquetas (MACKOW & GAVRILOVSKAYA, 2001). A adsorção e penetração dos *Phlebovirus* em células

1 dendríticas envolvem a interação das glicoproteínas virais de superfície com o receptor
2 DC-SIGN (LOZACH *et al.*, 2011).

3 Após a adsorção, os vírus penetram na célula através da via endocítica e são
4 acondicionados nos endossomos. No interior desse compartimento, o baixo pH induz
5 mudanças conformacionais em Gc, o que leva à fusão entre o envelope viral e a
6 membrana do endossomo e liberação do genoma viral e da polimerase no citoplasma da
7 célula. Apesar de Gc estar envolvida na fusão do envelope, também é importante a
8 participação da Gn nesse processo, visto que Gc não apresenta a conformação adequada
9 quando não está associada à Gn (SCHMALJOHN & NICHOL, 2007).

10 Após o desnudamento do genoma viral, é iniciada a transcrição primária do RNAv de
11 senso negativo em RNAm pela interação da RdRp viral com as três ribonucleoproteínas
12 virais. Estudos sugerem papel da proteína N na iniciação da transcrição, o que implica
13 que apenas segmentos envolvidos por essa proteína possam servir como molde para a
14 proteína L. A síntese do RNAm viral é iniciada por seqüências curtas, não-virais,
15 ligadas a cap. Esses iniciadores são obtidos por clivagem da extremidade 5' de RNAm
16 celular citoplasmático executada pela atividade de endonuclease da proteína L. Como
17 resultado, o RNAm viral possui seqüências de 10 a 20 nucleotídeos na extremidade 5'
18 que não estão presentes no RNAv. Além disso, os RNAm são truncados na extremidade
19 3' em aproximadamente 100 nucleotídeos, quando comparados à seqüência do RNA
20 complementar (RNAc), e não possuem cauda poliA (SCHMALJOHN & NICHOL,
21 2007).



1

2 **Figura 5. Ciclo de multiplicação dos vírus da família *Bunyaviridae*.** 1 - Adsorção das partículas
 3 virais á superfície da célula; 2 - Penetração por endocitose seguida por fusão de membrana,
 4 permitindo a liberação dos nucleocapsídeos e da polimerase no citoplasma; 3 - Transcrição
 5 primária; 4 - Tradução das proteínas virais; 5 - Replicação do RNAv através de um RNAc
 6 intermediário; 6 - Montagem das partículas no Golgi; 7 - Exocitose das partículas do Golgi. ER:
 7 retículo endoplasmático. Alguns vírus da família utilizam uma montagem alternativa, brotando
 8 diretamente da membrana plasmática. Fonte: adaptado de SCHAMALJOHN et al, 2007.

5

6 A tradução dos segmentos de RNAm S e L ocorre em ribossomos livres no citoplasma,
 7 ao passo que o RNAm do segmento M é traduzido em ribossomos associados às
 8 membranas do retículo endoplasmático rugoso. Depois de ser sintetizada, a poliproteína
 9 originada do segmento M é clivada e as sequências polipeptídicas originadas sofrem
 10 glicosilação primária no complexo de Golgi para originar as glicoproteínas do envelope
 11 (Gc e Gn). A proteína L não sofre processamento pós traducional, e o polipeptídeo que
 12 emerge dos ribossomos livres já possui as atividades de polimerase e de endonuclease
 13 (SCHMALJOHN & NICHOL, 2007).

14 Para que a replicação do genoma viral ocorra é preciso que o RNAc sintetizado a partir
 15 do RNAv esteja associado à proteína N. Ao contrário da transcrição primária, em que a
 16 proteína L depende da iniciação por cap, na replicação a polimerase copia a fita molde a
 17 partir da extremidade 3' sem o auxílio de um iniciador, a fim de sintetizar um transcrito
 18 do tamanho integral do genoma (SCHMALJOHN & NICHOL, 2007).

1 Depois de ser sintetizado, o RNAv é associado à proteína N e à proteína L para formar
2 os nucleocapsídeos que se acumulam na parte citoplasmática da membrana do Golgi
3 para que ocorra a morfogênese. As glicoproteínas Gc e Gn se acumulam na parte
4 luminal da membrana dessa organela após sofrerem glicosilações terminais. Em
5 seguida, ocorre a aquisição de membranas modificadas do hospedeiro através de
6 brotamento e liberação dentro do aparelho de Golgi. Apesar de se conhecer a
7 importância da associação da proteína N ao RNAv para que ocorra a sua encapsidação,
8 o mecanismo pelo qual os três segmentos constituintes do genoma são seletivamente
9 empacotados, originando partículas virais viáveis com uma cópia de cada um dos
10 segmentos, ainda não é conhecido. Logo após o brotamento da membrana do complexo
11 de Golgi, as partículas virais são transportadas no interior de vesículas até a membrana
12 plasmática onde são liberadas por um mecanismo semelhante á exocitose
13 (SCHMALJOHN & NICHOL, 2007; ZHENG & TAO, 2013).

1

2 **1.3 - Gênero *Orthobunyavirus***

3 O gênero *Orthobunyavirus* é composto por mais de 170 vírus e pelo menos 30 desses
4 são causadores de doença em humanos, sendo o maior gênero dentro da família
5 *Bunyaviridae* (HART *et al.*, 2008). O critério de classificação nesse grupo é baseado nas
6 características sorológicas, bioquímicas e genéticas em comum apresentadas por esses
7 vírus. O gênero é formado por 18 sorogrupos divididos por relações sorológicas
8 determinadas por testes de fixação de complemento, que distinguem os grupos com base
9 em antígenos presentes na proteína N (AQUINO *et al.*, 2002). O último relatório do
10 Comitê Internacional para Taxonomia de Vírus (ICTV, 2012) classificou esses vírus em
11 48 espécies, sendo o restante dos isolados classificados como amostras virais. Essa
12 classificação foi baseada em reações cruzadas nos testes de neutralização e inibição da
13 hemaglutinação. Deve-se ressaltar que essa classificação está sujeita a modificações,
14 visto que, para a maior parte dos *Orthobunyavirus*, pouco é conhecido de seus aspectos
15 moleculares. Além disso, a ocorrência de rearranjos durante a evolução leva ao
16 surgimento de novas amostras com características distintas daquelas já isoladas (HART
17 *et al.*, 2008).

18 Um estudo colaborativo entre a NAMRU-6 (US Naval Medical Research Unit No. 6) e
19 o Ministério da Saúde do Peru investiga, desde 1995, a etiologia de doenças febris no
20 Peru e outros países da América Latina. Desde então, cerca de 54 orthobunyavirus,
21 incluindo membros dos sorogrupos Guaroa, C, Maguari e Simbu foram isolados e
22 alguns deles caracterizados (AGUILAR *et al.*, 2011; HONTZ *et al.*, 2015).

23 Assim como é conhecido para outros vírus de genoma segmentado, o rearranjo genético
24 desempenha um importante papel na evolução dos *Orthobunyavirus*, sendo capaz de
25 alterar sua antigenicidade, virulência e espectro de hospedeiros. Na literatura, é possível
26 encontrar alguns exemplos de *Orthobunyavirus* que sofreram rearranjos na natureza e
27 emergiram como importantes patógenos humanos ou animais através deste mecanismo
28 genético.

29 O vírus Ngari (NRIV) foi isolado pela primeira vez de um mosquito do gênero *Aedes* e
30 foi por algumas vezes associado a surtos de febre hemorrágica na África. Estudos
31 revelaram que o NRIV surgiu a partir de um rearranjo entre os segmentos S e L do

1 BUNV e o segmento M do vírus Batai, ambos pertencentes ao sorogrupo Bunyamwera
2 e até o momento nunca associados ao desenvolvimento de doenças hemorrágicas
3 (BRIESE *et al.*, 2006; GERRARD *et al.*, 2004).

4 O vírus Schmollenberg (SBV) foi isolado pela primeira vez na Alemanha em 2011 de
5 vacas doentes que apresentavam febre, redução na produção de leite e diarreia, e, desde
6 então, vem sendo associado a surtos de malformações em ruminantes (bovinos,
7 caprinos, ovinos, etc) em vários países Europa. A caracterização molecular deste vírus
8 revelou que ele é o resultado de um rearranjo ocorrido na natureza entre os segmentos S
9 e L do vírus Shamonda (SHAV) e o segmento M do vírus Sathuperi (SATV), ambos
10 pertencentes ao sorogrupo Simbu e isolados pela primeira vez do sangue ruminantes
11 sadios no Japão em 2002 e 1999, respectivamente. Como estes dois vírus compartilham
12 a mesma distribuição geográfica (Ásia e África), artrópode vetor (mosquitos do gênero
13 *Culicoides*) e hospedeiro vertebrado (ruminantes), é provável que o SBV tenha sido
14 gerado por rearranjo genético durante uma coinfeção natural por SHAV e SATV
15 (British Veterinary Association, 2013; YANASE *et al.* 2012).

16 O vírus Jatobal (JATV) foi isolado em 1985 no estado do Pará (Brasil) e classificado
17 dentro do sorogrupo Simbu. Estudos posteriores concluíram que o JATV é o resultado
18 de um rearranjo entre o segmento S do OROV (sorogrupo Simbu) e um segmento M de
19 origem desconhecida (SAEED *et al.*, 2001). Da mesma forma, o vírus Iquitos (IQTV)
20 foi isolado em 1999 de um paciente febril no Peru. Posteriormente, o mesmo vírus foi
21 identificado como causador de um “surto de Oropouche” entre 2005 e 2006 nesta
22 mesma cidade. Entretanto, análises filogenéticas demonstraram que o vírus Iquitos trata-
23 se de um rearranjo entre os segmentos L e S do vírus Oropouche e o segmento M de
24 outro membro do grupo Simbu (AGUILAR *et al.*, 2011).

25 Assim como NRIV, SBV, JATV e IQTV, outros *Orthobunyavirus* já foram
26 identificados como sendo o resultado de rearranjos, o que aponta para a importância
27 deste mecanismo genético para a emergência de novos agentes virais dentro deste
28 gênero.

29 Os *Orthobunyavirus* são arbovírus transmitidos, na maior parte dos casos, através de
30 mosquitos e maruins, e o ciclo de vida natural desses vírus envolve alguns vertebrados
31 (aves e mamíferos), que podem atuar como hospedeiros amplificadores e na
32 disseminação dos vírus através da migração. A infecção desses hospedeiros é

1 geralmente inaparente, embora desenvolvam viremia suficiente para infectar artrópodes
2 hematófagos. Os humanos são geralmente considerados hospedeiros finais, uma vez
3 que, apesar de se tornarem doentes, raramente desenvolvem alta viremia. Esses podem
4 se tornar infectados quando invadem o hábitat natural dos vetores artrópodes (HART *et*
5 *al.*, 2008).

6 Ensaio sorológico como inibição da hemaglutinação (IH), fixação de complemento
7 (FC) e neutralização (NT) tradicionalmente são utilizados no diagnóstico das infecções
8 pelos *Orthobunyavirus*. O método da IH é muito sensível, embora reações cruzadas com
9 outros membros do mesmo grupo possam acontecer. O método da FC é mais específico
10 que IH e é capaz de detectar anticorpos que usualmente aparecem duas semanas após o
11 início da infecção, podendo persistir por até dois anos. O princípio da NT é a inibição
12 da infectividade viral pela ação de anticorpos de alta especificidade cujo título pode ser
13 determinado *in vivo* ou *in vitro*. O teste da NT é considerado o padrão ouro para o
14 estudo sorológico dos arbovírus. (AQUINO *et al.*, 2002; ZELENA *et al.*, 2008). O
15 método de MacELISA vem sendo utilizado para a detecção de anticorpos do tipo IgM, o
16 que permite o diagnóstico precoce da infecção ainda durante a fase aguda. Nos anos 90,
17 métodos de RT-PCR foram introduzidos para o diagnóstico dos *Orthobunyavirus*,
18 especialmente dos sorogrupos Califórnia e Bunyamwera (AQUINO *et al.*, 2002).

19 Os *Orthobunyavirus* podem causar uma ampla variedade de manifestações clínicas,
20 desde febre (vírus Tahyna), artralgia febril (vírus Oropouche), encefalites (vírus La
21 Crosse) até febre hemorrágica (vírus Ngari). Alguns *Orthobunyavirus* podem causar
22 ainda abortos ou efeitos teratogênicos no gado (vírus Akabane, Schmallenberg e Cache
23 Valley). Embora a maior parte dos *Orthobunyavirus* produza infecções com sintomas
24 brandos, alguns podem causar infecções graves que podem levar à morte, como as
25 encefalites provocadas pelos vírus do grupo California e a febre hemorrágica produzida
26 pelo vírus Ngari (HART *et al.*, 2008).

27 O vírus Oropouche, do grupo Simbu, é de grande importância para a saúde pública,
28 sobretudo para os países das Américas do Sul e Central, uma vez que já causou mais de
29 um milhão e meio de infecções nessas regiões. No Brasil, a febre do Oropouche é a
30 segunda arbovirose mais importante, com a ocorrência de diversos surtos epidêmicos e
31 uma grande morbidade. Na região amazônica, foi identificada uma imensa variedade de
32 *Orthobunyavirus* causadores de doença aos seres humanos. Inquéritos sorológicos

1 realizados na região revelaram a presença de anticorpos para diversos arbovírus, como
2 os vírus Mucambo, Caraparu, Murutucu e Oriboca (NUNES *et al.*, 2007; AZEVEDO *et*
3 *al.*, 2007b). Estudos epidemiológicos conduzidos com pacientes acometidos por doença
4 febril na América Latina evidenciaram uma prevalência de 2,5% de infecção por
5 *Orthobunyavirus*. Das cinquenta e quatro amostras virais isoladas, trinta amostras foram
6 classificadas como vírus do grupo C, dezoito como OROV e seis como Guaroa
7 (GROV), através das técnicas de ELISA e NT (FORSHEY *et al.*, 2010).

8 O tratamento das arboviroses consiste em medidas para controle dos sintomas e para
9 manutenção do estado geral do paciente. Ainda não estão estabelecidos protocolos de
10 tratamento antivirais para os *Orthobunyavirus*. Estudos sugeriram a atividade antiviral
11 da ribavirina frente a infecções pelo vírus La crosse em seres humanos (HADDOW *et*
12 *al.*, 2009). No entanto, estudos *in vitro* demonstraram que a ribavirina não possui
13 atividade antiviral sobre outros membros do gênero *Orthobunyavirus*, como os vírus
14 Caraparu e Oropouche (LIVONESI *et al.*, 2006).

15

16 **1.3.1 - *Orthobunyavirus* do grupo C**

17 O Laboratório de Vírus de Belém foi fundado em 1954 por pesquisadores do Serviço
18 Especial de Saúde Pública do Brasil e da Fundação Rockefeller com o objetivo de
19 identificar os agentes causadores de doenças febris semelhantes à febre amarela que
20 acometiam a população nas proximidades da cidade de Belém. Os pesquisadores
21 concluíram que a doença acometia trabalhadores que realizavam atividades na floresta
22 (desmatamento e extração de borracha) e moradores da região urbana que entravam em
23 contato com a floresta. Desde então, os pesquisadores conseguiram isolar mais de
24 10000 amostras pertencentes a cerca de 183 diferentes tipos de arbovírus, dos quais 157
25 foram pela primeira vez isolados no Brasil. Essas amostras foram isoladas de animais
26 sentinelas, animais selvagens, artrópodes vetores e de pacientes com doenças febris
27 (CAUSEY *et al.*, 1961; LEÃO *et al.*, 1997).

28 As amostras de vírus isoladas foram enviadas para a Fundação Rockefeller, em Nova
29 Iorque, onde foram realizados estudos sorológicos e estudos comparativos com vírus de
30 outras partes do mundo. Concluiu-se que as amostras de 451 arbovírus constituíam 18
31 sorotipos, sendo que 10 desses pertenciam a sorogrupos conhecidos, como sorogrupos
32 A, B, Bunyawera e Califórnia. Os outros sete demonstraram constituir dois novos
33 sorogrupos denominados grupos C e Guamá, e o sorotipo restante (Tacaiuma) foi

1 posteriormente agrupado no sorogrupo *Anopheles* A. Cerca de duzentas e cinco das
2 amostras isoladas correspondiam a vírus do grupo C, o que demonstra a importância e a
3 grande circulação desses vírus na região amazônica (CAUSEY *et al.*, 1961).

4 Posteriormente, outros vírus do grupo C foram isolados no Brasil, assim como em
5 outros países. São eles: vírus Itaqui, isolado em Belém/PA no Brasil (SHOPE *et al.*,
6 1961), vírus Madrid e Ossa no Panamá, vírus Nepuyo em Trinidad-Tobago e no Brasil
7 (SHOPE & WHITMAN, 1966), vírus Restan em Trinidad, Tobago e Suriname
8 (JONKERS *et al.*, 1967), vírus Bruconha no estado de São Paulo (CALISHER *et al.*,
9 1983) e vírus Gumbo-Limbo nos Estados Unidos (SHOPE, 1993).

10 Um estudo de vigilância epidemiológica realizado entre 2003 e 2008 com pacientes
11 febris no Peru e na Bolívia resultou no isolamento de algumas amostras virais. Análises
12 filogenéticas demonstraram que alguns destes isolados apresentavam-se intimamente
13 relacionados ao vírus Caraparu (FVB0426, FMD0783, IQD5973), enquanto o isolado
14 IQE7620, inicialmente denominado Zungarococha, está intimamente relacionado ao vírus
15 Marituba. No entanto, dois isolados (FSL2923 e IQT9646) apresentaram-se como um
16 provável rearranjo entre os vírus Caraparu (segmentos L e S) e Madrid (segmento M).
17 Estes dois novos isolados foram denominados Itaya vírus em referência ao rio que
18 circunda Iquitos, onde o vírus foi isolado (HANG *et al.*, 2014; HONTZ *et al.*, 2015).

19 Atualmente, o sorogrupo C é composto por 15 vírus: Apeu (APEUV), Bruconha
20 (BRCV), Caraparu (CARV), Itaqui (ITQV), Madrid (MADV), Marituba (MTBV),
21 Murutucu (MURV), Oriboca (ORIV), Ossa (OSSAV), Restan (RESV), Gumbo-Limbo
22 (GLV), Nepuyo (NEPV), Vines (VINV), 63U11 e Itaya (ITAYAV). Todos estão
23 associados a regiões de florestas em regiões tropicais e subtropicais das Américas e
24 transmitidos a pequenos roedores, primatas não humanos, marsupiais e seres humanos
25 por mosquitos culicíneos.

26 A atual classificação do grupo C é baseada em relações antigênicas determinadas
27 utilizando os testes de fixação do complemento (FC), neutralização (NT) e inibição da
28 hemaglutinação (IH). De acordo com a classificação sorológica por IH e NT, os vírus do
29 grupo C podem ser divididos em quatro complexos antigênicos: complexo Caraparu
30 (CARV, OSSAV, APEUV, VINV e BRCV); complexo Marituba (MTBV, MURV,
31 RESV, NEPV e GLV); complexo Oriboca (ORIV e ITQV); o complexo Madrid

1 (MADV), sendo este último considerado o membro do grupo C antígenicamente mais
2 distinto (KARABASTOS, 2002; NUNES *et al.*, 2005).

3 O ICTV atualmente utiliza como critérios para definição de espécies para o gênero
4 orthobunyavirus os dados sorológicos (reações cruzadas para NT e IH) e a divergência
5 de aminoácidos maior que 10% para a proteína N. No entanto, a aplicação destes
6 critérios não tem se mostrado suficiente para classificar os vírus do grupo C no nível de
7 espécie, o que sugere a necessidade de revisão dos critérios de especiação (HANG *et*
8 *al.*, 2014). Além disso, o fato dos vírus do grupo C serem potencialmente sujeitos à
9 ocorrência de rearranjos é outro fator que dificulta sua classificação em espécies. Dentre
10 os 15 vírus pertencentes ao sorogrupo C, apenas CARV, MADV, MTBV e ORIV são
11 considerados espécies virais na atual classificação do ICTV. Os demais membros deste
12 sorogrupo são considerados sorotipos pertencentes a estas espécies (ICTV, 2012).

13

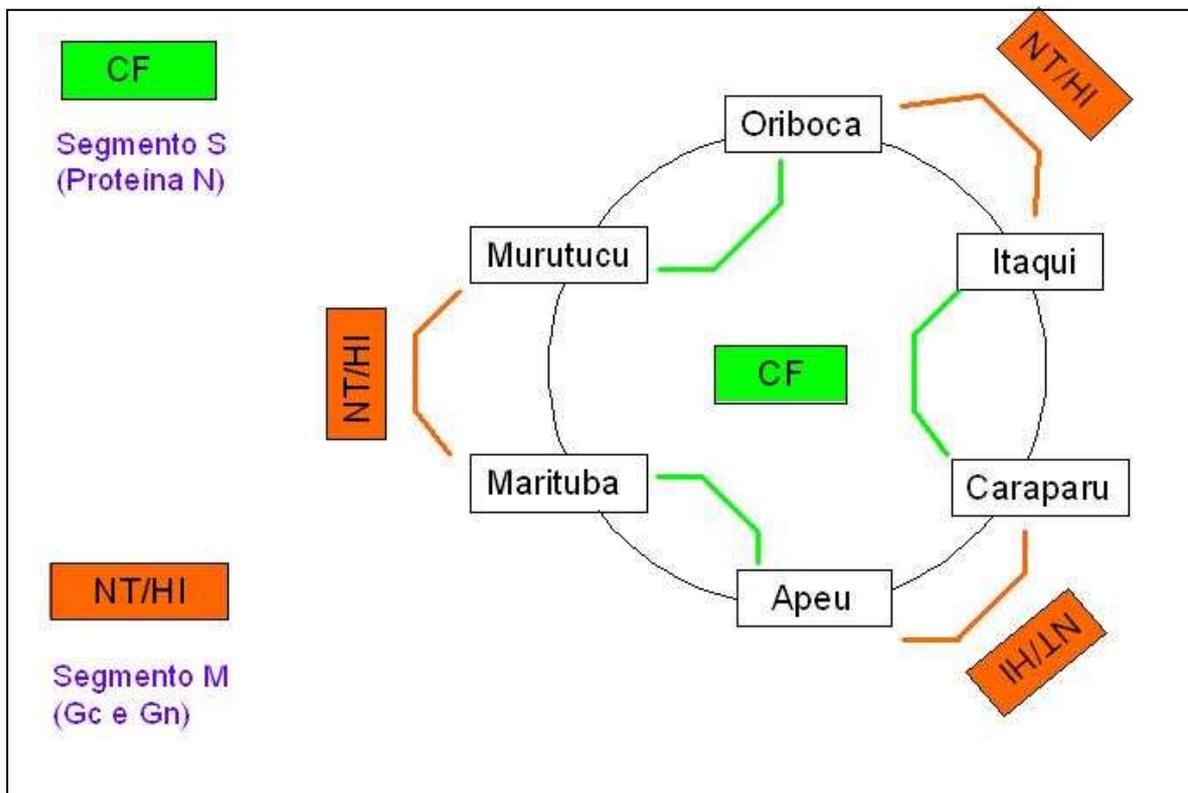
14 Em estudos realizados em 1962, SHOPE e colaboradores efetuaram provas sorológicas
15 (FC, NT e IH) para 200 amostras do grupo C isoladas na região amazônica. Eles
16 verificaram que as seis amostras protótipos brasileiras em estudo (APEUV, CARV,
17 ITQV, MTBV, MURV e ORIV) mostravam padrões antigênicos distintos quando
18 analisados pelos testes de FC ou IH/NT. Em reações de FC, que determinam anticorpos
19 dirigidos contra a proteína N, os grupos que reagiam cruzadamente e apresentavam-se
20 como pares antigênicos eram: MURV/ORIV, ITQV/CARV e MTBV/APEUV. Já nas
21 provas de IH e NT, que determinam anticorpos dirigidos contra as glicoproteínas Gc e
22 Gn, os pares antigênicos foram ORIV/ITQV, APEUV/CARV e MTBV/MURV
23 (FIGURA 6) (SHOPE *et al.*, 1962). Posteriormente, o sequenciamento completo das
24 quatro amostras virais protótipo listadas pelo ICTV (CARV, ORIV, MTBV e MADV)
25 confirmaram os dados sorológicos, uma vez que estes quatro vírus se agruparam de
26 forma distante quando o dendograma para o segmento M foi analisado, o que justifica a
27 ausência de reações cruzadas nas provas NT e IH (HANG *et al.*, 2014).

28

29 Os *Orthobunyavirus* do grupo C encontram-se distribuídos em países das Américas do
30 Sul (Brasil, Peru, Equador, Venezuela, Suriname e Guiana Francesa), Central (Panamá,
31 Trinidad, Honduras e Guatemala) e Norte (México e Estados Unidos). Alguns vírus têm
32 sido encontrados somente em determinados países, tais como os MADV e OSSAV no

1 Panamá; APEUV e BRCV no Brasil; VINV no Equador; e GLV nos Estados Unidos.
 2 No entanto, outros membros deste sorogrupo apresentam uma distribuição mais ampla,
 3 como os CARV, ITQV, ORIV e MURV encontrados no Brasil, Peru, Venezuela,
 4 Guiana Francesa e Trinidad. A taxa de anticorpos para esses arbovírus, observada na
 5 população humana de diferentes países das Américas Central e do Sul é bastante
 6 variável sendo verificada uma prevalência para anticorpos inibidores da hemaglutinação
 7 de até 40% (Shope *et al.*, 1988).

8



9

10

Figura 6. Relações sorológicas entre os *Orthobunyavirus* do grupo C: Apeu, Caraparu, Itaqui,

Marituba, Murutucu e Oriboca. Fonte: SHOPE *et al.*, 1962 modificado por Magalhães, 2004

11

Uma grande diversidade de hospedeiros invertebrados e vertebrados encontra-se

12

envolvida no ciclo natural de manutenção e transmissão dos vírus do grupo C. Dentre os

13

hospedeiros invertebrados, mosquitos pertencentes ao gênero *Culex*, principalmente ao

14

subgênero *Melanoconium* são reconhecidos como vetores potenciais para estes agentes

15

virais. Além disso, várias outras espécies de culicídeos pertencentes aos gêneros *Aede,s*

16

Limatus, *Wyeomyia*, *Coquillettidia*, *Mansonia* e *Psorophora* também podem atuar como

17

vetores para os vírus do grupo C. Em relação aos hospedeiros vertebrados, roedores

18

pertencentes aos gêneros *Proechimys*, *Oryzomys*, *Nectomys*, *Zygodontomys*, *Sigmodon*,

19

Heteromys e certos marsupiais membros dos gêneros *Didelphis*, *Marmosa* e *Caluromys*

1 são os mais comumente implicados no ciclo de manutenção dos vírus do grupo C. Além
2 disso, NEPV e CARV já foram isolados de espécies de morcegos *Artibeus literatus* e
3 *Artibeus jamaicensis* (SHOPE *et al.*, 1988).

4 Os vírus do grupo C são mantidos na natureza em dois ciclos silvestres de transmissão.
5 Um dos ciclos ocorre ao nível da copa das árvores cuja transmissão dos vírus é realizada
6 principalmente por mosquitos culicídeos que infectam marsupiais durante o repasto
7 sanguíneo. O outro ciclo ocorre ao nível do solo e a transmissão viral é mantida entre
8 culicídeos e roedores. Evidências ecológicas e epidemiológicas apontam para a
9 existência de fatores que servem de elo que interligam estes dois ciclos silvestres,
10 tornando-os dinâmicos entre si. Tais fatores referem-se à coexistência de hospedeiros
11 vertebrados, invertebrados e dos vírus do grupo C em um ecossistema compacto, uma
12 vez que um mesmo vírus pode infectar diferentes hospedeiros invertebrados e
13 vertebrados. Um terceiro ciclo, envolvendo humanos, pode ocorrer circunstancialmente,
14 quando o homem adentra a floresta e se torna infectado. Neste caso, o homem passa a se
15 comportar como um hospedeiro incidental. (SHOPE *et al.*, 1988). O compartilhamento
16 de hospedeiros vertebrados e invertebrados e a coexistência dos vírus do grupo C no
17 mesmo ecossistema permitem a ocorrência de coinfeções naturais de um mesmo
18 hospedeiro por dois ou mais sorotipos virais, o que pode favorecer a ocorrência de
19 rearranjos genéticos e o surgimento de novas amostras virais com segmentos genômicos
20 adquiridos de diferentes linhagens parentais.

21 Entre os quinze vírus pertencentes ao sorogrupo C doze (CARV, ORIV, ITQV, NEPV,
22 APEUV, MTBV, MURV, RESV, OSSAV, IQTV, ITAYAV e MADV) foram
23 associados à doença em seres humanos, a qual geralmente é caracterizada como
24 autolimitada, semelhante à dengue, consistindo de febre, dor de cabeça, mialgia, náusea,
25 vômito e fadiga, com 2 a 5 dias de duração (NUNES *et al.*, 2005).

26 Atualmente, o diagnóstico das infecções causadas pelos *Orthobunyavirus* do grupo C
27 ainda consiste de testes sorológicos de FC, IH e NT. Porém, reações cruzadas entre os
28 diferentes vírus dentro desse grupo podem ocorrer quando esses testes são empregados,
29 além de serem demorados e trabalhosos. Assim, os métodos sorológicos são de grande
30 utilidade e aplicabilidade em inquéritos sorológicos, porém não são os mais adequados
31 para o diagnóstico rápido durante a fase aguda da infecção, ou para análises
32 taxonômicas e filogenéticas (AQUINO *et al.*, 2002). A partir de 1990, foi introduzido o

1 método de RT-PCR para o diagnóstico de alguns *Orthobunyavirus*, especialmente para
2 os sorogrupos Califórnia e Bunyamwera. No entanto, alguns vírus do sorogrupo C ainda
3 não possuem uma caracterização completa do seu genoma, assim como dos aspectos
4 referentes à sua biologia, patogenia e epidemiologia (AQUINO *et al.*, 2002).

5

6 **1.3.2 – Caraparu, Apeu e Itaqui**

7 O vírus Caraparu (CARV BeAn 3994) foi isolado pela primeira vez de um macaco
8 sentinela (*Cebus apella*) na Amazônia brasileira, na floresta de Utinga, em Belém do
9 Pará. Posteriormente, o vírus também foi isolado do sangue de indivíduos febris que
10 trabalhavam na floresta e de artrópodes na mesma região (CAUSEY *et al.*, 1961). O
11 CARV é conhecido por ocasionar doença em seres humanos (MAGALHÃES *et al.*,
12 2007), e as manifestações clínicas mais comuns são febre alta, dor de cabeça severa,
13 mialgia e prostração (IVERSSON *et al.*, 1987)

14 Estudos conduzidos pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL) desde 1961 revelaram a presença
15 de anticorpos contra o CARV em amostras de sangue de aves silvestres na Mata
16 Atlântica no Estado de São Paulo (FERREIRA *et al.*, 1994). Em 1987, Iversson e
17 colaboradores identificaram um caso de doença febril em um homem, em Itapitangui,
18 no vale do Ribeira, no estado de São Paulo. O diagnóstico sorológico identificou o
19 agente etiológico como sendo o vírus Caraparu. Estudos conduzidos na mesma região
20 revelaram a presença de anticorpos contra o CARV no soro de trabalhadores saudáveis
21 que tiveram contato com a floresta, como também em mulheres e crianças saudáveis
22 que nunca tiveram contato com esse ambiente. Isso sugere uma possível transmissão
23 urbana desse vírus nessa região (IVERSSON *et al.*, 1987).

24 O vírus Apeu (BeAn 848) foi pela primeira vez isolado em 1955 de um macaco
25 sentinela (*Cebus apella*) em Belém do Pará, e foi classificado como um *Orthobunyavirus*
26 do grupo C dentro do complexo Caraparu (CAUSEY *et al.*, 1961). O vírus Apeu
27 provoca nos seres humanos uma doença caracterizada por sintomas semelhantes à gripe,
28 incluindo dor de cabeça, febre alta e mialgia, podendo estar associados a náusea,
29 vômitos, prostração, fadiga e fotofobia, com duração de 2 a 5 dias (GIBBS *et al.*, 1964).
30 Atualmente, o ICTV não classifica o APEUV como uma espécie viral. Este vírus é
31 classificado como um sorotipo viral pertencente à espécie Caraparu.

1 Magalhães e colaboradores (2011) sequenciaram parte dos segmentos S (765 nt), M
2 (1131 nt) e L (1254 nt) da amostra APEUV BeAn 848. As análises filogenéticas
3 demonstraram que o segmento S desta amostra viral é muito diferente do segmento S
4 dos *Orthobunyavirus* até então sequenciados. Estudos recentes demonstraram a
5 proximidade do segmento S desta amostra viral com o MTBV. Por outro lado, a árvore
6 filogenética feita com base no segmento M desta amostra viral (APEUV BeAn 848) a
7 agrupou dentro do complexo Caraparu juntamente aos VINV e CARV. Os dados
8 sugerem que os segmentos S e M do APEUV (BeAn848) possivelmente possuem
9 origens distintas (HANG *et al.*, 2014; MAGALHÃES *et al.*, 2011).

10 O vírus Itaqui (BeAn 12797) foi isolado em 1956 de um macaco sentinela (*Cebus*
11 *apella*) na Amazônia brasileira próximo a Belém do Pará e foi classificado por métodos
12 sorológicos como um *Orthobunyavirus* do grupo C e agrupado no complexo Oriboca.
13 Após 1956, o vírus Itaqui (ITQV) foi isolado de um caso de infecção humana, macacos
14 e camundongos sentinelas e roedores silvestres. O único caso de infecção em seres
15 humanos por ITQV relatado até hoje ocorreu em um homem de 17 anos que apresentou
16 dores de cabeça e febre em novembro de 1959 enquanto trabalhava numa clareira às
17 margens da Floresta Oriboca próximo a Belém. Através de prova de IH e NT o ITQV
18 foi relacionado ao vírus Oriboca e foi indistinguível do CARV através da prova de FC
19 (SHOPE *et al.*, 1961). Uma investigação molecular seria inviabilizada no caso de uma
20 suspeita de infecção por este vírus, visto que não há sequências publicadas para o ITQV.

21 Os dados demonstram que pouco se conhece sobre as características moleculares dos
22 vírus do grupo C APEUV e ITQV e revelam a necessidade de uma caracterização
23 molecular mais aprofundada destas amostras virais, visando elucidar as diferenças e
24 semelhanças entre esses agentes, confirmar a sua classificação sorológica e fornecer
25 métodos de diagnóstico mais específicos, uma vez que ocorrem reações cruzadas
26 quando os métodos sorológicos atualmente empregados são utilizados.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

II - RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

1
2 O desequilíbrio dos ecossistemas associado ao crescimento urbano desordenado
3 interferem nos ciclos que mantêm os arbovírus na natureza e leva à exposição da
4 população a agentes infecciosos emergentes e re-emergentes, dentre os quais se incluem
5 os arbovírus. As doenças emergentes virais que acometem a população humana são
6 agravadas pelo desconhecimento, na maior parte das vezes, dos agentes etiológicos
7 dessas doenças, o que dificulta o seu diagnóstico, tratamento e controle epidemiológico.
8 As arboviroses emergentes e re-emergentes vêm ocorrendo em diversas partes do
9 mundo, e muitas vezes em caráter epidêmico. Dentre essas doenças destacam-se no
10 Brasil a dengue, a febre amarela e a febre do Oropouche.

11 O Brasil, por ter grande parte do seu território recoberto por florestas tropicais, é um
12 ambiente altamente favorável para o surgimento de infecções humanas por arbovírus
13 mantidos em ciclos zoonóticos. Esses vírus podem ser transmitidos aos seres humanos
14 quando esses penetram no seu ambiente natural, ou podem se estabelecer em ciclos
15 urbanos causando grandes epidemias, como ocorre com a dengue em grande parte do
16 país e com a febre do Oropouche na região Amazônica. O risco de emergência das
17 arboviroses no Brasil também está relacionado à existência de grandes centros urbanos,
18 ocupados de maneira desordenada e que abrigam condições ideais para a manutenção e
19 disseminação das arboviroses. A presença de vetores (*Culex* e *Aedes aegypti*) altamente
20 antropofílicos e capazes de manter os arbovírus em ciclos urbanos, é um fator agravante
21 para a ocorrência de epidemias envolvendo as arboviroses.

22 As mudanças sofridas pelo ambiente interferem nos ciclos dos arbovírus, e,
23 conseqüentemente, é possível que membros da família *Bunyaviridae* possam se tornar
24 importantes agentes infecciosos emergentes e re-emergentes. Além disso, o amplo
25 espectro de hospedeiros vertebrados e de vetores invertebrados e sua ampla distribuição
26 em diversas partes do mundo podem contribuir para a emergência dos vírus dessa
27 família. O potencial de emergência e re-emergência dos membros da família
28 *Bunyaviridae* é bem exemplificado pelos Hantavírus, cuja elevação na incidência de
29 infecções teve como causa principal o aumento da população de roedores, em
30 decorrência do aumento do cultivo de grãos.

31 Os *Orthobunyavirus* do grupo C representam um grupo de arbovírus reconhecidamente
32 responsáveis por ocasionar infecções em seres humanos e pela grande circulação na
33 região da Amazônia. No entanto, nos últimos anos foi demonstrada a circulação desses

1 vírus em outras regiões do Brasil, especialmente no estado de São Paulo, onde inclusive
2 foram reportados casos de infecções humanas. Isso nos leva a crer que a distribuição
3 desses vírus é ainda muito pouco conhecida e que possam existir outros membros deste
4 sorogrupo ainda não isolados circulando na natureza, o que reflete o direcionamento dos
5 estudos para as áreas nas quais esses vírus foram inicialmente isolados e onde há
6 programas específicos de estudo das arboviroses.

7 Além disso, dificuldades de interpretação dos resultados obtidos nesses estudos são
8 frequentes, uma vez que as relações sorológicas entre os vírus do grupo C são bastante
9 complexas e as reações cruzadas nos testes sorológicos utilizados para identificar e
10 classificar esses vírus são bastante comuns. Isso aponta para as perspectivas de
11 substituição dos métodos de diagnóstico sorológicos pelos métodos moleculares, que
12 são muito mais específicos. Para tanto, maiores conhecimentos sobre a biologia
13 molecular desses vírus são necessários, o que implica na necessidade de
14 sequenciamento e caracterização do seu genoma. Por sua vez, a caracterização do
15 genoma dos vírus do grupo C permitirá o entendimento das complexas relações
16 antigênicas existentes entre os diferentes sorotipos, o que muitas vezes dificulta a sua
17 classificação no nível de espécie, além da detecção de possíveis padrões de rearranjo,
18 um mecanismo comum entre membros do gênero *Orthobunyavirus*.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

III – OBJETIVOS

1

2 **3.1 - Objetivo geral:**

3 Caracterização molecular dos *Orthobunyavirus* do grupo C Caraparu (BeAn 3994),
4 Apeu (BeAn 848) e Itaquí (BeAn 12797) e padronização de um ensaio de PCR
5 qualitativo para detecção dos vírus Caraparu, Apeu e Itaquí.

6 **3.2 - Objetivos específicos:**

7 **3.2.1- Caracterização molecular do Caraparu:**

- 8 ➤ Concluir o sequenciamento do segmento L.
- 9 ➤ Realizar o sequenciamento parcial dos segmentos M
- 10 ➤ Análise filogenética e comparação com as sequências de outros membros da
11 família *Bunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus* e sorogrupo C.

12 **3.2.2- Caracterização molecular do Apeu:**

- 13 ➤ Concluir o sequenciamento do segmento L.
- 14 ➤ Identificar, na sequência deduzida de aminoácidos, a presença de regiões
15 importantes para o desempenho da função da RNA polimerase viral, bem como
16 das demais regiões conservadas entre os membros da família.
- 17 ➤ Realizar o sequenciamento parcial do segmento M
- 18 ➤ Análises filogenéticas e comparação com as sequências dos segmentos M e L de
19 outros membros da família *Bunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus* e sorogrupo
20 C.

1

2 **3.2.3 – Caracterização molecular do Itaqui**

3 ➤ Sequenciar parte dos segmentos M e L.

4

5 ➤ Análises filogenéticas e comparação com as sequências dos segmentos M e L de
6 outros membros da família *Bunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus* e sorogrupo

7 C.

8 **3.2.4 – Padronização da PCR para identificar os *Orthobunyavirus* do grupo C**
9 **CARV, APEUV e ITQV**

10 ➤ Selecionar regiões genômicas alvo nos segmentos M e L;

11 ➤ Desenhar iniciadores adequados;

12 ➤ Realizar a PCR a fim de identificar e diferenciar as três amostras virais (CARV,
13 APEUV e ITQV)

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

IV MATERIAIS E MÉTODOS

1

2 **4.1 – Células**

3 **4.1.1 – Células Vero**

4 As células da linhagem contínua Vero, derivadas de epitélio de rim de macaco verde
5 (*Cercopithecus aethiops*), foram adquiridas originalmente da American Type Culture
6 Collection (ATCC), Maryland, USA, na passagem número 126. Essas foram cultivadas
7 no Laboratório de Vírus da UFMG por um número desconhecido de passagens. Essas
8 células foram utilizadas para multiplicação e titulação de vírus. Células vero foram
9 utilizadas para multiplicação do vírus pela sua incapacidade de IFNs do tipo I, devido a
10 uma deleção cromossômica nas seqüências gênicas que expressam IFNs do tipo I
11 (PETRILLO-PEIXOTO *et al*, 1980; DIAZ *et al*, 1988) e, por isso, não são capazes de
12 produzir essas citocinas frente a estímulos.

13 **4.1.2 - Meios de cultivo**

14 As células vero foram cultivadas em meio mínimo de Eagle (MEM), suplementado com
15 5% de soro fetal bovino (SFB) (CULTILAB, Brasil), gentamicina (50 µg/mL),
16 penicilina potássica (100 U/mL) e fungizona (2 µg/mL). As células foram mantidas em
17 garrafas apropriadas e incubadas em atmosfera de 5% CO₂ a 37°C.

18 Os subcultivos das linhagens foram realizados em intervalos de 2-3 dias, utilizando
19 solução salina tamponada por fosfato (PBS: NaCl 1,5 mM; Na₂HPO₄ 40 mM; KH₂PO₄;
20 pH 7,2) e solução de tripsina EDTA (NaCl 136 mM; KCl 5 mM; glicose 55 mM;
21 NaHCO₃ 69 mM; 0,5 g p/v tripsina 1:250 (Difco); EDTA 0,5 mM; 1% vermelho de
22 fenol).

1 **4.2 - Amostras virais**

2 **4.2.1 - Origem**

3 Nesse estudo foram utilizadas as amostra de *Orthobunyavirus* do grupo C Caraparu
4 (BeAn 3994), Apeu (BeAn 848) e Itaqui (BeAn 12797), obtidas da ATCC. Estas
5 amostras originais foram previamente clonadas e purificadas de placas de lise em
6 monocamada de células Vero. Os clones obtidos para CARV (Clone 9), APEUV (Clone
7 5) e ITQV (Clone 1) foram utilizados neste estudo.

8 **4.2.2 - Produção dos estoques virais**

9 Os vírus foram multiplicados em garrafas (182 cm²) contendo monocamada completa
10 de células Vero (20x10⁶ células). A adsorção foi feita a uma multiplicidade de infecção
11 (m.o.i.) de 0,1, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, com homogeneização em intervalos
12 regulares de 10 minutos durante 1 hora. Em seguida, meio MEM com 2% de SFB foi
13 acrescentado para um volume final de 25 mL, e a garrafa incubada até o efeito citopático
14 atingir 70 a 90% da monocamada. O sobrenadante das culturas infectadas foi clarificado
15 por centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos a 4°C e distribuído em alíquotas de 200 µL
16 que foram armazenadas a -70°C para posterior titulação e uso.

17 **4.3 - Titulação dos estoques virais**

18 **4.3.1 - Titulação dos vírus pelo método de Dulbecco**

19 Em placas de seis poços contendo células Vero com 90% de confluência (1x10⁶ células)
20 são adicionados 500 µL de diluições seriadas do vírus em 5 câmaras, sendo 1 reservada
21 para o controle de células. Após 1 hora de adsorção o meio é removido e são
22 acrescentados, a cada câmara, 2,0 mL de DMEM semi-sólido acrescido de 2% de
23 carboximetilcelulose (CMC) e suplementado com 2% de SFB, seguindo nova incubação
24 a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após o aparecimento das placas de lise, o meio é
25 desprezado e as células fixadas com solução de formol a 10% por 30 minutos. A seguir,
26 a monocamada é corada com solução de cristal violeta (1% de corante em 20% de

1 solução alcoólica), por 15 minutos. O título é expresso em unidades formadoras de
2 placa por mililitro (UFP/mL), calculada pelo número de placas (entre 30 e 300 placas) e
3 multiplicando pelo inverso da diluição (DULBECCO *et al.*, 1954).

4 **4.3.2 – Titulação do vírus pelo método de TCID50**

5 As células Vero são implantadas em microplacas de 96 câmaras, em MEM 5% de SFB.
6 Após 24h, o meio é retirado, sendo acrescentados 100 µl das diluições dos vírus
7 (diluições 10^{-1} até 10^{-10}) em meio MEM 2% de SFB. A coluna da microplaca
8 correspondente ao controle de células recebe 100 µl de MEM 2% de SFB em
9 substituição às diluições dos vírus. Após a homogeneização, as microplacas são
10 incubadas em atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C. A leitura das mesmas é feita a cada 24h
11 durante 5 dias. O título viral é determinado através da dose infectante para 50% da
12 cultura de tecido (TCID50), calculado pelo método de REED & MUENCH
13 (SCHMIDT, 1979).

14 **4.4- Sequenciamento dos vírus Caraparu, Apeu e Itaqui**

15 **4.4.1 - Extração do RNA viral dos vírus Caraparu, Apeu e Itaqui**

16 O RNA viral dos vírus Apeu, Caraparu e Itaqui foi obtido do sobrenadante de células
17 infectadas e mortas pelo congelamento a -70°C e descongelamento. O RNA foi
18 purificado utilizando o QIAamp Viral RNA Kit (Qiagen, Germany), conforme
19 recomendações do fabricante. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro ND-1000
20 (nanoDrop Technologies) e estocado a -70°C até o momento do uso.

21 **4.4.2 - Amplificação do segmento genômico**

22 Os iniciadores utilizados para amplificar os segmentos do genoma viral foram
23 desenhados tendo como base as regiões consenso de sequências disponíveis no
24 GenBank (National Center for Biotechnology Information, USA) para alguns membros
25 do gênero *Orthobunyavirus* (BUNV, ZUNV, CARV, APEUV, etc). Os iniciadores

1 foram desenhados a partir de regiões conservadas das proteínas virais através do
 2 alinhamento das sequências inferidas de aminoácidos para os segmentos destes vírus. À
 3 medida que novas sequências eram obtidas, estas também foram utilizadas como molde
 4 para desenhar novos pares de iniciadores (TABELA 2).

Tabela 2: Iniciadores utilizados para amplificar os segmentos genômicos dos vírus do grupo C.

Iniciador	Sequência (5'→ 3')	Segmento Amplificado
CARAS64F	TTCATTTGACGTGATGA	L
CARAL5973F	TCTTAATATGGACTGCTC	L
CARA5535F	AGAGTTTCATGGAATAACTGG	L
BUNL3643F	GCAACCAGGCCAATATGAAG	L
CARAL3534F	GGAAGATGTAATGTAAATAGTATG	L
ZUNVL2500F	ACATTTACCAGTTCCAAGTC	L
APEUL3971F	AAGGTATTTTTGTTTCGACAGG	L
CARAL198F	ATAGGGATTGAGTACAGGAAT	L
CARAL1F	AGTAGTGACTCCTCAGTTAT	L
APEUL1128F	GATGTTGAAAAATATGAAAC	L
APEUL1842F	ATTAGACAAGGAGCGTTGTCA	L
APEUL1801F	CATATAAAGTTAAGGGGGGAT	L
BUNL4827F	CTTATTCACCATTCCCCTGC	L
CARAS783R	GATTACGCTAAACGGATACC	L
APEUL6904R	TGGAACATTTCAGTATCTTT	L
CARAL6055R	TCCATTGAAGAATACCAT	L
BUNL5254R	CCACGATAATCATTTCACTTG	L
BUNL5505R	GCCAGTTATTCCATGAAACTCTTTC	L
APEUL4900R	CTTCATTAGCACCGCCCA	L
APEUL3663R	GATTTCCAAAAGATAAGCAGC	L
APEUL4507R	TGTGTTGGGCTTTGTATAGAT	L
CARAL2047R	GATAGTGCTAGCGAATTCAT	L
APEUL1028R	GCCAACTTTATCAATTTAGTA	L
APEUL1958R	TCGATAATGATGTGAAGAATG	L
APEUL2699R	TCAAAGTCACGTTCTGATTC	L
APEUL1540MF	ACTGACATCCTGGG	M
APEUL1801F	CATATAAAGTTAAGGGGGGAT	M
CARA3250MF	TGGGGATGTGAAGAAT	M

CARVM2689F	CATCAAAGTCCAAAAG	M
CARV3856MR	AATGCATCCTACGCA	M
CARV3178MR	GCATCTACCTGTGCA	M
ZUNVL2900R	TCGATTGCAGGCTTATCTTC	M
APEUVM3248R	ACACCCAAATTCTTC	M

1 **4.4.3 - Condições das amplificações**

2 As reações de RT PCR foram realizadas em um volume final de 20 μ L. Um volume de
3 5 μ L dos RNAs extraídos do sobrenadante de células infectadas foi colocado em
4 microtubos juntamente a 50 picomoles dos iniciadores senso e foram incubados a 70°C
5 por 5 minutos e no gelo por 5 minutos. Esse passo é feito para facilitar a ruptura de
6 estruturas secundárias do RNA e para desfazer possíveis dímeros de iniciadores.
7 Posteriormente, ainda em banho de gelo, foram adicionados: 1,25 μ L de dNTPs
8 (10mM), 2 μ L de Dithiothreitol (DTT 100mM) (Promega, USA), 1 μ L de transcriptase
9 reversa M-MLV (200 U/ μ L) e 4 μ L de tampão 5X da enzima (250mM tris pH 8,9,
10 15mM MgCl₂, 37 mM KCl). Um volume de 1,75 μ L de água foi adicionado para
11 completar volume para 20 μ L. As reações foram mantidas a 42°C por 60 minutos. Os
12 cDNAs obtidos foram submetidos à amplificação por PCR.

13 As reações de PCR foram realizadas em volume final de 20 μ L, na qual foram utilizados
14 2 μ L das reações de RT, 1,2 μ L de MgCl₂ (25mM), 2 μ L de tampão 10X, 0,2 μ L da
15 enzima Taq10 (2,5U/ μ L), 0,5 μ L dos iniciadores senso e antisense (10pM/ μ L), 0,5 μ L de
16 dNTPs (10mM) e 13,1 μ L de água para PCR.

17 As reações de PCR foram processadas em termociclador sob um ciclo de 3 minutos a
18 95°C, 35 ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 50°C e 1 minuto a 72°C, e um
19 ciclo final de extensão de 5 minutos a 72°C. As condições das reações foram otimizadas
20 para cada par de iniciadores utilizados. Para alguns pares de iniciadores um gradiente de
21 temperaturas foi realizado para identificar a temperatura ideal de amplificação.

22 Ao produto de cada reação e ao marcador de tamanho molecular foi adicionado o
23 SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) e estes foram separados em gel de agarose a
24 1%, em TAE 1X, a uma d.d.p. constante de 100V. Os fragmentos serão visualizados em
25 transluminador ultravioleta e os géis analisados e fotografados. As bandas referentes aos

1 amplificados desejados serão cortadas do gel com bisturi cirúrgico e posteriormente
2 purificadas com o Kit QIAEXII gel Extraction (Qiagen).

3 **4.4.4 - Ligação dos produtos de PCR ao vetor pGEM-T**

4 Os fragmentos amplificados pela reação de PCR e purificados foram inseridos no
5 plasmídeo pGEM-T, utilizando o sistema de clonagem pGEM-T Easy Vector Systems
6 (Promega, USA).

7 Para a reação de ligação foram adicionados 5µL do tampão de ligação (2 X), 1 µL (3 U)
8 da enzima T4 DNA ligase, 1 µL (50 ng) do pGEM-T e 3 µL do DNA. As reações foram
9 incubadas a 4°C por 18 horas. O produto da ligação foi utilizado para a transformação
10 de *Escherichia coli* DH5α quimicamente competentes.

11 **4.4.5 - Transformação bacteriana por choque térmico**

12 Os produtos da ligação dos fragmentos de PCR ao vetor pGEM foram utilizados para a
13 transformação de *Escherichia coli* DH5α quimicamente competentes, preparadas de
14 acordo com protocolo descrito por Sambrook e colaboradores em 1989.

15 Em microtubo foram adicionados 10 µL do material proveniente da ligação e 50 µL da
16 bactéria quimiocompetente. Os tubos foram mantidos em banho de gelo por 30 minutos
17 e, posteriormente, incubados a 42°C por 2,5 minutos e banho de gelo por 2 minutos. A
18 seguir, foram adicionados 500 µL de meio LB 1X sem antibiótico (Bacto triptona 1%
19 p/v, extrato de levedura 0,55 p/v, NaCl 171mM) e as bactérias incubadas a 37°C, sob
20 agitação, durante 1 hora. As bactérias foram sedimentadas por centrifugação, o
21 sobrenadante desprezado e ressuspendidas em 100 µL de meio LB 1X. A suspensão foi
22 então inoculada em placas de Petri contendo meio LB ágar suplementado com
23 ampicilina (50 µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C por 18 horas (SAMBROOK
24 *et al.*, 1989; HANAHAN *et al.*, 1991).

1 **4.4.6 - Triagem das colônias por PCR**

2 As colônias bacterianas obtidas foram coletadas e semeadas em 10 ml de meio LB1X
3 contendo ampicilina (50 µg/mL). Os clones bacterianos então foram triados para
4 verificar a presença dos amplificadores de interesse utilizando iniciadores específicos para
5 o inserto e para o vetor. Alíquotas de 2µL das culturas foram utilizadas como molde
6 para a reação de PCR, conforme protocolo já descrito. Os produtos obtidos foram
7 separados em gel de agarose a 1%, em TAE 1X, e visualizados sob luz ultravioleta.
8 Alíquotas das colônias identificadas como positivas foram congeladas com 30% de
9 glicerol a -70°C.

10 **4.4.7 - Obtenção do plasmídeo para sequenciamento**

11 Foi utilizado o kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega-USA) para
12 obtenção do DNA plasmidial das culturas obtidas após transformação, conforme
13 instruções do fabricante. O DNA plasmidial obtido foi dosado em espectrofotômetro
14 ND-1000 (nanoDrop Technologies) e armazenado em freezer a -20°C, até o momento
15 do uso.

16 **4.4.8 – Sequenciamento**

17 O sequenciamento foi realizado pelo método didesoxi em sequenciador automático
18 capilar MegaBace1000 (GE HEALTHCARE), utilizando o kit DYEnamic™ ET Dye
19 Terminator (MegaBACE™ - GE Healthcare), obedecendo às condições de reação e
20 leitura indicadas pelo fabricante (SANGER *et al.*, 1977).

21 A reação de sequenciamento foi realizada com os iniciadores universais do M13 em
22 placa de 96 câmaras, em termociclador Eppendorf 96-well mastercycle®. As condições
23 utilizadas na reação foram: desnaturação a 95°C por 25 segundos, pareamento dos
24 iniciadores a 50°C por 15 segundos, extensão a 60°C por 3 minutos, sendo esse ciclo
25 repetido por 35 vezes.

1 Os resultados do sequenciamento foram armazenados na forma de cromatogramas
2 processados automaticamente pelo equipamento. As sequências então foram analisadas
3 e trabalhadas para eliminar regiões do vetor e montagem das sequências consenso.

4 **4.4.9 - Análise das sequências**

5 Para montagem e visualização das sequências finais, os cromatogramas obtidos no
6 sequenciamento foram analisados utilizando os programas Phred (EWING *et al.*, 1998a;
7 EWING *et al.*, 1998b) através da homepage da EMBRAPA (Empresa Brasileira de
8 Pesquisa Agropecuária) (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>). As sequências
9 foram então agrupadas através do programa de montagem de sequências CAP3 para
10 obtenção das sequências consenso. As sequências consenso foram então comparadas
11 com sequências depositadas no GenBank, utilizando o programa BLASTn
12 (ALTSCHUL *et al.*, 1997; www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). As sequências de aminoácidos
13 foram deduzidas a partir das sequências nucleotídicas através do programa “Six-Frame
14 Translation” (http://www.bioline.com/calculator/01_13.html) e foram comparadas a
15 sequências depositadas no GenBank com auxílio do programa BLASTp.

16 O alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos foi realizado no programa
17 MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Os percentuais de identidade de
18 aminoácidos e nucleotídeos foram calculados através do software LALIGN
19 (http://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html). Múltiplos alinhamentos de
20 sequências foram gerados pelo software ClustalW no programa MEGA5 e estes foram
21 revisados manualmente.

22 **4.4.10 – Inferências filogenéticas**

23 Análises filogenéticas foram feitas separadamente para os segmentos M e L dos vírus
24 Caraparu, Apeu e Itaquí. As árvores foram construídas pelo método de distância
25 Neighborn-Joining (“agrupamento de vizinhos”) (NJ), e pelo método de Máxima
26 Parcimônia (MP).

27

1 Os métodos de distância se baseiam no fato de que as diferenças entre sequências
2 homólogas originam-se a partir de mutações (substituições) que ocorreram em
3 linhagens que se diversificaram a partir de seu ancestral comum. A quantificação
4 dessas diferenças pode ser utilizada para a inferência de filogenias, sendo esta
5 quantificação expressa na forma de valores de distância. Os algoritmos de
6 reconstrução filogenética que utilizam essas medidas são conhecidos coletivamente
7 como métodos de distâncias.

8

9 Por outro lado, os métodos baseados em caracteres discretos reconstroem a árvore
10 filogenética diretamente a partir dos dados. O método de MP se baseia em um
11 modelo de evolução onde uma mudança é mais provável do que duas. Ou seja,
12 trata substituições independentes gerando o mesmo resultado como um evento
13 relativamente raro. Assim ele busca encontrar a árvore que requer o menor
14 número de mudanças (mais parcimoniosa) para explicar as diferenças
15 observadas entre sequências (MATIOLI, 2001).

16

17 Enquanto os métodos de distância reduzem a variação entre duas sequências a uma
18 única medida de distância entre elas e trabalham com essas distâncias na estimativa da
19 árvore final, os métodos baseados em caracteres discretos analisam cada sítio
20 separadamente e constroem a árvore final diretamente a partir dos próprios caracteres
21 (MATIOLI, 2001).

22 Assim as árvores utilizando-se o modelo de distância NJ foram construídas no
23 programa MEGA5, e o modelo de substituição de nucleotídeos utilizado foi o modelo
24 de distância PAM (Point Accepted Mutation), também conhecido como modelo de
25 Dayhoof. Este modelo é utilizado para árvores construídas a partir de sequências de
26 aminoácidos e leva em consideração o fato de que as substituições ocorrem mais
27 frequentemente entre aminoácidos com propriedades bioquímicas semelhantes.
28 (MATIOLI, 2001).

29 As árvores construídas por MP foram feitas com o auxílio do programa
30 MEGA5, onde 100 árvores aleatórias iniciais foram usadas para a busca da
31 árvore e usando o algoritmo NCI ("closest-neighbor interchange") (MATIOLI,

1 2001). Para se medir a confiabilidade dos ramos reconstruídos por ambos os
2 métodos, utilizou-se o teste de “Bootstrap”. Durante as análises filogenéticas,
3 foram feitas análises com 1000 pseudo-réplicas de “bootstraps”.

4 **4.5 PCR convencional para detecção dos Orthobunyavirus do grupo C CARV,** 5 **APEUV e ITQV**

6 **4.5.1 Região Alvo e Iniciadores**

7 Os segmentos L e M serão alvo da amplificação por PCR para identificar e diferenciar
8 as infecções por CARV, APEUV e ITQV. Os pares de iniciadores empregados
9 encontram-se descritos na Tabela 3.

10 Tabela 3: Pares de iniciadores utilizados para amplificar os segmentos L e M de CARV,
11 APEUV e ITQV

Iniciador Senso	Iniciador anti-senso	Segmento alvo
CARVL1516F	CARVL2018R	L
APEUV1128F	APEUV1958R	L
ITAQM3245F	ITAQM3699R	M
APEUM3372F	APEUM3880R	M

12 *As seqüências dos iniciadores encontram-se descritas na Tabela 2

13 **4.5.2 Extração do RNA viral**

14 A extração do RNA viral será realizada conforme descrito no item 5.4.1.

15 **4.5.3 Condição das amplificações**

16 A transcrição reversa e da PCR serão realizadas conforme as condições previamente
17 descritas no ítem 5.4.3.

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

V RESULTADOS

1

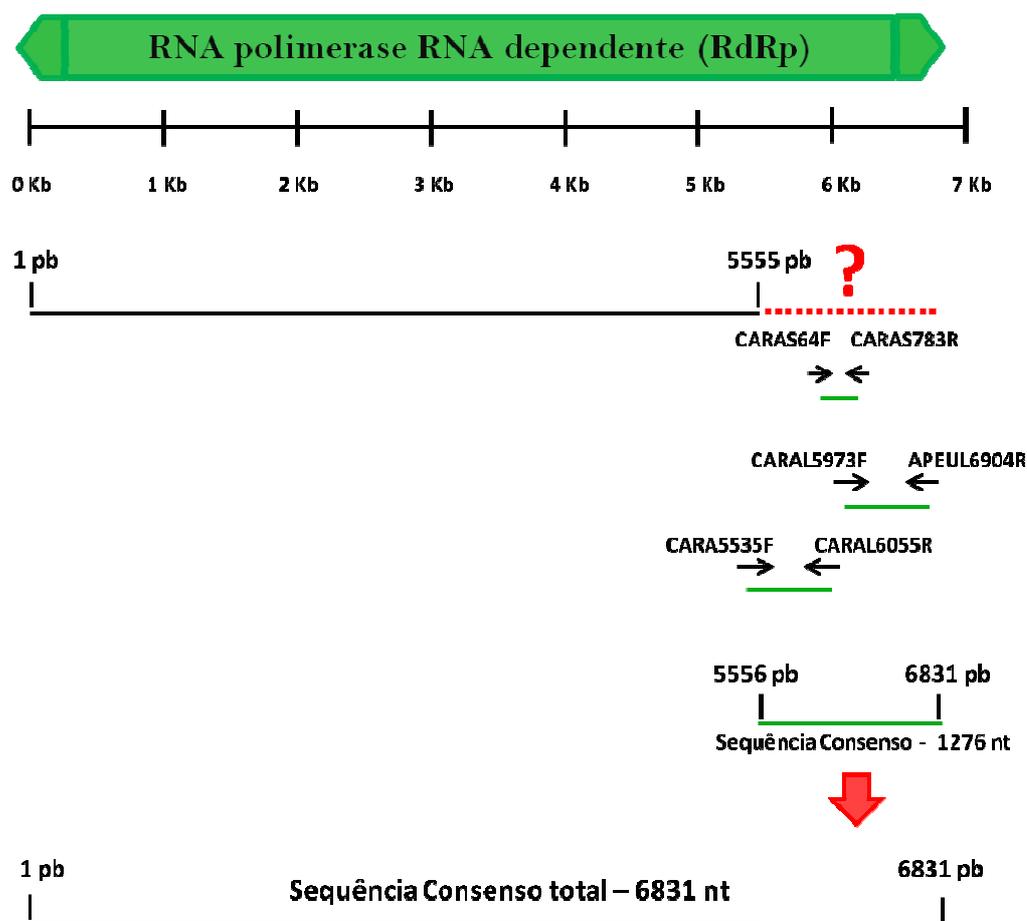
2 **5.1 Caracterização Molecular do segmento L para os vírus Caraparu, Apeu e Itaquí**

3 **5.1.1 Amplificação do segmento L dos vírus Caraparu, Apeu e Itaquí e obtenção** 4 **das sequências consenso**

5 *5.1.1.1 Amplificação do segmento L do Caraparu*

6 Magalhães e colaboradores (2007) sequenciaram e caracterizaram 5555 nucleotídeos do
7 segmento L da amostra CARV BeAn3994, restando aproximadamente 1200
8 nucleotídeos não sequenciado na extremidade 3' para se obter a sequência completa
9 deste segmento. Para amplificar a extremidade 3' do segmento L do CARV, três pares
10 de iniciadores foram utilizados. Curiosamente, os iniciadores CARAS64F e
11 CARAS783R, desenhados para amplificar o segmento S do CARV, amplificaram de
12 forma inespecífica o segmento L, o que resultou numa sequência de 225 nt. Em seguida,
13 esta sequência e a sequência parcial do segmento L do APEUV disponível até então
14 (GenBank: FJ859039.1) foram utilizados como molde para desenhar os dois outros
15 pares de iniciadores utilizados. As regiões amplificadas por cada um dos pares de
16 iniciadores encontram-se representadas na Figura 7. Foram sequenciados 1276
17 nucleotídeos que complementam a sequência de 5555 nucleotídeos obtidos
18 anteriormente. A sequência consenso total obtida apresenta 6831 nt e corresponde à
19 sequência completa do segmento L, responsável por codificar a RNA-polimerase viral.

Segmento L CARV (~7000 pb)

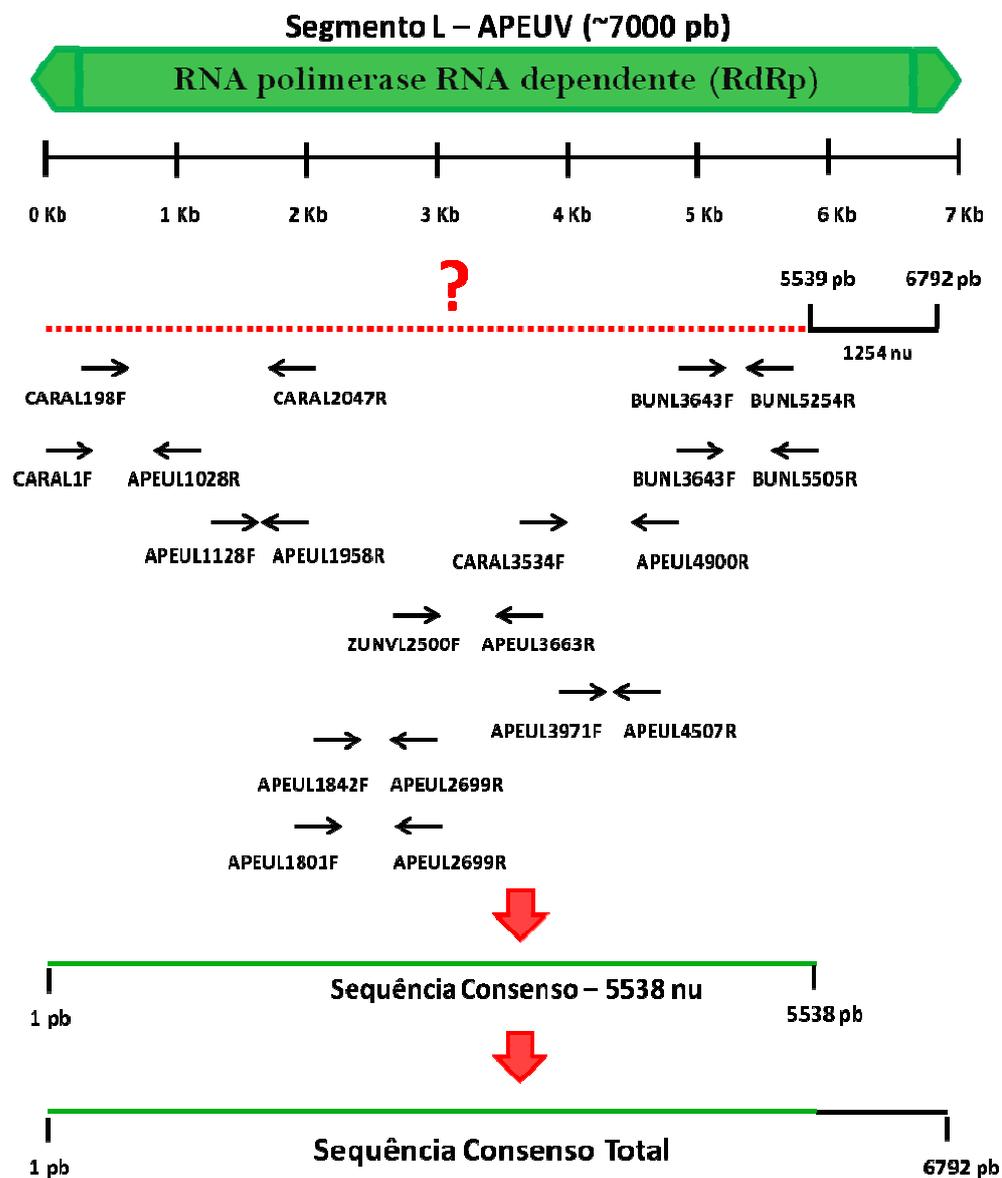


2 **Figura 7. Esquema utilizado para amplificar o segmento L do CARV.** Os pares de iniciadores
3 utilizados e a região alvo de cada um deles estão representados pelas setas. Para amplificar o segmento L
4 do CARV foram utilizados 3 pares de iniciadores. As regiões alvo de cada um deles podem ser estimadas
5 através da escala representada na figura. A sequência consenso obtida possui 1276 nucleotídeos e
6 complementa a sequência de 5555 nucleotídeos anteriormente publicada. A sequência consenso total
7 obtida possui 6831 nucleotídeos e corresponde à sequência completa do segmento L do CARV.

9 5.1.1.2 Amplificação do segmento L do Apeu

10 Para amplificar o segmento L do APEUV foram utilizados 10 pares de iniciadores.
11 Inicialmente foram utilizados iniciadores desenhados com base na sequência do
12 Bunyamwera (NC_001925.1) (protótipo da família) e CARV (EF122411.2). À medida
13 que as sequências para o APEUV foram obtidas e com a publicação da sequência do
14 ZUNV (IQE7626) (JN157805.1), foi possível utilizar estas sequências como molde para
15 a criação dos iniciadores. As regiões amplificadas por cada um dos pares de iniciadores
16 utilizados encontram-se representadas na Figura 8. Foram sequenciados 5538
17 nucleotídeos que complementam a sequência de 1254 nucleotídeos publicada por

1 Magalhães (2011) para a mesma amostra do APEUV. A sequência consenso total obtida
 2 apresenta 6792 nucleotídeos e corresponde à sequência completa do segmento L do
 3 APEUV, responsável pela expressão da RNA polimerase viral.
 4



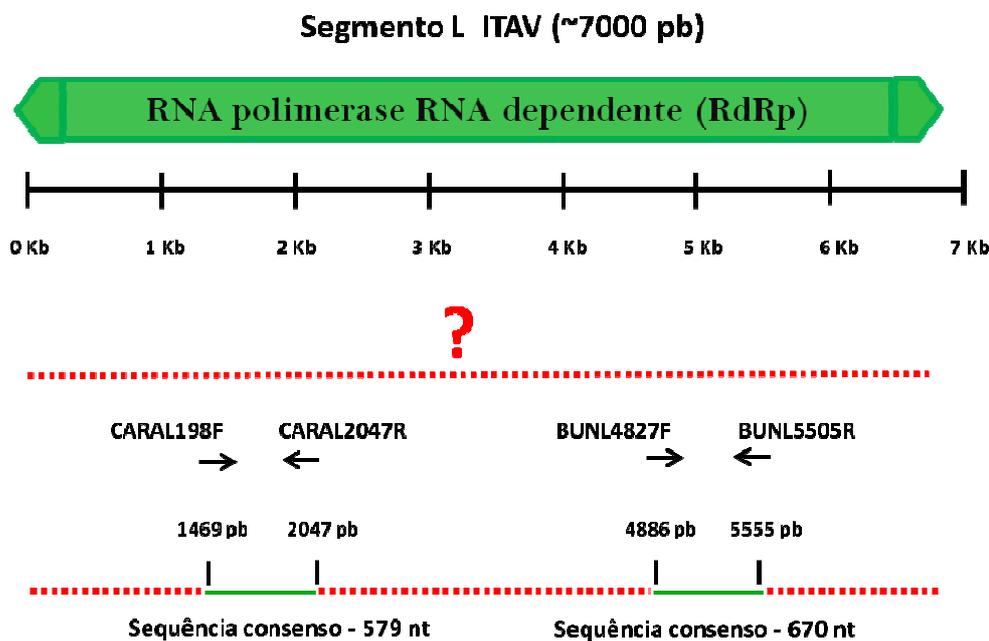
5
 6 **Figura 8. Esquema utilizado para amplificar o segmento L do APEUV.** Os pares de iniciadores
 7 utilizados e a região alvo de cada um deles estão representados pelas setas. Para amplificar o segmento L
 8 do APEUV foram utilizados 10 pares de iniciadores. As regiões alvo de cada um deles podem ser
 9 estimadas através da escala representada na figura. A sequência consenso obtida possui 5538 nucleotídeos
 10 e complementa a sequência de 1254 nucleotídeos anteriormente publicada. A sequência consenso total
 11 obtida possui 6792 nucleotídeos e corresponde à sequência completa do segmento L do APEUV.

12

1 5.1.1.3 Amplificação do segmento L do Itaqui

2 Para amplificar parcialmente o segmento L do ITQV dois pares de iniciadores foram
3 utilizados e as regiões amplificadas por cada um deles encontram-se representadas na
4 Figura 9. Foi possível amplificar dois fragmentos do segmento L: 1469 – 2047 pb e
5 4886 – 5555 pb, resultando na obtenção de duas sequências consenso com
6 respectivamente 579 e 670 nt de extensão. É importante destacar que não há na
7 literatura sequências publicadas para o segmento L do ITQV.

8



9

10 **Figura 9. Esquema utilizado para amplificar o segmento L do ITQV.** Os pares de iniciadores
11 utilizados e a região alvo de cada um deles estão representados pelas setas. Para amplificar o segmento L
12 do ITQV foram utilizados 2 pares de iniciadores. As regiões alvo de cada um deles podem ser estimadas
13 através da escala representada na figura. Foram obtidas 2 sequências consenso, sendo uma com 579 nt e a
14 outra com 670 nt de extensão.

15 **5.1.2 Análise das sequências genômicas**

16 5.1.2.1 Segmento L do Caraparu

17 A porção do segmento L do CARV sequenciada neste trabalho localiza-se na
18 extremidade 3' deste segmento, entre 5556 e 6831 nucleotídeos, numa região ainda
19 muito pouco caracteriza para a família *Bunyaviridae* no que diz respeito à sua função.

1 A Figura 10 apresenta o alinhamento da sequência de aminoácidos inferida a partir da
2 região entre 5556 e 6831 pb (porção carboxi-terminal da RdRp) para o CARV e sete
3 *Orthobunyavirus* (APEUV, BUNV, LACV, SSHV, TAHV, OROV e AKAV). O
4 alinhamento demonstra, em vermelho, a presença de algumas regiões bastante
5 conservadas na porção carboxi-terminal da RdRp dos *Orthobunyavirus*. Este resultado
6 era esperado por ser a RdRp a proteína mais conservada entre os bunyavírus. No
7 entanto, é possível observar que os últimos 40 aa da extremidade C-terminal são muito
8 pouco conservados entre as amostras analisadas, o que pode explicar as dificuldades
9 enfrentadas neste trabalho para se conseguir amplificar esta extremidade do segmento L
10 do CARV.

11

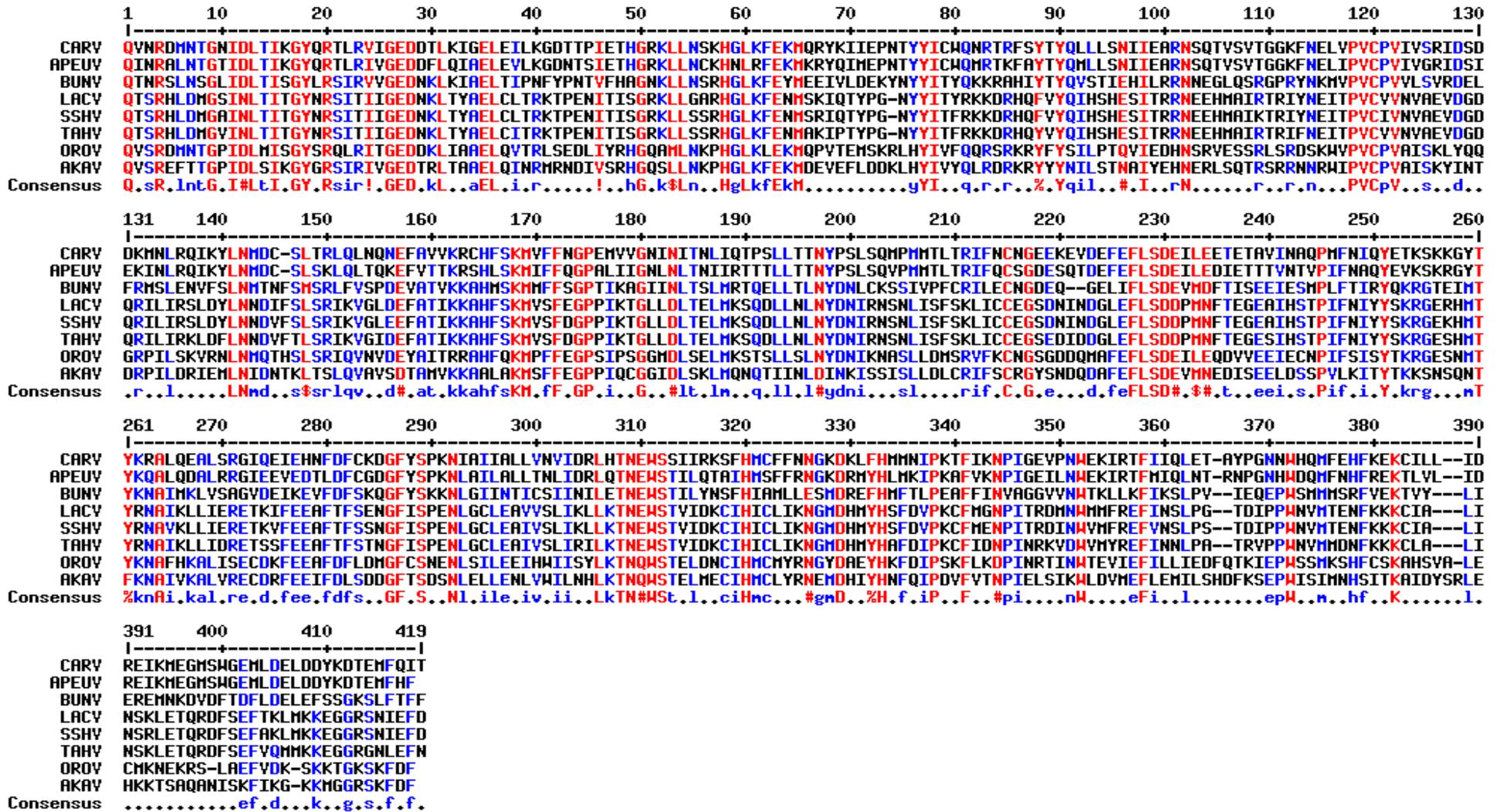


Figura 10. Alinhamento da sequência de aminoácidos inferida a partir da extremidade 3' do segmento L do CARV e oito membros do gênero *Orthobunyavirus*. Caraparú (CARV, sequência não publicada), Apeu (APEUV, ACZ65469.1), Bunyamwera (BUNV, P20470.1), La crosse (LACV, NP_671968.1), Snowshoe Hare (SSHV, ABW87611.2), Tahyna (TAHV, ADQ08672.1), Oropouche (OROV, NP_982304.1) e Akabane (AKAV, BAF57206.1). O alinhamento foi realizado pelo programa MultiAlin. Aminoácidos conservados entre todas as amostras analisadas estão representados em vermelho.

1 A tabela 4 apresenta os valores de identidade de aminoácidos entre o CARV e membros
 2 do gênero *Orthobunyavirus* (APEUV, BUNV, LACV, SSHV, TAHV e OROV) tanto
 3 para os 425 aa da porção carboxi-terminal inferidos a partir da sequência obtida neste
 4 trabalho, quanto para a sequência total da RdRp. É possível observar que os valores de
 5 identidade de aa para a porção carboxi-terminal da RdRp são bastante inferiores aos
 6 valores observados para a sequência total da polimerase. Os dados indicam que, apesar
 7 da porção carboxi-terminal da polimerase dos *Orthobunyavirus* apresentar algumas
 8 regiões bastante conservadas, a sua taxa de conservação é inferior à observada para a
 9 polimerase como um todo. Essa observação pode estar relacionada ao fato de não ter
 10 sido identificado nenhum domínio importante para a atividade da RdRp nesta região da
 11 proteína.

12

13 **Tabela 4: Percentual de identidade de aminoácidos da RdRp entre CARV e membros do**
 14 **gênero *Orthobunyavirus***

	APEUV ¹	BUNV	LACV	SSHV	TAHV	OROV
carboxi-terminal						
(425 aa)	73,6	40,9	36,6	36,9	36,9	37,9
RdRp Total	79,5	51,9	51,5	51,3	51,6	53,1
(2258 aa)						

15 Os percentuais de identidade de aa foram medidos pelo programa LALING (www.expasy.org).

16 ¹A sequência para a RdRp total do APEUV utilizada nesta análise foi obtida neste trabalho e será
 17 discutida em tópicos posteriores.

18

19 5.1.2.2 Segmento L do Apeu

20 A sequência consenso de 6792 pb obtida neste trabalho corresponde à totalidade do
 21 segmento L do APEUV e codifica os 2247 aa da RdRp viral em uma única janela aberta
 22 de leitura (ORF).

23 A RdRp é a proteína mais conservada entre os membros da família *Bunyaviridae*,
 24 podendo ser dividida em quatro regiões denominadas regiões 1, 2, 3 e 4. As regiões 1 e
 25 2 estão localizadas próximo à extremidade N-terminal e são ligadas por regiões

1 variáveis. Estas duas regiões são conservadas entre as famílias *Bunyaviridae* e
2 *Arenaviridae*. A região 3 está localizada no centro da proteína e contém os denominados
3 “módulos da polimerase”, sendo constituída pelo pré-motivo A e pelos motivos A, B, C,
4 D e E. Esta região possui aminoácidos que são conservados entre as RdRp de membros
5 de diversas famílias virais. A região 4 está localizada após a região 3 e possui quatro
6 resíduos de aminoácidos conservados: Gly (posição 1271), Tyr (posição 1292), Gly
7 (posição 1320) e Gly (posição 1333) (POCH *et al.*, 1989; MULLER *et al.*, 1994;
8 ROBERTS *et al.*, 1995; AQUINO *et al.*, 2003).

9

10 Neste trabalho, foi realizado o alinhamento das regiões 3 e 4 do APEUV e de mais 21
11 membros da família *Bunyaviridae* (Figuras 11 e 12). O alinhamento da região 3
12 demonstrou que o APEUV possui na sequência de sua RdRp o pré-motivo A e os
13 motivos A, B, C, D e E (Figura 11). Além disso, o APEUV possui os 16 resíduos de
14 aminoácidos presentes nestes motivos que são conservados entre os membros da família
15 *Bunyaviridae*: Lys(K)951, Arg(R)959, Glu(E)976, Asp(D)1044, Lys(K)1047,
16 Trp(W)1048, Gln(Q)1129, Gly(G)1130, Ser(S)1136, Ser(S)1137, Ser(S)1170,
17 Asp(D)1171, Asp(D)1172, Lys(K)1212, Glu(E)1221 e Ser(S)1224. Magalhães e
18 colaboradores (2007) descreveram a presença da região 3 e dos motivos A-E, além do
19 pré-motivo A, na sequência da RdRp do CARV. A região 4, descrita por Aquino e
20 colaboradores (2003), também foi identificada na RdRp do APEUV (Figura 12). Esta
21 região possui quatro resíduos de aa conservados: Gly(G)1270, Tyr(Y)1291, Gly(G)1318
22 e Gly(G)1331. Os vírus CCHFV e DUGV, pertencentes ao gênero *Nairovirus*,
23 configuram exceções, pois o CCHFV apresenta uma Ala(A) na posição 1270 e uma
24 Phe(F) na posição 1291. Na posição 1331 o CCHFV e o DUGV apresentam,
25 respectivamente, uma Arg(R) e uma Lys(K).

26

27

REGIÃO 3

	Pré-motivo A	Motivo A	Motivo B	Motivo C	Motivo D	Motivo E						
	951	980	1036	1053	1120	1142	1161	1175	1205	1216	1219	1230
APEUV	KGQKTAKDREIFVGEFEAKLCLYGVERIAK	GIKLE-INADMSKWSAQDV	TVNIRRNLWQGNLNYTSSYIHSC	RCNVSSMVHSDDNQT	GNQANM-KKTYIT	IKEFVSLFNIYG						
CARV	KGQKTAKDREIFVGELEAKLCLYGVERIAK	GIKLE-INADMSKWSAQDV	TVNIRRNLWQGNLNYTSSYIHSC	RCNVNSMVHSDDNQT	GNQANM-KKTYIT	IKEFVSLFNIYG						
BUNV	KGQKTAKDREIFVGEFEAKMCMYVVERISK	ALKLE-INADMSKWSAQDV	YVQIKRNWLQGNFNYSYVHSC	DCLINSMVHSDDNQT	GCQANM-KKTYIT	CKEFVSLFNLHG						
LACV	KGQKTSKDREIFVGEYEAKMCMYAVERIAK	GLKME-INADMSKWSAQDV	TVLIKRNWLQGNFNYSYVHSC	SILVNSLVHSDDNQT	GCQANM-KKTYVT	IKEFVSLFNLYG						
SSHV	KGQKTSKDREIFVGEYEAKMCMYAVERIAK	GLKME-INADMSKWSAQDV	TVPIKRNWLQGNFNYSYVHSC	SVLVNSLVHSDDNQT	GCQANM-KKTYVT	IKEFVSLFNLYG						
TAHV	KGQKTSKDREIFVGEYEAKMCMYAVERIAK	GLKME-INADMSKWSAQDV	TVPIKRNWLQGNFNYSYVHSC	SILVNSLVHSDDNQT	GCQANM-KKTYVT	IKEFVSLFNLYG						
OROV	KGQKTAKDREIFLGEFEAKMCLYLVERIAK	GLKIE-INADMSKWSAQDV	TVEIKRNWLQGNLNYTSSYLHSC	EALVNSMVHSDDNQT	GNQANM-KKTYLT	IKEFVSLFNIHG						
AKAV	KGQKTAKDREIFVGEFEAKMCLYLVERISK	STKIE-INADMSKWSAQDV	WVSIKRNWLQGNLNYTSSYLHSC	DVLVNSMVHSDDNHT	GNQANM-KKTYVT	IKEFVSLFNIYG						
TSWV	KMQRTKTDREIYLMKMKMMLYFIEHTFK	KSRLAFLSADQSKWSASDL	TYPVSMNWLQGNLNYLSSVYHSC	DFQTRWIVHSDDNAT	FCITLNPCKSYAS	EVEFISERIVNG						
PBNV	KMQRTKMDREIYLMKMKMMLYFIEHTYK	ECKMAFLSADQSKWSASDL	TFPVSMNWLQGNLNYLSSVYHSC	DFTIRWMVHSDDNAT	YCITLNPCKSYAS	EVEFISERINIG						
WSMV	KMQRTKMDREIYLMKMKMMLYFIEHTYK	ECKMAFLSADQSKWSASDL	TFPVSMNWLQGNLNYLSSVYHSC	DFTIRWMVHSDDNAT	YCITLNPCKSYAS	EVEFISERINIG						
HANV	KFQRTEADRGFFITTLPTRCRLEIIEDYYD	KRKLMYVSADATKWSPGDN	HGEVPGNWLQGNLNKCSLFGVA	DCFFFAHHSDDALF	GSIKISPKKTTLS	NAEFLSTF-FEG						
SEOV	KFQRTEADRGFFITTLPTRCRLEIIEDYYD	KRKLMYVSADATKWSPGDN	HGEVRGNWLQGNLNKCSLFGVA	DCFFFAHHSDDALF	GSIKISPKKTTLS	NAEFLSTF-FEG						
HTNV	KYQRTEADRGFFITTLPTRCRLEIIEDYYD	KRKLMYVSADATKWSPGDN	HGEVKGNWLQGNLNKCSLFGVA	DCFFFAHHSDDALF	GSIKISPKKTTVS	NAEFLSTF-FEG						
PUUV	KYQRTEADRGFFITTLPTRVRLEIIEDYYD	KRKLMYVSADATKWSPGDN	SASIKGNWLQGNLNKCSLFGAA	ECFFFAHHSDDALF	GSIKISPKKTTVS	NAEFLSTF-FEG						
TULV	KYQRTEADRGFFITTLPTRVRLEIIEDYFD	KRKLMYVSADATKWSPGDN	SAAIKGNWLQGNLNKCSLFGAA	DCFFFAHHSDDALF	GSIKISPKKTTVS	NAEFLSTF-FEG						
ANDV	KYQRTEADRGFFITTLPTRVRLEIIEDYFD	KRKLMYVSADATKWSPGDN	SANVKGNWLQGNLNKCSLFGAA	ECFFFAHHSDDALF	GSIKVSPKTTVS	NAEFLSTF-FEG						
SINV	KYQRTEADRGFFITTLPTRVRLEIIEDYYD	KRRMLYVSADATKWSPGDN	SATVKGNWLQGNLNKCSLFGAA	ECFFFAHHSDDALF	GSIKVSPKTTVS	NAEFLSTF-FEG						
RVFV	K-QQHGLREIYVMGAEERIVQSVVETIAR	PVWTCATSDDARKWNQGHF	YLETTTGMQGIHHTSSLLHTI	SLVCDMMQGSDDSSM	YLAIYPSEKSTAN	VMEYNSEFYFHT						
SAFV	K-QQHGLREIYVMGADERIVQSIIETIAR	SVWTCATSDDARKWNQGHF	YLKTSSTGMQGIHHTSSLLHSL	KVVCVDMQGSDDSSM	YIGIYPSEKSTPN	VMEYNSEFFHHS						
CCHFV	K-AQLGGARDLLVQETGKVMHATTEMFSR	FYKVICISGDNTKWGPIC	ALNSYNHMGGQIHHATSSVLTS	TVHVEHAGSSDDYAK	VQRCCQM-KDSAK	FLEFYSEFMMGY						
DUGV	K-AQLGGSRDLLVQETGKVIHATTEMFSR	FFKTVICISGDNTKWGPIC	AMNSYNHMGGQIHHATSSLLTSM	TVNVDHAGSSDDYAK	VRRCCQM-KDSAK	FLEFYSEFMMGN						

Figura 11. Alinhamento da sequência de aa do segmento L do APEUV (região 3) e outros membros da família *Bunyaviridae*. Gênero *Orthobunyavirus*: Apeu (APEUV, sequência não publicada), Caraparu (CARV, ABQ14448.2), Bunyamwera (BUNV, P20470.1), La crosse (LACV, NP_671968.1), Snowshoe Hare (SSHV, ABW87611.2), Tahyna (TAHV, ADQ08672.1), Oropouche (OROV, NP_982304.1) e Akabane (AKAV, BAF57206.1). Gênero *Tospovirus*: Tomato spotted wilt (TSWV, BAD86755.1), Peanut bud necrosis (PBNV, AAB94085.1), Watermelon silver mottle (WSMV, AAG43276.1). Gênero *Hantavirus*: Hantavirus Z37 (HANV, AAG27620.1), Seoul 80.39 (SEOV, CAA39847.1), Hantaan (HTNV, AAK01302.1), Puumala (PUUV, M63194), Tula (TULV, NP_942124.1), Andes (ANDV, NP_604473.1) e Sin Nombre (SINV, NP_941976.1). Gênero *Phlebovirus*: Rift Valley fever (RVFV, YP_003848704.1) e Sandfly fever (SAFV, AEL29668.1). Gênero *Nairovirus*: Crimean-Congo (CCHFV, AAZ76532.2) e Dugbe (DUGV, NP_690576.1). Alinhamento correspondente a região 3, mostrando o pré-motivo A e os motivos A-E. Aminoácidos conservados entre todos os vírus estão marcados em cinza. O alinhamento foi realizado pelo programa MultiAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) e revisado manualmente. Os números correspondem à posição do aminoácido no segmento L do APEUV.

REGIÃO 4

	1231	1270	1291	1318	1333
APEUV	EPFSV-FGRFLLPAVGDCAYIGPYEDMASRLSATQTAIKHGCPPSLAWVSIALN--HWITFNTYNMLPGQINDPTKVFLFD-----RRELPIELCG---ILQADLATVALVGLE				
CARV	EPYSV-YGRFLLPAVGDCAYIGPYEDMASRLSATQTAIKHGCPPSLAWVSIALN--HWITFNTYNMLPGQINDPTKVHFHE-----RRELPIELCG---LLQADLSTIALVGLE				
BUNV	EPLSV-FGRFLLPSVGDCAYIGPYEDLASRLSAAQQLKHGCPPSLVWLAISSCS--HWITFFTYNMLDDQINAPQQHLPFN----NRKEIPVELNG---YLNAPLYLIALVGLE				
LACV	EPFSI-YGRFLLTSVGDCAYIGPYEDLASRISSAQTAIKHGCPPSLAWVSIASIS--HWMTSLTYNMLPGQSNDPIDYFPAE----NRKDIPIELNG---VLDAPLSMISTVGLE				
SSHV	EPFSI-YGRFLLTSVGDCAYIGPYEDLASRISSAQTAIKHGCPPSLAWVSIASIS--HWMTALTYNMLPGQSNDPIDYFPAE----NRKDIPIELNG---VLDAPLSMISTVGLE				
TAHV	EPFSI-YGRFLLTSVGDCAYIGPYEDLASRISSAQTAIKHGCPPSLAWVSIASIS--HWMTYLTYNMLPGQSNDPIDYFPAE----NRKEIPIELNG---ILDAPLSMISTVGLE				
OROV	EPFSI-YGRFLLTAVGDCAYLGPYEDLASRLSATQTAIKHGCPPSLAWVSIALN--HWITHTTYNMLPGQNNDPDPFFPTN----NRSEIPVEMCG---ILESDELSTIALTGLE				
AKAV	EPFSV-YGRFLLTAVGDCAYLGPYEDLASRLSATQTAIKHGAQPSVAWVAIALT--QWITHSTYNMLPGQNNDPNLVLSQ----NRFDIPIELCG---LLNTDLPTLAIAGLE				
TSWV	AIPL-YCRHLANCCTESSHSYFDDLMSLSIHVMTLLRKGCNPEVIFPAYGAV--QVQALSISYMLPGEVNDISIRIFKGLGVSLKSNEIPTNMGG---WLTSPIEPLSILGPS				
PBNV	AVIPL-YCRHLANCSTESSHSYFDDLMSLSIHVMTLLRKGCNPELIPFAYAAI--QIQSLSIYSMLPGEENDITSIVKDINFPLKKREIPICAGG---WMHAPIELLSILGPS				
WSMV	AVIPL-YCRHLANCSTESSHSYFDDLMSLSIHVMTLLRKGCNPELIPFAYAAI--QVQSLSIYSMLPGEENDIDSIVKAIDFPLTKREIPICAGG---WMHAPVELLSILGPS				
HANV	CAVSIPFIKILLGSLSDLPGLGYFDDLAAAQTRCVKAMDLGASPQISQLAVSLS--TSKVERLYGTSGIMVNYPGTYLRTK-----HSETPIPLGG---SGAMSIMELSTAGIG				
SEOV	CAVSIPFIKILLGSLSDLPGLGYFDDLAAAQTRCVKAMDLGASPQISQLAVSLS--TSKVERLYGTSGIMVNYPGTYLRTK-----HSETPIPLGG---SGAMSIMELSTAGIG				
HTNV	CAVSIPFVKILLGSLSDLPGLGYFDDLAAAQSRCVKALDLDGASPQVAQLAVLVC--TSKVERLYGTAPGMVNHPAAYLQVK-----HGDTPIPLGG---NGAMSIMELATAGIG				
PUUV	CAVSIPFIKILLGSLSDLPGLGYFDDLAAAQSRCVKALDMDGACPQLAQLGIVLC--TSKVERLYGTAPGMVNNPTAYLKVD-----RSLIPIPLGG---DGSMSIMELATAGIG				
TULV	CAVSIPFIKILLGSLSDLPGLGYFDDLAAAQSRCVKALDMDGACPQLAQLGIVLC--TSKVERLYGTATGMVNNPTSFLKVE-----RSSIPIPLGG---DGSMSIMELATAGIG				
ANDV	CAVSIPFVKILLGSLSDLPGLGFFDDLAAAQSRCVKSLDLGACPQLAQLAIVLC--TSKVERLYGTADGMVNSPTAFLKVN-----KAHVVPVPLGG---DGSMSIMELATAGFG				
SINV	CAVSIPFIKILLGSLSDLPGLGFFDDLAAAQSRCVKAMDLDGASPQLAQLAVVIC--TSKVERLYGTADGMVNSPVAFLKVT-----KAHVPIPLGG---DGSMSIMELATAGIG				
RVFV	QHVRPTIRWIAACCS--LPEVETLVARQEEASNLMTSVTEG--GGSFS--LAAMIQ--QAQCTLHY--MLMG--MGVSELFLEYK---KAVLKWNDPGLG-----FFLLDNPYACGLG				
SANV	QHVRPTIRWIAACCS--LPEVETLVARQEEAANLLTAVTEG--GGSFS--LAAMVQ--QCQCTIHY--MLMG--MGVSAIFEQFS---KAISKWMDPGLG-----FFLFDNPYSAGLS				
CCHFV	RVTPAVIKFMFTGL--INSSVTSPQSLMQACQVSSQ---A--MYNSVPLVTNAAFTLLRQQIFF--NHVEDFIRRYGILTGLTSPFGRLFVPTYSGLVSSVALEDAEVIARAA				
DUGV	RVTPAVIKFIFTGL--INSSVTSPQSLVQACHVSSQ---G--MYNSVPLVTNAAFTILRQQIFY--NHVEDFIRRYGLITLGAVSPFGRLFLPRFSGLVSSVALEDESETISKAA				

Figura 12. Alinhamento da seqüência de aa do segmento L do APEUV (região 4) e outros membros da família *Bunyaviridae*. Gênero *Orthobunyavirus*: Apeu (APEUV, sequência não publicada), Caraparu (CARV, ABQ14448.2), Bunyamwera (BUNV, P20470.1), La crosse (LACV, NP_671968.1), Snowshoe Hare (SSHV, ABW87611.2), Tahyna (TAHV, ADQ08672.1), Oropouche (OROV, NP_982304.1) e Akabane (AKAV, BAF57206.1). Gênero *Tospovirus*: Tomato spotted wilt (TSWV, BAD86755.1), Peanut bud necrosis (PBNV, AAB94085.1), Watermelon silver mottle (WSMV, AAG43276.1). Gênero *Hantavirus*: Hantavirus Z37 (HANV, AAG27620.1), Seoul 80.39 (SEOV, CAA39847.1), Hantaan (HTNV, AAK01302.1), Puumala (PUUV, M63194), Tula (TULV, NP_942124.1), Andes (ANDV, NP_604473.1) e Sin Nombre (SINV, NP_941976.1). Gênero *Phlebovirus*: Rift Valley fever (RVFV, YP_003848704.1) e Sandfly fever (SAFV, AEL29668.1). Gênero *Nairovirus*: Crimean-Congo (CCHFV, AAZ76532.2) e Dugbe (DUGV, NP_690576.1). Aminoácidos conservados dentro da família estão marcados em cinza. O alinhamento foi realizado pelo programa MultiAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) e revisado manualmente. Os números correspondem à posição do aminoácido no segmento L do APEUV.

1 A subunidade PA da RNA-polimerase do vírus Influenza é responsável pelo
2 processamento de RNAm celulares a fim de se obter pequenos fragmentos de RNA
3 ligados a CAP, que são utilizados como iniciadores para a síntese dos RNAm virais
4 (mecanismo “cap-snatching”) (DIAS *et al.*, 2009). Reguera e colaboradores (2010)
5 demonstraram que a porção N-terminal da polimerase do LACV, assim como de outros
6 membros da família *Bunyaviridae*, compartilha alguns resíduos importantes para a
7 função “cap-snatching” com o vírus Influenza.

8

9 O alinhamento apresentado na Figura 13 foi realizado com a sequência de aa da porção
10 N-terminal da RdRp do APEUV e de outros 19 bunyavírus pertencentes aos gêneros
11 *Orthobunyavirus* (CARV, BUNV, LACV, SSHV, TAHV, OROV e AKAV),
12 *Tospovirus* (TSWV, PBNV e WSMV), *Hantavirus* (HANV, SEOV, HTNV, PUUV,
13 TULV, ANDV e SINV) e *Phlebovirus* (RVFV, SAFV), e também com a extremidade
14 N-terminal da subunidade PA da polimerase de três membros da família
15 *Orthomyxoviridae* (Influenza A H1N1, Influenza A H3N2 e Influenza B). O gênero
16 Nairovirus, que inclui os vírus Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHFV) e Dugbe
17 (DUGV), não foi incluído neste alinhamento, pois a localização da sua endonuclease na
18 sequência da RdRp é incerta (REGUERA *et al.*, 2010). O alinhamento demonstra que
19 os membros do sorogrupo C, APEUV e CARV apresentam o motivo
20 H...D...PD...DxK...T na porção N-terminal de suas RdRp. Reguera e colaboradores
21 (2010) demonstraram a presença deste motivo na RdRp do LACV e de outros membros
22 da família *Bunyaviridae*. No presente trabalho, pela primeira vez foi demonstrado que
23 este motivo conservado e importante para o desempenho da função “cap-snatching”
24 também está presente em membros do sorogrupo C (CARV e APEUV). Este motivo
25 apresenta uma lisina catalítica (K94) e quatro resíduos de ligação a cátions bivalentes
26 (His(H)34, Asp(D)52, Asp(D)79 e Asp(D)92), sendo conservado no subgrupo formado
27 pelos gêneros *Orthobunyavirus* e *Tospovirus* e compartilha características com o motivo
28 H...E...PD...ExT...K presente no subgrupo formado pelos gêneros *Hantavirus* e
29 *Phlebovirus* e pelas amostras de vírus Influenza analisadas.

30

1 55

APEUV LLGDVIRQYTARIRTCT-----NPEVGRDILAEITMTRHNYFAQQFCEAIN-----IEYRNDVP-----A
 CARV LLEDVIRQYSARIRNCN-----NPEIGRDILAEITMTRHNYFAQKFCEAIG-----IEYRNDVP-----A
 BUNV MEDQAYDQYLHRIQAAR-----TATVAKDISADILEARHDYFGREL CNSLG-----IEYKNNVL-----L
 LACV MDYQEYQQFLARINTAR-----DACVAKDIDVDLLMARHDYFGRELCKSLN-----IEYRNDVP-----F
 SSHV MDHQEYQQFLARINAAR-----DACVAKDIDVDLLMARHDFFGKELCKSLN-----IEYRNDVP-----F
 TAHV MDHQEYQQFLARINTAR-----DACIAKDIDVDLLMARHDYFGKELCKSLN-----IEYRNDVP-----F
 OROV MSQQLLNQYRNRIHCR-----EPEIAKDIDVDLLNDRHNYFSREFCRAAN-----LE YRNDVP-----A
 AKAV MDNYKINQYRARINDAN-----DPETAKDILADLLMDRHNHYFGRELCYYLD-----IEYKNDTP-----I
 TSWV KNYETMRELIVKITADGEGLNKG MATVDVKKLGEMVSLFEQKYLETELARHDIFGELISRHLR-----IKPKQRSEVEIEHALREYLDLNNKSCVN
 PBNV NSIMSMNYVLDRIEDMKSRYHQSSSSIDQKEMEKEIYFLDKYKELMRHDLFGVLAGRRLH-----FAPKHRSDVFLKDC LMSYIEFCNTSTNII
 WSMV NSIMSMNYILDKIEDMKSRYHQSSSSIDQKEMETEIYFLDKYKELMRHDLFGVLAGRRLH-----FAPKHRSDVFLKDC LMSYIEFCNTSTNII
 HANV EKYREIHRDLKEFTINS-----LTAVECMDYLDRLYAVRHDI V DQMIKHEWSDNKDS-EEPISKVLLFAGIPNNVITALEKKVIPDH--
 SEOV EKYREIHRDLKEFTINS-----LTAVECMDYLDRLYAVRHDI V DQMIKHEWSDNKDS-EEPISKVLLFAGIPNNVITALEKKVIPDH--
 HTNV DKYREIH NKLEKESPGT-----LTAVECIDYLDRLYAVRHDI V DQMIKHDWSDNKDS-EEAIGKVL LFAEVPNSNIITALEKKIIPNH--
 PUUV EKYREIHERVKEAVPGE-----TSAVECLDLLDRLYAVRHDI V DQMIKHDWSDNKDK-EQPIGLVLLMAGVPNDVIQSM EKRIIPGS--
 TULV EKYTEIHNRMRECV PGE-----VSAVECLDLLDRFYAVRHDI V DQMIKHDWSDNKDK-EQPIGHVLLMAGVPNEVIQGM EKKIIPGS--
 ANDV EKYREIHQRVRDLAPGT-----VSALECIDLLDRLYAVRHDI V DQMIKHDWSDNKDV-ERP I GQVLLMAGIPNDIIQGM EKKIIPNS--
 SINV EKYREIHQRVKEIPPGG-----ASALECLDLLDRLYAVRHDI V DQMIKHDWSDNKDM-ERP I GQVLLMAGVPNDVIQGM EKKIIPNS--
 RVFV ALPTFDVSKMVD RITIDFNLDI QGASEIGSTLLP--SMSIDVEDMANFVHDFTFGHL-----ADKTDRLLMREFPM
 SAFV PIPAYVIKHTSEGVTIDIATSELADY-QSGSTIQP--FESIPAQNLTLFKHDFTFGHL-----AETTRKRFVEVFGV
 A/H1N1 QCFNPMIVELAEKAMKE-----YGEDPKIETNKFAAICTHLEVC FMYSDFFH FIDERG-ESIIVESGDPNVLLKHRFEIEGRDRIMAWT
 A/H3N2 LCFNPMIVELAEKAMKE-----YGEDPKIETNKFAAICTHLEVC FMYSDFFH FIDEQG-ESIIVESGDPNALLKHRFEIEGRDRIMAWT
 B/Menphis DTFITRNFQTTIIQKAK-----NTMAEFSDEPELQPAMLFNICVHLEVCYVISDMNFLDEEGKAYTAL EGGQKEQNL RPQYEVIEGMPRTIAWM

56 131

APEUV ADIILEMQPALDLTTIKIPNVT PDNYYRDGT-----KIYIDYFKVSVSD-----ESALHTYKKYNTLLGDVFNLLGVD-----YEVVIIRM
 CARV ADIVLEMMPGLDLTRIRIPNIT PDNYYRDGT-----KIYIDYFKVSVSD-----ESAQHTYKKYDTLFGDVFNQLNIE-----YEVVIIRM
 BUNV DEIILDVVPGVNLLNYPNVT PDNYIWDGH-----FLIIDYKVS VGN-----DSSEITYKKYTSLILPVMSELGID-----TEIAIIRA
 LACV VDIILDIRPEVDPLTIDAPHIT PDNYLYINN-----VLYIDYKVS VSN-----ESSVITYDKYELTRDISDRLSIP-----IEIVIRI
 SSHV IDIILDIRPEIDPLTIDAPHIT PDNYLYINN-----ILYIDYKVS VSN-----ESSVITYDKYELTRDISARLNIP-----IEIVIRI
 TAHV IDIILDIRPESDPLTVDAPHIT PDNYLYVDN-----ILYIDYKVS VSN-----ESSVITYDKYELTRDISRRMNIE-----IEIVIRI
 OROV EDICAEVLDGYK--ARKVRFCT PDNYLLHDG-----KMYIDYFKVSVDD-----RSSRITREKYNEIFGEVFNPEGVD-----FEIVIRL
 AKAV DDILLDFLPPGT--DFKARYCT PDNYIHNH-----KLYLDYKVAVDN-----ESSAKTFEKYDKIFGDV L VPLGLD-----YEIVIRA
 TSWV KLS DDEF--ERINKEYVATNAT PDNYVIYKESKNS ELCLIIYDWKISVDA-----RTETKTMEKYKNIWKSFKDIKVN--GKPFLEDHPV FVSIVLKP
 PBNV NQIVD-I--DGLKEKLVFQHLTPDNYTIYKTKGEKACLMIYDWKVSDA-----VSEAKTSENYYTSVWKTFKDITID--GQPFLERHPIFITIVLNP
 WSMV NQINN-V--DDLKEKLVFQHLTPDNYTIYKTKGEKACLMIYDWKVSDT-----MSEAKTSENYYTSVWKTFKDITID--GQPFLERHPIFITIVLNP
 HANV -----PSGKTLRSFFKMT PDNYRITGS-----LIEFIEVTVTADV-----DKGIREKKMYELGLKYLEQELMTFFHRGELQNPYKITFKVVAVRT
 SEOV -----PSGKTLRSFFKMT PDNYRITGS-----LIEFIEVTVTADV-----DKGIREKKMYELGLKYLEQELMTFFHRGELQNPYKITFKVVAVRT
 HTNV -----PTGKNLKAFFKMT PDNYKIRGT-----TIEFIEVTVTADV-----DKGVREKRLKYEAGLVYIEQELHKFFLKG EIPQPYKITLNVAVRT
 PUUV -----PSGQILRSFFKMT PDNYKITGN-----LIEFIEVTVTADV-----ARGVREKILKYQGLEFIEQLLQIEAQKNCQSGFRIFKFDVVAIRT
 TULV -----PSGQILRSFFKMT PDNYKITGS-----LIEFIEVTVTADV-----ARGTREKILKYQAGLEYIEQLLHQESERGNLPGGYRIKFDVAVRT
 ANDV -----PSGQVLKSFFRMT PDNYKITGN-----LIEFIEVTVTADV-----SRGIREKKIKYEGGLQFVEHLLLETESRKGNI PQPYKITFSVAVKT
 SINV -----PSGQILKSFFRMT PDNYKITGA-----LIEFIEVTVTADV-----AKGIREKLLKYESGLQFVESLLSQEHKKNINQAYKITFDVAVKT
 RVFV MN-----DGFHLS PDMIKTTS G-----MYNIVEFTTFRGDERGAFQAAMT KLAKYEVPCENRSQGR-----VLYVVSAYR
 SAFV LENRA-----DDSDYQSPDVIETESG-----HVHVIEFTTTMGDLGSAEVAARNKI AKY EIACLNRS AIKP-----ISLHIIAVHF
 A/H1N1 VVNSICNTT-----GVEKPKFLPDLYDYE-----NRFIEIGVTRRE---VHIYYLEKANKIKS-----EKTHIHIF
 A/H3N2 VVNSICNTT-----KVEKPKFLPDLYDYE-----NRFIEIGVTRRE---VHIYYLEKANKIKS-----EKTHIHIF
 B/Menphis VQRSLAQEH-----GIETPKYLADLFDYKT-----KRFIEVGITKGL---ADDFYWKKEKLG N-----SMELMIF

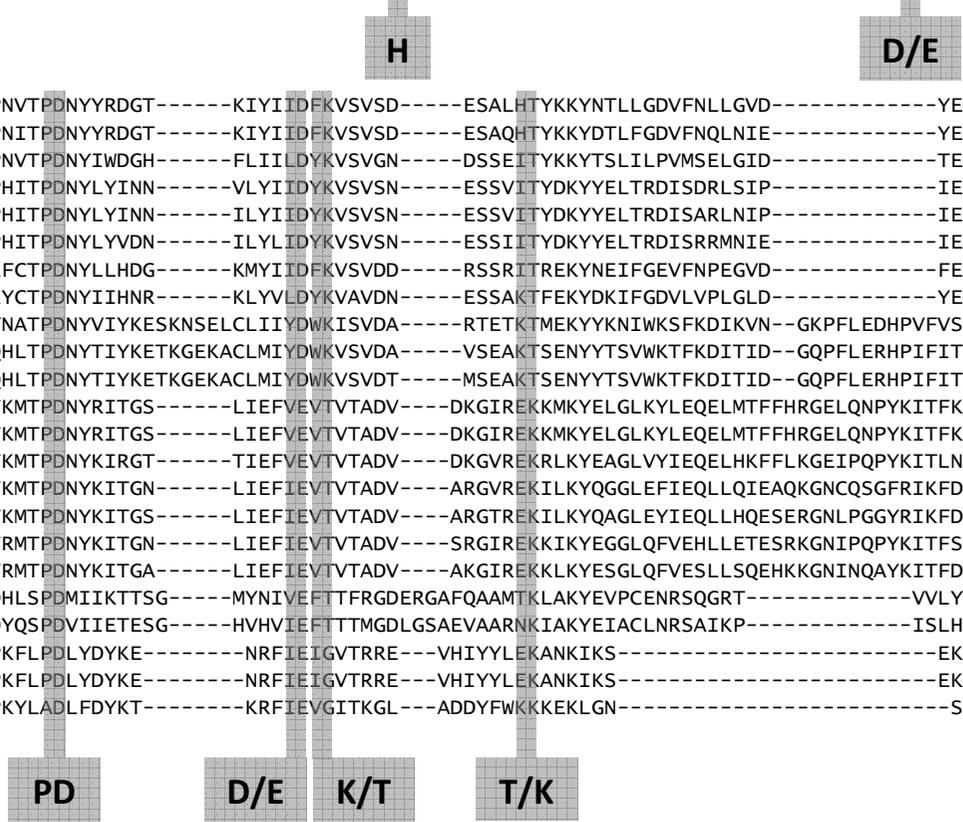


Figura 13. Alinhamento da região N-terminal da sequência do segmento L do APEUV (região “cap-snatching”) e outros membros da família *Bunyaviridae* e da região N-terminal da subunidade PA de membros da família *Orthomyxoviridae*. Família *Bunyaviridae*: Gênero *Orthobunyavirus*: Apeu (APEUV, sequência não publicada), Caraparu (CARV, ABQ14448.2), Bunyamwera (BUNV, P20470.1), La crosse (LACV, NP_671968.1), Snowshoe Hare (SSHV, ABW87611.2), Tahyna (TAHV, ADQ08672.1), Oropouche (OROV, NP_982304.1) e Akabane (AKAV, BAF57206.1). Gênero *Tospovirus*: Tomato spotted wilt (TSWV, BAD86755.1), Peanut bud necrosis (PBNV, AAB94085.1), Watermelon silver mottle (WSMV, AAG43276.1). Gênero *Hantavirus*: Hantavirus Z37 (HANV, AAG27620.1), Seoul 80.39 (SEOV, CAA39847.1), Hantaan (HTNV, AAK01302.1), Puumala (PUUV, M63194), Tula (TULV, NP_942124.1), Andes (ANDV, NP_604473.1) e Sin Nombre (SINV, NP_941976.1). Gênero *Phlebovirus*: Rift Valley fever (RVFV, YP_003848704.1) e Sandfly fever (SAFV, AEL29668.1). Família *Orthomyxoviridae*: Influenza A H1N1 (A/H1N1, BAJ10042.1), Influenza A H3N2 (A/H3N2, AAW78273.1) e Influenza B Memphis (B/Memphis, AAU94844.1) Alinhamento correspondente a região “cap-snatching”, mostrando o motivo H...D...PD...DxK...T, conservado entre os gêneros *Orthobunyavirus* e *Tospovirus* e o motivo H...E...PD...ExT...K, presente nas amostras de Influenza e conservado entre os gêneros *Hantavirus* e *Phlebovirus*. O alinhamento foi realizado pelo programa MultiAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) e revisado manualmente. Os números correspondem à posição do aminoácido no segmento L do BUNV.

5.1.2.3 Segmento L do Itaqui

A primeira sequência obtida para o segmento L do ITQV possui 579 nt de extensão, codifica para 193 aa e localiza-se próximo à extremidade 5', entre 1469 e 2047 pb. O outro fragmento sequenciado possui 670 nt de extensão, codifica para 223 aa e localiza-se entre 4886 e 5555 pb, próximo à extremidade 3' do segmento L. As análises a seguir serão realizadas com a sequência de 579 nt, correspondente à região entre 1469 e 2047 pb do segmento L do ITQV.

O alinhamento da sequência dos 193 aa inferidos a partir da região entre 1469 e 2047 pb do segmento L do ITQV e de outros oito membros do gênero *Orthobunyavirus* foi realizado e encontra-se representado na Figura 14. O fragmento analisado não corresponde a nenhuma das regiões importantes para a atividade da RNA-polimerase analisadas anteriormente, como a Região 3 ou domínio com função “cap-snatching”, mas apresenta algumas regiões bastante conservadas, conforme destacado na Figura 14, o que é esperado visto que a RdRp é a proteína mais conservada entre os membros da família *Bunyaviridae*.

```

ITQV  IGIEYRNVLE  EFKDKIVNAN  EETWATIEEI  AKTRYWQSIN  DFSVLIKNIL
CARV  NLVKVGNVLE  EFKDKIVNAN  EETWATIEEI  AKTRYWQSIN  DFSVLIKNIL
APEUV  GLKKIGNVLE  EFEYKIKDAN  PKTWEIIEEI  ANSRYWQAIN  DFSILIKNIL
BUNV  TLQDLHP IIM  QYASEIKEAS  KDTFDALLKI  SKTCFWQCIV  DVSTIMRNIL
LACV  GLKPDNFILN  EFGSKIKDAN  KETYDNMHKI  FETRYWQCIS  DFSTLMKNIL
SSHV  GLKPDNFILN  EFGSRIKDAN  KETYENMHKI  FETRYWQCIS  DFSTLMKNIL
TAHV  GLKSDNFILN  EFGQR IKDCN  KDTYENMYQI  FETRYWQCIS  DFSTLMKNIL
OROV  ELDKIGNYLE  HFSAKISACS  VEMWDFIYNT  TKTKYWQCIN  DYSTLMKNML
AKAV  MLDKMGCYLE  EYGPQICAAS  EETWETLKLI  CNMSYWSAIK  DFSTLMKNML
Consensus  .L.k.g..le  e%.kIk.an  .etw.....i  .ktr%WqCI.  DfStlmkNiL

```

```

51 100
ITQV  AVSQYNKHNT  FRIVCTANNN  FFGLVYPSTS  IQSKRSTIVF  STIVLHDNES
CARV  AVSQYNKHNT  FRIVCTANNN  FFGLVYPSTS  IQSKRSTIVF  STIVLHDNES
APEUV  SVSQYNKHNT  FRIVCTANNN  FFGILYPSAS  IKSRRSTVVF  SSVCLHENEN
BUNV  AVSQYNRHNT  FRVAMCANDS  VYALVFPSSD  IKTKRATVVF  SIVCMHKEKN
LACV  SVSQYNRHNT  FRLAMCANN  VFAIVFPSAD  IKTKKATVVY  SIIVLHKEEE
SSHV  SVSQYNRHNT  FRLAMCANN  VFAIVFPSAD  IKTKKATVVY  SIIVLHKEED
TAHV  SVSQYNRHNT  FRLAMCANN  VFAIVFPSAD  IKTKKATVVY  SIVVLHKEET
OROV  AVSQYNRHNT  FRIVSCANN  VFGLVMPSSD  IKTKKATLVY  AIMALHNEEA
AKAV  AVSQYNRHNT  FRVVTcANN  LFAIVMPSSD  IKTKRATLAY  FIICIHDKD
Consensus  aVsqYnrHNT  FR|v.cAN#n  v%alv.PS.d  IktKraTvv%  sii.lH.ee.

```

```

101 150
ITQV  DVLKCGALYK  TYRVKNG.YL  SISKAIRLDK  ERCQRLVISP  GLFMLTSLLF
CARV  DVLKCGALYK  TYRIKNG.YL  SISKAIRLDK  ERCQRLVISP  GLFMLTSLLF
APEUV  EVLKCGALYR  TYKVKGG.YL  SISKAIRLDK  ERCQRLVTSP  GIFLLTTLF
BUNV  DLMDAGALFT  TLECKNKEYI  SISKAIRLDK  ERCQRIVSSP  GLFILSSMLL
LACV  NIFNPGCLHG  TFKCMNG.YI  SISR AIRLDK  ERCQRIVSSP  GLFLTTCCLF
SSHV  NIFNPGCLHG  TFKCMNG.YI  SISR AIRLDK  ERCQRIVSSP  GLFLTTCCLF
TAHV  NVLNPGCLHG  TFKCMNG.YI  SISR AIRLDK  ERCQRIVSSP  GLFLTTCCLF
OROV  EIAELGSLYS  TFKTATG.YI  SISKAFRLDK  ERCQRIVSSP  GLFLMTSCLL
AKAV  NIMHHGALHA  TFKSEGK.YV  SISKGIRLDK  ERCQRIVSSP  GLFLLTTLML
Consensus  #....GaL..  Tfk..ng.Yi  SISKaiRLDK  ERCQRIvsSP  GLFllt.lLf

```

```

151 194
ITQV  KGDC.DVSLN  DVMNF AFFF  TS  LSITKSMLSL  TEPsRYMIMN  SLAL
CARV  KGDC.DVSLN  DVMNF AFFF  TS  LSITKSMLSL  TEPsRYMIMN  SLAL
APEUV  KSDN.DVNLN  DVMNF AFFF  TS  LSITKSMLSL  TEPsRYMIMN  SLAL
BUNV  YNNNPEVNLV  DVLNF TFFY  TS  LSITKSMLSL  TEPsRYMIMN  SLAI
LACV  KHDNPTLVMS  DIMNF SIF  TS  LSITKSVLSL  TEPARYMIMN  SLAI
SSHV  KHDNPTLVMS  DIMNF SIF  TS  LSITKSVLSL  TEPARYMIMN  SLAI
TAHV  KHENPTLVMS  DVMNF SIF  TS  LSITKSVLSL  TEPARYMIMN  SLAI
OROV  FNGNKSLEFD  KLLGF SFF  TS  ISITKAMLSL  TEPsRYMIMN  SLAV
AKAV  YNNNPTIKIE  DVANF AFH  TS  LSITKAMLSL  TEPsRYMIMN  SLAI
Consensus  k..np.....  dvmnF.f  TS  lSITKsmLSL  TEPsRYMIMN  SLAi

```

Figura 14. Alinhamento da sequência de aa inferidos a partir da região entre 1469 e 2047 pb do segmento L do ITQV e oito membros do gênero *Orthobunyavirus*. Caraparu (CARV, ABQ14448.2), Apeu (APEUV, sequência não publicada), Bunyamwera (BUNV, P20470.1), La crosse (LACV, NP_671968.1), Snowshoe Hare (SSHV, ABW87611.2), Tahyna (TAHV, ADQ08672.1), Oropouche (OROV, NP_982304.1) e Akabane (AKAV, BAF57206.1). O alinhamento foi realizado pelo programa MultiAlin. Aminoácidos conservados entre todas as amostras analisadas estão representados em vermelho.

5.1.3 Análise dos percentuais de identidade

Tabela 5: Percentual de identidade de nt e aa do segmento L dos membros do grupo C CARV, APEUV e ITQV e de membros dos sorogrupos Bunyamwera, California e Simbu do gênero *Orthobunyavirus*.

Amostra	ITQV	APEUV	CARV	BUNV	LACV	TAHV	OROV	AKAV
ITQV		<u>80,6</u>	<u>97,4</u>	55,6	60,2	59,7	58,8	57,8
APEUV	<u>74,6</u>		<u>79,2</u>	53,4	60,1	61,7	55,7	58,9
CARV	<u>94,8</u>	<u>73,7</u>		55,6	60,2	59,7	58,5	57,3
BUNV	67,0	60,0	60,1		63,1	61,1	54,9	59,6
LACV	63,8	59,7	60,3	61,2		92,2	62,2	62,7
TAHV	64,3	59,4	59,9	60,6	77,0		61,1	61,6
OROV	63,8	60,5	61,2	59,5	59,5	59,0		61,5
AKAV	62,6	59,5	59,6	59,2	58,7	59,2	62,6	

Os percentuais de identidade de nt (em azul) e aa (em verde) foram medidas pelo programa LALING (www.expasy.org).

Na Tabela 5 encontram-se representados os percentuais de identidade de nucleotídeos e aminoácidos para a sequência total do segmento L dos vírus do grupo C APEUV e CARV e parcial do segmento L (1469 – 2047 pb) do ITQV, além dos *Orthobunyavirus* BUNV, LACV, TAHV, OROV e AKAV. É possível visualizar que os vírus do grupo C analisados apresentam percentuais de identidade tanto de aa quanto de nt bem mais altos entre si do que quando estes são comparados aos orthobunyavirus pertencentes a outros sorogrupos, o que condiz com a classificação destes vírus em um sorogrupo distinto dos demais vírus analisados.

Tabela 6 - Percentual de identidade de nt e aa para o segmento L de 13 amostras de orthobunyavirus do sorogrupo C

	APEUV*	CARV*	ITQV*	CARV	CARV	CARV	CARV	ORIV	MTBV	MADV	ZUNV	ITAYA	ITAYA
	BeAn848	BeAn3994	BeAn12797	FMD0783	IQD5973	FVB0426	BeAn3994	BeAn17	BeAn15	BT4075	IQE7620	FSL2923	IQT9646
APEUV BeAn848*		79,5	80,6	79,6	79,5	79,5	79,6	<u>91,1</u>	<u>94,5</u>	79,3	<u>92,3</u>	79,4	79,5
CARV BeAn3994*	73,6		<u>99,5</u>	<u>97,2</u>	<u>97,1</u>	<u>96,9</u>	<u>99,8</u>	79,9	79,5	<u>93,7</u>	79,9	<u>97,1</u>	<u>97,1</u>
ITQV BeAn12797*	74,3	<u>94,6</u>		<u>93,0</u>	<u>94,6</u>	<u>94,1</u>	<u>99,5</u>	82,3	80,1	89,2	83,3	<u>94,6</u>	<u>94,6</u>
CARV FMD0783	73,6	83,9	83,6		98,5	98,1	97,4	80,2	79,5	94,4	79,8	98,7	<u>98,6</u>
CARV IQD5973	74,0	83,8	83,4	86,5		97,8	97,3	79,8	79,5	94,2	79,8	99,4	<u>99,5</u>
CARV FVB0426	74,0	84,2	82,9	84,4	84,9		97,1	79,9	79,4	94,3	79,7	97,9	<u>98,0</u>
CARV BeAn3994	73,5	<u>99,7</u>	<u>94,6</u>	83,9	83,9	84,3		80,1	79,6	94,0	80,0	97,3	<u>97,3</u>
ORIV BeAn17	78,6	73,4	72,3	73,5	73,4	73,1	73,5		91,2	79,4	92,8	79,9	79,9
MTBV BeAn15	<u>82,3</u>	73,4	73,7	73,6	73,7	73,6	73,4	78,6		79,0	92,8	79,4	79,5
MADV BT4075	73,1	79,6	80,2	79,9	80,2	80,1	79,7	73,1	73,1		79,3	94,3	<u>94,2</u>
ZUNV IQE7620	79,1	73,4	75,0	73,3	73,5	72,9	73,5	78,7	79,4	73,9		79,8	79,8
ITAYA FSL2923	73,7	84,1	83,1	86,2	<u>96,9</u>	84,5	84,1	73,1	73,5	79,9	73,8		<u>99,7</u>
ITAYA IQT9646	73,8	84,1	83,2	86,3	<u>96,9</u>	84,3	83,8	73,4	73,5	80,1	73,6	98,8	

Os percentuais de identidade de nt (em azul) e aa (em verde) foram medidas pelo programa LALING (www.expasy.org). As amostras marcadas com “*” representam aquelas sequenciadas neste trabalho.

1 Na tabela 6 encontram-se representados os percentuais de identidade de aa e nt entre as
2 amostras sequenciadas neste trabalho (APEUV, CARV e ITQV) e os demais membros
3 do sorogrupo C. É possível observar que a amostra CARV BeAn3994 sequenciada pelo
4 nosso grupo apresenta altas taxas de identidade de nt e aa em relação às demais
5 amostras de CARV cujas sequências encontram-se disponíveis.

6
7 É possível ainda observar que os percentuais de identidade de aa e nt entre a amostra de
8 ITQV sequenciada neste trabalho e os demais membros do sorogrupo C analisados são
9 bastante elevados, o que condiz com a classificação sorológica do ITQV no sorogrupo
10 C. Os dados demonstram existir uma grande semelhança entre a RdRp do ITQV e de
11 todas as amostras de CARV analisadas, em especial com a amostra sequenciada neste
12 trabalho, cujas taxas de identidade de nt e aa obtidas foram 94,6 e 99,5,
13 respectivamente. Estudos realizados por Shope e colaboradores (1962) demonstraram
14 que ITQV e CARV apresentam reações cruzadas quando provas de CF são empregadas.
15 Esta prova sorológica reconhece a proteína N viral, codificada pelo segmento S, o que
16 sugere que exista uma grande semelhança entre o segmento S destes dois vírus. No
17 entanto, neste trabalho, pela primeira vez, é possível demonstrar a alta taxa de
18 identidade entre o segmento L destes dois membros do sorogrupo C. Este dado, em
19 conjunto com os dados publicados anteriormente em 1962, fortemente sugere que os
20 segmentos L e S dos vírus ITQV e CARV possuem uma origem em comum.

21
22 As taxas de identidade de aminoácidos e nucleotídeos entre os vírus APEUV e CARV
23 são respectivamente 79,5 e 73,6, e são relativamente altas quando comparadas às taxas
24 de identidade entre APEUV e demais *Orthobunyavirus* analisados na Tabela 5 e
25 pertencentes a outros sorogrupos (BUNV, LACV, TAHV, SSHV, OROV). Este dado
26 condiz com a classificação destes vírus, CARV e APEUV, dentro do mesmo grupo
27 (grupo C). No entanto, este dado contraria a classificação atual destes vírus pelo ICTV
28 que considera o CARV como espécie viral protótipo e o APEUV como uma amostra
29 viral pertencente à espécie CARV. Os dados demonstram uma identidade de aa muito
30 maior entre APEUV e as amostras ORIV, MTBV e ZUNV, 91,1; 94,5; 92,3,
31 respectivamente, do que entre APEUV e CARV, o que sugere que a classificação atual
32 do APEUV não é adequada.

33

1

2 5.1.4 Análises Filogenéticas

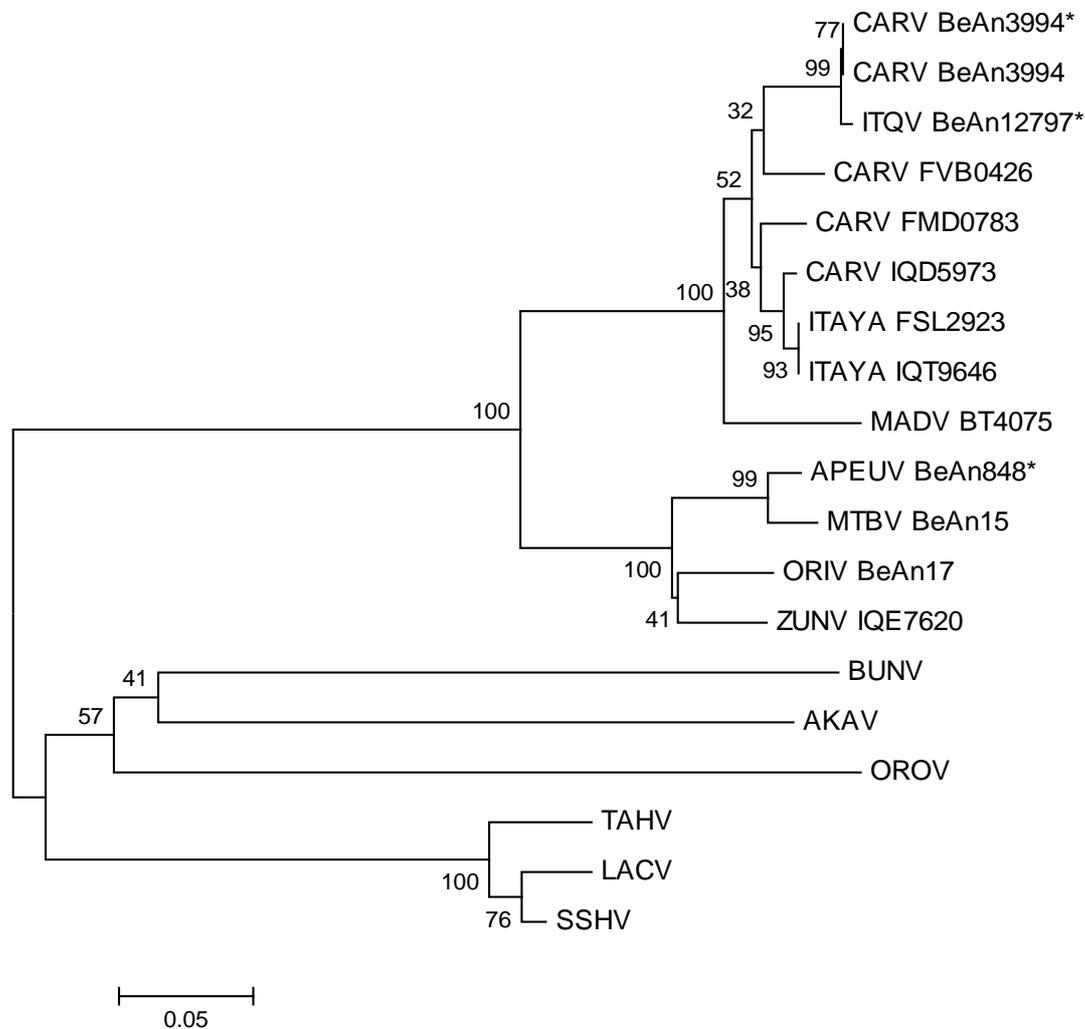


Figura 15. Árvore filogenética das amostras CARV BeAn3994, APEUV BeAn848 e ITQV BeAn12797 e membros dos sorogrupos C, Simbu, California e Bunyamwera do gênero *Orthobunyavirus*, baseada na sequência de aminoácidos inferida a partir do segmento L. A árvore foi gerada pelo método Neighbor-Joining e o cálculo de distâncias foi realizado através do modelo de substituição de aminoácidos de Dayhoff. O valor adjacente a cada braço corresponde às porcentagens de "bootstrap" suportado por 1000 réplicas. As amostras seqüenciadas neste trabalho encontram-se destacadas com um "*". A escala representa 5% de divergência de aa. Itaqui, (ITQV, sequência não publicada), Apeu (APEUV, sequência não publicada), Caraparu (CARV, sequência completa não publicada), Caraparu FMD0783 (CARV FMD0783, AGW82157.1), Caraparu IQD5973 (CARV IQD5973, AGW82149.1), Caraparu FVB0426 (CARV FVB0426, AGW82145.1) Caraparu BeAn3994 (CARV BeAn3994, AGW82134.1), Oriboca BeAn17 (ORIV BeAn17, AGW82130.1), Marituba BeAn15 (MTBV BeAn15, AGW82126.1), Zungarococha IQE7620 (ZUNV IQE7620, AEW62397.1), Madrid BT4075 (MADV BT4075, AGW82138.1), Itaya FSL2923 (ITAYA, AGW82153.1), Itaya IQT9646 (ITAYA IQT9646, AJZ73167.1), Bunyamwera (BUNV, P20470.1), La crosse (LACV, NP_671968.1), Snowshoe Hare (SSHV, ABW87611.2), Tahyna (TAHV, ADQ08672.1), Oropouche (OROV, NP_982304.1) e Akabane (AKAV, BAF57206.1).

1
2 Análises filogenéticas foram realizadas para a RdRp dos vírus APEUV, CARV e ITQV,
3 bem como para os demais membros do sorogrupo C e orthobunyavirus pertencentes aos
4 sorogrupos Simbu, Bunyamwera e California. A Figura 15 mostra a topologia da árvore
5 construída com o modelo de distância NJ. Uma Árvore filogenética construída pelo
6 método MP também foi gerada e demonstrou topologia semelhante à árvore gerada pelo
7 método NJ (dados não mostrados), porém a árvore gerada pelo método MP apresentou
8 alguns valores de “bootstrap” mais baixos.

9
10 As 13 amostras do grupo C analisadas agruparam-se em um clado distinto das amostras
11 pertencentes aos demais sorogrupos Simbu, Bunyamwera e California, sendo essas
12 divididas em dois cladogramas distintos, suportado por alto valor de “bootstrap” (100%). Em
13 um dos cladogramas agruparam-se as amostras de CARV, ITAYA, ITQV, estando o MADV
14 agrupado de maneira mais distante a estes. É possível observar uma grande
15 proximidade entre o ITQV e a amostra CARV BeAn3994, suportado por alto valor de
16 “bootstrap” (99%), o que revela a grande semelhança entre a RdRp destas duas amostras
17 virais, sugerindo que o segmento L destes vírus provavelmente possuem uma origem
18 em comum.

19
20 Por sua vez, no outro clado agruparam-se APEUV, MTBV, ORIV e ZUNV, os quais se
21 subdividem em dois cladogramas (APEUV/MTBV e ORIV/ZUNV), suportado por valor de
22 “bootstrap” de 100%. Conforme observado, o APEUV agrupa-se de maneira muito
23 distante ao CARV, e de maneira mais próxima ao MTBV (“bootstrap” de 99%), dentro
24 do sorogrupo C, o que corrobora os dados de percentuais de identidade de aa e nt
25 apresentados neste trabalho, os quais sugerem que a classificação atual das amostras
26 CARV e APEUV pelo ICTV não é adequada.

1

2 **5.2 Caracterização Molecular do segmento M para os vírus Caraparu, Apeu e Itaqui**

3 **5.2.1 Amplificação do segmento M dos vírus Caraparu, Apeu e Itaqui e obtenção** 4 **das sequências consenso**

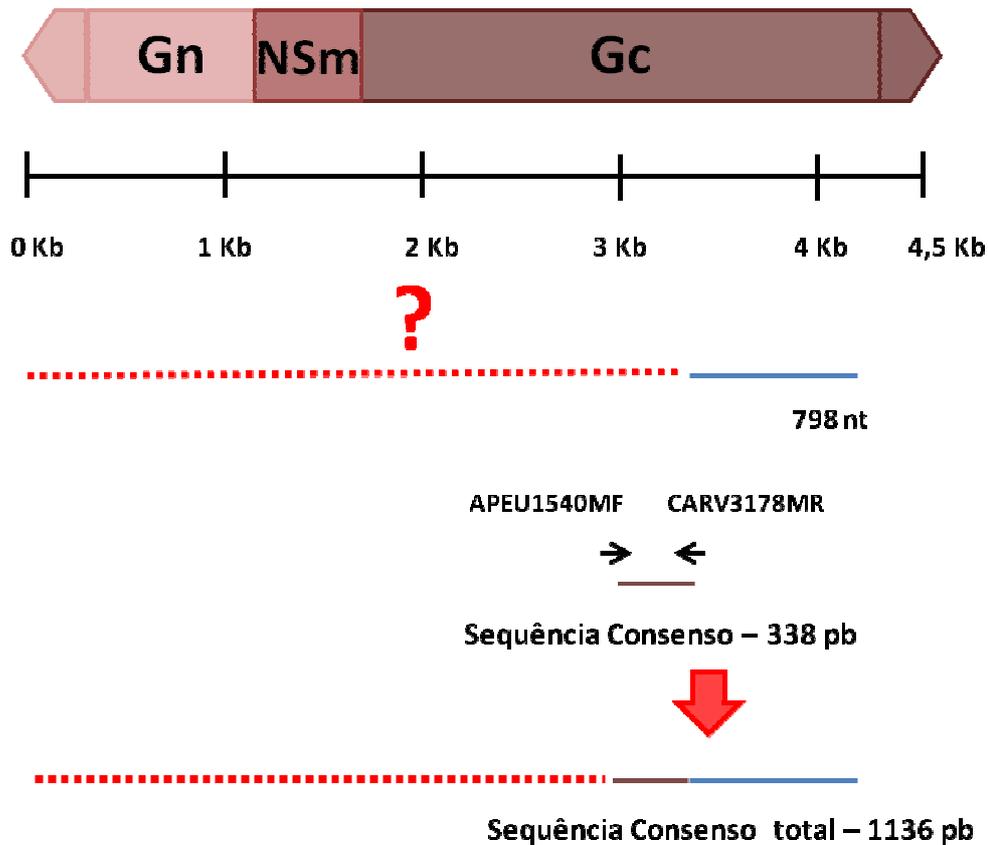
5 *5.2.1.1 Amplificação do segmento M do Caraparu*

6 Para amplificar parte do segmento M do CARV, foi utilizado um par de iniciadores
7 desenhados com bases nas sequências do segmento M do APEUV e CARV obtidas por
8 Magalhães (2008) (dados não publicados). Curiosamente, a região amplificada por este
9 par de iniciadores, representada na Figura 16, foi diferente da região alvo para a qual
10 este havia sido desenhado. Foi obtida uma sequência de 338 nucleotídeos localizados na
11 região entre 2913 e 3250 pb, adjacente à extremidade 5' da região sequenciada
12 anteriormente por Magalhães (2008), a qual está localizada entre 3251 e 4048 pb
13 (dados não publicados). A sequência consenso gerada apresenta 1136 nucleotídeos, está
14 localizada na região entre 2913 e 4048 pb e corresponde à sequência parcial da
15 glicoproteína C (Gc). Esta sequência codifica para 378 aa, o que corresponde a
16 aproximadamente 40% da Gc que possui 956 resíduos de aa.

17 Para as futuras análises que envolvam o segmento M do CARV, utilizaremos a
18 sequência consenso de 1136 nt gerada parcialmente neste trabalho e discutida no
19 presente tópico.

20

Segmento M CARV (~4500 pb)



1

2 **Figura 16. Esquema utilizado para amplificar o segmento M do CARV.** O par de iniciadores
3 utilizado e sua respectiva região alvo estão representados pelas setas. Para amplificar o segmento M do
4 CARV foi utilizado 1 par de iniciadores. A sua região alvo pode ser estimada através da escala
5 representada na figura. A sequência consenso obtida possui 338 nucleotídeos e localiza-se na extremidade
6 5' da sequência de 798 nucleotídeos anteriormente obtida. A sequência consenso total obtida possui 1136
7 nucleotídeos e corresponde à sequência parcial da Gc do CARV.

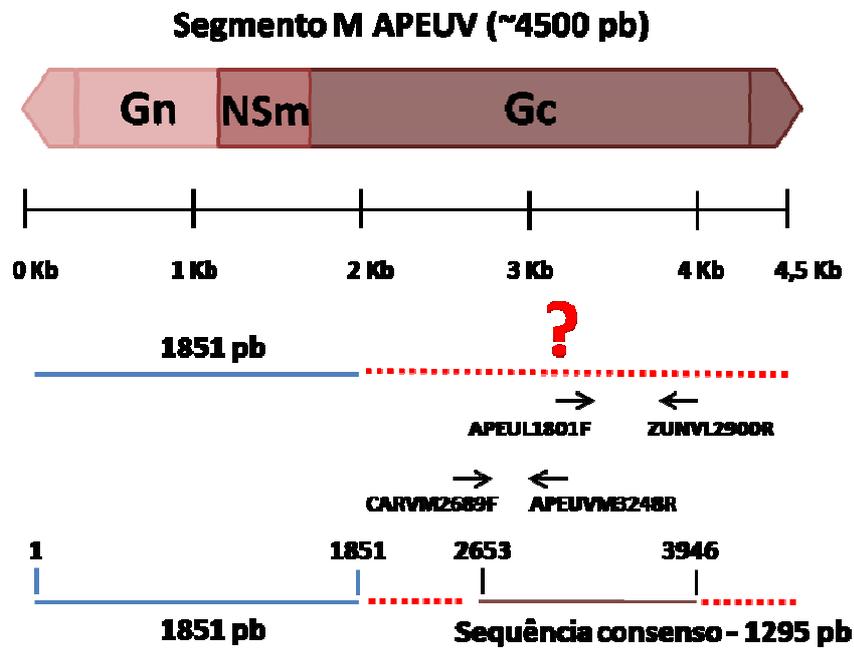
8

9 5.2.1.2 Amplificação do segmento M do Apeu

10 Para amplificar o segmento M do APEUV foram utilizados dois pares de iniciadores,
11 APEUL1801F/ZUNVL2900R e CARVM2689F/APEUVM3248R. Curiosamente, o
12 primeiro havia sido desenhado para amplificar o segmento L do APEUV, mas
13 amplificou de maneira inespecífica um fragmento do segmento M. A região amplificada
14 encontra-se representada na Figura 17. A sequência consenso de 1136 pb obtida
15 corresponde à região entre 2653 – 3946 pb e está contida na região codificadora da
16 glicoproteína C (Gc) do segmento M. A localização da porção sequenciada difere do
17 fragmento de 1851 nt obtido por Magalhães (2008) que está representado em azul na

1 Figura 17. A sequencia obtida codifica para 431 aa, o que corresponde a
 2 aproximadamente 45% da Gc que tem o tamanho aproximado de 956 aa.

3



4

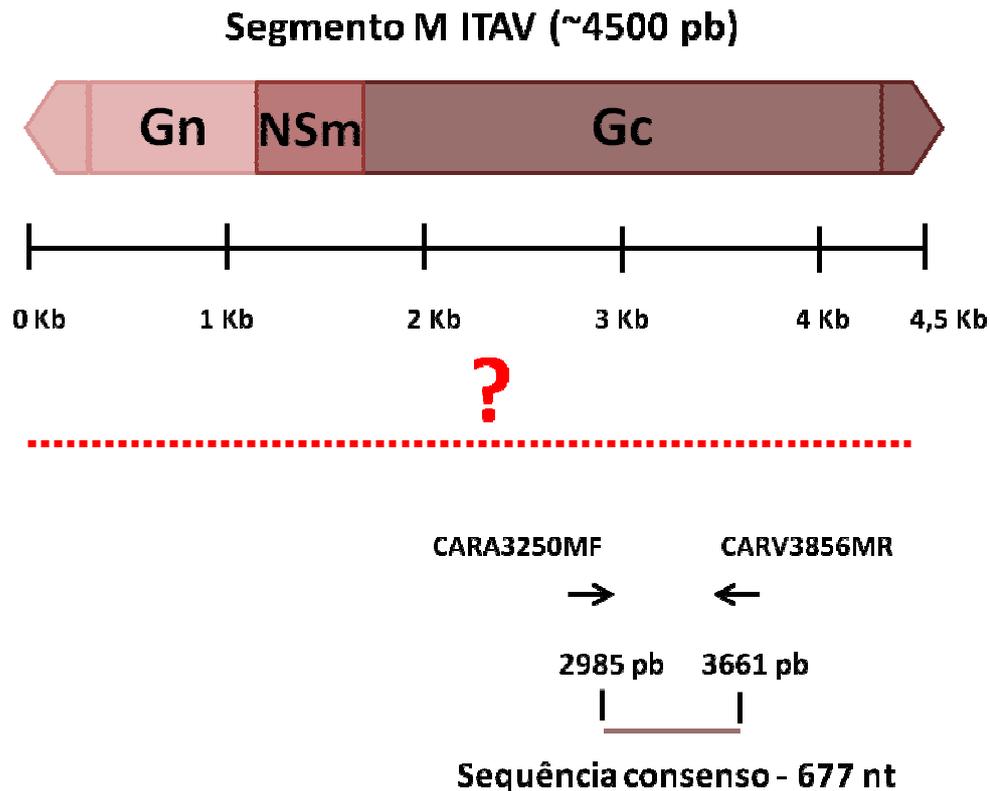
5 **Figura 17. Esquema utilizado para amplificar o segmento M do APEUV.** O par de iniciadores
 6 utilizado e a sua região alvo estão representados pelas setas. Para amplificar o segmento M do APEUV
 7 foi utilizado 1 par de iniciadores. A sua região alvo pode ser estimada através da escala representada na
 8 figura. A sequência consenso obtida possui 746 nucleotídeos e localiza-se numa região distinta da
 9 sequência de 1851 nt anteriormente obtida.

10

11 5.2.1.3 Amplificação do segmento M do Itaqui

12 Para amplificar parcialmente o segmento M do Itaqui um par de iniciadores foi utilizado
 13 e a região amplificada encontra-se representado na Figura 18. O fragmento amplificado
 14 situa-se na região entre 2985 e 3661 pb do segmento M, possui 677 nt de extensão e
 15 corresponde à sequência parcial da glicoproteína C (Gc), sendo esta a primeira
 16 sequência obtida para o segmento M desta amostra viral.

17



1

2 **Figura 18. Esquema utilizado para amplificar o segmento M do ITQV.** O par de iniciadores utilizado
 3 e a sua região alvo estão representados pelas setas. A sequência consenso obtida possui 677 nucleotídeos
 4 e corresponde à sequência parcial da Gc do ITQV.

5 5.2.2 Análise dos percentuais de identidade

6 A Tabela 7 apresenta os percentuais de identidade de nt e aa para o segmento M das
 7 amostras virais sequenciadas neste trabalho, CARV, APEUV e ITQV, e de outras 10
 8 amostras do sorogrupo C.

9

10 É possível observar uma alta taxa de identidade de aminoácidos e nucleotídeos entre
 11 APEUV e as diferentes amostras de CARV analisadas. Estes dados estão de acordo com
 12 os resultados das provas sorológicas realizadas por Shope e colaboradores (1962) que
 13 demonstraram a ocorrência de reações cruzadas entre APEUV e CARV quando
 14 empregadas provas de HI e NT. Estas provas sorológicas reconhecem antígenos de
 15 superfície e, desta forma, reagem com as glicoproteínas Gc e Gn dos *Orthobunyavirus*.
 16 Portanto, é esperado que as taxas de identidade de aa obtidas para Gc e Gn coincidam
 17 com os dados destas provas sorológicas.

18

1 Por sua vez, ao comparar o ITQV com os demais membros do sorogrupo C é possível
2 observar que os percentuais de identidade tanto de nt quanto de aa ocorrem em torno de
3 70%, com exceção do ORIV que apresentou taxa de identidade de aa de 87,1% em
4 relação ao ITQV. Ao contrário do que foi discutido anteriormente para o segmento L,
5 observa-se que há pouca semelhança entre a porção da Gc sequenciada para o ITQV e
6 as amostras de CARV analisadas. Em conjunto, os dados demonstram que os segmentos
7 L destes dois vírus provavelmente possuem uma origem em comum, devido à sua alta
8 taxa de identidade. Por outro lado, a análise da Gc revela uma grande diferença entre os
9 segmentos M destes dois membros do sorogrupo C, o que fortemente sugere que os
10 segmentos M de ITQV e CARV possuem origens distintas.

Tabela 7: Percentual de identidade de nt e aa para o segmento M dos membros do sorogrupo C

Amostra	APEUV* BeAn848	CARV* BeAn3994	ITQV* BeAn12797	CARV FMD0783	CARV IQD5973	CARV FVB0426	CARV BeAn3994	ORIV BeAn17	MTBV BeAn15	MADV BT4075	ZUNV IQE7620	ITAYA FSL2923	ITAYA IQT9646
APEU* BeAn848		<u>92,3</u>	72,6	<u>92,8</u>	<u>93,2</u>	<u>92,8</u>	<u>92,8</u>	71,9	85,1	87,7	85,5	88,5	90,2
CARV* BeAn3994	<u>80,4</u>		73,2	97,9	97,6	97,6	99,2	74,5	86,8	88,9	86,5	90,2	88,9
ITQV* BeAn12797	71,0	71,6		73,7	74,2	72,7	73,7	87,1	73,7	74,8	74,2	75,6	75,6
CARV FMD0783	<u>80,7</u>	82,7	70,4		98,7	97,3	96,9	65,3	75,8	82,0	75,4	83,8	83,8
CARV IQD5973	<u>80,9</u>	83,3	70,4	86,1		97,9	97,4	65,2	75,7	82,1	75,5	83,6	83,6
CARV FVB0426	<u>80,5</u>	82,5	69,9	86,1	85,2		96,8	65,6	75,9	82,0	75,6	84,2	84,1
CARV BeAn3994	<u>80,5</u>	99,5	71,7	82,5	82,6	82,4		65,5	75,8	82,0	75,6	83,1	83,0
ORIV BeAn17	70,2	70,2	75,5	65,8	66,6	66,4	66,0		67,4	65,1	66,7	66,1	66,2
MTBV BeAn15	76,0	76,6	70,9	71,5	71,3	71,4	71,2	67,3		75,0	90,5	76,7	76,7
MADV BT4075	77,4	77,7	70,4	73,8	74,0	74,6	73,7	66,6	70,9		74,0	84,8	84,8
ZUNV IQE7620	77,1	76,7	72,9	71,2	71,1	71,4	71,2	67,8	77,7	70,7		84,8	75,5
ITAYA FSL2923	79,3	80,1	72,8	75,8	74,9	75,7	75,2	66,1	71,7	75,9	71,1		<u>99,7</u>
ITAYA IQT9646	79,9	79,9	73,0	75,8	74,9	75,7	74,8	67,3	71,7	74,9	71,2	<u>98,8</u>	

Os percentuais de identidade de nt (em azul) e aa (em verde) foram medidas pelo programa LALING (www.expasy.org).

1 **5.2.3 Inferências Filogenéticas**

2 Análises filogenéticas foram realizadas para a sequência de aa inferida a partir do segmento M dos vírus
3 APEUV, CARV e ITQV, bem como para os demais membros do sorogrupo C. A Figura 19 mostra a
4 topologia da árvore construída com o modelo de distância NJ. Uma Árvore filogenética construída
5 pelo método MP também foi gerada e demonstrou topologia semelhante à árvore gerada pelo método
6 NJ (dados não mostrados), porém a árvore gerada pelo método MP apresentou alguns valores de
7 “bootstrap” mais baixos.

8 É possível observar que o APEUV agrupa-se no mesmo clado das 5 amostras de CARV analisadas,
9 suportado por valor de “bootstrap” de 83%. Este agrupamento tão próximo corrobora os dados
10 apresentados anteriormente neste trabalho que demonstraram uma alta taxa de identidade de aa entre a
11 sequência parcial da Gc do APEUV e das amostras de CARV analisadas.

12

13 A exemplo do que foi demonstrado para os percentuais de identidade, é possível visualizar que o
14 ITQV agrupa-se de maneira bem próxima ao ORIV, estando os dois representados no mesmo clado
15 suportado por alto valor de “bootstrap” (100%).

16

17

18

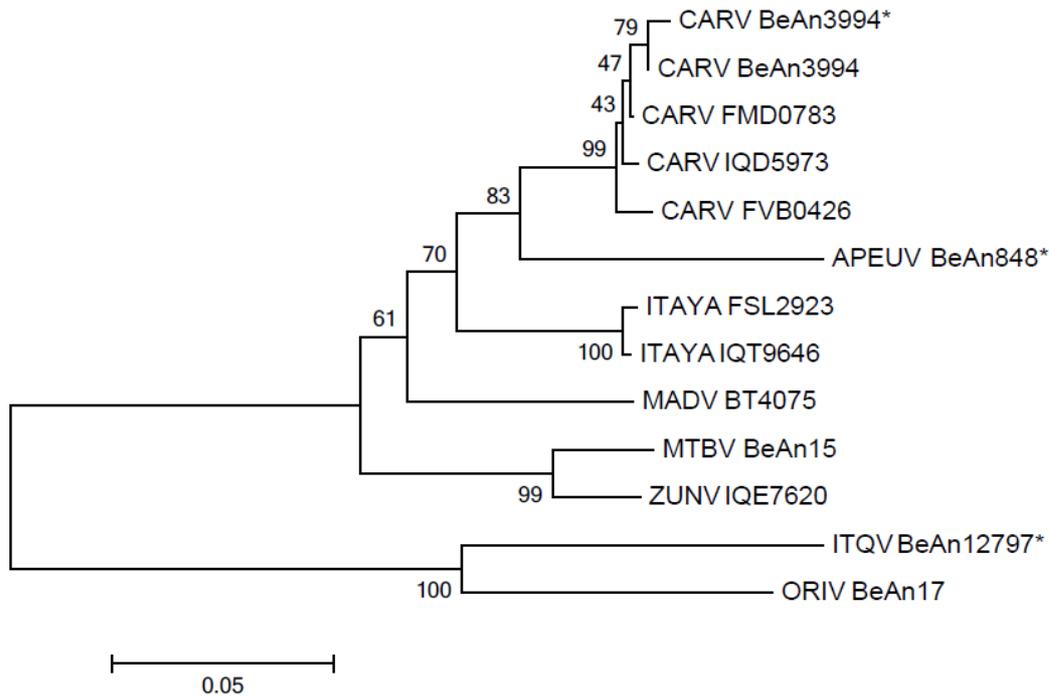


Figura 19. Árvore filogenética das amostras CARV BeAn3994, APEUV BeAn848 e ITQV BeAn12797 e outras 10 amostras do sorogrupo C do gênero *Orthobunyavirus*, baseada na sequência de aminoácidos inferida a partir do segmento M. A árvore foi gerada pelo método Neighbor-Joining e o cálculo de distâncias foi realizado através do modelo de substituição de aminoácidos de Dayhoff. O valor adjacente a cada braço corresponde às porcentagens de “bootstrap” suportado por 1000 réplicas. As amostras seqüenciadas neste trabalho encontram-se destacadas com um “*”. A escala representa 5% de divergência de aa. Itaqi, (ITQV, sequência não publicada), Apeu (APEUV, sequência não publicada), Caraparu (CARV, sequência não publicada), Caraparu FMD0783 (CARV FMD0783, AGW82158.1), Caraparu IQD5973 (CARV IQD5973, AGW82150.1), Caraparu FVB0426 (CARV FVB0426, AGW82146.1) Caraparu BeAn3994 (CARV BeAn3994, AGW82135.1), Oriboca BeAn17 (ORIV BeAn17, AGW82131.1), Marituba BeAn15 (MTBV BeAn15, AGW82127.1), Zungarococha IQE7620 (ZUNV IQE7620, AGW82142.1), Madrid BT4075 (MADV BT4075, AGW82139.1), Itaya FSL2923 (ITAYA, AGW82154.1), Itaya IQT9646 (ITAYA IQT9646, AJZ73168.1).

1

2 *5.3 PCR convencional para detecção de CARV, APEUV e ITQV*

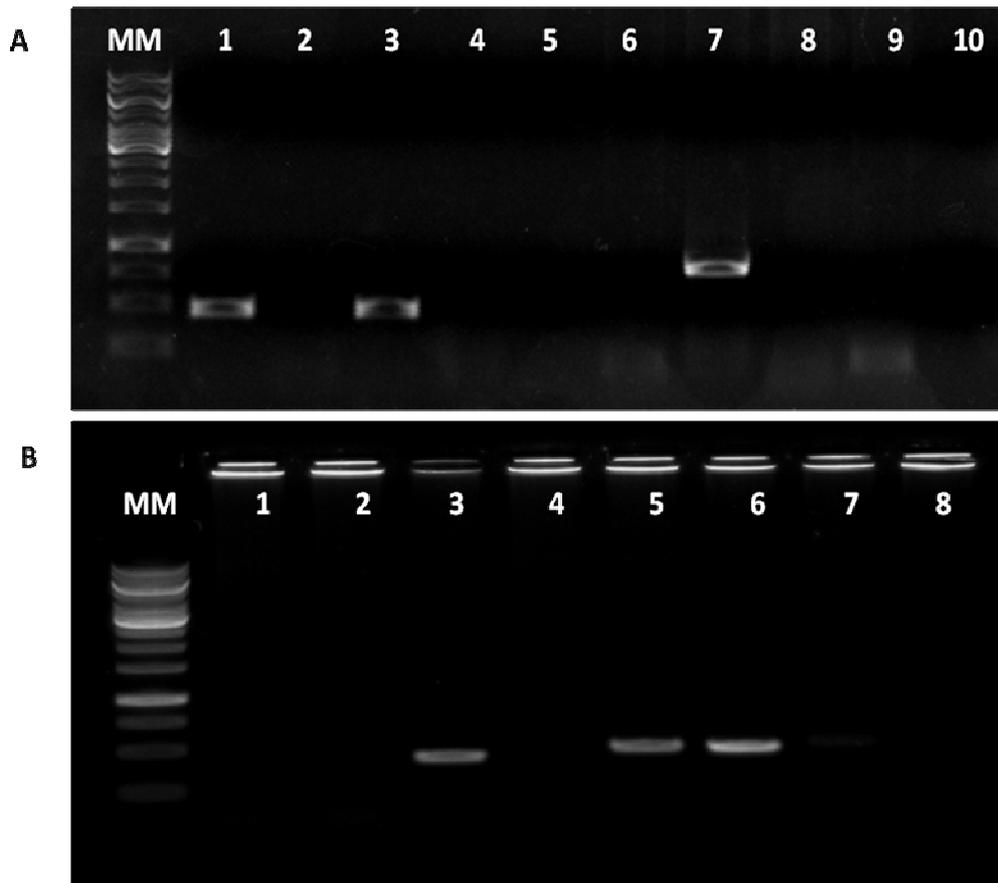
3

4 A PCR convencional para os segmentos L e M foi realizadas para os vírus CARV, APEUV e ITQV
5 utilizando quatro pares de iniciadores conforme descrito na Figura 20. Para o segmento L, o par de
6 iniciadores CARVL1516F/CARVL2018R foi capaz de amplificar apenas o CARV e o ITQV (~500
7 pb), enquanto apenas o APEUV apresentou uma banda de tamanho esperado (~800 pb) quando o par
8 APEUV1128F/APEUV1958R foi utilizado. Para o segmento M, o par de iniciadores
9 ITAQM3245F/ITAQM3699R apresentou uma amplificação específica (~400 pb) apenas para o ITQV,
10 enquanto o par APEUM3372F/APEUM3880R produziu bandas de tamanho específico (~500 pb) tanto
11 para APEUV quanto para CARV.

12 Os dados demonstram que é possível detectar e distinguir CARV, APEUV e ITQV baseado na PCR
13 convencional para os segmentos M e L. Estes iniciadores podem ser utilizados para auxiliar no
14 diagnóstico dos arbovírus do grupo C, uma vez que nenhum método molecular encontra-se disponível
15 para o diagnóstico destas arboviroses potencialmente emergentes.

16

17



1
2
3
4
5
6

Figura 20. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos para os segmentos L e M de CARV, APEUV e ITQV utilizando diferentes pares de iniciadores. (A) Segmento L - MM: marcador de peso molecular (1 Kb); canaletas 1 – 5: Iniciadores CARVL1516F/CARVL2018R, (1) CARV, (2) APEUV, (3) ITQV, (4 e 5) controles negativos; canaletas 6 – 10: Iniciadores APEUV1128F/APEUV1958R, (6) CARV, (7) APEUV, (8) ITQV, (9 e 10) controles negativos. (B) Segmento M – MM: marcador de peso molecular (1 Kb); canaletas 1 – 4: Iniciadores ITAQM3245F/ITAQM3699R, (1) CARV, (2) APEUV, (3) ITQV, (4) controle negativo; canaletas 5 – 8: Iniciadores APEUM3372F/APEUM3880R (5) CARV, (6) APEUV, (7) ITQV, (8) controle negativo.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

VI DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

1 A caracterização da sequência completa do segmento L do APEUV revelou que a RdRp deste membro
2 do sorogrupo C possui todas as regiões conservadas anteriormente descritas para os *Orthobunyavirus*,
3 como a região 3 com seus motivos A-E e pré-motivo A e a região 4. Além disso, a RdRp do APEUV
4 possui o domínio com atividade de endonuclease que desempenha o mecanismo “cap-snatching”
5 originalmente descrito para o vírus Influenza e posteriormente detectado também na sequência do
6 LACV.

7 Estudos sorológicos realizados na década de 60 com CARV, APEUV, ITQV, MTBV, ORIV e MURV
8 demonstraram que estas seis amostras apresentavam padrões antigênicos distintos quando analisados
9 pelos testes de FC ou IH/NT. Em reações de FC, que determinam anticorpos dirigidos contra a
10 proteína N (segmento S), os grupos que reagiam cruzadamente e apresentavam-se como pares
11 antigênicos eram: MURV/ORIV, ITQV/CARV e MTBV/APEUV. Já nas provas de IH e NT, que
12 determinam anticorpos dirigidos contra as glicoproteínas Gc e Gn (segmento M), os pares antigênicos
13 foram ORIV/ITQV, APEUV/CARV e MTBV/MURV (SHOPE *et al.*, 1962). Ainda de acordo com os
14 dados sorológicos, as provas de IH e NT são capazes de subdividir os vírus do sorogrupo C em quatro
15 complexos antigênicos, sendo eles Caraparu, Oriboca, Marituba e Madrid. O ICTV atualmente utiliza
16 essa classificação por complexos antigênicos para definir estes quatro vírus como as espécies protótipo
17 do sorogrupo C. Os demais membros deste sorogrupo são, portanto, classificados como amostras virais
18 pertencentes a uma destas espécies protótipo.

19 Em estudos recentes, o sequenciamento completo das quatro amostras virais protótipo listadas pelo
20 ICTV (CARV, ORIV, MTBV e MADV) confirmou os dados sorológicos, uma vez que estes quatro
21 vírus se agruparam de forma distante quando o dendograma para o segmento M foi analisado, o que
22 justifica a ausência de reações cruzadas nas provas NT e IH (HANG *et al.*, 2014). Por sua vez, os
23 dendogramas obtidos para os segmentos S e L demonstraram um perfil semelhante entre si, porém
24 completamente distinto daquele obtido para o segmento M.

25 As análises de percentuais de identidade e filogenéticas realizadas para as sequências da RdRp
26 (segmento L) e poliproteína (segmento M) obtidas para as amostras CARV (BeAn3994), APEUV
27 (BeAn848) e ITQV (BeAn12797) no presente trabalho revelaram que as relações genéticas
28 existentes entre esses vírus são diferentes quando os segmentos L e M são analisados. Os dendogramas
29 gerados para o segmento L revelam um agrupamento muito próximo entre CARV e ITQV, sendo que a
30 sequência parcial obtida para o segmento L do ITQV apresenta 99,5% de identidade de aa com a
31 amostra BeAn3994 do CARV. Por sua vez, o APEUV nestes mesmos dendogramas agrupou-se de
32 maneira mais próxima ao MTBV, ficando distante de todas as amostras de CARV analisadas, bem

1 como do ITQV. Os dados obtidos para a RdRp das três amostras analisadas sugerem que o segmento L
2 de CARV e ITQV possuem uma origem em comum, a qual não é compartilhada pelo segmento L do
3 APEUV. De forma semelhante aos dados obtidos para o segmento L, Hang e colaboradores
4 demonstraram, através de um dendograma para o segmento S, a semelhança existente entre a proteína
5 N do APEUV em relação ao MTBV, e a sua distância em relação às amostras de CARV analisadas.

6 Corroborando os dados obtidos por Hang e colaboradores em 2014, os dendogramas gerados para o
7 segmento M revelam uma topologia completamente distinta em relação àqueles obtidos para o
8 segmento L. As análises filogenéticas realizadas com a poliproteína (segmento M) revelam a
9 subdivisão dos vírus do grupo C nos quatro complexos antigênicos descritos, estando CARV e
10 APEUV agrupados no complexo Caraparu e ITQV no complexo Oriboca. Ao contrário do que se
11 observa para o segmento L, os dados aqui obtidos sugerem uma origem em comum para o segmento M
12 de CARV e APEUV. Por sua vez, é mais provável que os segmentos M de ITQV e CARV possuam
13 origens distintas, devido à baixa similaridade existente entre os mesmos.

14 Em conjunto, os dados obtidos neste trabalho e aqueles encontrados na literatura sugerem que os atuais
15 critérios de classificação adotados pelo ICTV para definir as espécies entre os membros do sorogrupo
16 C, os quais se baseiam nas relações antigênicas existentes nas provas (IH/NT) que reconhecem as
17 glicoproteínas de superfície (Gc e Gn) codificadas pelo segmento M, não são os mais adequados. De
18 acordo com tais critérios, o APEUV é classificado como uma amostra pertencente à espécie Caraparu.
19 No entanto, conforme demonstrado neste trabalho, bem como na literatura, as sequências da RdRp e da
20 proteína N deste vírus são bastante diferentes em relação a todas as amostras de CARV analisadas.
21 Portanto, classificar o APEUV como uma amostra do CARV seria incorreto, uma vez que estas duas
22 proteínas (RdRp e N) participam de etapas importantes do ciclo viral e, desta forma, as diferenças
23 existentes nas suas sequências podem conferir características biológicas distintas entre os dois vírus.
24 Por este mesmo critério, o ITQV seria classificado como uma amostra da espécie protótipo Oriboca,
25 no entanto, esse vírus compartilha, com altas taxas de identidade, a RdRp com o CARV.

26 A classificação dos vírus do grupo C é uma tarefa bastante peculiar devido à capacidade potencial
27 destes vírus sofrerem rearranjos entre seus três segmentos. Curiosamente, os dados encontrados na
28 literatura (ex. Ngari, Schmollenberg, Jatobal, Iquitos) indicam que tal mecanismo de rearranjo, em
29 geral, envolve a troca do segmento M, por mecanismos ainda não muito bem esclarecidos. É possível
30 que, pelo fato da RdRp e proteína N precisarem estar ligadas aos segmentos genômicos para a
31 formação dos complexos de ribonucleoproteínas para que a montagem das partículas virais possa
32 ocorrer de maneira correta, a interação entre estas duas proteínas seja bastante específica. Além disso,

1 a interação entre a RdRp e a proteína N é fundamental para a regulação das etapas de transcrição e
2 replicação. Estas interações poderiam ser perdidas caso o segmento L ou S fosse trocado por outro,
3 gerando proteínas com características diferentes, o que poderia gerar partículas virais defectivas,
4 inviabilizando tal rearranjo genético. Por sua vez, o segmento M e as glicoproteínas de superfície são
5 intimamente relacionados com a especificidade pelo vetor, infectividade e escape do sistema
6 imunológico. Deste modo, variações do segmento M permitem a adaptação a novos vetores e
7 hospedeiros e dois vírus do mesmo ancestral podem se tornar diferentes em relação a este segmento
8 genômico quando submetidos a pressões seletivas diferentes (ex. sistema imunológico) (HANG *et. al.*,
9 2014). Sendo assim, um critério de classificação de espécies baseado no segmento que mais
10 frequentemente é trocado entre os vírus do mesmo sorogrupo não parece ser o mais adequado. Por
11 outro lado, uma classificação baseada na sequência do segmento L ou da RdRp, sendo esta a proteína
12 mais conservada e melhor caracterizada dentro do gênero Orthobunyavirus, poderia ser mais adequada.

13 Devido à grande semelhança entre os segmentos L de ITQV e CARV e a ocorrência de reações
14 cruzadas entre estes dois vírus em provas de FC, é possível que os segmentos L e S destes dois
15 membros do sorogrupo C sejam originados de um vírus em comum e que seus segmentos M possuam
16 origens diferentes, através do mecanismo de rearranjo genético. Por sua vez, devido à grande
17 semelhança entre os segmentos M de APEUV e CARV, é possível que os segmentos M destes dois
18 vírus tenham a mesma origem e que o CARV tenha adquirido seus segmentos L e S de uma amostra
19 viral e o APEUV de outra, através deste mesmo mecanismo genético. É bastante lógico supor que os
20 vírus do grupo C existentes tenham sido originados a partir de rearranjos genéticos ao longo de sua
21 evolução uma vez que estes vírus compartilham os mesmos vetores e hospedeiros em um mesmo
22 ecossistema. Portanto, a coinfeção por dois ou mais membros deste sorogrupo é algo bastante
23 provável, o que facilmente pode resultar no surgimento de novos vírus que compartilhem segmentos
24 originários de vírus diferentes. Os dados apresentados neste trabalho e aqueles encontrados na
25 literatura são prova da importância deste mecanismo genético para o surgimento das amostras virais
26 existentes hoje e apontam para uma potencial capacidade de emergência de novas amostras virais com
27 características distintas daquelas atualmente conhecidas.

28

29

30

31

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ALTSCHUL, S. F., T. L. MADDEN, *et al.* GAPPED BLAST and PSI-BLAST: a new generation of
2 protein database search programs. Nucleic Acids Res, v.25, n.17, Sep 1, p.3389-402. 1997.
- 3 AGUILAR, P.V., A.D. BARRETT, *et al.* Iquitos Virus: A Novel Reassortant Orthobunyavirus
4 Associated with Human Illness in Peru. Plos Negl Trop Dis, v.5 (9): e1315, Sep. 2011.
- 5 AQUINO, V.H., E. ARRUDA, *et al.* Brazilian vírus in the Genus *Orthobunyavirus*. Virus Rev Res,
6 v.7, n.2, p. 7-20. 2002.
- 7 AQUINO V.H, M.L. MORELI, L.T.M. FIGUEIREDO. Analysis of oropouche virus L protein amino
8 acidsequence showed the presence of an additional conserved region that could harbour an
9 important role for the polymerase activity. Arch Virol v.148, p.19–28. 2003.
- 10 AZEVEDO, R.S.S. *et al.* Arboviroses In: Infectologia pediátrica. Ed. Ateneu. São Paulo. P.533-551.
11 2007a.
- 12 AZEVEDO, R. S., M. R. NUNES, *et al.* Reemergence of Oropouche fever, northern Brazil. Emerg
13 Infect Dis, v.13, n.6, Jun, p.912-5. 2007b.
- 14 BEATY, J.B., D.H.L. BISHOP. Bunyavirus-vector interactions. Virus Res, v.10, p.289-302. 1988.
- 15 BEATY, B.J., H.C. CALISHER, *et al.* Arbovirus. In: Diagnostic Procedures for viral, Rickettsial and
16 Chlamydial infections. Seventh edition, p. 189-212. 1995.
- 17 BOWEN, M. D., S. G. TRAPPIER, *et al.* A reassortant bunyavirus isolated from acute hemorrhagic
18 fever cases in Kenya and Somalia. Virology, v.291, n.2, Dec 20, p.185-90. 2001.
- 19 BRIESE, T., B. BIRD, *et al.* Batai and Ngari Viruses: M Segment Reassortment and Association with
20 Severe Febrile Disease Outbreaks in East Africa. Journal of Virology, v.80, n.11, Jun, p.5627–
21 5630. 2006.
- 22 BRITISH VETERINARY ASSOCIATION (BAV). Emerging diseases: Schmallenberg virus continues
23 to spread across Europe. Veterinary Record, v.172:543. 2013.
- 24 BUCKLEY S., R.E. SHOPE. Comparative assay of arthropod-bourne group C virus antibodies by
25 tissue neutralization and hemagglutination-inhibition tests. Amer. Journ. Trop. Med. Hyg. 1961.
- 26 CALISHER C. H., T. L. COIMBRA, *et al.* Identification of new Guama and Group C serogroup
27 bunyaviruses and an ungrouped virus from Southern Brazil. am j trop med hyg. v.32, n.2, Mar,
28 p.424-31. 1983.

- 1 CAUSEY, O. R., C. E. CAUSEY, *et al.* The isolation of arthropod-borne viruses, including members
2 of two hitherto undescribed serological groups, in the Amazon region of Brazil. Am J Trop Med
3 Hyg, v.10, Mar, p.227-49. 1961.
- 4 CASALS J., L. V. BROWN. HEMAGGLUTINATION WITH ARTHROPOD-BORNE VIRUSES. J
5 Exp Med., v. 99, n.5, May, p. 429–449. 1954.
- 6 CASALS, J.; WHITMAN, L.; Group C, a new serological group of hitherto undescribed arthropod-
7 borne viruses, Immunological studies, American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,
8 10:250-258, 1961.
- 9 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Hantavirus pulmonary syndrome in visitors to a
10 national park— Yosemite Valley, California, 2012. Morb Mortal Wkly Rep v. 61, n. 46, p.952.
11 2012.
- 12 CHEN S., J.A.L. SHORT, *et al.* Heterocellular induction of interferon by negative-sense RNA viruses.
13 Virology., v.407, p.247–255. 2010.
- 14 DIAS A., D. BOUVIER, *et al.* The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides
15 in the PA subunit. Nature, v.458, p.914-8. 2009.
- 16
- 17 DIAZ M.O., S. ZIEMIN *et al.* Homozygous deletion of the alpha- and beta 1-interferon genes in human
18 leukemia and derived cell lines. Proc. Natl.Acad.Sci. U.S.A. v.85, , p.5259-63.1988.
- 19
- 20 DULBECCO, R., M. VOGT. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis virus. J
21 exp Med, v. 99, p.167-82. 1954.
- 22 ELLIOTT, R. M. Molecular biology of the Bunyaviridae. J Gen Virol, v.71 p.501-22. 1990.
- 23 ELLIOTT, R.M. Emerging viruses: the Bunyaviridae. Mol Med, vol.3, p.572-577, 1997.
- 24 EWING, B., L. HILLIER, *et al.* Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy
25 assessment. Genome Res, v.8, n.3, Mar, p.175-85. 1998a.
- 26 EWING, B., P. GREEN. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error
27 probabilities. Genome Res, v.8, n.3, Mar, p.186-94. 1998b.
- 28 FERREIRA, I. B., L. E. PEREIRA, *et al.* Surveillance of arbovirus infections in the Atlantic Forest
29 Region, State of Sao Paulo, Brazil. I. Detection of hemagglutination-inhibiting antibodies in wild
30 birds between 1978 and 1990. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.36, n.3, May-Jun, p.265-74. 1994.

- 1 FIGUEIREDO, L. T. Emergent arboviruses in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop, v.40, n.2, Mar-Apr,
2 p.224-9. 2007.
- 3 FORSHEY, B. M., C. GUEVARA, *et al.* Arboviral Etiologies of Acute Febrile Illnesses in Western
4 South America, 2000–2007. PLoS Negl Trop Dis, v.4, n.8, p.e787. 2010.
- 5 GERRARD S. R., L. Li, *et al.* Ngari Virus Is a Bunyamwera Virus Reassortant That can be Associated
6 with Large Outbreaks of Hemorrhagic Fever in Africa. Journal of Virology, v.78, n.16, Aug,
7 p.8922–8926. 2004.
- 8
- 9 GIBBS C.J., E.A. BRUCKNER, S. SCHENKER. A Case of Apeu Virus Infection. Am. J. Trop. Med.
10 Hyg., v.13, n.1, 1964, p. 108-113. 1964.
- 11 GONZALEZ-SCARANO, F., S.S. SOLDAN. Emerging infectious disease: the *Bunyaviridae*. J
12 Neurovir, reviews, v.11, p.412-423. 2005.
- 13 GOULD, E. A., S. HIGGS, *et al.* Potential arbovirus emergence and implications for the United
14 Kingdom. Emerg Infect Dis, v.12, n.4, Apr, p.549-55. 2006.
- 15 GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems.
16 Arch Med Res, v.33, n.4, Jul-Aug, p.330-42. 2002.
- 17 HADDOW A.D., A.D. HADDOW. The use of oral ribavirin in the management of La Crosse viral
18 infections. Med Hypotheses, v.72(2), p.190-2. 2009.
- 19 HANAHAN, D., J. JESSEE, *et al.* Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria.
20 Methods Enzymol, v.204, p.63-113. 1991.
- 21 HANG J., B.M. FORSHEY, *et al.* Random Amplification and Pyrosequencing for Identification of
22 Novel Viral Genome Sequences. Journal of Biomolecular Techniques v.23, p.4–10. 2012.
- 23 HANG J., B.M. FORSHEY, *et al.* Genomic Characterization of Group C Orthobunyavirus Reference
24 Strains and Recent South American Clinical Isolates. Plos One v. 9 (3): e92114. 2014.
- 25 HART, T. J., A. KOHL, *et al.* Role of the NSs Protein in the Zoonotic Capacity of Orthobunyaviruses.
26 Zoonoses Public Health, Sep 1. 2008.
- 27 HOLLIDGE B.S., F. GONZÁLEZ-SCARANO, S.S. SOLDAN. Arboviral Encephalitides:
28 Transmission, Emergence, and Pathogenesis. J Neuroimmune Pharmacol, v.5, p.428–442. 2010.

- 1 HOLLIDGE B.S., S.R. WEISS, S.S. SOLDAN. The Role of Interferon Antagonist, Non-Structural
2 Proteins in the Pathogenesis and Emergence of Arboviruses. Viruses v.3 (6), Jun, p. 629-658.
3 2011.
- 4 HONTZ R.D., C. GUEVARA, *et al.* Itaya virus, a Novel Orthobunyavirus Associated with Human
5 Febrile Illness, Peru. Emerging Infectious Disease, v.21 (5), Maio, p.781-788. 2015.
- 6 ICTV - Comitê Internacional para Taxonomia de Vírus. Sítio na web: www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/
7 - acesso em 12 de agosto de 2013.
- 8 IVERSON, L.B., A.P.A. TRAVASSOS DA ROSA, *et al.* Human disease in Ribeira Valley, Brazil
9 caused by Caraparu, a group c arbovírus – Report of a case. Rev Inst Med Trop São Paulo, v.29,
10 n.2, Mar-Apr, p.112-117. 1987.
- 11 IVERSSON, L.B. Situação atual do conhecimento eco-epidemiológico sobre arbovírus patogênicos
12 para o homem na região da Mata Atlântica do estado de São Paulo. Rev. Inst. Med. Trop. v.4,
13 p.343-353, 1994.
- 14 JONES K.E., N.G. PATEL, *et al.* Global trends in emerging infectious diseases. Nature, v.451, p.990–
15 993. 2008.
- 16
- 17 JONKERS A.H., D. METSELAAR, *et al.* Restan virus, a new group C arbovirus from Trinidad and
18 Surinam. Am J Trop Med Hyg., v.16(1), p.74-8. 1967.
- 19
- 20 KARABATSOS, N. International Catalogue of Arboviruses Including Certain Other Viruses of
21 Vertebrates. The American Committee on Arthropod-Borne Viruses. 2000 Annual Report on the
22 Catalogue of Arthropod-Borne and Selected Vertebrate Viruses of the World, Subcommittee on
23 Information Exchange, n° 108, 2002.
- 24
- 25 KHAN A. S., R. F. KHABBAZ, *et al.* Hantavirus pulmonary syndrome: the first 100 US cases. J
26 Infect Dis n.173, p.1297–1303. 1996.
- 27
- 28 LEÃO, N.Q. *et al.* Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque amazônico. Ed. Cejup. Univ. Est. Pará.
29 Inst. Evandro Chagas. 886p. 1997.
- 30 LIVONESI M.C., R.L. DE SOUSA, *et al.* In vitro and in vivo studies of ribavirin action on Brazilian
31 Orthobunyavirus. Am J Trop Med Hyg, v.75, p.1011-6. 2006.
- 32

- 1 LOZACH, P. Y., A. Kühbacher, *et al.* DC-SIGN as a receptor for phleboviruses. *Cell Host Microbe*,
2 n.10, p.75–88. 2011.
- 3 MACKOW, E.R., I.N. GAVRILOVSKAYA. Cellular receptors and hantavirus pathogenesis. *Curr Top*
4 *Microbiol Immunol.*, v.256, p.91-115. 2001.
- 5 MAGALHÃES, C.L.B., *et al.* Caraparu vírus (group c *Orthobunyavirus*) sequencing and phylogenetic
6 analysis based on the conserved region 3 of the RNA polymerase gene. *Virus Genes*, p.681-684.
7 2007.
- 8 MAGALHÃES, C.L.B. Caracterização de amostras de Bunyavirus do sorogrupo C (*Bunyaviridae*) por
9 estudos biológicos e moleculares. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de
10 Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade federal de Minas Gerais para
11 obtenção do título de Doutora em Microbiologia. 2008.
- 12 MAGALHÃES, C.L.B., B.P. DRUMOND, *et al.* Identification of a phylogenetically distinct
13 *orthobunyavirus* from group C. *Arch Virol*, DOI 10.1007/s00705-011-0976-1. 2011.
- 14 MATIOLI, S.R. *Biologia molecular e evolução*. 1. ed. Ribeirão Preto, SP: Holos, Editora, v. 1. 202 p.,
15 2001.
- 16 MELLOR, P. S. Replication of arboviruses in insect vectors. *J Comp Pathol*, v.123, p.231-47. 2000.
- 17 MOHAMED, M., A. McLEES, R. M., ELLIOTT. Viruses in the Anopheles A, Anopheles B, and Tete
18 serogroups in the *Orthobunyavirus* genus (family *Bunyaviridae*) do not encode an NSs protein. *J*
19 *Virol*. N.83, p.7612–7618. 2009.
- 20 MÜLLER R., O. POCH, *et al.* Rift valley fever virus L segment: correction of the sequence and
21 possible functional role of newly identified regions conserved in RNA-dependent polymerases.
22 *Journal of General Virology* v.75, p.1345 – 1352. 1994.
- 23 NALCA, A., P. F. FELLOWS, *et al.* Vaccines and animal models for arboviral encephalitides.
24 *Antiviral Res*, v.60, n.3, Nov, p.153-74. 2003.
- 25 NICHOL, S. T., J. ARIKAWA, *et al.* Emerging viral diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.97,
26 p.12411-2. 2000.
- 27 NUNES, M. R., A. P. TRAVASSOS DA ROSA, *et al.* Molecular epidemiology of group C viruses
28 (*Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus*) isolated in the Americas. *J Virol*, v.79, p.10561-70. 2005.

- 1 NUNES, M.R.T., A.P. TRAVASSOS DA ROSA, *et al.* A febre do Oropouche : uma revisão dos
2 aspectos epidemiológicos e moleculares na Amazônia brasileira. Cad. Saúde Colet. Rio de Janeiro,
3 2007.
- 4 NUNES, M.R.T., N.R. FARIA, *et al.* Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in
5 Brazil. BMC Med, v.13(102). 2015
- 6 PAPPU H. R., R. A. JONES, R. K. JAIN. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping
7 systems: successes achieved and challenges ahead. Virus Res. n.141, p.219–236. 2009.
- 8 PETRILLO-PEIXOTO, M.L., P.C., FERREIRA, *et al.* Sensitivity of group C arboviruses
9 (bunyaviridae) to human amnion interferon. Intervirology, v.14, n.1, p.16-20. 1980.
- 10 PINHEIRO, F.P. *et al.* Arbovirose In: Saúde na Amazônia. 2 ed. São Paulo, 1983.
- 11 POCH O., I. SAUVAGET, M. DELARUE, N. TORDO. Identification of four conserved motifs among
12 the RNA dependent polymerase encoding elements. The EMBO Journal v.8(12), p.3867-3874.
13 1989.
- 14 REGUERA, J., F. WEBER, S. CUSACK. Bunyaviridae RNA polymerases (L-protein) have an N-
15 terminal, influenza-like endonuclease domain, essential for viral cap-dependent transcription. PLoS
16 Pathog., v.6, n.9, Sep, p. e1001101. 2010.
- 17 ROBERTS A, C. ROSSIER, *et al.* Completion of the La Crosse Virus Genome Sequence and Genetic
18 Comparisons of the L Proteins of the Bunyaviridae. Virology v.206, p.742-745. 1995.
- 19 SAEED, M. F., H. WANG, *et al.* Jatobal virus is a reassortant containing the small RNA of
20 Oropouche virus. Virus Res, v.77, n.1, Sep, p.25-30. 2001.
- 21 SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH, *et al.* Molecular cloning: a laboratory manual. 2 ed. Cold Spring
22 Harbor Laboratory Press, v.3. 1989.
- 23 SANGER, F., S. NICKLEN, *et al.* DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad
24 Sci U S A, v.74, n.12, Dec, p.5463-7. 1977.
- 25 SCHMALJOHN, C.S., S.T. NICHOL. *Bunyaviridae*. In B.N. Fields and D.M. Knipe (ed.), Fields
26 Virology, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. p. 1741-1780. 2007.

- 1 SCHMIDT N. J. Cell culture techniques for diagnostic virology. *In* E. H. Lennette and N. J.
2 Schmidt (ed.), *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*, 5th ed.
3 American Public Health Association, Washington, D.C. p. 65-139, 1979.
- 4 SHI, X., A. KOHL, *et al.* Requirement of the N-terminal region of orthobunyavirus nonstructural
5 protein NSm for virus assembly and morphogenesis. *J Virol.* N.80, p.8089–8099. 2006.
- 6 SHOPE, R.E., C.E. CAUSEY, *et al.* Itaquí virus a new member of Arthropod-borne group C. *Amer J*
7 *Trop Med Hyg*, v.11, p.283-290. 1961.
- 8 SHOPE, R. E., O. R. CAUSEY. Further studies on the serological relationships of group C arthropod-
9 borne viruses and the application of these relationships to rapid identification of types. *Am J Trop*
10 *Med Hyg*, v.11, Mar, p.283-90. 1962.
- 11 SHOPE, R. E., L. WHITMAN. Nepuyo virus, a new group C agent isolated in Trinidad and Brazil. II.
12 Serological studies. *Am J Trop Med Hyg*, v.15, n.5, Sep, p.772-4. 1966.
- 13 SHOPE, R.E.; WOODALL, J.P.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A. The epidemiology of disease
14 caused by viruses in group C and Guamá (*Bunyaviridae*) In: *The arboviruses: Epidemiology and*
15 *ecology*. T.P. Monath (ed.). Boca Raton, USA, CRC press, p. 37-52. 1988.
- 16 SHOPE, R.E. The Discovery of Arbovirus Disease. *Ann. New York Acad. of Sci.*, p.138-145. 1993.
- 17 THOMAS, D., G. BLAKQORI, *et al.* Inhibition of RNA Polymerase II Phosphorylation by a Viral
18 Interferon Antagonist. *The Journal of Biological Chemistry*, v.279, n.30, Jul, p. 31471–31477.
19 2004.
- 20 VASCONCELOS, P. F., A. P. TRAVASSOS DA ROSA, *et al.* Inadequate management of natural
21 ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of
22 arboviruses. *Cad Saude Publica*, v.17 Suppl, p.155-64. 2001.
- 23 VEGA-RÚA, A., K. ZOUACHE, *et al.* High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes*
24 *albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. *J*
25 *Virology*, v. 88, p.6294–306. 2014.
- 26 VERBRUGGEN P., M. RUF, *et al.* Interferon Antagonist NSs of La Crosse Virus Triggers a DNA
27 Damage Response-like Degradation of Transcribing RNA Polymerase II. *J. Biol. Chem.*, n.286,
28 p.3681-3692. 2011.

1 WALTER C.T., J. N. BARR. Recent advances in the molecular and cellular biology of bunyaviruses.
2 Journal of General Virology, v.92, p.2467-2484. 2011.

3 WEAVER, S. C. Vector Biology in Viral Pathogenesis. In: Nathanson, N., editor. Viral Pathogenesis.
4 Lippincott-Raven; New York, p. 329-352. 1997.

5 WEAVER, S. C., W.K. REISEN. Present and Future Arboviral Threats. Antiviral Res., v.85 (2), Feb,
6 p.328 - 45. 2010.

7 WEBER, F., R. M. ELLIOTT. Antigenic drift, antigenic shift and interferon antagonists: how
8 bunyaviruses counteract the immune system. Virus Res, v.88, n.1-2, Sep, p.129-36. 2002.

9 YANASE, T., T. KATO, *et al.* Genetic reassortment between Sathuperi and Shamonda viruses of the
10 genus Orthobunyavirus in nature: implications for their genetic relationship to Schmallenberg
11 virus. Arch. Virol., v.157, p.1611–1616. 2012.

12 ZELENA, H., J. JANUSKA, *et al.* Micromodification of virus-neutralisation assay with vital staining
13 in 96-well plate and its use in diagnostics of Tahyna virus infections. Epidemiol Mikrobiol Imunol,
14 v.57, n.3, Aug, p.106-10. 2008.

15 ZHENG, W., Y. J. TAO Genome encapsidation by orthobunyavirus nucleoproteins. PNAS, v. 110, n.
16 22, May, p. 8769 – 8770. 2013.

17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16

VIII ANEXOS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

8.1 Produção Bibliográfica

Artigo publicado em periódico

Fernanda Caetano Camini; Letícia Trindade Almeida; Carolina Silva Bernardes; Maísa Silva, Ph.D.; Maria Lúcia Pedrosa, Ph.D.; Daniela Caldeira Costa, Ph.D.; Wanderson Geraldo de Lima, Ph.D.; Carla do Amaral Pinto, M.S.C.; Paulo César Peregrino Ferreira, Ph.D.; José Carlos de Magalhães, Ph.D.; Cintia Lopes de Brito Magalhães, Ph.D. 2014- **Caraparu virus induces damage and alterations in antioxidant defenses in the liver of BALB/c mice after subcutaneous infection.** Arch Virol. v159(10):2621-32. doi: 10.1007/s00705-014-2123-2.

Resumos Publicados em anais de eventos

- 1- MOURA, C.S.S.; **PINTO, C.A.**; Magalhães, C.L.B.; ASSIS, M.T.A.; BONJARDIM, C.A.; KROON, E.G.; FERREIRA, PAULO CÉSAR PEREGRINO. **Caracterização da Sequência Genômica do fragmento L do vírus Itaquí (Orthobunyavirus).** In: IX Fórum de Microbiologia, 2013, Belo Horizonte
- 2- **PINTO, C.A.**; MOURA, C.S.S.; Magalhães, C.L.B.; ASSIS, M.T.A.; BONJARDIM, C.A.; KROON, E.G.; FERREIRA, P.C.P.. **Caracterização de uma nova sequência genômica do vírus apeu (orthobunyavirus).** In: VIII Fórum de Microbiologia Profª Maria Auxiliadora Roque de Carvalho, 2012. v. Unico. p. 30-30.
- 3- ALMEIDA, L.T.; BERNARDES, C.S.; COSTA, A.C.T.; CAMINI, F.C.; SILVA, M.; PEDROSA, M.L.; LIMA, W.G.; **PINTO, C.A.**; FERREIRA, P.C.P.; MAGALHAES, J.C.; Magalhães, C.L.B. **Avaliação do estresse oxidativo e das defesas antioxidantes em modelo murino de infecção hepática pelo vírus Caraparu.** VIII Fórum de Microbiologia, 2012. v. Unico. p. 37-38.

- 1 4- **PINTO, C.A.**; MOURA, C.S.S.; Magalhães, C.L.B.; ASSIS, M.T.A.; BONJARDIM, C.A.;
2 KROON, E.G.; FERREIRA, P.C.P. **Genomic Characterization of a novel sequence of Apeu**
3 **virus (Orthobunyavirus)**. In: XXIII Congresso Brasileiro de Virologia, 2012, Foz do Iguaçu.
4 Virus Reviews and Research, 2012. v. 17. p. 24-24.
5
- 6 5- ALMEIDA, L.T.; BERNARDES, C.S.; COSTA, A.C.T.; CAMINI, F.C.; SILVA, M.; SOUZA,
7 M.O.; PEDROSA, M.L.; LIMA, W.G.; **PINTO, C.A.**; FERREIRA, P.C.P.; MAGALHAES,
8 J.C.; Magalhães, C.L.B. **Evaluation of Oxidative stress in murine model of hepatic**
9 **infection by Caraparu virus (Bunyaviridae)**. In: XXIII Congresso Brasileiro de Virologia,
10 2012, Foz do Iguaçu. Virus Reviews and Research, 2012. v. 17. p. 24-24.
11
- 12 6- BERNARDES, C.S.; ALMEIDA, L.T.; COSTA, A.C.T.; CAMINI, F.C.; SILVA, M.;
13 ROSSONI JUNIOR, J.V.; PEDROSA, M.L.; LIMA, W.G.; **PINTO, C.A.**; FERREIRA, P.C.P.;
14 MAGALHAES, J.C.; Magalhães, C.L.B. **Infection by Caraparu virus (Bunyaviridae)**
15 **modulates activity and gene expression of antioxidants enzymes in mice liver**. In: XXIII
16 Congresso Brasileiro de Virologia, 2012, Foz do Iguaçu. Virus Reviews and Research, 2012. v.
17 17. p. 24-24.
18
- 19 7- COSTA, A.C.T.; ALMEIDA, L.T.; BERNARDES, C.S.; CAMINI, F.C.; SILVA, M.;
20 PEDROSA, M.L.; LIMA, W.G.; **PINTO, C.A.**; FERREIRA, P.C.P.; MAGALHAES, J.C.;
21 Magalhães, C.L.B. **Characterization of Caraparu virus (Bunyaviridae) liver infection in**
22 **the Balb/C mice**. In: XXIII Congresso Brasileiro de Virologia, 2012, Foz do Iguaçu. Virus
23 Reviews and Research, 2012. v. 17. p. 90-90.

1

2 **8.2 Apresentação de Trabalhos**

3

4 **1- PINTO, C.A.; MOURA, C.S.S.; Magalhães, C.L.B. ; ASSIS, M.T.A.; BONJARDIM, C.A.;**
5 **KROON, E.G.; FERREIRA, P.C.P. CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA SEQUÊNCIA**
6 **GENÔMICA DO VÍRUS APEU (ORTHOBUNYAVIRUS).** In: VIII Fórum de
7 Microbiologia Profª Maria Auxiliadora Roque de Carvalho, 2012. (Apresentação de Pôster).

8 **2- PINTO, C.A.; MOURA, C.S.S.; Magalhães, C.L.B.; ASSIS, M.T.A.; BONJARDIM, C.A.;**
9 **KROON, E.G.; FERREIRA, P.C.P. Genomic Characterization of a novel sequence of Apeu**
10 **virus (Orthobunyavirus).** In: XXIII Congresso Brasileiro de Virologia, 2012, Foz do Iguaçu,
11 2012. (Apresentação de Pôster).

12 **8.3 Eventos**

13 1- VIII Fórum de Microbiologia Profª Maria Auxiliadora Roque de Carvalho, Belo Horizonte,
14 2012.

15 2- XXIII Congresso Brasileiro de Virologia, Foz do Iguaçu 2012.