

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Veterinária

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Bárbara Chrispin Longo

**ESTUDO MOLECULAR E ANÁLISE FILOGENÉTICA DO SEGMENTO-7 DO
VÍRUS DA LÍNGUA AZUL (*ORBIVIRUS CAERULINGUAE*) ISOLADOS DE CERVÍDEOS
DA ESPÉCIE *MAZAMA NANA***

Belo Horizonte

2024

Bárbara Chrispin Longo

**ESTUDO MOLECULAR E ANÁLISE FILOGENÉTICA DO SEGMENTO-7 DO
VÍRUS DA LÍNGUA AZUL (*ORBIVIRUS CAERULINGUAE*) ISOLADOS DE CERVÍDEOS
DA ESPÉCIE *MAZAMA NANA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Zélia Inês Portela Lobato

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes

Belo Horizonte

2024

L856e Longo, Bárbara Chrispin, 1996-
Estudo molecular e análise filogenética do segmento – 7 do vírus da língua azul (*Orbivirus caerulinguae*) isolados de cervídeos da espécie *Mazama nana*/ Bárbara Chrispin Longo.- 2024.
88 f: il.

Orientadora: Zélia Inês Portela Lobato
Coorientadora: Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes
Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra.
Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva.
Bibliografia f.76 a 88.

1. Cervídeo - Doenças - Teses – 2. Vírus da Língua Azul – Teses – 3. Doenças transmissíveis em animais - Teses – I. Lobato, Zélia Inês Portela- II. Guedes, Maria Isabel Maldonado Coelho – III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – IV. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

BÁRBARA CHRISPIN LONGO

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós Graduação em **CIÊNCIA ANIMAL**, como requisito para obtenção do grau de **MESTRE** em **CIÊNCIA ANIMAL**, área de concentração **Medicina Veterinária Preventiva**. Defesa da dissertação intitulada: "**Estudo molecular e análise filogenética do Segmento-7 do vírus da língua azul (*Orbivirus caerulinguae*) isolados de cervídeos da espécie *Mazama nana*.**"

Aprovado(a) em 16 de dezembro de 2024, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Zelia Ines Portela Lobato - Orientador(a)

Dr.(a). Erica Azevedo Costa

Dr.(a). Ana Carolina Diniz Matos



Documento assinado eletronicamente por **Zelia Ines Portela Lobato, Membro**, em 16/12/2024, às 12:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Erica Azevedo Costa, Professora do Magistério Superior**, em 16/12/2024, às 17:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Carolina Diniz Matos, Usuário Externo**, em 16/12/2024, às 23:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3819917** e o código CRC **031FE371**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, minha família, amigos e namorado que me auxiliaram nesta caminhada.

Ao laboratório de Pesquisa em Virologia Animal e todos os colegas de trabalho.

Aos órgãos de fomento apoio financeiro que permitiram a realização do experimento.

À Itaipu Binacional e toda equipe do Refúgio Biológico Bela Vista.

Aos animais e a todos que não foram aqui mencionados, mas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Muito obrigada!

RESUMO

A família Cervidae, composta por 56 espécies globalmente distribuídas, inclui 6 gêneros de cervídeos na América Latina, representados por 17 espécies, sendo 7 delas no Brasil. Entre essas, *Mazama nana* e *Blastocerus dichotomus*, que são espécies vulneráveis, em risco de extinção devido a caça, destruição do habitat e doenças infecciosas e não infecciosas. A redução da população destes cervídeos pode ser atribuída a fatores como doenças virais, especialmente as doenças hemorrágicas, como as causadas por vírus da família Sedoreoviridae, como o Orbivirus caerulinguae (Vírus da Língua Azul - VLA) e Orbivirus ruminantium (Vírus da doença epizootica hemorrágica VDEH), que são transmitidos por dípteros do gênero Culicoides.

Na ITAIPU Binacional, há o Refúgio Biológico Bela Vista (RBV) que possui um papel fundamental na conservação de animais silvestres, entre eles, cervídeos nativos brasileiros como *Mazama nana* e *Blastocerus dichotomus*. Neste local, diferentes sorotipos do VLA têm sido identificados, com casos clínicos caracterizados por quadros agudos e fatais. O presente estudo busca avanços no entendimento da epidemiologia desses vírus no RBV, com foco na análise molecular do segmento 7 (Seg-7) do Orbivirus caerulinguae, que codifica a proteína estrutural VP7, considerada a mais imunodominante e que está correlacionada a multiplicação viral no vetor. A participação dessa proteína na multiplicação viral no vetor, tem correlação com a origem geográfica dos vírus, uma vez que a distribuição das espécies de Culicoides spp é geograficamente diversa. Dessa forma, a análise do Seg-7 pode nos auxiliar a traçar possíveis rotas de introdução e manutenção do VLA no RBV - ITAIPU, bem como no Brasil.

Palavras-chave: Doença hemorrágica; cervídeos, Vírus da Língua Azul; Vírus da doença epizootica hemorrágica; Sequenciamento Sanger; Origem geográfica.

ABSTRACT

The Cervidae family, comprising 56 globally distributed species, includes six genera of deer in Latin America, represented by 17 species, seven of which are found in Brazil. Among these, *Mazama nana* and *Blastocerus dichotomus* are classified as vulnerable species, facing extinction risks due to hunting, habitat destruction, and infectious and non-infectious diseases. The population decline of these deer can be attributed to factors such as viral diseases, particularly hemorrhagic diseases caused by viruses from the *Sedoreoviridae* family, such as *Orbivirus caerulinguae* (Bluetongue Virus - BTV) and *Orbivirus ruminantium* (Epizootic Hemorrhagic Disease Virus - EHDV), which are transmitted by *Culicoides* midges.

At ITAIPU Binacional, the Bela Vista Biological Refuge (RBV) plays a fundamental role in the conservation of native Brazilian wildlife, including *Mazama nana* and *Blastocerus dichotomus*. In this location, different BTV serotypes have been identified, with clinical cases characterized by acute and fatal conditions. This study aims to advance the understanding of the epidemiology of these viruses at RBV, focusing on the molecular analysis of segment 7 (Seg-7) of *Orbivirus caerulinguae*, which encodes the structural protein VP7. This protein is considered the most immunodominant and is correlated with viral replication in the vector. The role of this protein in viral replication within the vector is associated with the geographic origin of the virus, as the distribution of *Culicoides* species varies geographically. Thus, Seg-7 analysis can help trace possible routes of introduction and maintenance of BTV at RBV - ITAIPU, as well as in Brazil.

Keywords: Hemorrhagic disease; deer; Bluetongue Virus; Epizootic Hemorrhagic Disease Virus; Sanger sequencing; Geographic origin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação atual do antigo Vírus da Língua Azul.	16
Figura 2. Classificação atual do antigo Vírus da Doença Epizoótica Hemorrágica.	16
Figura 3. Desenho esquemático das proteínas virais do Orbivirus caerulinguae.	17
Figura 4. O Diagrama ilustra a proteção cruzada in vitro dos sorotipos virais do Vírus da Língua Azul,	18
Figura 5. Desenho esquemático da replicação intracelular do Vírus da Língua Azul.....	25
Figura 6. Distribuição geográfica do veado Mazama nana.	31
Figura 7. Mapa mostrando a localização das áreas protegidas amostradas e regiões da Mata Atlântica de acordo com a classificação da vegetação	32
Figura 8. Mapa de distribuição do cervo Mazama nana.....	33
Figura 9. Fluxograma de trabalho	44
Figura 10. Desenhos esquemáticos da Construção dos primers.	51
Figura 11. Multiplicação viral em célula BHK-21	53
Figura 12. Extração do dsRNA dos vírus isolados em BHK-21	54
Figura 13. Gel de agarose revelando RT-PCR dos isolados de VLA sorotipos 3,14,18 Y e 22 com alvo para a região codificadora do Seg 7 do vírus.....	55
Figura 14. Gel de agarose revelando RT-PCR do isolado VLA-24 com alvo para a região codificadora do Seg 7 do vírus.	56
Figura 15. Árvore filogenética construída pelo método “neighbor joining (NJ)” com “bootstrap” de 1000 em MEGA6, baseada na sequência parcial do Seg-7 (VP7).....	59
Figura 16. Print de tela das sequências de VLA argentinos disponíveis no VLA Glue	60
Figura 17. Print de tela das sequências sul-americanas disponíveis no VLA glue.....	61
Figura 18. Árvore filogenética construída pelo método de Máxima Verossimilhança	65
Figura 19. “Cluster” de alinhamento do VLA-3 em árvore filogenética construída pelo método de Máxima Verossimilhança baseada na comparação entre as sequências completas da região codificadora do Seg-7 (VP7) de amostras brasileiras e amostras disponíveis no “VLA GLUE”	66
Figura 20. “Cluster” de alinhamento dos VLA de sorotipos 18, 22 e 24 em árvore filogenética construída pelo método de Máxima Verossimilhança, baseada na comparação entre as sequências completas da região codificadora do Seg-7 (VP7) de amostras brasileiras e amostras disponíveis no “VLA GLUE”	67

Figura 21. “Cluster” de alinhamento dos isolados VLA-Y e VLA-19, em árvore filogenética construída pelo método de Máxima Verossimilhança, baseada na comparação entre as sequências completas da região codificadora do Seg-7 (VP7) de amostras brasileiras e amostras disponíveis no “VLA GLUE” 68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Grau Celsius

μL - Microlitro

μM - Micromolar

BHK-21 - Baby Hamster Kidney (células de rim de hamster).

BTBVLA - Bluetongue Virus (Vírus da Língua Azul).

CDS - Coding DNA Sequence (sequência de DNA codificante).

DEH - Doença Epizootica Hemorrágica.

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos fosfatados

dsRNA - RNA de fita dupla

et al. - E outros

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus).

LA - Doença da língua azul.

M - Molar

MEGA6 - Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Software para análise filogenética).

min - Minuto

mL - Mililitro

NCBI - National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Informação em Biotecnologia).

ng - Nanograma

pb - Pares de bases

PBS - Tampão fosfato-salino

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pH - Potencial hidrogeniônico

RCF - Força centrífuga relativa

RNA - Ácido ribonucleico

RPM - Rotações por minuto

RT-PCR - Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa).

RT-qPCR - Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real

s - Segundo

Seg- Segmento do genoma do vírus da Língua Azul.

ssDNA - DNA de fita simples

ssRNA - RNA de fita simples

TAE - Tris-Acetato-EDTA

T_m - Temperatura de desnaturação

V - Volts

VDEH - Vírus da Doença Epizoótica Hemorrágica.

VLA - Vírus da Língua Azul.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Vírus Orbivirus caerulinguae	16
2.1.1	Classificação taxonômica.....	16
2.1.2	Estrutura Viral	16
2.1.3	Replicação viral	23
2.2	Transmissão	25
2.3	Histórico e Epidemiologia.....	27
2.4	Principais espécies acometidas por VLA.....	29
2.4.1	Ruminantes silvestres: cervídeos	29
2.4.2	Ruminantes Domésticos.....	35
2.5	Aspectos clínicos	39
2.6	Diagnóstico	40
2.7	Tratamento, prevenção e controle.....	41
3	OBJETIVOS	43
3.1	OBJETIVOS GERAIS:	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	43
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1	Fluxograma de trabalho	44
4.2	Aspectos éticos	45
4.3	LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS:.....	45
4.4	Amostras virais:.....	45
4.4.1	Origem das amostras virais:.....	45
4.5	Preparo das amostras.....	46
4.5.1	Cultivo celular para realização dos testes laboratoriais:	46
4.5.2	Extração Viral	47
4.5.3	PCR do Seg-7.....	47
4.6	Purificação do cDNA , preparação e Sequenciamento Sanger.....	48
4.7	Bancos de dados utilizados	49
4.8	Análise primária das sequências obtidas: Montagem e análise filogenética do Sequenciamento Parcial	49
4.9	Sequenciamento completo dos vírus	50

4.10	Montagem e análise filogenética do Seg-7 completo.....	52
5	RESULTADO E DISCUSSÃO	53
5.1	Amplificação viral	53
5.2	Extração Viral.....	53
5.3	RT-PCR	54
5.4	Sequenciamento.....	57
5.4.1	Sequenciamento parcial	57
5.4.2	Sequenciamento completo	61
6	CONCLUSÃO.....	75
	REFERÊNCIAS	76

1 INTRODUÇÃO

A família Cervidae é composta por 56 espécies mundialmente distribuídas (IUCN, 2024). Na América Latina há registros de 6 gêneros de cervídeos: *Mazama* sp., *Pudu* sp., *Hippocamelus* sp., *Odocoileus* sp., *Ozotoceros* sp. e *Blastocerus* sp. Esses 6 gêneros são representados por 17 espécies de cervos, também conhecidos como cervos neotropicais. As espécies presentes no Brasil são: *Mazama nana*; *Mazama bororo*; *Mazama americana*. *Mazama nemorivaga*; *Odocoileus virginianus*; *Ozotoceros bezoarticus* e *Blastocerus dichotomus* (IUCN, 2024).

Os cervos desempenham um papel fundamental nos processos que mantêm a estrutura e composição da comunidade do ecossistema. Entretanto, várias das espécies são consideradas em risco de extinção (Peres et al., 2021). *Mazama nana* e *Blastocerus dichotomus* são espécies nativas brasileiras consideradas vulneráveis à extinção pela União Internacional para a Conservação da Natureza – IUCN e integram as espécies contempladas no Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Ungulados do Ministério do Meio Ambiente – MMA (Duarte, 2015; Duarte, 2016; Brasil, 2019).

A redução da população de cervos pode estar relacionada à caça e a destruição do habitat, juntamente com as doenças infecciosas (bacterianas, virais, doenças parasitárias e priônicas) e doenças não infecciosas (doenças tóxicas, nutricionais, distúrbios metabólicos e neoplasia) (Dinkines et al., 1992; Nettles et al., 2002; Vreeland, Diefenbach; Wallingford, 2004; Mawhinney et al., 2010).

Os estudos de monitoramento da saúde em cervos sul-americanos concentraram-se principalmente na exposição a vários agentes infecciosos, tanto em veados livres como em cativeiro, mas estudos clínicos e de patogênese também estão disponíveis (Driemeier et al., 2002; Uhart et al., 2003). Entre elas, doenças virais hemorrágicas têm sido um desafio para o manejo e conservação de cervídeos nativos brasileiros em unidades de conservação (Baldini et al., 2018).

As principais doenças hemorrágicas envolvendo cervídeos no Brasil são causadas por vírus da família *Sedoreoviridae* e do gênero *Orbivirus*: *Orbivirus caerulilinguae* (antigamente conhecido como vírus da Língua azul - VLA) e *Orbivirus ruminantium* (antigamente conhecido como vírus da Doença epizootica hemorrágica - VDEH) (Baldini et al., 2018); ICTV, 2024).

Esses agentes virais são transmitidos por dípteros do gênero *Culicoides* e causam doença clínica indistinguível, geralmente fatal para espécies de cervídeos, configurando

entraves nos trabalhos de manejo e conservação de cervídeos nativos brasileiros em instituições de conservação como Refúgio Bela Vista (Baldini et al, 2018).

O Refúgio Bela Vista pertencente à Usina Hidrelétrica ITAIPU Binacional fundado em 1984, é referência em conservação de diversas espécies. Integra a Reserva da Biosfera da Mata Atlântica (RBMA) e o Corredor de Biodiversidade do Rio Paraná, conectando os Parques Nacionais do Iguaçu e de Ilha Grande, assim como conecta áreas protegidas da região. Há ainda o Zoológico Roberto Ribas Lange que é associado ao RBV- ITAIPU e abriga diversos animais de diferentes espécies oriundos de seu próprio criadouro, de outros zoológicos ou de órgãos ambientais envolvidos com resgate de fauna.

Embora existam relatos que sugerem a circulação do Orbivirus caerulinguae desde 1990 no Refúgio Bela Vista (Barbanti e Reis, 2012), somente a partir de 2015 foi possível o diagnóstico molecular com caracterização dos sorotipos virais. Entre 2015 e 2021 foram identificados os sorotipos 3, 12, 14, 18, 19, 22 e 24 do Orbivirus caerulinguae (Baldini et al., 2018; Dados não publicados).

Os primeiros casos relatados no local apresentavam animais que vieram a óbito de forma aguda após apresentarem edema submandibular e sublingual, anorexia, apatia e prostração, fezes hemorrágicas e pastosas, hemorragia em esclera (Baldini et al., 2018). Na necropsia foram observados achados compatíveis com doença hemorrágica, tais como: acúmulo de sangue em cavidade abdominal e hemotórax; congestão segmentar em intestinos, petéquias em pericárdio, rins e pulmões congestos. Ainda, havia congestão e aumento de volume em baço e fígado.

O cenário é um desafio para a manutenção dessas espécies em cativeiro, haja visto que não existem tratamentos específicos para essa enfermidade. Dessa forma, para controlar a doença em regiões endêmicas e epidêmicas apenas restam a adoção de medidas de controle dos vetores (i.e., adoção do uso de larvicidas e inseticidas; instalação de telas nos recintos) e imunoprofilaxia por meio de vacinação (Mcvey and McLachlan, 2015).

O genoma do vírus Orbivirus caerulinguae consiste em 10 segmentos de dsRNA que codificam sete proteínas estruturais e cinco não estruturais. Apresenta grande variabilidade genética e antigênica, com pelo menos 36 prováveis sorotipos já relatados e com ampla distribuição em todo o mundo.

O segmento 7 (Seg-7) é o terceiro segmento mais variável do genoma do vírus e codifica a proteína estrutural VP7, que é considerada o antígeno do VLA mais imunodominante. As análises filogenéticas de Seg-7 foram correlacionadas às origens geográficas e às populações de vetores para diferentes estirpes virais. Isso se deve ao fato

de que as espécies de *Culicoides* spp apresentarem ampla e variada distribuição geográfica. A análise filogenética do Seg-7 de VLA será realizada com o objetivo de contribuir com informações sobre a epidemiologia molecular dos isolados virais que acometeram cervídeos nativos de cativeiro, levando-os a óbito com quadro de doença hemorrágica.

Informações acerca das características moleculares dos vírus que circulam e infectam, cervídeos na América latina e Caribe são escassas. Até o momento, há apenas 27 sequências de Seg-7 completas do VLA identificadas na América latina depositadas no Genbank e organizadas no BTV-GLUE.

Dessa forma, em uma tentativa de melhor compreender a epidemiologia e a composição dos vírus que vêm causando doença no Refúgio de ITAIPU em espécies de cervídeos nativos ameaçadas de extinção (*Mazama nana* e *Blastocerus dichotomus*), comparamos o Seg-7 de de isolados de diferentes sorotipos do VLA que foram identificados no Refúgio de ITAIPU com isolados disponíveis em plataformas públicas de dados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Vírus *Orbivirus caerulinguae*

2.1.1 Classificação taxonômica

O vírus *Orbivirus caerulinguae* e o *Orbivirus ruminantium*, conhecidos respectivamente como vírus da Língua Azul (VLA) e vírus da doença epizootica hemorrágica (VDEH) são membros da Ordem *Reovirales*, Família *Sedoreoviridae* e gênero *Orbivirus*, (WALKER et al.; 2022; ICTV, 2024) (Figuras 1 e 2).

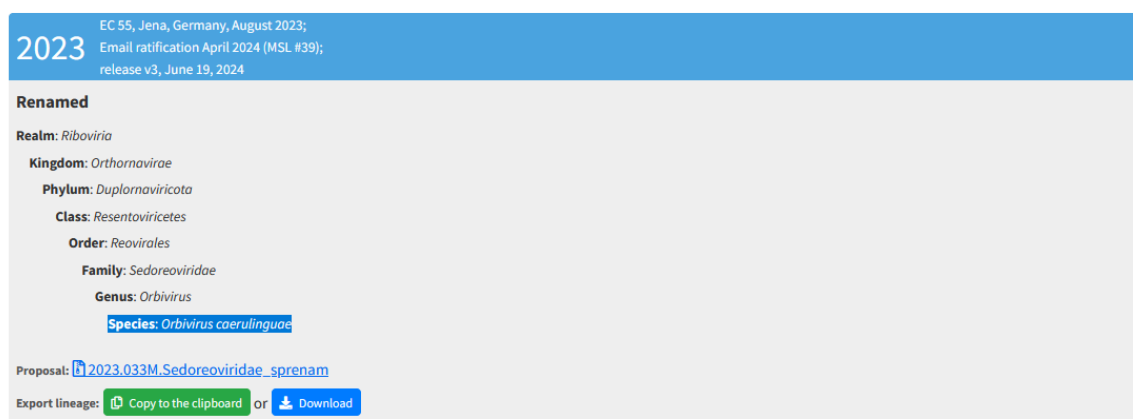


Figura 1. Classificação atual do antigo Vírus da Língua Azul (ICTV, 2024).

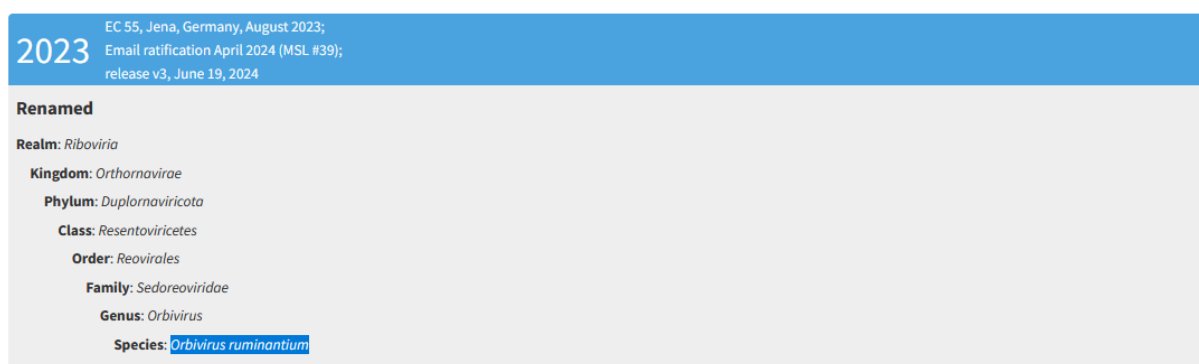


Figura 2. Classificação atual do antigo Vírus da Doença Epizootica Hemorrágica (ICTV, 2024).

2.1.2 Estrutura Viral

Os vírus do gênero *Orbivirus* apresentam conformação icosaédrica constituída por três camadas de proteínas (Holmes et al., 1998). Esses vírus não possuem envelope viral

e apresentam material genético caracterizado por dez segmentos de RNA fita dupla (dsRNA) podendo apresentar ao total um genoma com cerca de 19200 pares de base (Forzan et al., 2004; Mertens et al., 1984; Genus: Orbivirus | ICTV, 2024). O material genético do VLA é constituído por dez segmentos de dsRNA (Mertens et al., 1984), responsáveis pela codificação de sete proteínas estruturais (VP1-VP7) e cinco não-estruturais (NS1-NS5), ilustrados em Figura 3, (Mertens et al., 2009; Rodríguez-Martín et al., 2021).

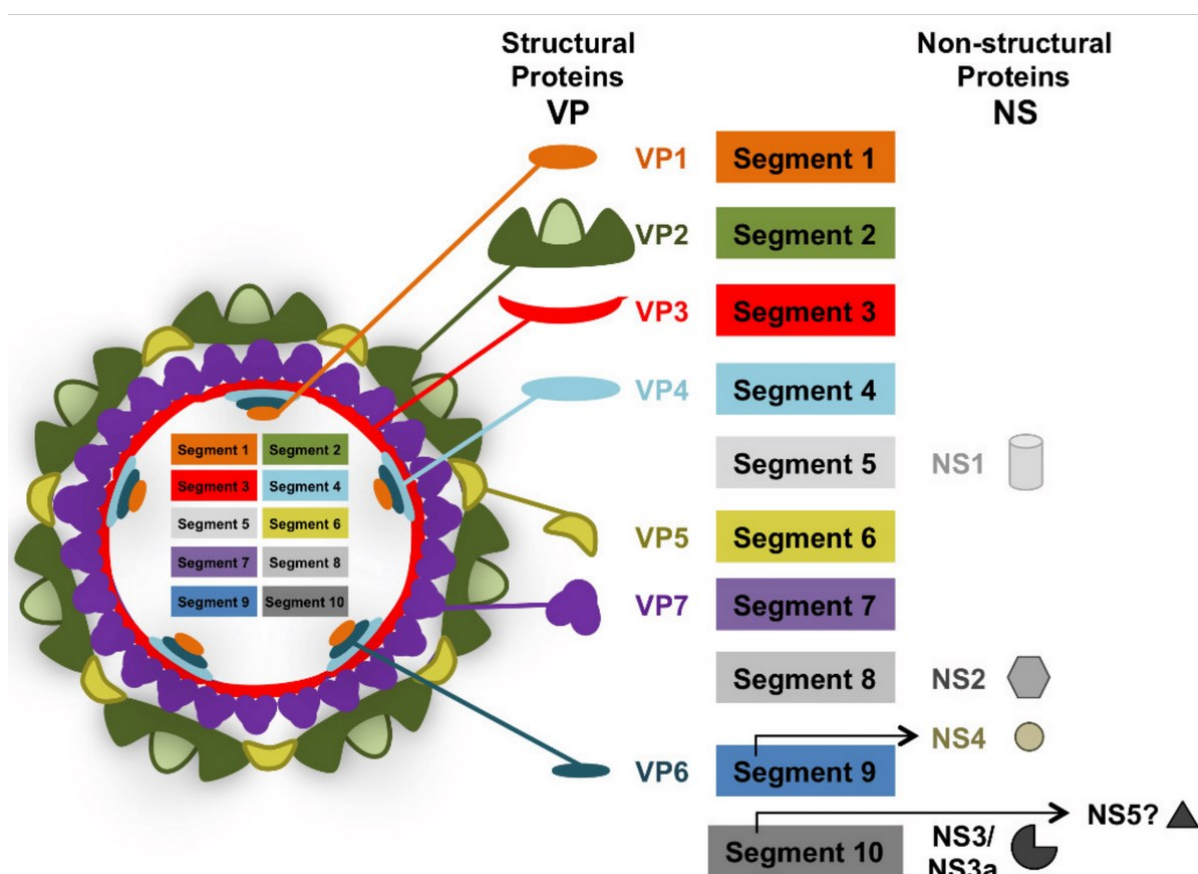


Figura 3. Desenho esquemático das proteínas virais do Orbivirus caerulinguac. (Rodríguez-Martín et al., 2021)

A camada mais externa da partícula viral é composta pelas proteínas VP2 e VP5, que são codificadas pelos segmentos 2 e 6, respectivamente. Essas proteínas apresentam maior variabilidade, principalmente por estarem estruturalmente mais externas, e diretamente envolvidas nas etapas iniciais da adsorção viral e por isso sofrerem grande pressão do sistema imunológico (Maan et al., 2009). Dessa forma, pressões evolutivas continuamente atuam levando a adaptações para a sobrevivência e longevidade dos vírus

(Mertens et al., 2009). Estas proteínas são também responsáveis pela indução da produção de anticorpos neutralizantes e assim direcionam a classificação em sorotipos virais (Maan et al., 2009; Mertens et al., 1989; Mertens et al., 2009).

A proteína VP2 é a proteína responsável pela entrada do vírus na célula hospedeira e pela atividade de neutralização viral, sendo o principal antígeno responsável pela especificidade de sorotipo (Rassan & Roy, 1999). A proteção imunológica entre os diferentes sorotipos é limitada, como ilustrado no diagrama da figura 4, o que permite a classificação em sorogrupos, ou seja, sorotipos que apresentam alguma reação cruzada entre eles.

Com menor variabilidade, localizados mais internamente ao nucleocapsídeo, cinco proteínas estruturais (VP1, VP3, VP4, VP6 e VP7) e no subnúcleo estão presentes as proteínas VP1, VP4 e VP6 - Figura 3 (Mertens et al., 2009).

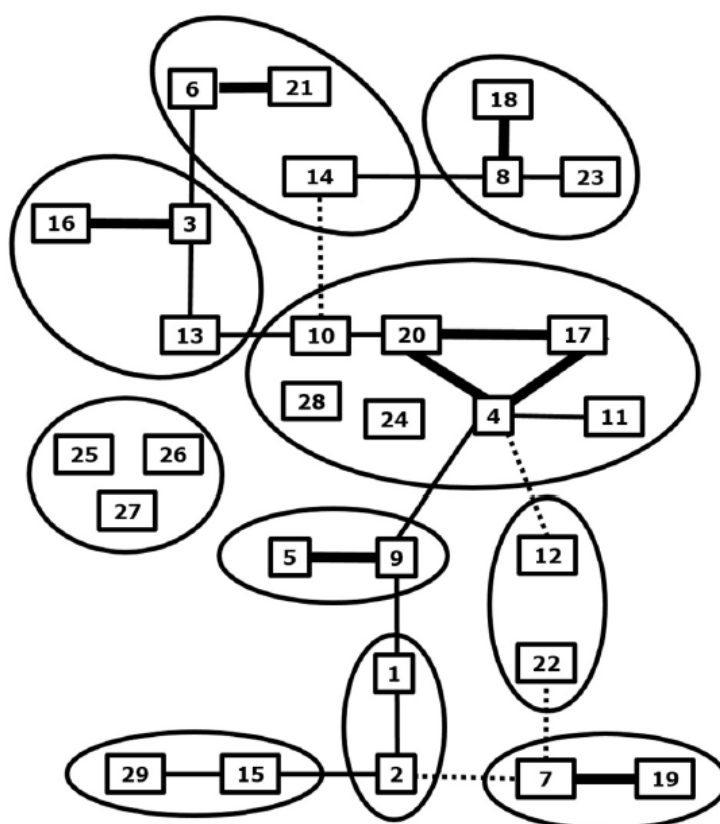


Figura 4. O Diagrama ilustra a proteção cruzada in vitro dos sorotipos virais do Vírus da Língua Azul, representados por números. As linhas tracejadas indicam baixa proteção cruzada, enquanto as linhas

inteiriças representam moderada proteção cruzada e as linhas em negrito indicam alta proteção cruzada (Rijn, 2019).

Atualmente já foram relatados 36 possíveis sorotipos virais de VLA, sendo 29 sorotipos reconhecidos pela OIE e 7 ainda em vias de reconhecimento pelos órgãos oficiais(OIE, 2016; Ries et al., 2021). Dificuldades na classificação em sorotipos de isolados que são distintos aos 29 sorotipos reconhecidos pela Organização Mundial de Saúde Animal - OIE, tem feito com que haja um crescimento constante do número de sorotipos relatados (Ries et al., 2020).

Esse aparecimento constante de novos sorotipos ocorre em virtude do fato de que quando diferentes vírus infectam uma mesma célula, podem ocorrer rearranjos genéticos em virtude da natureza do RNA segmentado. Dessa forma, a longo prazo pode haver a emergência de sorotipos novos, que associado aos eventos de mutação, colaboram para a diversidade genética de ambos os vírus (Pritchard et al., 2004).

Embora a classificação em sorogrupos de VLA seja conhecida há muito tempo, a literatura não apresenta essa classificação para os sorotipos emergentes. Dessa forma, apenas são conhecidas as reatividades cruzadas entre os sorotipos 1 a 24 (Ries, et al, 2021).

A proteína VP1, codificada pelo Seg 1, é uma das proteínas estruturais mais conservadas do VLA. A VP1 é responsável pela função enzimática de RNA polimerase e está localizada dentro de um complexo central subviral, responsável pela transcrição do genoma viral. A atuação da VP1 polimerase permite a síntese de mRNA quando é acionada e a liberação do mesmo ocorre por meio de poros na camada de VP3 deixando a partícula do núcleo através do centro espaço nos anéis pentaméricos dos trímeros VP7 (Noad & Roy, 2009).

A VP3 forma o capsídeo viral interno ou subnúcleo. É codificada pelo Seg-3 e sua montagem pode ditar a organização dos outros componentes estruturais da partícula que estão ligados ou interagem com ele, tanto interna quanto externamente (Noad & Roy, 2009). Existem semelhanças notáveis com o invólucro do capsídeo mais interno e proteína interna do capsídeo de muitos outros vírus dsRNA (Bamford et al., 2005; Mertens, 2004b). A arquitetura do subnúcleo VLA e até mesmo a forma geral da proteína VP3, sugere que esses vírus dsRNA evoluíram de um ancestral comum que originalmente desenvolveu um mecanismo simples e fino para a montagem de uma camada interna do capsídeo, que agora representa um passo importante na via de montagem do vírion.

A VP4, codificada pelo Seg-4, atua como enzima que estabiliza mRNAs eucarióticos por meio da estrutura 50 'Cap' antes de serem liberados no citoplasma da célula hospedeira. Está envolvida na ligação aos ribossomos, promovendo a tradução eficiente (revisado por Scheper & Proud, 2002).

A VP6 é codificada pelo Seg-9 do genoma e tem como função ser a proteína central secundária (o núcleo associado à helicase do vírus). É uma proteína bastante conservada nos sorogrupos do VLA (Maan et al., 2008). Por isso se tornou alvo para o desenvolvimento de ensaio de RT-PCR em tempo real pan-VLA, uma vez que fornece um alvo duplo para a detecção e identificação de VLA em combinação com os ensaios para o Seg 1 (Shaw et al., 2007). Tal abordagem ajudou a contornar problemas potenciais que poderiam ser causados por mutação no genoma do vírus ou anelamento de primers (Maan et al, 2015).

Embora a VP7 esteja localizada mais internamente na estrutura viral, é a proteína mais imunodominante e a terceira mais variável (Mann et al., 2009). É usada principalmente para testes diagnósticos sorológicos, como a imunodifusão em Gel de Agarose - IDGA. A vantagem do uso da VP7 nesses testes está correlacionada ao fato de não apresentar reação cruzada com membros de outras espécies de orbivirus, embora exista certa reatividade cruzada entre as estirpes de VLA (independentemente do sorotipo ou topotipo).

O Seg-7, que codifica a VP7, também permite a classificação por georreferência, uma vez que estirpes virais que são originárias da porção ocidental do globo terrestre tendem a se agrupar em análises filogenéticas próximas a outras amostras oriundas da mesma região, bem como o contrário também é verdadeiro para espécimes da porção oriental que se agrupam entre si (Maan et al., 2009).

A proteína NS1, codificada pelo Seg-5, tem como função a regulação da síntese de proteínas virais a partir da formação de túbulos durante a infecção. É altamente conservada entre os sorotipos virais e por isso é alvo no desenvolvimento de estratégias terapêuticas de intervenção antiviral mesmo que não possua atividade neutralizante. Ainda, é sintetizada em grandes quantidades (Huismans e Els, 1979).

A proteína NS2, é uma proteína não estrutural fosforilada, que quando expressa isoladamente, possui a capacidade intrínseca de formar corpos de inclusão sem membrana (Roy et al., 2003). Diversos estudos relataram que a NS2 é responsável por interagir e recrutar cada uma das proteínas recém-sintetizadas do VLA, como VP1, VP3, VP4 e VP6. Além disso, ela também é responsável pelo recrutamento de transcritos ssRNA virais (Thomas & Roy, 1990).

A proteína NS3 é codificada pelo Seg 10 do genoma viral e expressa como duas isoformas distintas, NS3 e NS3A (Roy et al., 1990). São glicoproteínas e desempenham um papel fundamental na liberação viral. Esse processo pode ocorrer através de duas vias: a atividade viroporina (Han & Harty, 2004) ou por brotamento viral. No brotamento viral, ocorrem interações entre NS3 e as proteínas VP2/VP5 presentes no capsídeo externo (Bhattacharya & Roy, 2008), bem como interações com proteínas celulares que fazem parte da via endossomal de classificação essencial para o transporte viral. É um fator de virulência e determinante da patogênese. A importância dessas funções foi confirmada por outros estudos *in vivo* usando amostras do VLA com mutações específicas em NS3/NS3A (Janowicz et al., 2015; Feenstra et al., 2014; Ftaich et al., 2015). Essas pesquisas adicionais destacam a relevância da proteína NS3 na patogenicidade do VLA e sua contribuição para a disseminação viral e virulência em hospedeiros.

Essa proteína, também foi associada como um antagonista da resposta de interferon (Rojas et al., 2021). Função compartilhada com a proteína não estrutural NS4, que é codificada por uma ORF alternativa no Seg-9.

O Seg-10 também possui uma ORF alternativa identificada que pode estar relacionada à codificação de uma proteína não estrutural adicional NS5 (Stewart et al., 2015), entretanto, sua contribuição na infecção viral ainda seja desconhecida.

A classificação em topótipos de VLA pode representar as discontinuidades evolutivas desde a antiguidade em relação às separações geográficas, que quando ocorrem por um longo período, podem resultar em vírus com acúmulo de mudanças neutras nas sequências de nucleotídeos. Em contrapartida, todo o espectro de diversidade genética em genes individuais de VLA já existe nas cepas de vírus que ocorrem na região endêmica da África. Cada introdução em uma nova área contou com um evento fundador seguido de uma expansão viral com o acúmulo lento e neutro de substituições, o que é consistente com o mínimo da variação relatada até o momento entre o Seg-10 de cepas de campo de VLA isoladas durante a epidemia entre os anos 1990 e 2000 na Bacia do Mediterrâneo (Nikolakaki e outros, 2005; Breard e outros, 2007). Por isso, mecanismos como deriva genética e efeitos fundadores (Bonneau et al., 2001), em combinação com seleção, são provavelmente os fatores mais importantes para determinar a evolução molecular da proteína NS3 de cepas de campo de VLA dentro de cada ecossistema global (BALASURIYA et al., 2008)

As funções dessas proteínas estão resumidas no quadro 1 a seguir.

Quadro 1. Resumo das funções das proteínas virais do Vírus da Língua Azul

Segmento	Proteína codificada	Localização	Função
Seg-1	VP1	Núcleo interno	RNA Polimerase
Seg-2	VP2	Capsídeo Externo	Adsorção; Determinação do Sorotipo
Seg-3	VP3	Subnúcleo	Sustentação da VP7
Seg-4	VP4	Núcleo Interno	Função enzimática de guanililtransferase e metiltransferase
Seg-5	NS1	Não-estrutural	Formação dos túbulos
Seg-6	VP5	Capsídeo Externo	Penetração viral
Seg-7	VP7	Subnúcleo	Determinação dos sorogrupos; Correlação com origem geográfica e multiplicação do vetor;
Seg-8	NS2	Não-estrutural	Formação dos corpúsculos de inclusão e ligação de RNA de fita simples;
Seg-9	VP6 NS4	Núcleo interno	Ligação à ssRNA, dsRNA, helicase e ATPse Antagonista na resposta de interferon

Seg-10	NS3	Não-estrutural	Auxílio no egresso das partículas víricas Antagonista na resposta de interferon
	NS5		Importância ainda desconhecida

Adaptado Alfieri, 2017, Ross- Smith et al, 2009 e Rojas et al., 2021.

2.1.3 Replicação viral

O VLA é o protótipo de estudo do gênero dos Orbivirus. Dessa forma, acredita-se que esse gênero apresenta a proteína VP2 como contato inicial à célula do hospedeiro mamífero, já que é a proteína do capsídeo mais externa e proeminente. A literatura sugere que a multiplicação em células de inseto acontecem a partir da ligação da VP7, atuando de forma semelhante ao que a VP2 performa para os mamíferos (MERTENS, 2009).

Logo, em mamíferos suscetíveis à infecção por orbivírus, a VP2 faz a mediação da ligação do vírus à célula. Então o vírus é internalizado em vesículas revestidas por clatrina por endocitose mediada por receptor. A posterior acidificação no interior dos endossomas é crucial para a liberação do núcleo da partícula viral no citoplasma da célula hospedeira em que a VP5 faz a mediação desse processo de permeabilização da membrana (GOULD & EATON, 1990; WHITE & EATON ET AL., 1990).

Após a liberação no citoplasma, as partículas centrais do VLA iniciam a transcrição do genoma viral e RNAs mensageiros virais recém-sintetizados (mRNAs) que são limitados, mas não poliadenilados, são expulsos para o citoplasma (VERWOERD et al., 1972). As duas principais proteínas do núcleo, VP3 e VP7, respondem pela morfologia geral da partícula, enquanto as três proteínas menores, VP1, VP4 e VP6, são responsáveis pela transcrição de mRNA. A partícula central marca um ponto final na desmontagem do vírus e, portanto, protege o genoma do dsRNA viral dos mecanismos celulares de vigilância antiviral.

A replicação do dsRNA viral ocorre em duas etapas distintas. Primeiro, como apenas descritos, os RNAs de cadeia positiva (mRNAs) são transcritos, usando a cadeia negativa de segmentos de dsRNA como moldes e extrudados da partícula central (BANNERJEE & SHATKIN, 1970). Em segundo lugar, os RNAs de fita positiva servem como modelos para a síntese de novos RNAs de cadeia negativa em um ponto ainda

indefinido estágio durante a montagem de novas partículas do núcleo do vírus. Não se sabe se todas as moléculas de dsRNA de novo são sintetizadas simultânea ou consecutivamente.

Como ilustrado na Figura 5, o ciclo do Vírus da Língua Azul (VLA) começa com a ligação do vírus à célula através da proteína VP2. O VLA é então internalizado por endocitose mediada por receptor, onde o pH ácido ativa a proteína VP5, liberando os núcleos virais no citoplasma. Os núcleos virais ativam sua transcriptase e as proteínas VP1, VP4 e VP6 trabalham em conjunto para sintetizar o RNA mensageiro do vírus. Os novos núcleos são montados, primeiro pela interação de decâmeros de VP3 e, em seguida, pela montagem ordenada de trímeros de VP7. A proteína NS2 desempenha um papel essencial na montagem dos núcleos, reunindo proteínas e RNA para facilitar o processo. Os núcleos recém-sintetizados são liberados das inclusões virais, possivelmente pela desfosforilação da proteína NS2. As proteínas externas do capsídeo, VP2 e VP5, são adicionadas às partículas virais recém-sintetizadas. Por fim, essas partículas virais maduras são liberadas das células hospedeiras pela atividade da proteína NS3, em conjunto com a interação com Tsg101 e calpactina p11. Esse ciclo complexo permite a replicação e disseminação eficiente do VLA dentro do organismo hospedeiro, contribuindo para a propagação da infecção.

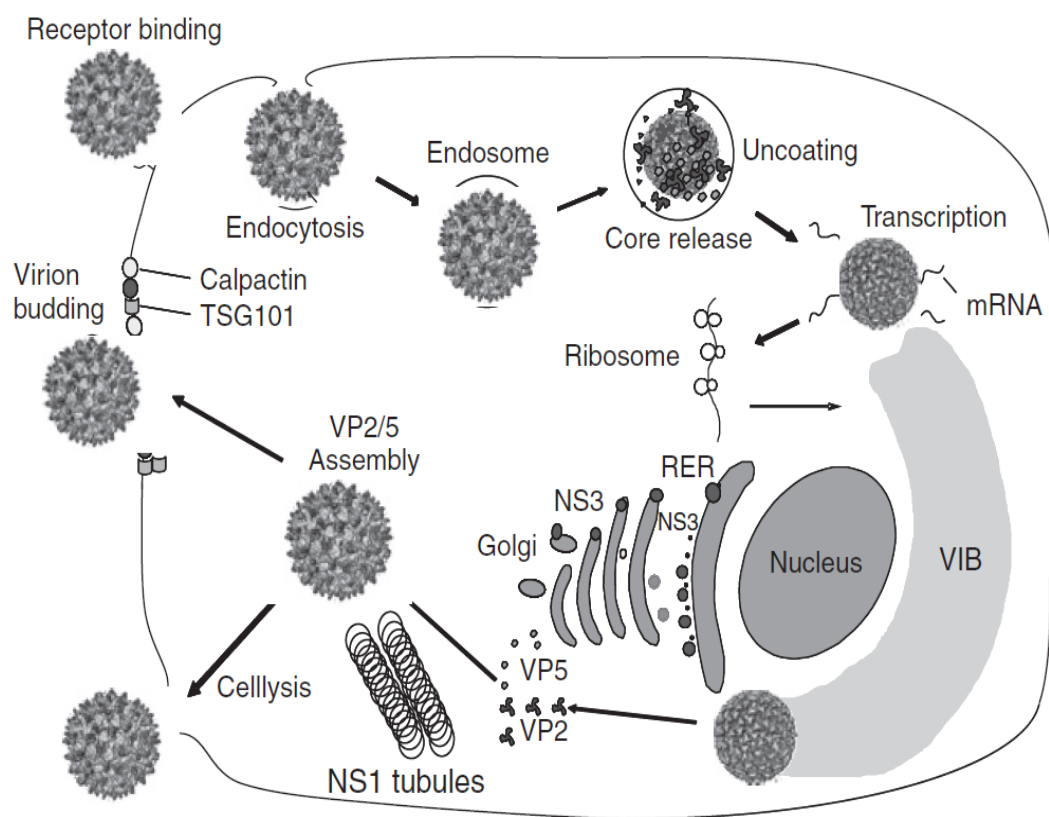


Figura 5. Desenho esquemático da replicação intracelular do Vírus da Língua Azul (Noad & Roy, 2009).

2.2 Transmissão

Os Orbivirus são transmitidos principalmente por vetores biológicos do gênero *Culicoides* sp (MACLACHLAN et al., 2010; WILSON et al., 2009). Adicionalmente, a transmissão do VLA pode ocorrer de duas formas: vertical, da mãe para o feto, ou horizontal, através do contato direto, o que pode acontecer para alguns poucos sorotipos específicos. (BACKX et al., 2009; BATTEN et al., 2009; MENZIES et al., 2008; MAYO et al., 2010).

Para diversos sorotipos do VLA, a transmissão vertical (transplacentária) foi relatada, resultando em malformações congênitas graves (VAN DER SLUIJS et al., 2013). Essa transmissão geralmente foi associada a cepas vacinais vivas, mas a cepa europeia do VLA-8 demonstrou alta incidência de transmissão transplacentária em situações naturais. Embora a relevância desse tipo de transmissão para a epizootiologia seja considerada limitada, especialmente em áreas enzoóticas, ela pode ter um impacto econômico substancial devido à perda de prole. Vacinas inativadas têm se mostrado eficazes na

prevenção da transmissão transplacentária (BACKX et al., 2009). Os sorotipos mais recentemente reconhecidos, como o BTV-25, o BTV-26 e o BTV-27, parecem ser transmitidos exclusivamente por vias independentes de vetores e podem resultar em infecção persistente em caprinos.

A distribuição de espécies de culicídeos que transmitem o VLA é geograficamente diversa, com diferentes espécies atuando como vetores em várias regiões do mundo. Essas espécies são cruciais na epidemiologia da doença, pois o vírus é limitado a áreas onde espécies de vetores competentes estão presentes.

Os fatores climáticos influenciam diretamente a distribuição das espécies de *Culicoides*, afetando sua reprodução, sobrevivência e capacidade de transmitir doenças. A temperatura é um dos principais fatores reguladores do ciclo de vida desses insetos, modulando o desenvolvimento das diferentes fases da vida, impactando sua atividade e competência vetorial (MELLOR et al., 2000). Temperaturas intermediárias, entre 25°C e 30°C, favorecem a população adulta, enquanto temperaturas abaixo de 10°C inibem sua atividade (MULLENS et al., 1995). Além disso, invernos mais quentes e noites com temperaturas mais elevadas permitem a persistência do VLA (PURSE et al., 2005). Regiões com pelo menos oito meses de temperatura média acima de 12,5°C são especialmente favoráveis para a presença do vetor *C. imicola*, como observado na Península Ibérica (WITTMAN; MELLOR; BAYLIS, 2001).

A precipitação e a umidade também desempenham um papel fundamental na distribuição das espécies de *Culicoides*. A disponibilidade e a permanência de habitats úmidos são essenciais para a reprodução das larvas e pupas (MELLOR et al., 2000). Chuvas influenciam a sazonalidade e a abundância dos vetores, como demonstrado em estudos na África do Sul e no Quênia (BAYLIS et al., 1997). O Índice de Vegetação por Diferença Normalizada (NDVI), que mede a umidade do solo e a produtividade vegetal, tem sido associado à presença de *C. imicola*, evidenciando que áreas com solo úmido, mas não alagado, são ideais para sua proliferação (RAWLINGS et al., 1998).

As mudanças climáticas recentes têm impactado significativamente a distribuição dos *Culicoides*. O aumento das temperaturas médias, juntamente com a redução da ocorrência de geadas, tem possibilitado a expansão desses insetos para novas áreas da Europa. Isso, por sua vez, ampliou a transmissão do VLA, afetando regiões que antes não eram consideradas de risco (PURSE et al., 2005). Além disso, alterações nos padrões de precipitação têm tornado certas áreas mais propensas à proliferação dos vetores, modificando sua distribuição e sazonalidade (ROGERS; RANDOLPH, 2003).

Outro fator relevante é a dispersão pelo vento. Apesar de serem fracos voadores, os *Culicoides* podem ser transportados pelo vento por centenas de quilômetros, facilitando sua disseminação entre diferentes regiões e ilhas (SELLERS, 1992). Esse mecanismo de dispersão explica, por exemplo, a chegada de insetos infectados a novas localidades sem a necessidade de deslocamento de hospedeiros animais. Dessa forma, os fatores climáticos combinados desempenham um papel crucial na dinâmica populacional dos *Culicoides* e na propagação de doenças transmitidas por esses vetores (PURSE et al., 2005).

A distribuição de espécies de *Culicoides* é fortemente influenciada por fatores climáticos, como temperatura, precipitação e umidade. Por exemplo, *C. imicola* prospera em climas tropicais e subtropicais, enquanto o *C. orientalis* na região do Himalaia é influenciado pela altitude e precipitação (Leta et al., 2019; Mukhopadhyay et al., 2017).

Na América do Norte o *Culicoides sonorensis* é o vetor primário, enquanto na América do Sul, *Culicoides insignis* é responsável pela transmissão de diferentes sorotipos de VLA (Tabachnick, 2004). Na Europa, *Culicoides obsoletus* e *Culicoides scoticus* são prevalentes no norte da Europa. Essas espécies são mais ativas de março a novembro (Ander et al., 2012). Além disso, *Culicoides imicola* expandiu seu alcance para o sul da Europa, contribuindo para a disseminação do VLA (Mellor & Wittmann, 2002; Leta et al., 2019).

Na África e Ásia, o *Culicoides imicola* serve como um vetor significativo para VLA e outras doenças (Leta et al., 2019). Na Índia, *Culicoides orientalis* e *Culicoides oxystoma* são suspeitos de serem vetores, com sua distribuição influenciada por fatores climáticos e altitudinais (Kar et al., 2023; Mukhopadhyay et al., 2017).

A região da Australásia tem seus próprios sorotipos distintos de VLA, com espécies de *Culicoides* adaptadas às condições locais (Reddy et al., 2018).

2.3 Histórico e Epidemiologia

As áreas de ocorrência do vírus são compatíveis com locais onde há condições favoráveis à manutenção do vetor, ou seja, regiões tropicais e subtropicais (45–53N and 35S), o que também confere o caráter sazonal à doença (Maan et al, 2009).

O primeiro registro envolvendo o VLA data do final do século XVIII na África (Spreull, 1905). Desde então, a doença tem sido relatada em diversos continentes e países, incluindo América do Sul e do Norte, Austrália, Europa e Ásia, abrangendo também o

subcontinente indiano (Saminathan et al., 2020). Atualmente, a VLA está presente em quase todos os continentes, exceto na Antártida (Gould e Pritchard, 1990).

Saminathan e colaboradores em 2020, revisaram sobre a ampla presença do vírus em todo o mundo (Quadro 2).

Quadro 2 . Prevalência de vários sorotipos do vírus da língua azul (VLA) em todo o mundo relatados por isolamento do vírus e/ou presença de anticorpos neutralizantes.	
Distribuição geográfica	Sorotipos prevalentes de VLA
Continente africano (África do Sul, Egito, Argélia, Líbia, Marrocos, Tunísia, e Nigéria)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24
Continente europeu (França, Holanda, Alemanha, Bélgica, Espanha, Portugal, Suíça, Irlanda, Luxemburgo)	1, 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 14, 16, 25, 27
Continente norte-americano (EUA, México, Canadá)	1, 2, 3, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 22, 24
Continente sul-americano (Brasil, Guiana Francesa, Argentina, Colômbia, Suriname, Guiana e Equador)	1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 26
América Central (Guatemala) e região do Caribe (Jamaica e ilhas do Caribe)	1, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 19, 22
Continente australiano	1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 12, 15, 16, 20, 21, 23, 24
Sul da Ásia (Índia, Paquistão, Sri Lanka, Bangladesh, Afeganistão)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24
Leste da Ásia (China, Japão e Taiwan)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 20, 21, 23, 24, 28
Sudeste da Ásia (Indonésia e Malásia)	1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 12, 15, 16, 20, 21, 23
Oeste da Ásia (Turquia, Chipre, Síria, Líbano, Israel, Jordânia, Omã, Kuwait, Arábia Saudita)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 16, 24, 26, 28

Adaptado Saminathan et al., 2020

A complexidade da epidemiologia desta enfermidade pode ser influenciada por fatores como a densidade e distribuição da população do vetor *Culicoides*, a composição das espécies hospedeiras, as condições climáticas e as cepas do vírus. Surtos LA ocorrem em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, em regiões que favorecem a reprodução das espécies de vetores competentes. Durante um surto, são registrados mais de um ou dois sorotipos, o que reflete as mudanças dinâmicas nos sorotipos do VLA e na imunidade de rebanho (Saminathan et al., 2020).

O VLA foi detectado em vários países da América do Sul, incluindo Brasil, Argentina, Colômbia, Guiana, Suriname, Peru, Equador e Chile. Na América do Sul, o primeiro registro da presença de VLA ocorreu no Brasil, em 1978, a partir de estudos sorológicos (Silva, 1978). No Brasil, mortalidade significativa em ovelhas foi observada durante surtos envolvendo os sorotipos 1, 4 e 17 (Lager, 2004; Guimarães et al., 2017). Na Argentina, o sorotipo 4 do VLA foi isolado de bovinos sem sinais clínicos (Legisa et al., 2013). Outros sorotipos detectados por meio de sorologia incluem 4, 6, 14, 17, 19 e 20 no Brasil, e 12, 14 e 17 na Colômbia (Lager, 2004).

Desde então, já foi relatada a circulação de pelo menos 17 sorotipos: VLA-1, VLA-2, VLA-3, VLA-4, VLA-8, VLA-9, VLA-10, VLA-12, VLA-14, VLA-16, VLA-17, VLA-18, VLA-19, VLA-21, VLA-22, VLA-24 e VLA-26 (Clavijo et al., 2002; Matos, 2016; Gasparini et al., 2017; Baldini, 2018; Da Silva, 2018; Lobato et al., 2015).

Embora o vírus apresente ampla distribuição no Brasil, como demonstrado pelos estudos sorológicos, ainda são escassas as informações sobre a distribuição dos sorotipos pelo país e principalmente em relação às sequências de seus segmentos de RNA. Até o momento foram depositadas no banco de sequências mundial GenBank® apenas um isolado com genoma completo do VLA oriundo do Brasil: VLA-17 (Matos et al., 2016), muito provavelmente em função da escassez de estudos na área, bem como peculiaridades das amostras brasileiras que dificultam sequenciamento e análise das sequências.

2.4 Principais espécies acometidas por VLA

2.4.1 Ruminantes silvestres: cervídeos

A evolução dos cervídeos levou aproximadamente 30 milhões de anos. Acredita-se que os primeiros animais surgiram na Ásia e que o aparecimento desses mamíferos no Ocidente se iniciou pela América do Norte (Dong et al., 2004; Ludt et al., 2004; Gilbert et al., 2006). A teoria mais aceita é que esses animais entraram na América do Sul há apenas 2,8 milhões de anos, após a formação do “Istmo do Panamá” ou “istmo Centro-americano”, que é uma estreita porção de terra que liga a América do Norte e a América do Sul (O’DEA, A. et al. 2016; STEHLI; WEBB, 1985; WEBB, 2000).

Esses animais são classificados morfologicamente com base em seu tamanho e chifres. Cervos da América Latina podem ser alocados em dois grupos morfológicos. No primeiro grupo estão as espécies com corpo pequeno e machos com chifres pontiagudos

não ramificados, que incluem os gêneros *Mazama* e *Pudu*. Acredita-se que essas características estão relacionadas à adaptação ao seu ecossistema de florestas altas e paisagens fechadas. O segundo grupo inclui espécies de corpo maior e machos com chifres ramificados. Esses animais habitam em florestas abertas como áreas de campos, pampas e áreas úmidas. As espécies dos gêneros *Odocoileus*, *Hippocamelus*, *Ozotoceros* e *Blastocerus* pertencem a esse agrupamento (DUARTE; GONZÁLEZ; MALDONADO, 2008).

Os cervídeos são mamíferos representantes da ordem *Artiodactyla* e família *Cervidae* (ABREU et al, 2021). No Brasil existem quatro gêneros de cervídeos nativos: *Blastocerus sp.*; *Mazama sp.*, *Odocoileus sp* e *Ozotoceros sp*. No total, há nove espécies de cervídeos na Lista de Mamíferos do Brasil reconhecida pela Sociedade Brasileira de Mastozoologia - SBMz (ABREU et al., 2021). Três dessas espécies são consideradas vulneráveis à extinção pelos órgãos competentes nacionais e/ou internacionais como a Lista Oficial de espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção e a Lista vermelha - “The IUCN Red List of Threatened Species” (BRAZIL, 2021; DUARTE et al., 2015; DUARTE et al., 2016). Entre as espécies vulneráveis estão: *Blastocerus dichotomus* (DUARTE et al., 2016); *Mazama nana* (DUARTE et al., 2015) e *Ozotoceros bezoarticus bezoarticus* (BRAZIL, 2021). Ainda, as espécies *Blastocerus dichotomus* e *Mazama nana* integram o Plano de Ação Nacional para a Conservação de Ungulados – PAN Ungulados (BRASIL, 2019).

O veado-de-mão-curta (*Mazama nana*) é considerado pequeno, uma vez que raramente ultrapassa os 15 kg e 45 cm de altura (Rossi, 2000). Seu nome popular no Brasil se originou após a descrição das características morfológicas que esse animal apresentava: as patas traseiras mais escuras e curtas que as anteriores (Abril et al, 2010; Mikich e Bernils 2004; Duarte et al., 1996; Duarte et al., 1997). A definição de sua área de ocorrência é controversa. De modo geral, estariam distribuídos por diferentes estados brasileiros, bem como nos países latinos: Argentina, Bolívia e Paraguai (Figuras 6, 7 e 8; Quadro 3).

Quadro 3. Referências sobre a distribuição geográfica do veado *Mazama nana*.

Autores	Área de ocorrência do veado <i>Mazama nana</i>
Cabrera et al, 1960)	Sudeste do Brasil, nordeste do Argentina e leste do Paraguai.

Grubb (1990)	Bolívia
Vieira (1995)	Mato Grosso, São Paulo e Rio Grande do Sul
Duarte (1996)	Norte do Estado do Paraná até o centro do Rio Grande do Sul e no Paraguai e Argentina (áreas fragmentadas e com muita alteração antrópica)
Redford e Eisenberg (1992) e Eisenberg e Redford (1999)	Sudeste Paraguai, ao norte da província de Misiones, na Argentina, e nos estados brasileiros de Minas Gerais (extremo sul), São Paulo (exceto Serra do Mar), Mato Grosso do Sul (sul e sudeste), Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (norte).

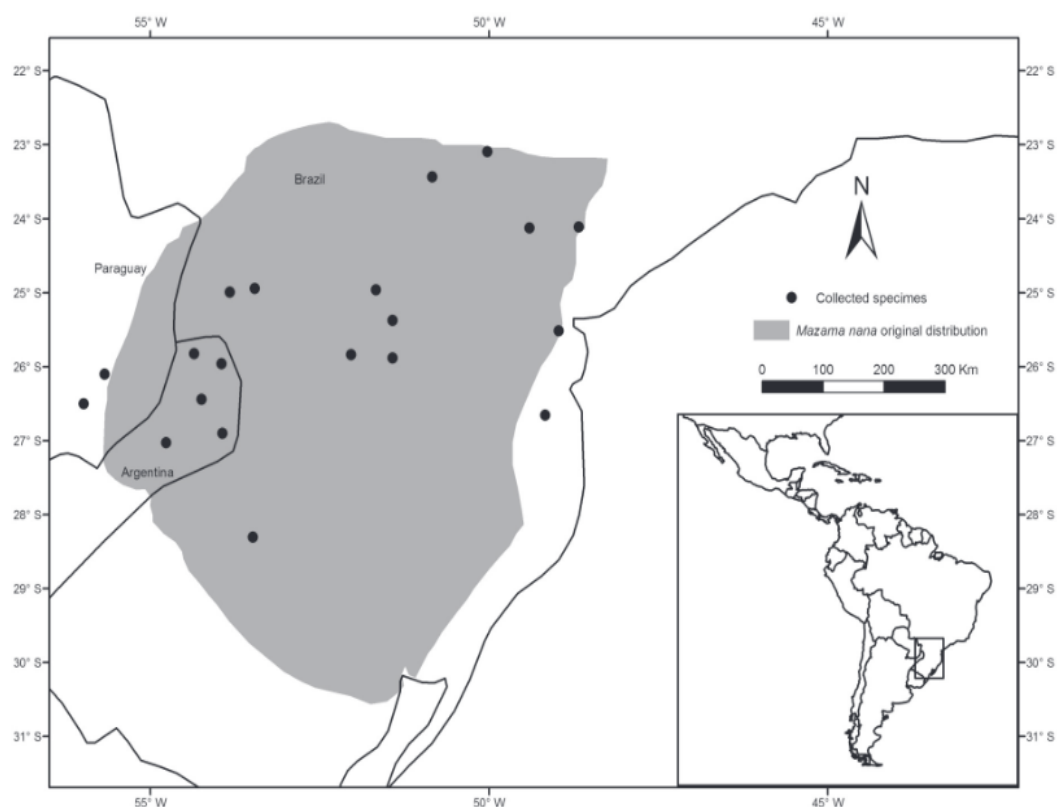


Figura 6. Distribuição geográfica do veado *Mazama nana* (Abril et al., 2010).

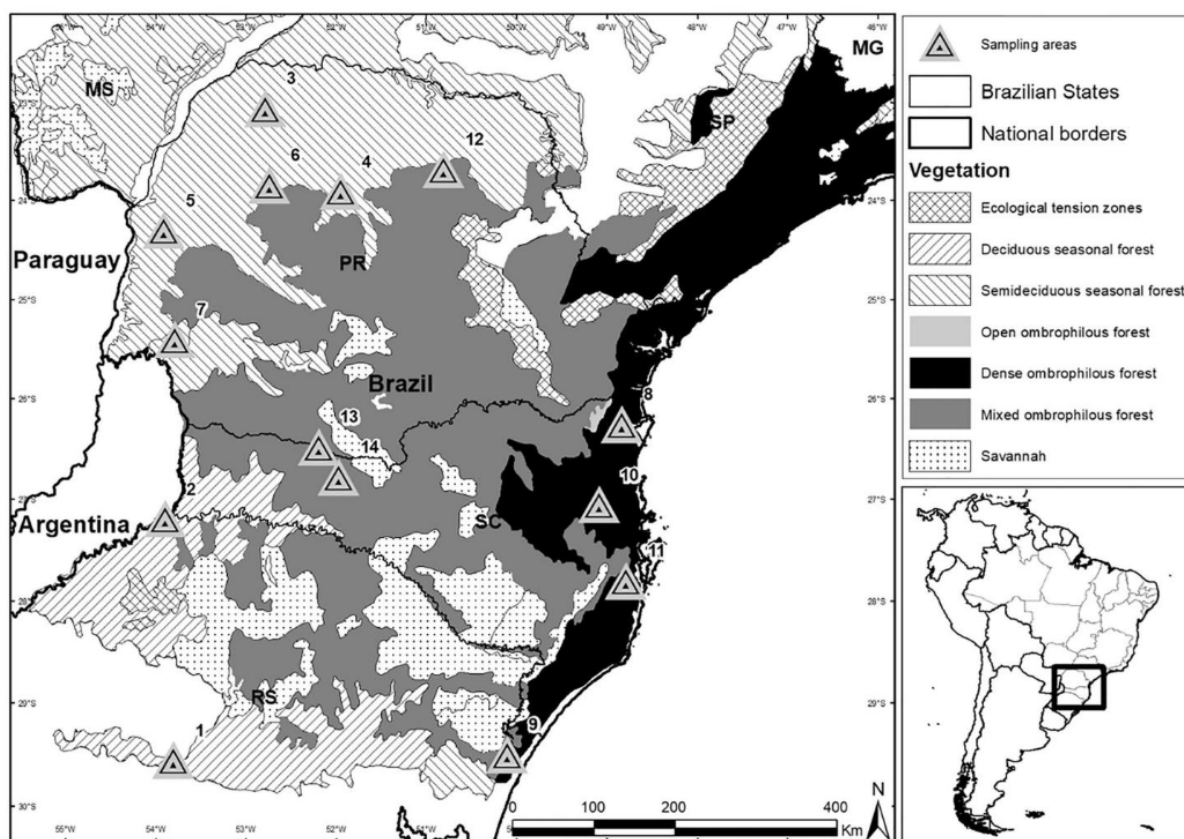
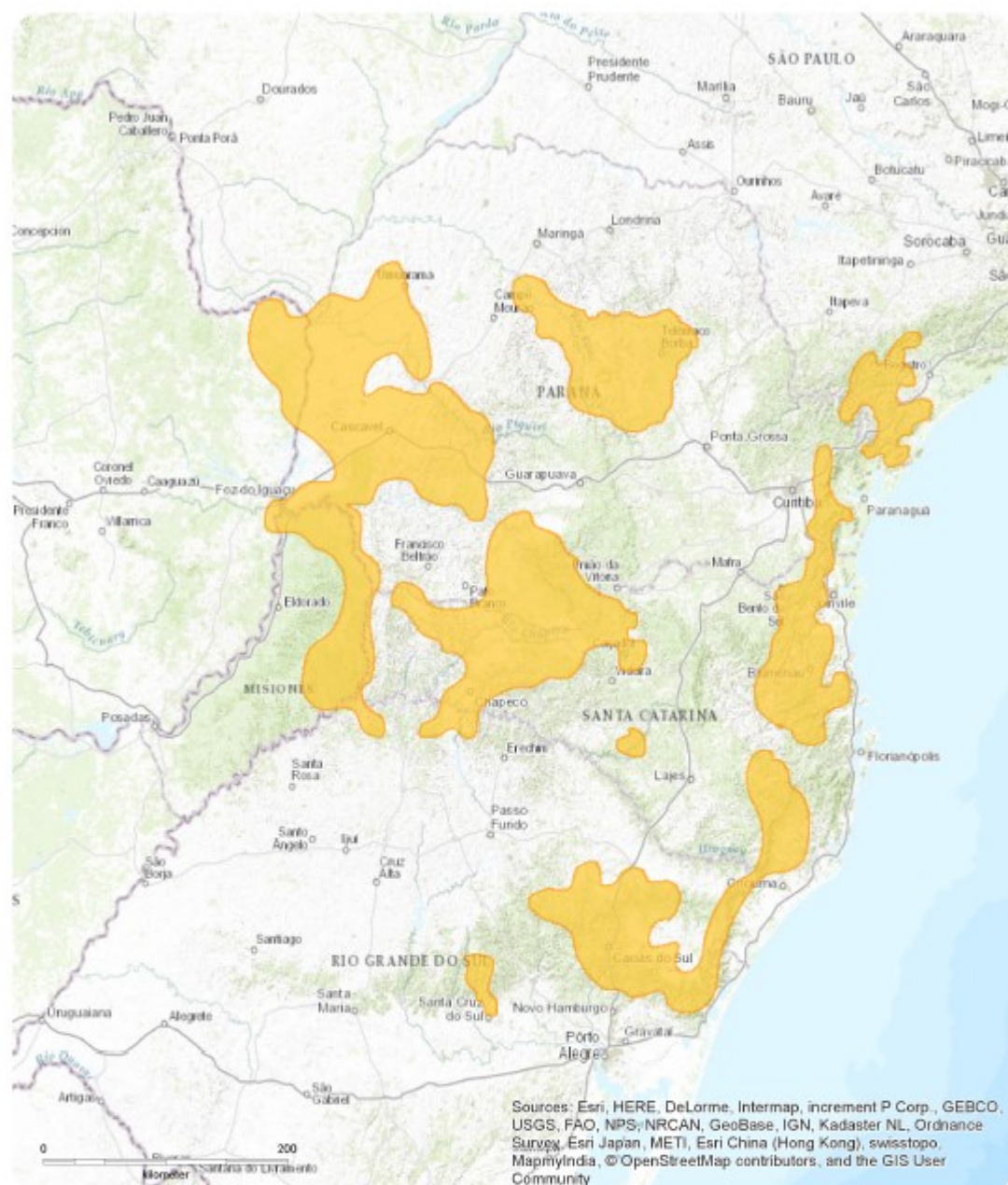


Figura 7. Mapa mostrando a localização das áreas protegidas amostradas e regiões da Mata Atlântica de acordo com a classificação da vegetação (de Oliveira et al., 2019). Os números correspondem às localidades mostradas na Tabela 1.

Embora existam diferentes correntes de pensamento sobre a distribuição dessa espécie no Brasil, há poucas evidências sobre sua existência já que coleções científicas são escassas e se restringem sua distribuição ao sudoeste de São Paulo (ao sul do Rio Paranapanema), Paraná, Santa Catarina e norte do Rio Grande do Sul (Rossi 2000).

Segundo estudos de *De Oliveira e colaboradores* em 2019, potencialmente, a distribuição geográfica atual desse veado neotropical está associada aos países sul-americanos: Brasil, Paraguai e Argentina. Em virtude da raridade e características comportamentais evasivas desta espécie, métodos indiretos como coleta de fezes e identificação das espécies por PCR/RFLP associada à espacialização da amostra foram utilizados para tentar caracterizar a área de ocorrência desses animais. Foi identificada a presença de fezes compatíveis geneticamente com o *Mazama nana* no Brasil distribuídas pelos estados do Paraná, Santa Catarina, norte e centro do Rio Grande do Sul, extremo sul de São Paulo e Mato Grosso do Sul. No restante da América do Sul sua distribuição geográfica está no leste do Paraguai, e na província de Misiones, na Argentina.



Mazama nana

Range

■ Extant (resident)

Compiled by:
International Union for the
Conservation of Nature



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply any official endorsement, acceptance or opinion by IUCN.

Figura 8. Mapa de distribuição do cervo *Mazama nana* (IUCN, 2015).

A espécie *Mazama nana* está associada a diferentes vegetações tipos ao longo da sua distribuição (Margarido e Braga 2004; Rossi 2000). No entanto, a sobreposição do localidades fornecidas por esses autores com o observa corresponde à Floresta Ombrófila Mista (MOF - Mata com Araucária) e aos ecótonos com as áreas adjacentes formações florestais: Floresta Estacional Semidecidual (FES), Floresta Ombrófila Densa (FDO) e Cerrado (CER). Certamente, a área de Floresta Ombrófila Mista (Mata de Araucária) sofreu uma redução significativa, estimada em cerca de 95% da área original, principalmente devido à exploração madeireira (*Araucaria* sp.) e à expansão agrícola (Monteiro, 2003). Essa diminuição drástica no habitat provavelmente levou à fragmentação da área de distribuição da espécie, resultando no surgimento de populações geograficamente isoladas.

No Brasil há relatos da presença de 9 espécies de cervos neotropicais. Entre elas, 10 espécimes pertencem ao gênero *Mazama* (Duarte et al., 2015). Sendo elas: *Mazama chunyi*, *Mazama rufina*, *Mazama americana*, *Mazama gouazoubira*, *Mazama nana*, *Mazama pandora*, *Mazama bororo*, *Mazama temama*, *Mazama bricenii*, *Mazama nemorivaga*. Há apenas o *Blastocerus dichothomus* representando o gênero. (Duarte et al, 2016).

Segundo o Plano de Ação Nacional Brasileiro para a Conservação dos cervos sul-americanos ameaçados de extinção, as principais ameaças à sua sobrevivência incluem a caça excessiva, a conversão de zonas úmidas em áreas agrícolas e a construção de barragens. Além disso, doenças transmitidas pelo gado, como febre aftosa, brucelose e babesiose, bem como ecto e endoparasitas, também são reconhecidas como fatores importantes no declínio de suas populações (DUARTE; GONZÁLEZ, 2010; PIOVEZAN et al., 2010; DUARTE; REIS, 2012).

Além da preocupação da extinção de algumas espécies nativas e exclusivas brasileira, que por si só é um prejuízo ao país, a revisão de Bernes e colaboradores publicada em 2018 revela que embora hajam lacunas de conhecimento, também há vasta literatura sobre os impactos da herbivoria de ungulados nas florestas. Sendo assim, a existência de cervídeos pode estar relacionada à regeneração de árvores e na abundância, diversidade e composição da vegetação de alguns locais. A partir dessas metanálises, é possível afirmar que a riqueza de espécies de plantas vasculares (ervas) e briófitas foi maior em locais em que havia níveis mais elevados de herbivoria.

Dessa forma, fica claro que doenças hemorrágicas virais que possam contribuir para diminuição da população ou extinção de espécies de veados brasileiros pode gerar, no

futuro, problemas maiores ao reduzir sistematicamente a diversidade de fauna e flora no Brasil.

Durante os surtos de doença hemorrágica ocorridos entre 2015 a 2022 no Refúgio Biológico Bela vista as espécies *Blastocerus dichotomus* e *Mazama nana* foram as envolvidas (BALDINI et al, 2018). Assim, fica evidente que as doenças hemorrágicas com etiologia viral representam um risco para a manutenção dessas espécies em cativeiro, bem como em vida livre.

2.4.2 Ruminantes Domésticos

As espécies de ruminantes domésticos associadas a relatos de VLA incluem ovinos, búfalos, caprinos e bovinos (Brown et al., 1989; Castro et al., 1992; Cunha, 1990; Lopez et al., 1985; Melo et al., 2000; Rosario et al., 1984; Tamayo et al., 1983; Viegas de Abreu, 1983).

O primeiro isolamento viral do VLA de um animal brasileiro ocorreu em 1980, nos EUA em bovinos exportados que estavam em quarentena, sendo encontrado o sorotipo 4. Em 2001, durante um surto no Paraná, foi isolado o sorotipo 12 em ovelhas e cabras. Outros surtos ocorreram em 2002, afetando cabras e ovelhas no Paraná. Estudos subsequentes identificaram diferentes sorotipos em diferentes estados brasileiros desde 2001, com diversos estudos sorológicos indicando a disseminação da doença entre várias espécies de ruminantes (Cunha Filho et al., 2018).

Acredita-se que a evolução da LA no Brasil possa ter correspondência com a história da pecuária brasileira, principalmente com enfoque na introdução de bovinos e ovinos no país.

A introdução de bovinos de origem europeia no Brasil possivelmente ocorreu nas primeiras décadas após o descobrimento do Brasil. Estima-se que os primeiros bovinos foram introduzidos na Capitania de São Vicente (São Paulo) em 1534 (Adas, 1983, p.240). No sul do Brasil, a criação de bovinos foi desenvolvida inicialmente pelos padres jesuítas, nas missões próximas ao rio Uruguai. Com o tempo, a criação se multiplicou, espalhando-se por toda a região Sul, o que originou várias estâncias (Teixeira & Hespanhol, 2014).

No princípio do século XVII o rebanho brasileiro já alcançava 1.500.000 cabeças (Medeiros Neto, 1970). De acordo com Medeiros Neto (1970), no início do século XX foram tomadas medidas oficiais para facilitar a importação de reprodutores visando a melhoria do plantel, implantando parques frigoríficos, estabelecendo o Serviço de

Veterinária do Ministério da Agricultura, no ano de 1910, e criando escolas de laticínios e postos zootécnicos. Com a expansão da criação de bovinos no Brasil, algumas regiões destacaram-se nessa atividade, tais como: o Rio Grande do Sul, o Triângulo Mineiro e a ilha de Marajó. No Rio Grande do Sul, foram introduzidas raças europeias com a finalidade de melhorar as espécies bovinas, como: Hereford, Devon, Polled Angus, Holandês, Charolês, Santa Gertrudes e Shorthorn. No Triângulo Mineiro foi introduzido o gado indiano (zebu), que se adaptou muito bem às condições regionais e aí conseguiu-se uma raça brasileira, a Indu-Brasil. Nessa área destacam-se como raças mais criadas: Gir, Nelore, Gurezá e Indu Brasil. Na ilha de Marajó foi introduzido o gado bufalino, vindo da Índia, que se adaptou muito bem às condições regionais, apresentando resistência às doenças, além de grande rendimento (Adas, 1983, p. 241).

Apesar do crescimento considerável da pecuária bovina brasileira desde o período colonial, somente a partir da década de 1960 passou a ocorrer maior expansão da atividade no país. Nos anos 1960 foram introduzidas novas raças, como resultado da política de governo para esse setor, além de melhorias na criação. O Programa Nacional da Pecuária contribuiu para a expansão das áreas de pecuária no Norte e Centro-Oeste, visando regularizar o abastecimento de carne no país e dispor de excedentes para exportação (Medeiros Neto, 1970).

Apesar disso, na década de 2000, novos programas de avaliação genética foram desenvolvidos para auxiliar os pecuaristas na escolha e acasalamento de seus reprodutores, com o objetivo de melhorar a qualidade do rebanho e conseguir maior retorno econômico. Assim, a pecuária continuou a ser a principal atividade econômica do país nessa década, ocupando uma área de 172 milhões de hectares, de acordo com os dados do Censo Agropecuário do IBGE referente ao ano de 2006 (Teixeira & Hespanhol, 2014).

Em relação à origem das raças de ovinos presentes no Brasil, a cronologia em relação à introdução de novas raças é parecida com a de bovinos, já que remonta aos primeiros períodos da história do Brasil. As raças domésticas de ovelhas são provavelmente descendentes do muflão selvagem (*Ovis aries orientalis*), originário da Ásia. Inicialmente, as ovelhas eram criadas para carne, leite e pele (Ensminger & Parker, 1986), mas foi apenas por volta de 3.500 a.C. que o homem aprendeu a fiar lã (Smith et al., 1997).

Com a expansão do pastoreio de ovelhas na Ásia e Europa, a lã se tornou uma das fibras mais utilizadas para vestuário e um importante produto comercial. A Espanha desenvolveu a raça Merino no século 12, famosa pela qualidade e manteve o monopólio sobre essa raça, o que contribuiu para a grande riqueza do país e ajudou nas suas

explorações no Novo Mundo. É provável que as ovelhas, como fonte de alimento, tenham sido trazidas da África (Angola ou Nigéria) ou de Cabo Verde, um ponto de trânsito no comércio de escravos no Atlântico (Primo, 2000).

Embora não haja registros específicos de ovelhas sendo trazidas diretamente da Europa para o Brasil (Rodero et al., 1992), ovelhas foram introduzidas no país através do Paraguai, por Nũflo de Chaves em 1549 e Felipe de Cáceres em 1569, além da Argentina, por Juan de Garay em 1580. As ovelhas estavam entre os animais registrados nas capitâneas por Pero de Magalhães em 1576 (Gândavo, 1980) e foram enviadas para a Bahia em 1587 (Sousa, 1938). Embora haja algumas controvérsias, acredita-se que as raças introduzidas tenham sido a Churra, Churra Bordaleira, Merino e Lacha (Mariante & Cavalcante, 2006).

Rapidamente, esses animais se adaptaram ao novo ambiente e começaram a se multiplicar. Seus descendentes se espalharam por diversas regiões brasileiras, passando por um intenso processo de seleção natural ao longo dos séculos, o que levou ao surgimento de características específicas de adaptação aos diferentes ambientes encontrados no país (Vilela, 2021).

A crescente demanda por produtos de origem animal levou à necessidade de aumentar a produtividade dos animais de raças naturalizadas. Dessa forma, no início do século XX, começaram as importações de ovinos de raças exóticas, altamente produtivas, porém adaptadas a climas temperados. Em diversas regiões do Brasil, realizaram-se cruzamentos indiscriminados com essas raças exóticas, com o objetivo de obter mestiços mais adaptados e produtivos. Contudo, os mestiços mostraram-se menos produtivos que os pais. Uma das principais consequências dessas importações e cruzamentos foi a diminuição do tamanho efetivo das populações das raças naturalizadas no país, o que resultou em muitas delas estando hoje em risco de extinção (McManus et al., 2010).

Os animais de raças exóticas, provenientes de países de clima temperado, possuem sua criação restrita a determinadas regiões do Brasil, pois apresentam limitações adaptativas e reprodutivas em algumas áreas, especialmente no Nordeste. Existem mais de 27 raças ou ecótipos de ovinos no Brasil, mas apenas onze estão em crescimento (Mariante et al., 2003), com novas raças sendo importadas.

Embora quase todas as raças exóticas estejam registradas no Ministério da Agricultura, várias raças naturalizadas brasileiras não possuem registro. A legislação que regula o registro genealógico de animais (Lei 4716/1965) usava a expressão "registro genealógico de animais domésticos", o que gerava interpretações diversas. Em 2008, a Comissão de Agricultura, Produção Animal, Abastecimento e Desenvolvimento Rural da

Câmara dos Deputados aprovou uma alteração na proposta de Lei 7210/2006, que passou a se referir ao "registro genealógico de animais de interesse agropecuário", o que deve facilitar o registro de raças menores, ecótipos e populações (Godoy, 2015).

A evolução do sistema aduaneiro no Brasil sofreu diversas modificações ao longo do tempo. Durante o período de Capitânias Hereditárias, instaurado pelos portugueses no Brasil na década de 1530, os nobres e militares que possuíam concessão das capitânias detinham ampla autonomia administrativa. A centralização da administração aduaneira ocorreu em 1549 com a criação da Provedoria Mor da Fazenda Real, cujos Provedores, além de Juizes de Alfândega, também assumiam funções militares (Godoy, 2015).

No século XVI, o sistema aduaneiro passou por algumas mudanças, como a criação da alfândega do Rio de Janeiro em 1566 e a regulamentação do sistema com o Foral da Alfândega de Lisboa em 1587, que permaneceu em vigor até 1832. Em 1591, os portos brasileiros foram fechados para embarcações estrangeiras, e as aduanas se expandiram ao longo do século XVII, acompanhando o crescimento do comércio (Carrera, 1889).

No século XVIII, com o ciclo do ouro, o sistema aduaneiro passou por modificações, incluindo a liberalização parcial do comércio, mas mantendo o monopólio metropolitano. No século XIX, a chegada da Família Real ao Brasil resultou na abertura dos portos ao comércio internacional, o que aumentou o movimento nas alfândegas, com a adoção de medidas protecionistas, como a tarifa preferencial para mercadorias inglesas até 1826.

No século XX, a política aduaneira sofreu mais transformações, incluindo a criação da Secretaria da Receita Federal (1968), a modernização das leis aduaneiras. Entretanto, o Serviço de Defesa Sanitária Animal Brasileiro só é regulamentado a partir de 1934, com a promulgação do Decreto 24.548, em 03 de julho de 1934. Entretanto, o VLA só passou a integrar a lista de doenças de notificação obrigatória em 2013, com a efetivação da Instrução Normativa nº 50, de 24 de setembro de 2013 do Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), embora o primeiro relato sorológico de VLA no Brasil data de 1978 (Silva, 1978).

Dessa forma, fica claro que há uma ampla variedade de possibilidades de introdução do VLA no Brasil com a importação de animais vivos virêmicos há décadas e até séculos atrás. Considerando o favorecimento climático para a reprodução dos culicídeos no país, uma vez introduzido o vírus, a sua manutenção e disseminação nos rebanhos de ruminantes não apresentou obstáculos.

Embora ainda haja muito trabalho a ser feito, a conscientização sobre a lacuna de conhecimento sobre VLA no Brasil e efetividade das legislações atuais no controle e prevenção da doença têm crescido. Ainda, medidas estão sendo adotadas para melhorar o entendimento da situação epidemiológica da infecção por VLA na América do Sul (Lager, 2004). Entretanto, é importante ter em mente que a introdução de animais positivos em áreas livres de infecção, bem como o aparecimento de sorotipos exóticos deve ser monitorada para avaliar se podem servir como fonte de infecção para os animais nativos e por quanto tempo permanecem soropositivos, podendo impactar a vida selvagem e a agropecuária brasileiras.

2.5 Aspectos clínicos

O VLA está relacionado ao acometimento do sistema circulatório, resultando em distúrbios hemorrágicos (MacLachlan & Gard, 2009). Esse vírus infecta células endoteliais dos vasos sanguíneos, levando à morte celular e consequentes distúrbios circulatórios e hemostáticos nos animais infectados (Belbis et al., 2017).

Após a inoculação pelos vetores biológicos, os vírus inicialmente infectam leucócitos agranulócitos (como linfócitos, monócitos e macrófagos) no local da entrada e células dendríticas nos linfonodos regionais. Em seguida, as partículas virais se disseminam pelo organismo, atingindo órgãos linfóides secundários, como baço e outros linfonodos, além de órgãos altamente vascularizados, como pulmões. A disseminação pode ocorrer também por meio das hemácias e plaquetas, afetando diversos sistemas orgânicos e resultando em síndromes sistêmicas (Belbis, 2017; Roy, 2017).

A infecção pode resultar em morte celular por apoptose ou necrose, e as células infectadas podem produzir mediadores inflamatórios que causam vasodilatação, agregação plaquetária e síndrome hemorrágica, trombozes e edema. A exposição do colágeno subendotelial estimula a coagulação intravascular disseminada (CID) e formação de trombos (MacLachlan & Gard, 2009).

A sintomatologia varia de acordo com a espécie animal, características do hospedeiro e sorotipo viral envolvido. Os animais infectados podem apresentar desde uma infecção assintomática até uma doença fatal. Ovinos são mais suscetíveis e tendem a apresentar doença clínica mais agressiva, enquanto a doença em bovinos é menos comum, mas eles são importantes reservatórios para os vetores biológicos (MacLachlan et al., 2015).

Entre os sinais clínicos mais comuns incluem prostração, letargia, febre, problemas respiratórios, hemorragias, ceratoconjuntivite, estomatite, ulcerações e necrose, entre outros (OIE, 2016). Nos cervídeos, a infecção pode levar a quadros hemorrágicos graves e fulminantes que podem resultar em choque hipovolêmico e morte (Lobato et al., 2015; Bianchi et al., 2017; OIE, 2016).

Os bovinos geralmente não apresentam sinais clínicos evidentes, embora haja relatos de surtos causados por sorotipos atípicos, como o sorotipo VLA-8 no norte da Europa (Elbers et al., 2008). Esses animais também podem desenvolver uma reação de hipersensibilidade mediada por IgE e têm um papel importante na transmissão do vírus, funcionando como reservatórios (Schwartz-Cornil et al., 2008). Ovinos e alguns ruminantes silvestres, por outro lado, podem apresentar uma gama de manifestações clínicas, que variam desde infecções subclínicas ou doenças leves até quadros agudos ou fatais. A viremia é geralmente detectável entre 3 a 5 dias após a infecção em ovinos. Os sinais clínicos incluem febre, taquipneia e letargia. As alterações patológicas são caracterizadas por edema generalizado, hemorragias, especialmente nos linfonodos, pulmões, coração e músculos esqueléticos, além de necrose nas superfícies mucosas dos sistemas oro-nasal e alimentar. Os pulmões, órgãos mais afetados nos ruminantes, são particularmente vulneráveis a distúrbios de permeabilidade vascular causados pelo VLA. As lesões microscópicas incluem hipertrofia endotelial, estase vascular e trombose com infarto tecidual. Animais que sobrevivem à infecção aguda podem desenvolver dermatite crônica, além de lesões vesiculares e erosivas nas superfícies interdigital e mucosa. A panleucopenia atinge seu pico entre o sétimo e o oitavo dia após a infecção, afetando todos os linfócitos, com ênfase nas células T CD8.

2.6 Diagnóstico

O diagnóstico dessas arboviroses pode ser feito clinicamente, mas requer confirmação por meio de técnicas laboratoriais, pois alguns quadros clínicos são inespecíficos (Kawanami, 2018). O diagnóstico laboratorial é especialmente importante para identificar animais assintomáticos ou com infecções subclínicas (Wilson et al., 2015). As principais abordagens de diagnóstico preconizadas pela OIE (2018) são classificadas em métodos diretos e indiretos. Entre os métodos diretos são preconizados o isolamento viral em hospedeiros susceptíveis, ovos embrionados ou culturas celulares; testes moleculares, incluindo a reação em cadeia da polimerase convencional ou em tempo real.

Estes métodos utilizam *primers* específicos para o gene do segmento 10 e 9, que codificam proteínas conservadas desses vírus (Orru et al., 2006; Mann et al., 2016 a,b). Entre os métodos indiretos estão a pesquisa de anticorpos contra proteínas virais estruturais e não estruturais por meio de técnicas de diagnóstico de grupo específico, incluindo imunodifusão em gel de ágar (IDGA), ensaios imunoenzimáticos (ELISA), bem como reações de imunofluorescência. Ainda, são também realizados os testes de soroneutralização, ensaios de redução e inibição em placas ou inibição de fluorescência para o diagnóstico de sorotipos específicos.

Para o diagnóstico diferencial entre VLA e outras doenças hemorrágicas em cervídeos, é recomendado pela OIE (2016) a investigação de a Doença Epizootica Hemorrágica (DEH) e adenovírus, principalmente. Para bovinos e ovinos destacamos ectima contagioso, febre aftosa, estomatite vesicular, febre catarral maligna, diarreia viral bovina, rinotraqueíte viral bovina, infecção por parainfluenza do tipo 3, varíola ovina, fotossensibilização, pneumonia, poliartrites e abscessos, além da fotossensibilização.

2.7 Tratamento, prevenção e controle

A doença hemorrágica causada pelo vírus VLA não possui tratamentos específicos (OIE, 2016). Nos casos clínicos, o manejo é restrito a cuidados de suporte, como o uso de anti-inflamatórios não esteroidais, fluidoterapia para reposição do volume plasmático comprometido por episódios hemorrágicos, e antibioticoterapia para o controle de infecções bacterianas secundárias (Bianchi et al., 2017).

Como não há tratamentos específicos, as medidas de controle e profilaxia tornam-se essenciais para prevenir a infecção, reduzir a manifestação clínica da doença e minimizar a transmissão pelos vetores. Entre os métodos tradicionais de controle recomendados pela literatura estão a restrição de movimentação de animais virêmicos. Contudo, essas abordagens se mostram frequentemente inviáveis em áreas endêmicas, devido à persistência dos vetores biológicos e do vírus, que pode ser associado a infecções assintomáticas na população animal, além do grande número de animais afetados (OIE, 2018).

Em regiões endêmicas, a OIE (2018) sugere estratégias mais adequadas para o controle, como o monitoramento da presença do vírus por meio de animais sentinelas, a vigilância ativa e o rastreamento de animais potencialmente infectados, e a implementação de quarentena nos sistemas produtivos. Além disso, é recomendada a restrição de

movimentação de animais durante o período de atividade dos insetos vetores, o controle dos vetores biológicos e a vacinação dos animais suscetíveis, que é a medida mais eficaz para o controle da doença.

As estratégias de vacinação podem variar conforme as políticas públicas e a distribuição geográfica dos sorotipos do vírus VLA, o que ocorre de forma diferente em cada país (Bhanuprakash, 2009). No Brasil, não existem vacinas comerciais disponíveis, e o uso de vacinas importadas é proibido (Lobão et al., 2014). Nesse cenário, a utilização de vacinas autógenas pode ser a única alternativa viável para a imunização de hospedeiros suscetíveis no país. Em relação aos tipos de vacinas, as de primeira geração, que utilizam antígenos completos atenuados ou inativados, já estão licenciadas em diversos países (McVey e MacLachlan, 2015). Por outro lado, as vacinas de segunda e terceira geração, que envolvem antígenos recombinantes, vacinas vetorizadas e proteínas quiméricas, ainda estão em fase de pesquisa científica (Bhanuprakash, 2009; Rijn, 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS:

Sequenciar o genoma do Seg-7 de VLA isolados de cervídeos *Mazama nana* que vieram a óbito com doença hemorrágica e analisar a sequência do Seg 7 comparando com dados disponíveis em bancos internacionais a fim de melhor compreender a biologia e epidemiologia da circulação desse vírus no Brasil.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Cultivar amostras isoladas de VLA de cervídeos *Mazama nana* em células BHK-21 (clone 13);
- Realizar o sequenciamento completo do Seg-7 do *Orbivirus caerulinae* (VLA) de diferentes sorotipos que acometeram cervídeos *Mazama nana* com casos clínicos agudos;
- Alinhar as sequências do Seg-7 dos isolados de VLA e compará-las com sequências disponíveis nos bancos de dados internacionais (GenBank);
- Analisar as sequências considerando espécie animal afetada e origem geográfica;
- Depositar sequências completas do Seg-7 no Genbank, contribuindo com o banco de dados internacional, possibilitando o acesso para estudos moleculares e avanços na epidemiologia e controle da doença hemorrágica causada pelo *Orbivirus caerulinae*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fluxograma de trabalho

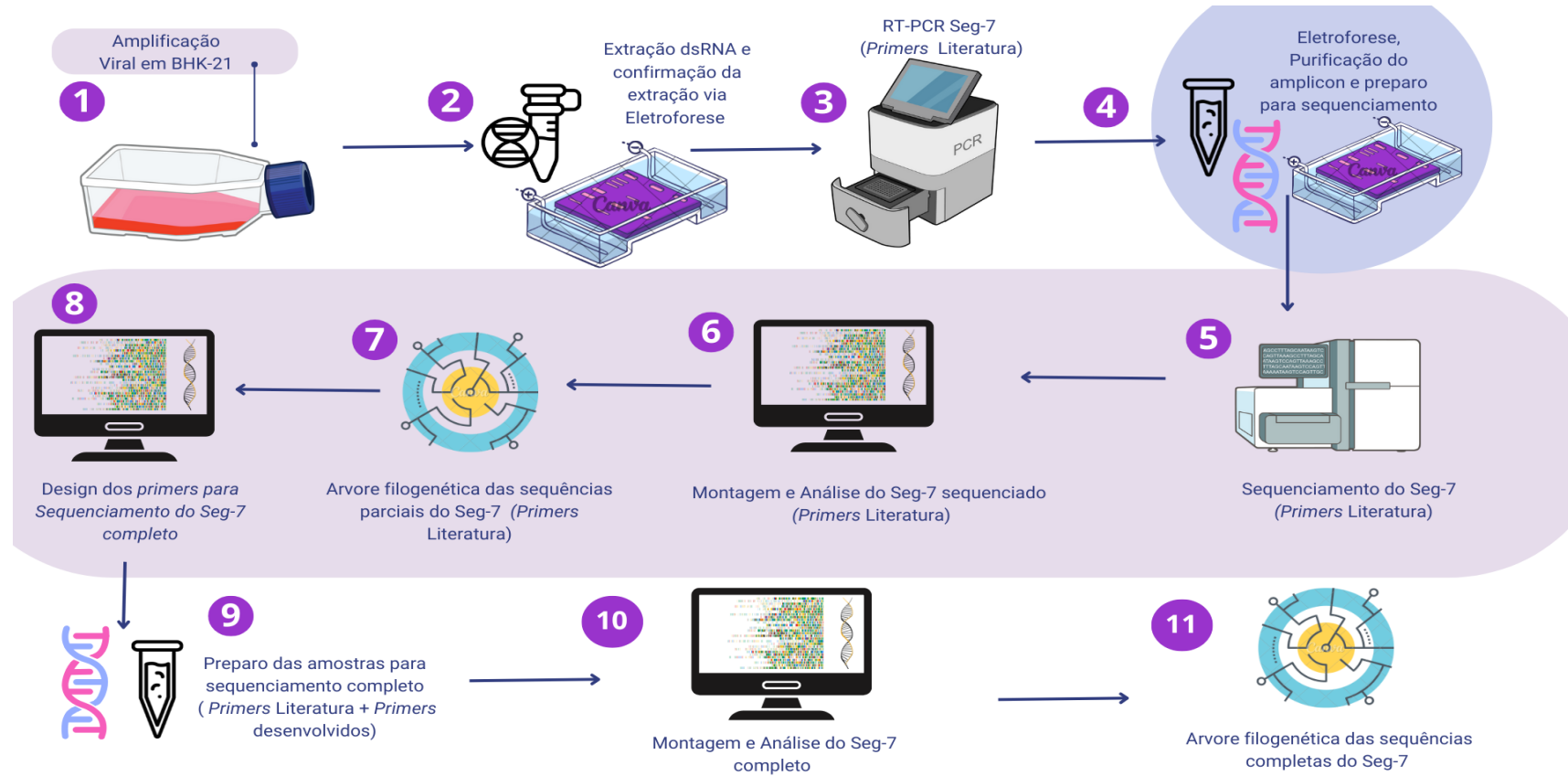


Figura 9. Fluxograma de trabalho (Elaborado neste trabalho no aplicativo Canva, 2024).

4.2 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético, de acordo com o número de registro AEC90E7, número de autorização do estudo no SISBIO é 76693-1 e Protocolo CEUA/UFMG 231/2021.

4.3 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS:

O crescimento viral e demais técnicas laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Pesquisa de Virologia Animal (LPVA) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da EV-UFMG. O sequenciamento genético foi realizado pela empresa Myleus biotecnologia. As análises filogenéticas do Seg-7 foram realizadas em pela Equipe do LPVA e pelo Prof^o Dr. João Cunha na Escola de Veterinária - UFMG.

4.4 Amostras virais:

4.4.1 Origem das amostras virais:

Os vírus utilizados eram oriundos do banco de amostras do Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal e foram isolados em célula de inseto a partir de amostras biológicas de cervídeos que vieram a óbito no Brasil com sintomatologia clínica compatível com doença hemorrágica nos anos de 2015 e 2017. Dos tecidos desses animais foram isolados e caracterizados orbivírus como previamente descrito por Baldini e colaboradores em 2018. Todas as amostras biológicas foram oriundas de cervídeos do Refúgio Bela Vista pertencente à Usina Hidrelétrica ITAIPU Binacional e que vieram a óbito com doença hemorrágica.

A detecção de VLA ocorreu via qRT-PCR visando o gene do Seg 10 que codifica a proteína não estrutural NS3 (Batten et al., 2015) com caracterização dos sorotipos via RT-qPCR (Maan et al., 2016). Em ambos os testes, utilizando “SuperScript™ III one-step RT-qPCR system” (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA). Também foi realizado RT-PCR utilizando “primers” com alvo específico para o Seg-2 como descrito por Maan et al. (2012) e os sorotipos de VLA foram confirmados por pelo sequenciamento parcial do Seg-2 pelo método Sanger (Baldini et al., 2018).

Para o estudo do Seg-7 de VLA, utilizamos todos os isolados disponíveis no banco, que não apresentavam co-infecção com o VDEH.

Tabela 1. Isolados de VLA selecionados para o sequenciamento Sanger

VÍRUS	IDENTIFI CAÇÃO	NO	¹	ESPÉCIE
VLA-3	CASIB 2433	015	2	<i>Mazama nana</i>
VLA-14	CASIB 2583	015	2	<i>Mazama nana</i>
VLA-18	CASIB 2534	015	2	<i>Mazama nana</i>
VLA-19	ZOO 0535	016	2	<i>Mazama nana</i>
VLA-22	ZOO 0469	016	2	<i>Mazama nana</i>
VLA-24	ZOO 0547/NEC 2632	017	2	<i>Mazama nana</i>
VLA - sorotipo não identificado (VLA-Y)	ZOO 0456	016	2	<i>Mazama nana</i>

(Banco de dados do Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal, 2024)

4.5 Preparo das amostras

4.5.1 Cultivo celular para realização dos testes laboratoriais:

Para multiplicação viral foram utilizados isolados virais em células de inseto, que foram submetidas à isolamento em Células BHK-21, de linhagem contínua de epitélio de rim de hamster (*Mesocricetus auratus*), obtidas da “American Type Culture Collection” (ATCC), catálogo número CCL-10 (Maryland, Estados Unidos). As células foram semeadas em meio Glasgow's Modified Eagle Medium (G-MEM) suplementado 5% de soro fetal bovino (SFB), gentamicina (50 µg/ml) e penicilina potássica (200 U/ml), sob incubação a 37° C, em atmosfera de 5% de CO₂.

4.5.2 Extração Viral

As suspensões celulares de BHK-21 infectadas foram submetidas à extração do material genético (dsRNA) utilizando Trizol Reagent® (Invitrogen, Paisley, UK) como descrito por Attoui et al., 2000.

Monocamadas celulares de BHK-21 em garrafas de 175 cm² foram infectadas com os isolados de VLA. Quando 100% de efeito citopático foi atingido, as suspensões foram aliquotadas em tubos falcon de 50mL e centrifugadas por 10 minutos a 1912 x g. O sobrenadante foi descartado. Ao pellet de células formado foi acrescido 1 ml de Trizol LS Reagent®. A solução foi agitada em *vortex* até que os *pellets* se dissolvessem sendo posteriormente mantida em temperatura ambiente por 10 minutos.

Foram adicionados 200 µl de clorofórmio às suspensões que foram incubadas em gelo por 10 minutos. As soluções foram centrifugadas por 10 minutos a 15294 x g. A camada superior transparente formada foi transferida e foram adicionados 900 µl de isopropanol e as amostras incubadas à -20 °C *overnight*. Após nova centrifugação por 10 minutos a 15294 x g, os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* formados lavados com 1 ml de etanol a 70%. Então, a suspensão foi centrifugada novamente a 10 minutos a 15294 x g e removido qualquer excesso de etanol.

Os pellets formados foram dissolvidos em 100 µl de água livre de RNase e adicionados 100 µl de LiCl 4M e incubados a 4°C *overnight*. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 15294 x g para sedimentar o RNA simples. Os sobrenadantes foram preservados e adicionados a eles 400 µl de isopropanol e 100 µl de acetato de amônio 7,5M. A mistura foi incubada a -20°C por 2 horas.

Então foram centrifugadas por 10 minutos a 15294 x g, lavadas com 1 ml de etanol a 70% e centrifugadas novamente em mesma rotação e período. O pellet formado foi dissolvido em 30 µl de água livre de RNase.

A qualidade do dsRNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e visualizados sob luz UV após coloração com brometo de etídio.

4.5.3 PCR do Seg-7

Para amplificação cDNA do Seg-7, as amostras de dsRNA extraídas foram submetidas ao RT-PCR duplex que diferencia as amostras orientais e ocidentais, utilizando o kit “*SuperScript™ one-step RT-PCR system*” (Invitrogen). O RT-PCR duplex foi realizado

contendo ambos os pares de “*primer*” (Tabela 4), a partir de protocolo descrito por Anthony et al., 2007 e Bréard et al. 2003.

A reação ‘*master-mix*’ continha 28 µl de água livre de RNase, 10 µl de tampão “*SuperScript™ one-step RT-PCR system*” de uma etapa, 2 µl de mistura dNTP, 0,6 µM de cada primer (dois forward e dois reverse) e 2 µl da mistura de enzimas (contendo enzimas de reação RT e PCR). Seis microlitros de RNA desnaturado foram então adicionados a 45 µl da master mix. O RNA foi transcrito reversamente a 45 °C por 30 minutos. Em seguida, uma etapa de ativação a 94 °C por 15 min (para inativar simultaneamente as transcriptases reversas e ativar as DNA polimerases). Quarenta ciclos de amplificação foram então realizados (94 °C por 1 min, 45 °C por 1 min e 72 °C por 2 min), seguidos por uma etapa de extensão terminal a 72 °C por 10 min. Os produtos de cDNA foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e visualizados sob luz UV após coloração com brometo de etídio.

Tabela 4. *Primers* utilizados para amplificação do cDNA parcial do Seg-7.

Primer	Orientação do Primer	Primer binding site (nucleotídeo)	Tamanho do amplicon (bp)	Sequência	Referência
VLA/S7/01	Forward	1–20	1156	GTTAAAAATC TATAGAGATG	Breard et al. (2003)
VLA/S7/02	Reverse	1137–1156	1156	GTAAGTGTA TCTAAGAGA	Breard et al. (2003)
VLA/S7/03	Forward	1–21	1156	GTTAAAAAAT CGTTCAAGAT G	Anthony et al.(2007)
VLA/S7/04	Reverse	1135–1156	1156	GTAAGTTTAA ATCGCAAGAC G	Anthony et al.(2007)

(Adaptado Anthony et al., 2007)

4.6 Purificação do cDNA , preparação e Sequenciamento Sanger

Os *amplicons* de cada sorotipo foram purificados via Kit DNA Clean & Concentrator™ (Zymo Research) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

As amostras purificadas de cDNA, foram submetidas a quantificação do material genético *Qubit™ dsDNA BR Assay* (Invitrogen) de acordo com protocolo descrito pela fabricante para padronizar a concentração de 40 ng de cDNA na reação de sequenciamento.

As amostras foram sequenciadas pela Empresa Myleus, de acordo com seu protocolo interno.

4.7 Bancos de dados utilizados

O GenBank ® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) funciona como um banco mundial de dados genéticos. É um banco de dados abrangente que armazena sequências de nucleotídeos de quase 260.000 espécies formalmente descritas, com acesso público. Essas sequências são obtidas principalmente por meio de submissões de laboratórios individuais e envios em lote de grandes projetos de sequenciamento, como projetos de sequenciamento de genoma inteiro (NGS) e amostragem ambiental. A equipe do GenBank atribui números de acesso assim que os dados são recebidos. A troca diária de dados com outras plataformas como o *European Nucleotide Archive (ENA)* e o *DNA Data Bank of Japan (DDBJ)* garante cobertura global (Benson et al., 2013).

BTV-GLUE® (MRC-University of Glasgow Centre for Virus Research) (<http://VLA.glue.cvr.ac.uk>), é uma plataforma que organiza as sequências genéticas de VLA disponíveis no GenBank ® (National Center for Biotechnology Information, U.S.), bem como seus metadados. Atua como um recurso bioinformático de dados de sequências para o VLA, uma vez que as sequências do banco de dados de nucleotídeos do NCBI são curadas juntamente com metadados complementares e integradas dentro do GLUE (<http://tools.glue.cvr.ac.uk>), um pacote de software centrado em dados para capturar dados de sequências virais e organizá-los ao longo de linhas evolutivas. O conjunto de dados também contém sequências de referência com anotações de características do genoma, alinhamentos múltiplos de sequências, clados definidos e árvores filogenéticas para cada segmento e clado do VLA. Uma nova ferramenta automatizada de genotipagem para todos os segmentos foi desenvolvida (Singer et al., 2019)

4.8 Análise primária das sequências obtidas: Montagem e análise filogenética do Sequenciamento Parcial

Os produtos do sequenciamento em formato “AB1” foram recebidos e foi realizada montagem em “*contigs*” das sequências obtidas neste estudo em software Seqman LaserGene

(DNASStar, Inc., Madison, WI, EUA) de acordo com método descrito por Swindell et al, 1997. As sequências montadas foram transformadas em formato “FASTA” no mesmo aplicativo. As sequências foram revisadas manualmente utilizando o programa BioEdit (Hall et al., 2011) e a qualidade das mesmas foi analisada em cromatogramas no mesmo software.

A análise primária das sequências obtidas foi realizada a partir da avaliação das sequências em software online “*Standard Nucleotide BLAST*” disponível em plataforma NCBI em que as amostras foram comparadas com todas as amostras depositadas no Genbank®. Foi realizado o *download* das sequências que apresentavam similaridade superior a 90% em comparação com nossas amostras, com exceção dos isolados VLA-Y e VLA-19 que não apresentavam estimativas de similaridades acima de 90% e nesses casos foram selecionadas todas as sequências disponíveis.

O alinhamento dessas sequências obtidas foi realizado em software MEGA 6, pelo método ClustalW (Thompson et al., 1994). A similaridade das amostras foi calculada pelo método “*Pairwise distance calculation*” e árvores filogenéticas foram montadas a partir do método “*neighbor joining* (NJ)” com “*bootstrap*” de 1000 no mesmo aplicativo pelo método descrito por Tamura et al., 2013.

4.9 Sequenciamento completo dos vírus

Para obtenção da sequência completa dos Seg-7 dos vírus analisados, os arquivos FASTA das sequências brasileiras foram alinhadas em software BioEdit e submetidas à plataforma *Primer Blast* do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) de forma a identificar padrões que permitissem criar novas sequências de *primers* para realizar sequenciamento Sanger das regiões não reveladas no primeiro sequenciamento.

A análise de sequências Seg-7 (geradas durante este estudo preliminar) e sua comparação com sequências publicadas demonstraram diferenças significativas entre elas, já que não se agrupam em mesmo clado embora tenham sido isoladas na mesma região. Com base nesses dados, não é surpreendente que as sequências terminais dos isolados brasileiros não tenham sido sequenciadas com os *primers* disponíveis na literatura internacional.

Como as sequências geradas não eram de comprimento total e não incluíam as regiões terminais (usadas aqui como alvos para ligação de primer), desenhamos “*primers overlapping*” (Figura 11) como uma estratégia para alcançarmos a sequência completa do Seg-7 dos isolados brasileiros (Figura 10). Essa estratégia também foi usada por Anthony e colaboradores em 2007

com objetivo de transpor o desafio de sequenciamento de região não codificadora de sorotipos que apresentavam uma maior variabilidade genética.

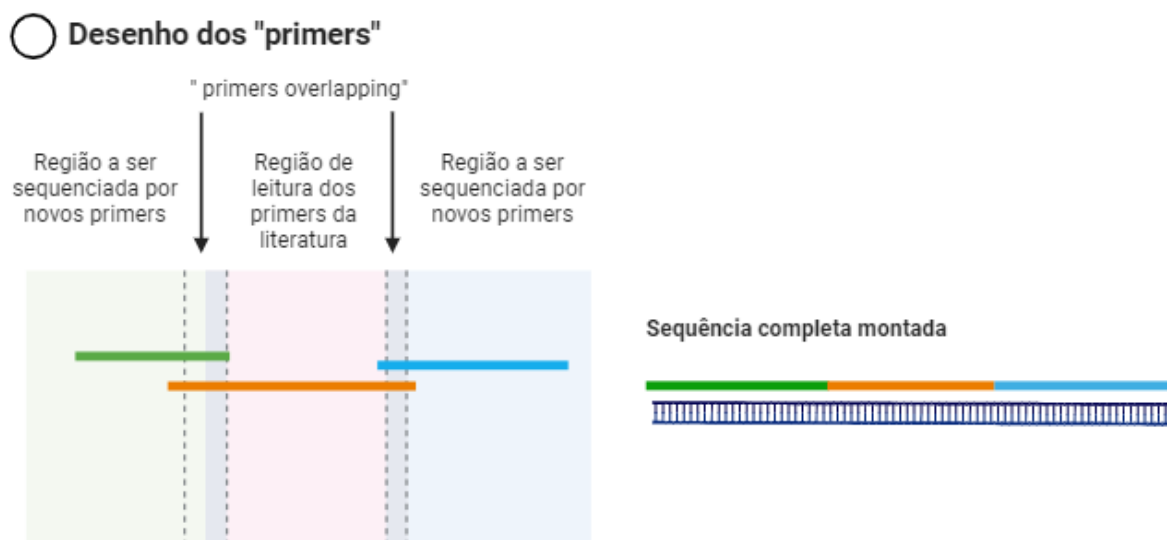


Figura 10. Desenhos esquemáticos da Construção dos primers.

Dessa forma, foram desenhados 4 pares de *primers* (um par para cada cluster formado na árvore filogenética do sequenciamento parcial, projetados para serem usados em conjunto com os *primers* genéricos da literatura no sequenciamento.

Assim, foram desenhados as sequências de *primers* a seguir:

Quadro 4. Sequências de *primers* visando o sequenciamento completo da VP7 das amostras estudadas.

Sorotipo Alvo	Primer	Sequência de Primer para sequenciamento	Posição Nucleotídeo e Sequência referência
VLA-18, VLA-22 E VLA-24	VLA18_22_24_VP7_F	5'-GTGTTCTATATATCTATGG-3'	761 a 779 (395pb) [MW536504.1]
	VLA18_22_24_VP7_R	3'-GAAGTCTCTCCAGTAACAC-5'	293 a 316 (316pb) [MW536504.1]
VLA-3 E VLA-14	VLA3_14_VP7_F	5'-GGTACAAATTCAAGTAGT-3'	745 a 762 (411pb) [MW536503.1]
	VLA3_14_VP7_R	3'-GAAGTCTCTCCAGTAACAC-5'	351 a 369 (369pb) [MW536503.1]

VLA-19	VLA19_VP7_732F	5'- GGCGAACGCAATGATTCAA- 3'	732 a 751 (424pb) [MW536505.1]
	VLA19_VP7_324R	5'- CCTCATTCGCACATTCAGTG- 3'	304 a 324 (324pb) [MW536505.1]
VLA-Y	VLAY_VP7_709F	5'- CTTAACGTTTCATAATCCGAC- 3'	709 a 729 (447pb) [MW536508.1]
	VLAY_VP7_347R	5'- GCGACTTCATTAGCGCACTC- 3'	327 a 347 (347pb) [MW536508.1]

Dessa forma, para obtenção da sequência completa do Seg-7 desses isolados, 6,5 uL do mesmo *amplicon* da PCR com os *primers* descritos na Tabela 04 foi enviado para sequenciamento Sanger (empresa Myleus) na concentração de 40 ng de cDNA associado aos *primers* desenvolvidos para cada sorotipo do vírus (Quadro 4).

4.10 Montagem e análise filogenética do Seg-7 completo

Os produtos do sequenciamento Sanger tiveram sua qualidade avaliada pelo aplicativo TRIMMOPATIC®, bem como realizada a remoção de adaptadores e leituras de baixa qualidade. Então as sequências foram comparadas com sequências referência de mesmo sorotipo de forma a remover qualquer resquício do processamento e sequenciamento que não fossem fragmentos virais. Essa análise foi realizada via programação desenvolvida pelo Laboratório de Bioinformática do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, liderado pelo Profº João Cunha.

As sequências e metadados de VLA a serem comparadas com nossas amostras foram recuperadas via BTV-GLUE®. Apenas as sequências que tinham mais de 1150 nucleotídeos foram adicionadas. Foram comparadas 535 sequências do Seg-7 completos, correspondendo a quatro sequências geradas neste trabalho e 531 sequências obtidas do banco de dados público.

O alinhamento assim como o estudo de filogenia foi realizado utilizando o programa MAFFT® (Katoh e Standley, 2013), com os parâmetros: maxiterate 1000 (1000 interações de alinhamento), por Máxima Verossimilhança por modelo Tamura-nei (GOLENDER et al., 2023).

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Amplificação viral

Após incubação por até 72 horas (entre 48 e 72 horas) as garrafas com monocamada celular inoculadas com os diferentes isolados de VLA apresentaram efeito citopático (ECP) viral característico (Figura 11), como arredondamento celular, formação de sincícios, agrupamento de células, morte e lise celular, como já descrito por outros autores (Wechsler & Mcholland, 1988; OIE, 2023).

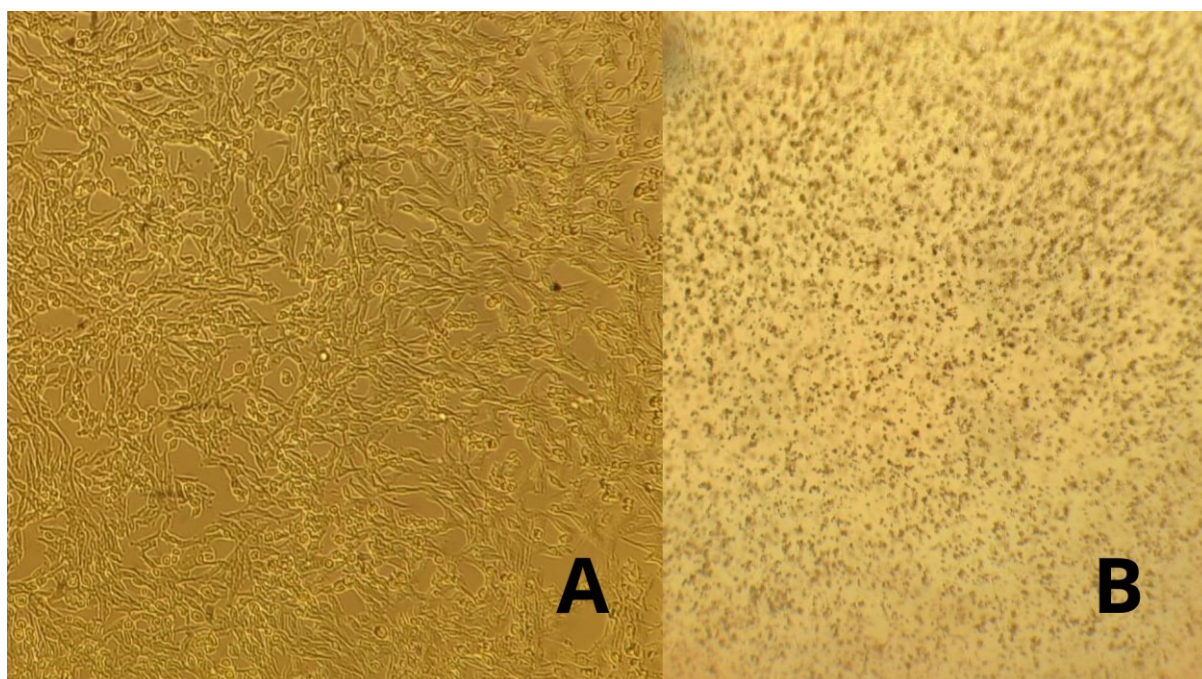


Figura 11. Multiplicação viral em célula BHK-21 (Baby Hamster Kidney ATCC CCL-10). À esquerda (A), Controle negativo de inoculação de VLA em BHK-21. À direita (B), foto de garrafa com 100% de efeito citopático de VLA-3 após 48 horas de infecção.

5.2 Extração Viral

O pellet celular dos isolados de VLA amplificados em cultivo celular de BHK-21 foram extraídos com objetivo de obter o dsRNA dos diferentes sorotipos de VLA. Os mesmos apresentaram formação de bandas como o esperado para o protocolo, como mostra a figura 12 (Attoui et al., 2000).

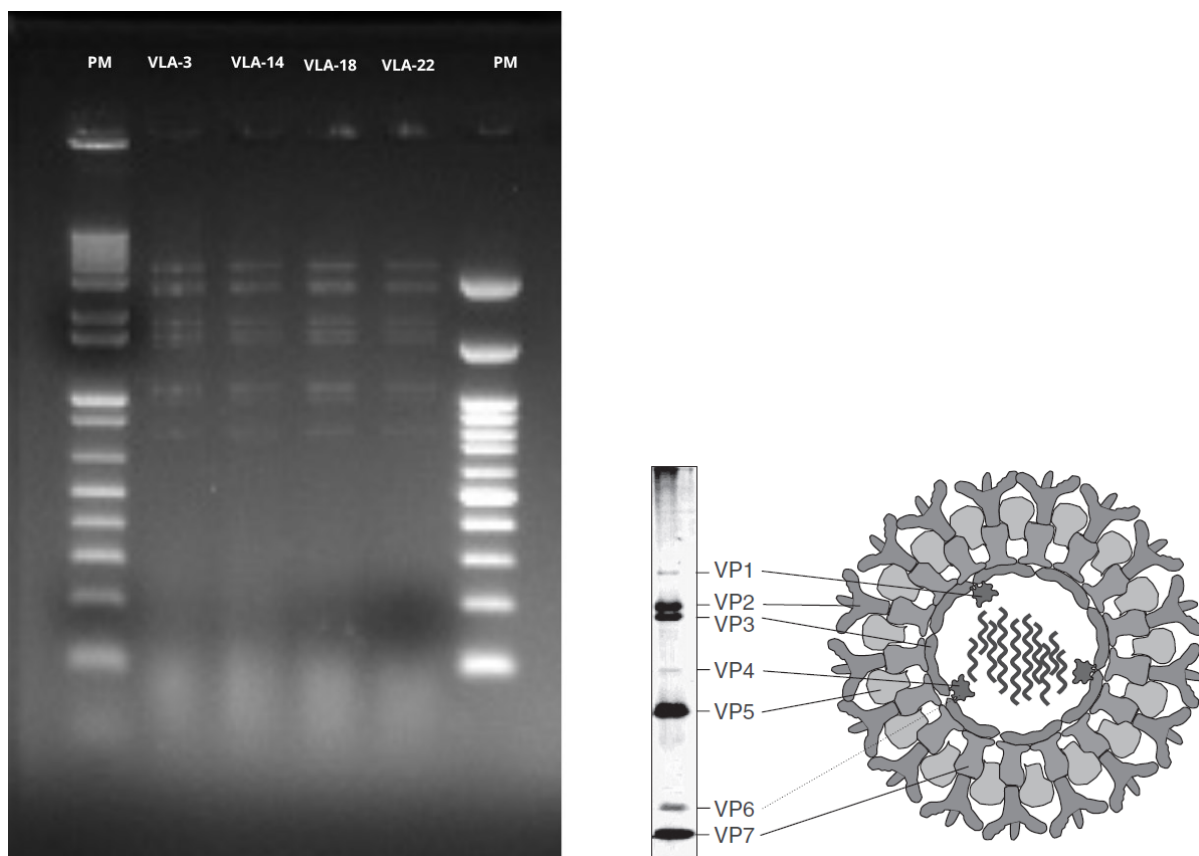


Figura 12. Extração do dsRNA dos vírus isolados em BHK-21 com Trizol Reagent (Sigma-Aldrich). Imagem de Gel de agarose demonstrando as proteínas do VLA e à direita, esquema da estrutura da partícula do vírus da língua azul (VLA) (Noad & Roy, 2009). Padrão Molecular (PM) em Caneletas 1 e 6. Amostras de Vírus isolados em célula de mamífero (BHK-21) nas canaletas de 2 -5, sendo dsRNA do VLA-3 em canaleta 2, dsRNA do VLA-14 em canaleta 3, dsRNA do VLA-18 em canaleta 4 e dsRNA do VLA-22 em canaleta 5.

5.3 RT-PCR

Os dsRNA extraídos e submetidos à reação de RT-PCR utilizando os *primers* descritos na literatura (Anthony et al., 2007 e Bréard et al. 2003) apresentaram amplificação com tamanho molecular esperado de 1156pb em eletroforese em Gel de agarose (Figuras 13 e 14). Os isolados de sorotipos 3, 14, 18, 22 e 24 amplificaram com o par de *primers* VLA/S7/01” e “VLA/S7/02. Os isolados VLA-19 e “VLA-Y” amplificaram com o conjunto de *primers* VLA/S7/03” e “VLA/S7/04.

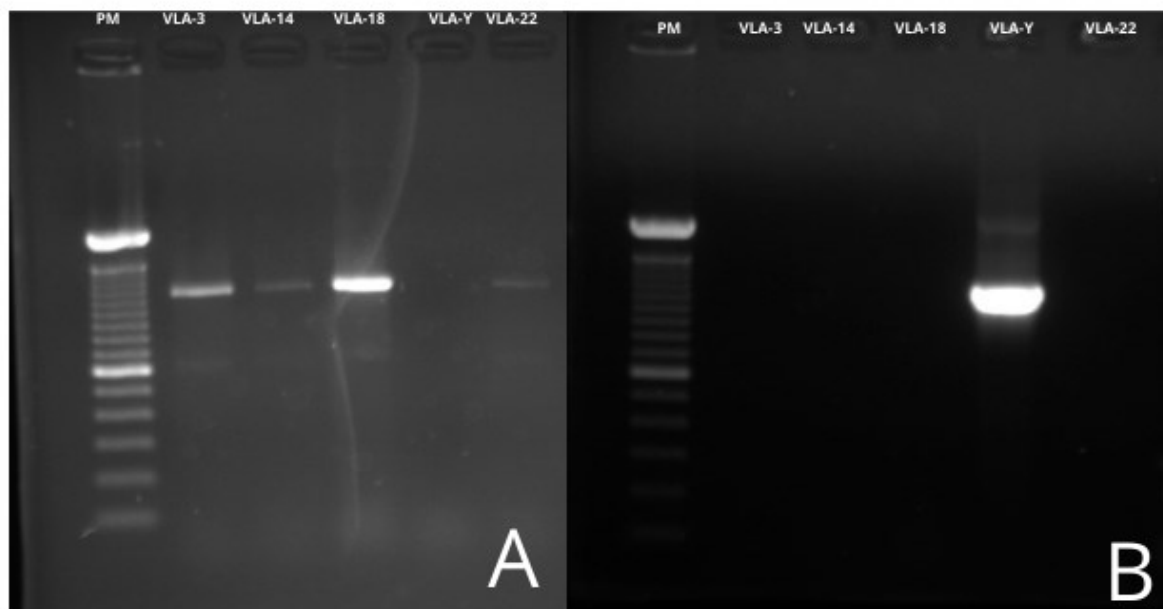


Figura 13. Gel de agarose revelando RT-PCR dos isolados de VLA sorotipos 3,14,18 Y e 22 com alvo para a região codificadora do Seg 7 do vírus, utilizando os primers dispostos na literatura (Bread et al, 2003 e Anthony et al., 2007). No gel A, à esquerda, estão dispostas as amostras de VLA de sorotipos 3,14,18, Y e 22 amplificadas com o conjunto de primers “VLA/S7/01” e “VLA/S7/02”, respectivamente em canaletas de 2-6. No gel B, à direita, estão dispostas as mesmas amostras em mesma sequência de aplicação, respectivamente em canaletas de 2-6, amplificadas com os “primers” “VLA/S7/03” e “VLA/S7/04”. Padrão molecular (PM) disposto em canaleta 1 em ambos os géis.

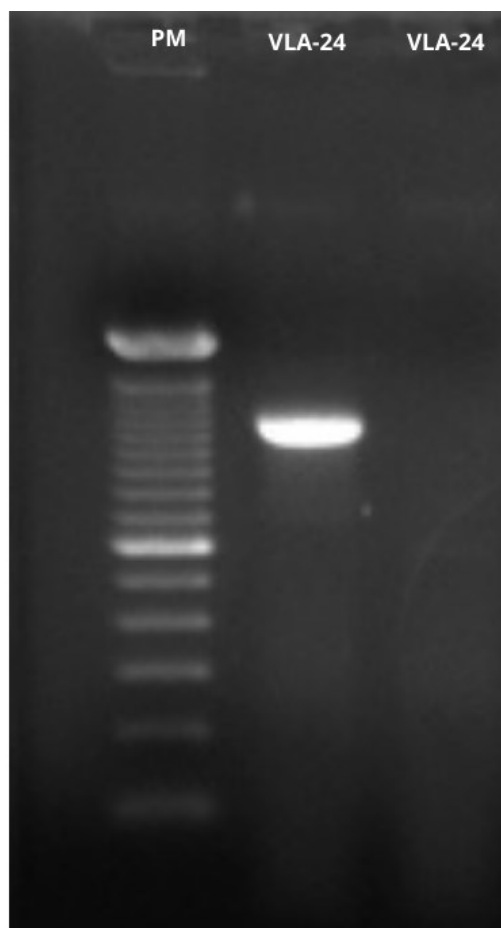


Figura 14. Gel de agarose revelando RT-PCR do isolado VLA-24 com alvo para a região codificadora do Seg 7 do vírus, utilizando os “primers” dispostos na literatura (Bread et al, 2003 e Anthony et al., 2007). Gel de agarose em que o VLA-24 apresenta banda referente à amplificação com o conjunto de “primers” “VLA/S7/01” (canaleta 2) e “VLA/S7/02” à esquerda e com “primers” “VLA/S7/03” e “VLA/S7/04” à direita (canaleta 3). Padrão molecular (PM) disposto em canaleta 1.

Os “*primers*” projetados por Breard e colaboradores em 2003 para amplificar o Seg- 7 do genoma de VLA representam versões estendidas de *primers* originalmente projetadas por Wade-evans et al. em 1990. Um segundo par de primer (VLA/S7/03 e VLA/S7/04) foi projetado por Anthony e colaboradores com base nas sequências terminais de VLA dos sorotipos 7, 15 e 19, que não conseguiram amplificar com o primeiro conjunto de *primers*.

Em estudos anteriores, as amostras amplificadas com esses *primers* formavam clados diferentes em análises filogenéticas. As amostras quando amplificadas com os “*primers*” “VLA/S7/01” e “VLA/S7/02” se agrupavam com amostras de origem ocidental e as amostras que anteriormente amplificaram com os “*primers*” “VLA/S7/03” e “VLA/S7/04” comumente se alinhavam à amostras de origem oriental.

5.4 Sequenciamento

5.4.1 Sequenciamento parcial

A proteína VP7, que é codificada pelo Seg-7 de VLA, é responsável pela ligação do vírus às células de vetores e por isso, as análises filogenéticas desse segmento permitem que sejam observadas algumas variabilidades na capacidade vetorial, ou seja, podem refletir especificidade da célula hospedeira, logo, diferentes espécies de *Culicoides* sp são capazes de transmitir VLA dependendo de sua localização geográfica (Maan et al, 2009).

Assim, o Seg-7 de VLA apresenta diferenças nas sequências de nucleotídeos mediante a localização dos isolados, fazendo com que esses fossem classificados em topotipos oriental e ocidental. Embora o mais comum seja a divisão dos isolados em seis agrupamentos distintos, já foram relatados grupos adicionais de Seg-7 (Anthony et al., 2007; Maan et al., 2008; Wilson et al., 2000).

Em 2000, Wilson e colaboradores verificaram que há uma correlação geográfica quando se analisa o Seg-7 de diferentes isolados. Acontece por meio do padrão de divisão dos isolados de Seg-7 de VLA em pelo menos seis agrupamentos “Leste-Oeste”, em que três agrupamentos possuíam apenas vírus de origem oriental e três origem ocidental, salvo algumas exceções, como é o caso de um isolado chinês que mais tarde foi associado a um agrupamento ocidental devido introdução do vírus no país (Maan et al., 2008).

As amostras de Seg-7 parcialmente sequenciadas neste presente estudo se separam em 4 agrupamentos de similaridade distintos (Figura 15).

Os isolados VLA-3 e VLA-14 se agruparam intimamente com VLA-3 oriundo de Barbados [KY092011.1] e isolado de VLA-14 da República de Trinidad e Tobago [KY092033.1]. Também se agrupam com menor similaridade mas ainda no mesmo “cluster” com amostras de VLA de diferentes sorotipos oriundas dos Estados Unidos da América (EUA) [KY092018.1], [KY092020.1], [KY092021.1], [KY092017.1]; [GQ506542.1].

As sequências parciais de VLA dos sorotipos 18, 22 e 24 alinham com amostras brasileiras que infectaram animais de produção, pertencentes aos sorotipos 10, 18, 24 e um VLA não sorotipificado, todos oriundos do banco de dados do Laboratório de pesquisa em Virologia Animal da Escola de Veterinária da UFMG (Dados não publicados). Essas sequências também se alinham com uma amostra brasileira de sorotipo 12 [AY263377.1] também isolada em animal de produção; Amostras da Argentina de sorotipo 4 [JX024958.1],

JX024943.1],[JX024953.1] e VLA-2 isolados nos Estados Unidos da América EUA [KF966509.1] e [KF986505.1].

O isolado de VLA-19 se alinhou intimamente com uma amostra de VLA-19 isolada na Flórida [KX164135.1]. Nesse mesmo “*cluster*” também se agrupam isolados de referência da África do Sul (RSArrrr) de sorotipos 7 [MN710268.1], 8 [KP821680.1] e 19 [DQ465028.1].

O isolado VLA-Y se agrupou intimamente com amostras de VLA-15, entre elas estavam a sequência referência da África do Sul [DQ465027.1] e uma sequência de VLA-15 que foi isolado em alpaca em Israel [KP821702.1].

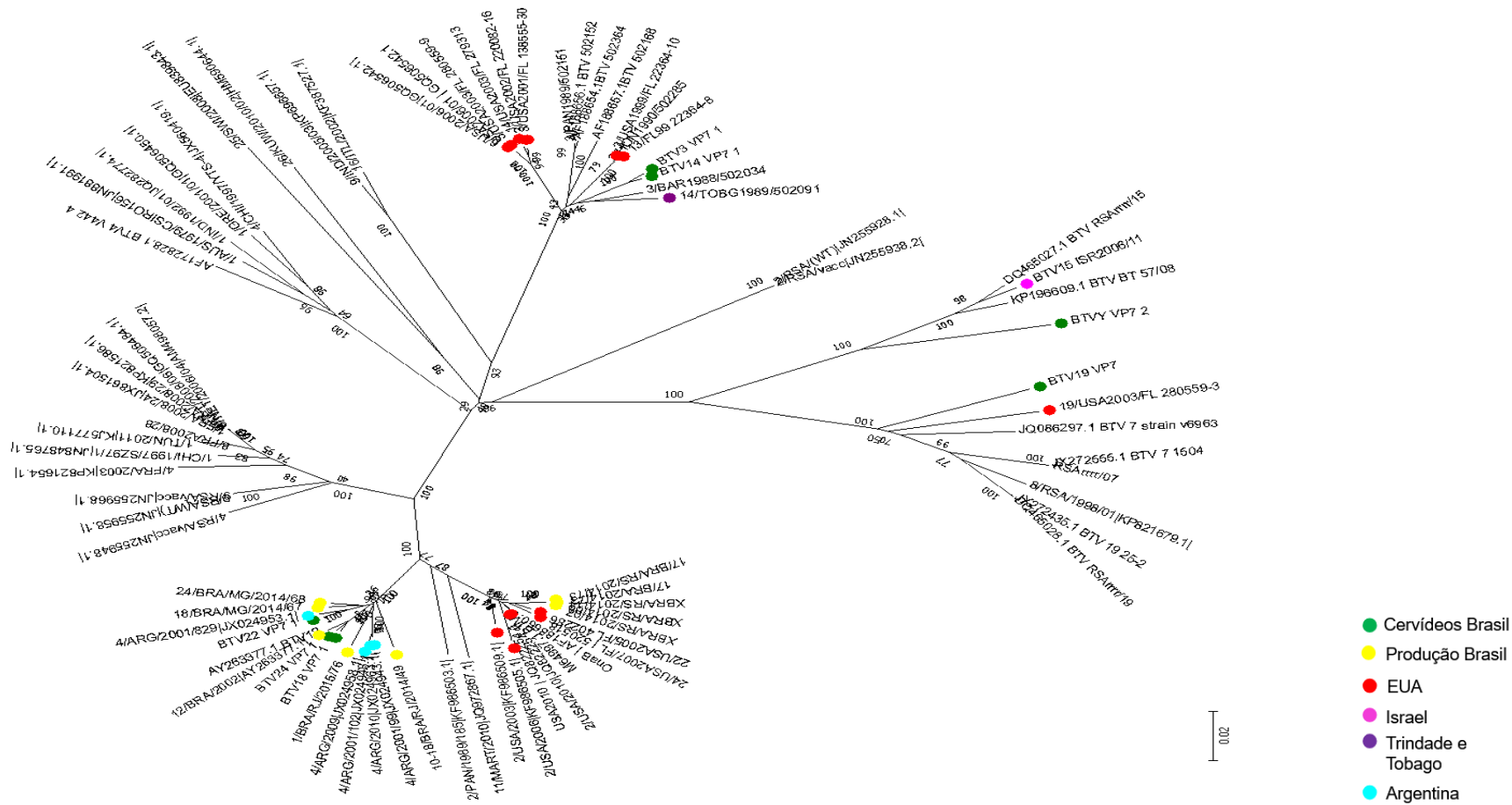


Figura 15. Árvore filogenética construída pelo método “neighbor joining (NJ)” com “bootstrap” de 1000 em MEGA6, baseada na sequência parcial do Seg-7 (VP7) das amostras brasileiras comparada com as sequências de Seg-7 das amostras GenBank. Em amarelo e verde estão destacadas as amostras brasileiras, em vermelho as estado-unidenses, em azul as da Argentina, em rosa o isolado de Israel e em Roxo a amostra de Trinidad e Tobago.

Os isolados VLA-18, VLA-22 e VLA-24 que se agrupam com amostras argentinas e brasileiras apresentaram resultados compatíveis com o esperado, já que o local de origem dos isolamentos (Foz do Iguaçu/PR) é uma região de fronteira com a Argentina. No VLA Glue, todas as sequências de Seg-7 de VLA da Argentina correspondem ao sorotipo 4 (Figura 16). Neste local, estudos relacionando ruminantes silvestres como llhamas, guanacos, vicunhas e veados-pampeanos de vida livre apresentaram resultados negativos para presença de VLA (Karesh et al., 1998; Leoni et al., 2001; Puntek et al., 1999; mas no Peru uma alpaca foi infectada (Rivera et al., 1987).

A Argentina conduziu um programa de vigilância epidemiológica para VLA a partir de um projeto de monitoramento de animais sentinelas no período de 1999 a 2001 nos Departamentos de Santo Tomé e Ituzaingó da Província de Corrientes. Apesar de surtos de *VLA* serem raros na América do Sul, há evidências de circulação do vírus no continente desde o início da colonização. Os isolados argentinos de *VLA4* compartilham uma relação próxima com cepas circulantes no Mediterrâneo, sugerindo uma origem africana.

Sequences 1 to 6 of 6

GenBank Accession	Segment	Length	Complete Segment?	GenBank Creation Date	GenBank Last Update Date	Isolate	Host Species	Country of Origin	Collection Year
JX024940	2	2917	Yes	25-Nov-2012	04-Mar-2013	4/ARG/2001/99	-	Argentina (ARG)	1999
JX024945	2	2914	Yes	25-Nov-2012	04-Mar-2013	4/ARG/2001/102	-	Argentina (ARG)	1999
JX024950	2	2917	Yes	25-Nov-2012	04-Mar-2013	4/ARG/2001/829	-	Argentina (ARG)	1999
JX024955	2	2917	Yes	25-Nov-2012	04-Mar-2013	4/ARG/2009	-	Argentina (ARG)	2009
JX024960	2	2916	Yes	25-Nov-2012	04-Mar-2013	4/ARG/2010	-	Argentina (ARG)	2010
AJ585169	2	2926	Yes	27-Nov-2006	09-Aug-2016	ARG2002/01	-	Argentina (ARG)	2002

Figura 16. Print de tela das sequências de VLA argentinos disponíveis no VLA Glue (VLA Glue, 2024).

Entretanto, afirmações mais profundas sobre a causa dessas particularidades dos isolados brasileiros e sua proximidade com outras amostras precisou ser mais profundamente estudado. Esses resultados das análises dos segmentos parciais serviram apenas como um norteamento, já que se tratava de uma análise preliminar com poucas sequências escolhidas estrategicamente, de modo que podem não representar a realidade. Por isso, decidimos avançar na tentativa de obter a sequência completa do Seg-7 dos nossos isolados e compará-los com um número maior de amostras e utilizar métodos mais robustos de bioinformática.

5.4.2 Sequenciamento completo

O sequenciamento Sanger utilizando a associação dos *primers* disponíveis na literatura (Anthony et al., 2007; Bréard et al. 2003) e dos *primers* desenvolvidos no presente trabalho (Quadro 4) permitiu que conseguíssemos obter e depositar no *Genbank* seis sequências completas da região codificadora (CDS) do Seg 7 do VLA dos sorotipos 3[MW536503.1], 18 [MW536504.1], 19 [MW536505.1], 22 [MW536506.1], 24 [MW536507.1] e um isolado não sorotipificado denominado VLA-Y/VLA-Y [MW536508.1].

A partir do nosso depósito no Genbank, o número de amostras brasileiras disponíveis à acesso público passa a totalizar oito amostras. Na América do Sul, estão disponíveis até o momento apenas 12 sequências de Seg-7 de VLA identificadas nesta região, sendo dois isolados brasileiros (Figura 17). Portanto, podendo contribuir no auxílio à comunidade científica no estudo do VLA e entendimento dos seus diferentes aspectos relacionados à biologia e evolução.

Sequences 1 to 12 of 12

GenBank Accession	Segment	Length	Complete Segment?	GenBank Creation Date	GenBank Last Update Date	Isolate	Host Species	Country of Origin	Collection Year
MH049546	7	991	No	12-Dec-2018	12-Dec-2018	Ov7	-	Peru (PER)	2017
MH049547	7	886	No	12-Dec-2018	12-Dec-2018	C1N	-	Peru (PER)	2017
KY049868	7	1156	Yes	22-Feb-2017	22-Feb-2017	BTV-9/15-1(7)	-	Ecuador (ECU)	2015
KY049877	7	1156	Yes	22-Feb-2017	22-Feb-2017	BTV-13/15-1(6)	-	Ecuador (ECU)	2015
KY049886	7	1156	Yes	22-Feb-2017	22-Feb-2017	BTV-18/15-1(58)	-	Ecuador (ECU)	2015
KX599365	7	1156	Yes	03-Sep-2016	03-Sep-2016	17/BRA/2014/73	-	Brazil (BRA)	2014
JX024943	7	1146	Yes	25-Nov-2012	04-Mar-2013	4/ARG/2001/99	-	Argentina (ARG)	1999
JX024948	7	1146	Yes	25-Nov-2012	04-Mar-2013	4/ARG/2001/102	-	Argentina (ARG)	1999
JX024953	7	1146	Yes	25-Nov-2012	04-Mar-2013	4/ARG/2001/829	-	Argentina (ARG)	1999
JX024958	7	1146	Yes	25-Nov-2012	04-Mar-2013	4/ARG/2009	-	Argentina (ARG)	2009
JX024963	7	1146	Yes	25-Nov-2012	04-Mar-2013	4/ARG/2010	-	Argentina (ARG)	2010
AY263377	7	1162	Yes	29-Apr-2003	29-Apr-2003	Unlabelled_AY263377	-	Brazil (BRA)	-

Figura 17. Print de tela das sequências sul-americanas disponíveis no VLA glue. (BTV- Glue, 2024)

Ao alinhar as nossas sequências de amostras brasileiras com sequenciamento completo da região codificadora de Seg-7 do vírus VLA, oriundas de surtos entre 2015 e 2017 no RBV - ITAIPU acometendo cervídeos com status de vulnerabilidade, e compará-las a outros isolados disponíveis no GenBank®, em plataforma *NCBI BLAST® Blastn suite*, percebemos que nossos isolados mantiveram a estimativa de similaridade produzida nos *clusters* da análise preliminar das sequências parciais de Seg-7. Ou seja, alguns isolados brasileiros se apresentaram com alta similaridade entre si e com outras sequência ocidentais, o que era esperado devido à

proximidade geográfica. Entretanto, o isolado VLA-Y [MW536508.1] apresentou divergência de até 30% comparado com amostras brasileiras e argentinas (Quadro 5) e expressou similaridade de 90% com uma sequência de VLA- 15 da África do Sul (amostra de referência - RSArrr) [DQ465027.1] e 89% com um isolado de VLA-15 oriundo de Israel [KP821702.1].

Quadro 5. Estimativa de Similiaridade entre as sequências da análise de Seg-7.

Amostras Estudadas	Maior similaridade	Menor similaridade
VLA-3 [MW536503.1]	VLA-3 Barbados [KY092011.1] (96%)	VLA-15 China [MH346497.1] (70%)
VLA-18 [MW536504.1]	VLA- 12 Brasil [AY263377.1] e VLA-24 Brasil [MW536507.1] (99%)	VLA-Y Brasil [MW536508.1] (71%)
VLA-19 [MW536505.1]	VLA-19 Flórida [KX164135.1] (91%)	VLA-3 Brasil[MW536503.1] e VLA-13 Flórida [AY855283.1] (71%)
VLA-22 [MW536506.1]	VLA-4 Argentina [JX024953.1] (98%)	VLA-Y Brasil [MW536508.1] (71%)
VLA-24 [MW536507.1]	VLA- 12 Brasil [AY263377.1] (99%)	VLA-Y Brasil [MW536508.1] (71%)
VLA-Y [MW536508.1]	VLA- 15 RSArrr [DQ465027.1] (90%) e VLA-15 Israel [KP821702.1] (89%)	VLA-4 Argentina [JX024953.1], VLA- 12 Brasil [AY263377.1] (70%)

(Análise “Parwise” - NCBI BLAST® Blastn suite, 2024)

Estudos de epidemiologia molecular permitem comparar sequências genéticas de isolados novos com cepas existentes, identificando sorotipos e topótipos, além de linhagens específicas e cepas recombinantes. As variações nas sequências de RNA podem ser detectadas até dentro de um único surto de VLA ou de isolados de um mesmo local em momento diferentes, como o que aconteceu no Refúgio Biológico Bela Vista. Essa característica permite rastrear a propagação espacial e temporal dos vírus, uma tarefa impossível com ensaios sorológicos convencionais. Esses estudos dependem de bases de dados de sequências de isolados virais, cujos dados são mantidos em coleções de referência de longo prazo, como a coleção VLA no IAH Pirbright, permitindo a correlação das sequências com informações biológicas e epidemiológicas dos vírus. Entre as sequências de *VLA* disponíveis no *VLA Glue*,

há 668 sequências do Seg-7. Entre elas, 648 com seguimento completo do vírus e poucas delas provenientes da América do Sul, até o momento.

A falta de informações sobre a variabilidade genética do Seg-7 das amostras sul-americanas revela um entrave para o entendimento da biologia e epidemiologia da VLA nessa região. Já que é sabido que as estirpes de VLA apresentam variações genéticas nos segmentos de seu genoma dsRNA, que refletem suas origens geográficas. Essas variações dividem os vírus em dois grupos principais: "oriental", que inclui isolados do Oriente Médio, Extremo Oriente, subcontinente indiano, Austrália, China e Malásia, e "ocidental", que inclui vírus da África e das Américas (Maan et al., 2009).

A RNA polimerase do VLA tem uma "taxa de erro" que introduz mutações durante a replicação viral. Essas mutações podem se fixar na população viral, e a separação geográfica contribui para a acumulação de mutações regionais. Isso levou ao surgimento de variantes regionais distintas, com uma divergência significativa entre os vírus orientais e ocidentais, sugerindo um longo período de separação (Maan et al., 2009).

Embora os processos de mutação e *reassortment* apresentem papel fundamental na variabilidade genética do VLA, as diferenças de agrupamentos correlacionados à localização geográfica também recebem influencia de causas multifatoriais. Isso porque cada localização terá suas particularidades relacionadas ao ecossistema que possui, clima e hospedeiros disponíveis para contribuir com o sucesso evolutivo do vírus.

A vigilância epidemiológica molecular do VLA é crucial para o controle da doença, permitindo a identificação de sorotipos e variantes genéticas, a detecção precoce de surtos, o monitoramento da evolução do vírus e dos vetores transmissores, e a prevenção de sua disseminação para novas áreas. Além disso, ela apoia o desenvolvimento de vacinas eficazes, garantindo a sanidade de rebanhos comerciais e da vida selvagem (Balara et al., 2017). Ainda, pode fornecer dados essenciais para políticas públicas e estratégias de controle. Isso contribui para a proteção do setor agropecuário e a preservação da fauna brasileira.

Ao compararmos as nossas amostras brasileiras com sequenciamento completo de Seg-7 do vírus VLA a outras sequências de Seg-7 de VLA disponíveis na plataforma BTV-GLUE®, que organiza as sequências de VLA e seus metadados presentes no GenBank®, pudemos obter mais de seis agrupamentos formados na árvore filogenética (Figura 19).

A identificação das amostras nas figuras 19 a 22 seguiu a ordem: Número de depósito no *Genbank*, genogrupo, sigla do país de origem da amostra, ano de identificação e espécie

hospedeira. Os isolados alvo deste presente estudo foram identificados como “Seg7 VLA - sorotipo”, como por exemplo: “Seg7 VLA-3”.

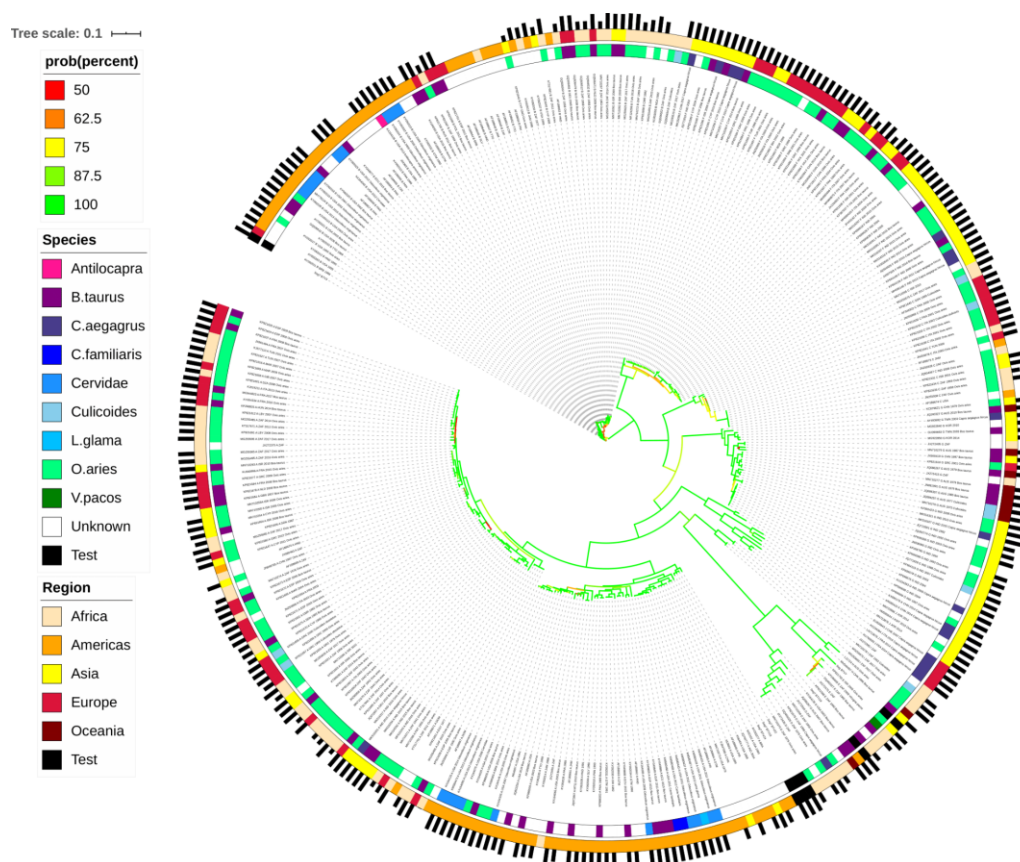


Figura 18. Árvore filogenética construída pelo método de Máxima Verossimilhança (com 1000 interações de alinhamento), baseada na comparação entre as sequências completas da região codificadora do Seg-7 (VP7) de amostras brasileiras e amostras disponíveis no “VLA GLUE”. As barras pretas mais externas na figura representam o ano de identificação, em que quanto maior a barra, mais recente foi a obtenção da sequência. As regiões de origem dos isolados foram marcadas com cores por continente de acordo com legenda à esquerda da figura. Algumas espécies hospedeiras de interesse também foram marcadas com cores de acordo com legenda à esquerda.

Tree scale: 0.1

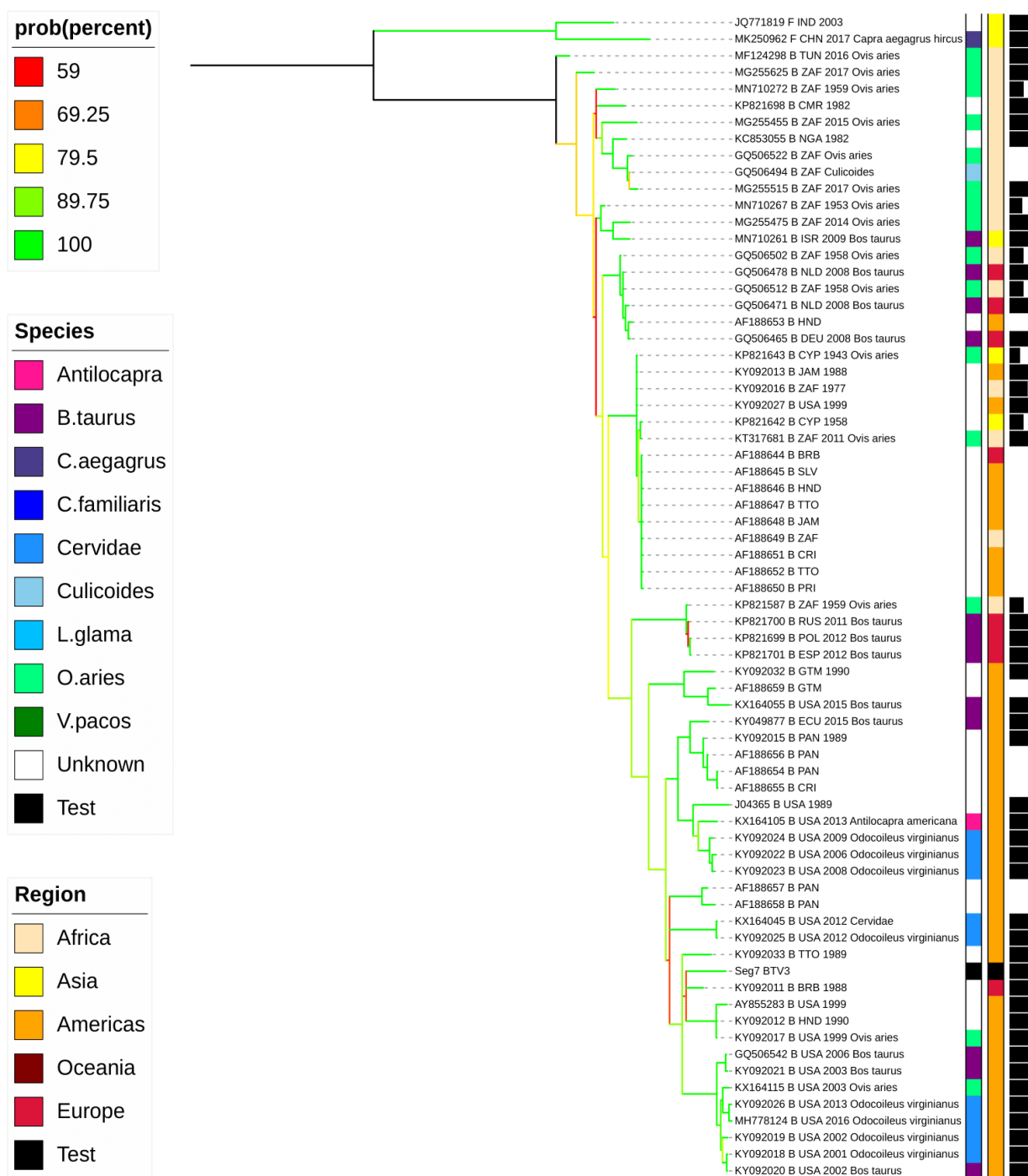


Figura 19. “Cluster” de alinhamento do VLA-3 em árvore filogenética construída pelo método de Máxima Verossimilhança (com 1000 interações de alinhamento), baseada na comparação entre as sequências completas da região codificadora do Seg-7 (VP7) de amostras brasileiras e amostras disponíveis no “VLA GLUE”. As barras pretas à extrema direita na figura representam o ano de identificação, em que quanto maior a barra, mais recente foi a obtenção da sequência. As regiões de origem dos isolados foram marcadas com cores por continente de acordo com legenda à esquerda da figura. Algumas espécies hospedeiras de interesse também foram marcadas com cores de acordo com legenda à esquerda.

Tree scale: 0.1

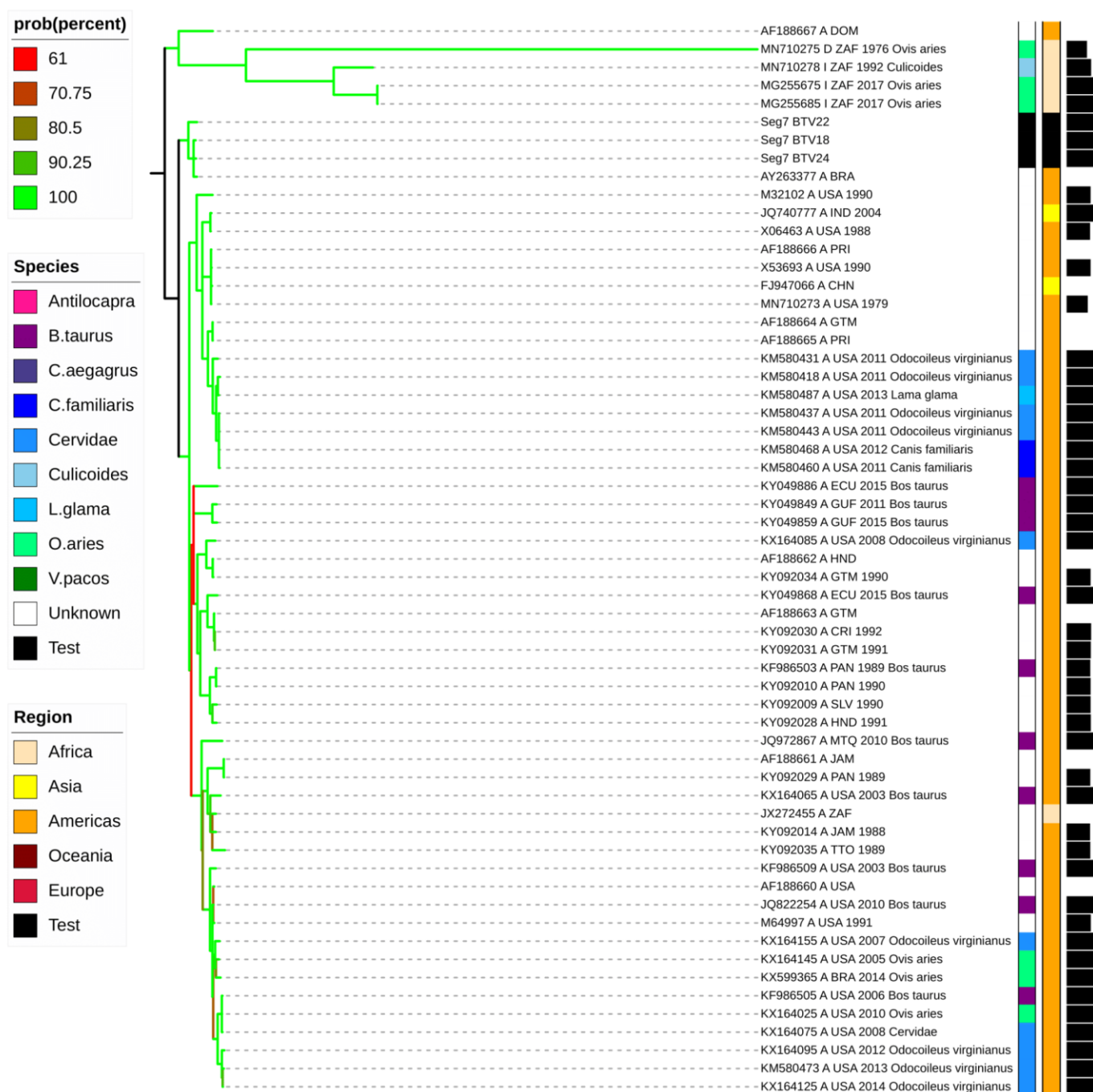


Figura 20. “Cluster” de alinhamento dos VLA de sorotipos 18, 22 e 24 em árvore filogenética construída pelo método de Máxima Verossimilhança (com 1000 interações de alinhamento), baseada na comparação entre as sequências completas da região codificadora do Seg-7 (VP7) de amostras brasileiras e amostras disponíveis no “VLA GLUE”. As barras pretas à extrema direita na figura representam o ano de identificação, em que quanto maior a barra, mais recente foi a obtenção da sequência. As regiões de origem dos isolados foram marcadas com cores por continente de acordo com legenda à esquerda da figura. Algumas espécies hospedeiras de interesse também foram marcadas com cores de acordo com legenda à esquerda.

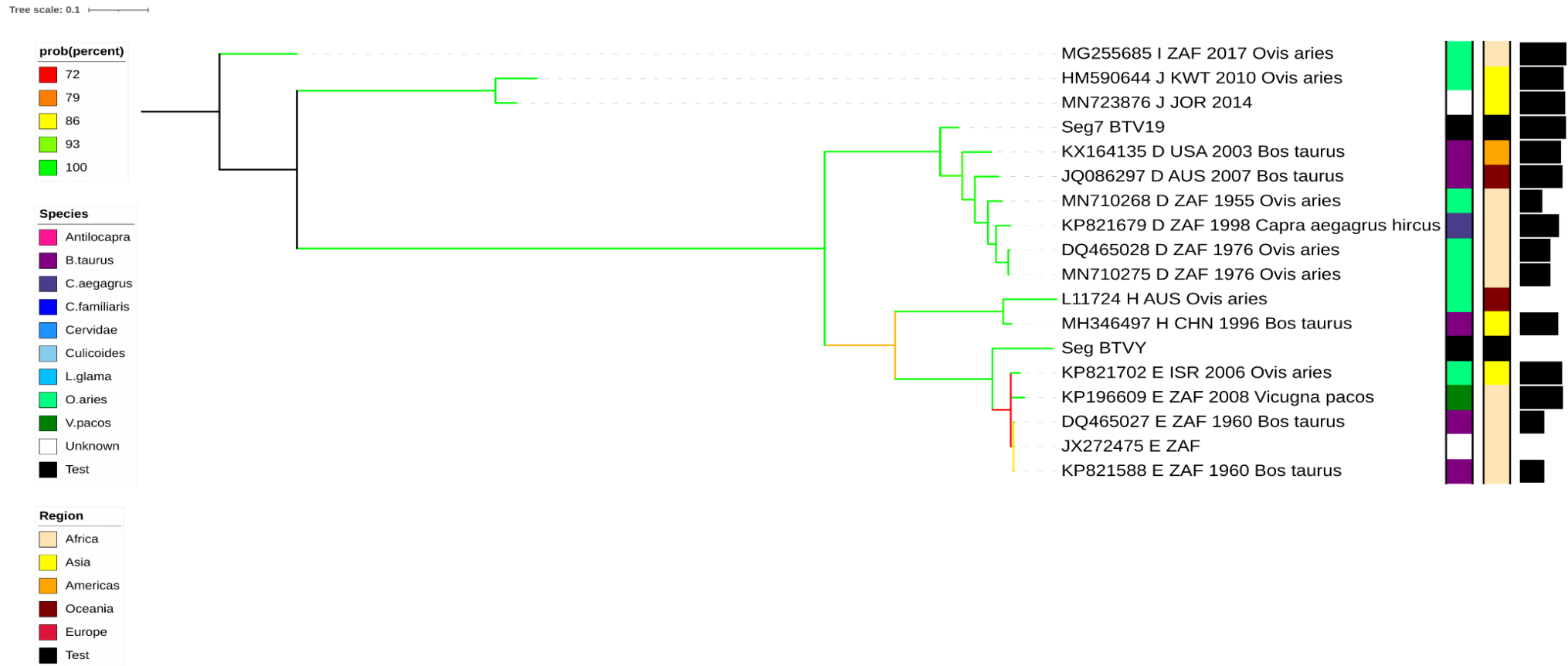


Figura 21. “Cluster” de alinhamento dos isolados VLA-Y e VLA-19, em árvore filogenética construída pelo método de Máxima Verossimilhança (com 1000 interações de alinhamento), baseada na comparação entre as sequências completas da região codificadora do Seg-7 (VP7) de amostras brasileiras e amostras disponíveis no “VLA GLUE”. As barras pretas à extrema direita na figura representam o ano de identificação, em que quanto maior a barra, mais recente foi a obtenção da sequência. As regiões de origem dos isolados foram marcadas com cores por continente de acordo com legenda à esquerda da figura. Algumas espécies hospedeiras de interesse também foram marcadas com cores de acordo com legenda à esquerda.

As sequências de Seg-7 podem ser classificadas por genogrupos mediante alterações pontuais nas sequências de nucleotídeos baseadas no distanciamento geográfico de suas origens. Os genogrupos são classificados em ordem alfabética de “A” a “K”. Nas Américas circulam os genogrupos “A” e “B” do Seg - 7. Na América do Norte, também circula o genogrupo “D” (BTV-GLUE®, 2024).

Estão disponíveis no BTV-GLUE® apenas isolados virais de genogrupo “A” e “B” que infectaram cervídeos. Entretanto, todos os isolados virais disponíveis infectaram animais com origem norte-americana. Logo, essa particularidade pode estar associada à escassez de dados e não propriamente à realidade. Colaborando com essa perspectiva, a árvore filogenética obtida (Figura 18) apresentou a divisão dos isolados brasileiros em genogrupos “A”, “B”, “D”, “E”.

O VLA-3 se agrupou com amostras de genogrupo “B” (Figuras 18 e 19), com alta similaridade a isolados de Barbados, Estados Unidos e Honduras que datam das décadas de 80 e 90, além de não possuírem hospedeiros identificados nos registros. Ainda, alinhou-se a amostras virais de VLA que infectaram cervídeos norte-americanos da espécie *Odocoileus virginianus* originárias do período entre 2001 e 2016.

Essa compatibilidade do VLA-3 com isolados oriundos de cervídeos é esperada, já que a família *Cervidae* é frequentemente associada a casos clínicos de VLA. No Brasil, em 1991, cervídeos no Zoológico do Rio de Janeiro foram afetados por uma doença hemorrágica e, em janeiro-fevereiro de 1992, a doença foi descrita em um rebanho de veados-mateiro (*Mazama gouazoubira*) no campus da Universidade Estadual Paulista (UNESP): Um dos quatro veados morreu. Novamente nesta instituição, seis veados-mateiro morreram em 1993. Ainda, estudos sorológicos indicaram anticorpos contra VLA ou um orbivírus relacionado (Cubas, 1996). Em julho de 1992, a doença foi documentada em um espécime de um veado-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) no Zoológico de Ilha Solteira no Brasil (Cubas, 1996).

A espécie de cervídeo nativo brasileiro envolvida no presente estudo, *Mazama nana*, têm status de vulnerável à extinção pela IUCN, dessa forma, caracterizando que a doença hemorrágica causadas por VLA tem sido um entrave para a conservação e manutenção desses animais em cativeiro, reafirmando a necessidade de serem feitos mais estudos acerca do tema (DUARTE, 2015).

As amostras VLA-18, VLA-22 e VLA-24 estão estreitamente relacionadas entre si e com a amostra brasileira de 2002 [AY263377] (Figuras 18 e 20). Estão também relacionadas ao genogrupo “A”. Nesse mesmo agrupamento que abriga os isolados de genogrupo “A”, também está o outro isolado brasileiro disponível até o momento: VLA-17 de 2016 [KX599365], entretanto com menor afinidade. Também estão relacionadas às amostras dos

Estados Unidos (1988 e 1990) e Índia (2004) cujos hospedeiros não foram identificados, bem como espécimes norte-americanos de cervídeos da espécie *Odocoileus virginianus* (2011); cão doméstico da espécie *Canis familiaris* (2011 e 2012); E Lhama da espécie *Lama glama* (2013).

A associação dos sorotipos 18, 22 e 24 aos outros isolados brasileiros disponíveis, sugere uma estabilidade em relação a esses sorotipos na região. Essa característica pode estar sendo promovida por um reservatório ambiental comum, visto que o primeiro relato de Seg-7 de VLA data de 2002. Essa possibilidade se faz notória e é considerada por Baldini e colaboradores em 2018 quando observa a existência de outros ungulados como Antas (*Tapirus terrestris*) e Cateto (*Pecari tajacari*) no RBV-ITAIPU. Entretanto, esse achado também pode ser resultado da carência de informações a respeito do Seg- 7 de VLA no Brasil.

A evolução do VLA é rápida, com mutações genéticas e “reassortment”, gerando diversidade viral, o que pode resultar no surgimento de novas cepas com características de virulência e transmissão distintas. As poucas amostras americanas disponíveis mostram evolução independente em comparação com os isolados do “Velho Mundo” (Legisa et al., 2021). Isso indica que muitos isolados recentes provêm de linhagens regionais.

Mas a hipótese de introdução contínua de estirpes virais de VLA não é descartada. A análise genética realizada por Legisa e colaboradores em 2021 sugere que quando as sequências americanas foram associadas às orientais, estavam intimamente relacionadas aos isolados africanos e europeus e foram agrupadas no topotipo ocidental, dessa forma sugeriu introdução do VLA à América a partir do continente africano via Caribe e América Central. Além disso, perceberam que alguns isolados dos EUA e indianos se agruparam em algumas árvores e sugeriram que poderia estar relacionado ao comércio de animais e movimentação de vetores. Entretanto, as conclusões decorrentes de análises genéticas na América do Sul devem ser tomadas com cautela em virtude da escassez de dados até o momento em relação a genomas completos.

Embora a América do Sul apresente condições favoráveis à manutenção do vetor (Maan et al., 2009) e o VLA esteja amplamente distribuído mundialmente com novos sorotipos emergentes (Ries et al., 2021), são escassas as informações acerca desse patógeno e de outros orbivirus na região, já que acontecem com base em detecções esporádicas e estudos isolados. Um cenário semelhante ocorreu na Europa antes dos surtos em grande escala nos anos 90 (Samy et al., 2016).

O VLA de sorotipo ainda não identificado, chamado de VLA-Y, agrupou com amostras de genogrupo “E” (Figuras 18 e 21), entre elas uma amostras de ovino de Israel de 2006

[KP821702], amostras de bovino oriundas da África do Sul de 1960 e amostra também da África do Sul mas de Alpaca da espécie *Vicugna pacos* do ano de 2008 [KP196609].

A partir de um mesmo agrupamento, se dividem os genogrupos “D”, “E” e “H” (Figuras 20 e 23). A amostra de VLA-19 está associada ao genogrupo “D” cujas amostras similares são advindas de bovinos dos Estados Unidos de 2003 e 2007, bem como amostras oriundas de ovinos da África do Sul (1955 e 1976) e uma cabra do mesmo local (1998). Além disso, também compartilha semelhanças com uma amostra australiana de bovino de 2007.

Nessa análise, esse agrupamento com amostras do genótipo “E” parece dividir um ancestral comum com um clado com amostras de VLA-15 do genótipo “H” como a amostra chinesa [MH346497] e a amostra australiana [L11724]. Entretanto, para confirmar essa ancestralidade, estudos mais robustos precisam ser realizados, já que a confiabilidade desse ramo é de 79% (Figura 23).

Wang e colaboradores em 1994 alertaram sobre as diferenças do Seg-7 e VP7 desse isolado australiano [L11724]. A evolução desse VLA-15 em relação a outros sorotipos levanta questões importantes e oferece dados úteis para o aprimoramento de testes sorológicos. VP7 é um antígeno chave, estimulando a resposta imune mediada por células B e, devido à presença de células T citotóxicas reativas em ovelhas, pode conter epítomos reconhecidos por células T. Entender melhor as propriedades do VP7 de diferentes sorotipos pode ajudar no desenvolvimento de vacinas eficazes contra o VLA.

O estudo de filogenia do Seg-7 de VLA se baseia em sua correlação com a origem geográfica das amostras uma vez que o segmento codifica uma proteína que está ligada a multiplicação do vírus no vetor (Maan et al, 2009). Assim sendo, espera-se que as sequências se dividam em grupos/topotipos 'orientais/leste' e 'ocidentais/oeste', embora já existam exceções conhecidas (Maan et al., 2007a; Maan et al, 2008; Mertens et al.,2007a).

O grupo ocidental inclui vírus da África e das Américas, enquanto o oriental inclui isolados do Oriente Médio e Extremo Oriente, Índia, Austrália, China e Malásia. Entretanto, em alguns casos esse padrão geográfico não se manteve, sugerindo introdução de uma cepa de vírus em um local diferente ao de sua circulação (Maan et al., 2009). Em vista disso, o alinhamento dos isolados VLA-19 e VLA-Y com amostras orientais como Austrália [L11724.1] e Israel [KP821702], respectivamente, é inesperado.

Na Austrália, *Culicoides brevitarsis* é identificado como o principal vetor de VLA no país. Vetores de outras espécies, como *C. wadai*, *C. actoni* e *C. fulvus*, foram identificadas como vetores potenciais, com níveis variados de competência na transmissão do vírus. Foi constatado via estudos genéticos que o *C. brevitarsis* se trata de uma espécie invasora na Austrália, com

origem na Ásia/Sudeste Asiático (Tay et al., 2016). Ainda, a multiplicação desse vetor está associada à presença de bovinos, uma vez que se reproduz em esterco de vaca, e é menos eficiente na transmissão do VLA para ovelhas (Standfast et al., 1985).

A distribuição dos vetores *Culicoides* é influenciada pela temperatura e precipitação pluviométrica. A atividade de *C. brevitarsis* cessa em baixas temperaturas (abaixo de 13,5 ° C) e retoma à medida que as temperaturas aumentam, com altas temperaturas (acima de 35 ° C) também afetando a distribuição. Esses limiares de temperatura sugerem mudanças potenciais na distribuição vetorial com o aquecimento global, potencialmente expandindo a atividade vetorial para o sul Austrália (Bispo et al., 2015)

A distribuição de espécies de *Culicoides* spp que transmitem VLA é ampla e varia significativamente entre diferentes regiões. As principais espécies incluem *C. sonorensis* na América do Norte, *C. insignis* na América do Sul, *C. obsoletus* e *C. scoticus* na Europa e *C. imicola* na África e Ásia. Fatores ambientais e atividades humanas desempenham papéis cruciais na formação de sua distribuição, impactando a epidemiologia da doença da língua azul globalmente. Nossos dados nos levantam o questionamento sobre a área de ocorrência das espécies de vetores competentes nos continentes e levanta a suspeita de haverem no Brasil espécies emergentes em relação ao montante populacional que possam estar contribuindo para o sucesso da manutenção da doença.

Ainda, tendo em vista a dimensão continental de nosso país e a ampla variedade de ecossistemas que permite a existência de um número vasto de possíveis vetores competentes, nossos resultados nos levam a refletir sobre a possibilidade da transmissão e perpetuação de estirpes virais exóticas que podem ter entrado no país via animais de produção durante às ondas de importação do passado. Haja visto que o primeiro relato de VLA no Brasil data de 1978 (Silva, 1978) e VLA só passou a ser uma doença de notificação obrigatória em 2013.

A afinidade dos isolados de sorotipos 18,22 e 24 com uma amostra indiana, embora pudesse estar associada à importação de bovinos, neste caso é justificada pois este isolado o qual nossas amostras apresentaram afinidade, tratava-se de uma estirpe vacinal norte-americana. Assim sendo, todas as amostras são originárias das Américas.

Embora referente a um período relativamente curto (2015-2017) e advindos da mesma origem, os isolados de VLA brasileiros se encaixam em diferentes genogrupos, sendo um genogrupo até então não associado às Américas. Além disso, circularam diferentes sorotipos na região do RBV- ITAIPU. Isso mostra o desafio ao qual esses animais são expostos, com alta variabilidade entre as estirpes circulantes.

A importação de animais pode estar envolvida com a introdução de sorotipos exóticos e com o aparecimento de surtos de LA. A introdução de bovinos e ovinos no Brasil remonta ao período colonial, intensificando-se no século XX com a importação de raças exóticas para fins produtivos (MEDEIROS NETO, 1970; TEIXEIRA; HESPANHOL, 2014). A falta de controle sanitário adequado em períodos anteriores facilitou a introdução e circulação de diversos patógenos no país, levando à necessidade de regulamentação da defesa sanitária animal, estabelecida oficialmente em 1934 (BRASIL, 1934). No entanto, foi apenas em 2013 que o VLA passou a integrar a lista de doenças de notificação obrigatória (BRASIL, 2013). A importação indiscriminada de animais de regiões endêmicas para VLA representa um risco significativo, pois pode ter introduzido novos sorotipos do vírus, comprometendo a fauna nativa e o setor pecuário nacional (LAGER, 2004; BALDINI et al., 2018). Soma-se a esses fatores a observação de que a doença clínica nos bovinos é extremamente rara para a maioria dos sorotipos do VLA e a viremia nessa espécie é prolongada, aumentando a possibilidade de introdução de novos sorotipos em áreas ou países, através da importação de animais vivos. O aumento da conectividade global e o comércio de animais vivos também intensificam esse risco, exigindo maior rigor na fiscalização sanitária para evitar surtos inesperados.

A evolução dos cervídeos na América do Sul está diretamente ligada à dinâmica ecológica do continente e pode influenciar a adaptação e diversificação do VLA. Os primeiros cervídeos surgiram na Ásia há aproximadamente 30 milhões de anos e, posteriormente, migraram para a América do Norte. Sua chegada à América do Sul ocorreu há cerca de 2,8 milhões de anos, após a formação do Istmo do Panamá, um evento que permitiu a dispersão de diversas espécies entre os continentes (O'DEA et al., 2016; STEHLI; WEBB, 1985). Atualmente, nove espécies de cervídeos reconhecidas no Brasil são consideradas vulneráveis à extinção devido à perda de habitat e doenças emergentes (ABREU et al., 2021; DUARTE et al., 2016).

Estudos recentes indicam que a evolução dos cervídeos pode estar associada à emergência e diversificação de diferentes sorotipos do VLA. Durante surtos ocorridos no Refúgio Biológico Bela Vista, Paraná, foi observada a infecção de cervídeos por múltiplos sorotipos do vírus, sugerindo que a exposição frequente a diferentes sorotipos pode ter impacto na imunidade e adaptação desses animais (BALDINI et al., 2018). Essa relação é preocupante, pois a fragmentação do habitat e a proximidade com rebanhos domésticos podem aumentar o contato entre cervídeos silvestres e mosquitos vetores, ampliando a disseminação do VLA. Vale ressaltar que os animais que vieram a óbito apresentaram doença aguda, de curso curto (até 10 dias), com alta mortalidade. Estudos sorológicos realizados ao longo dos anos nos cervídeos do

Refúgio, associados aos surtos que acontecem praticamente todos os anos, demonstram uma alta susceptibilidade da espécie *Mazama nana* ao VLA, sendo que a grande parte dos animais que adoecem morrem. Os animais que continuam vivos são na sua maioria soronegativos para o VLA, indicando que não foram infectados (dados não publicados).

Os cervídeos desempenham um papel ecológico fundamental, contribuindo para a regeneração da vegetação e manutenção da biodiversidade (BERNES et al., 2018). A sua extinção ou redução populacional devido a surtos de doenças hemorrágicas pode ter efeitos negativos na dinâmica dos ecossistemas florestais, comprometendo processos naturais como dispersão de sementes e equilíbrio populacional de outras espécies (ROSSI, 2000; DE OLIVEIRA et al., 2019). Dessa forma, além da vigilância sanitária voltada para a pecuária, é essencial manter as estratégias de conservação para proteger os cervídeos nativos e mitigar os impactos do VLA na fauna brasileira.

6 CONCLUSÃO

Concluimos que a maioria das amostras brasileiras sequenciadas no presente estudo se associaram a outras amostras ocidentais indicando esperada ligação geográfica entre elas e possível coevolução dos sorotipos virais acometendo cervídeos e as espécies de veados nativos brasileiros.

Os isolados VLA-19 e VLA-Y precisam de maiores estudos para compreender suas relações epidemiológicas, já que não seguiram esse padrão.

REFERÊNCIAS

- ABREU, Edson F.; CASALI, Daniel; COSTA-ARAÚJO, Rodrigo et al. Lista de Mamíferos do Brasil (2021-2) [Data set]. Zenodo, 2021. DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.5802047>. Acesso em: 27 nov. 2024.
- ABRIL, V. V.; VOGLIOTTI, A.; VARELA, D. M.; DUARTE, J. M. B.; CARTES, J. L. In: DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S. (orgs.). Neotropical cervidology: Biology and medicine of Latin American deer. Jaboticabal, Brasil: Funep; Gland, Suíça: IUCN, 2010. p. 160-165.
- ADAS, Melhem. Panorama Geográfico do Brasil. São Paulo: Moderna, 1983.
- ALFIERI, A. A. et al. Reoviridae. In: FLORES, E. F. Virologia Veterinária. 3. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2017.
- ATTOUI, H.; BILLOIR, F.; CANTALOUBE, J. F.; BIAGINI, P.; DE MICCO, P.; DE LAMBALLERIE, X. Strategies for the sequence determination of viral dsRNA genomes. *Journal of Virological Methods*, v. 89, n. 1-2, p. 147-158, 2000.
- BACKX, A.; HEUTINK, R.; VAN ROOIJ, E.; VAN RIJN, P. Transplacental and oral transmission of wild-type bluetongue virus serotype 8 in cattle after experimental infection. *Veterinary Microbiology*, v. 138, p. 235-243, 2009.
- BACON, C. D. et al. Biological evidence supports an early and complex emergence of the Isthmus of Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 19, p. 6110-6115, 12 mai. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1501482112>.
- BALARO, Mário Felipe Alvarez; SILVA, Paulo César Amaral Ribeiro da; BRANDÃO, Felipe Zandonadi. Língua azul: desmistificando a doença. *Revista Acadêmica de Ciências Animais*, v. 15, supl. 2, p. S21-S31, 2017. Disponível em: <https://periodicos.pucpr.br/cienciaanimal/article/view/16812/16107>. Acesso em: 26 nov. 2024.
- BALDINI, M. H. M.; ROSA, J. C. C.; MATOS, A. C. D. et al. Multiple bluetongue virus serotypes causing death in Brazilian dwarf brocket deer (*Mazama nana*) in Brazil, 2015–2016. *Veterinary Microbiology*, v. 227, p. 143-147, 2018.
- BAMFORD, D. H.; GRIMES, J. M.; STUART, D. I. What does structure tell us about virus evolution? *Current Opinion in Structural Biology*, v. 15, n. 6, p. 655–663, 2005. DOI: 10.1016/j.sbi.2005.09.006.
- BANNERJEE, A. K.; SHATKIN, A. J. Transcription in vitro by reovirus associated ribonucleic acid-dependent polymerase. *Journal of Virology*, v. 6, p. 1-11, 1970.
- BARBANTI, J. M.; REIS, M. L. Introdução. In: DUARTE, J. M. B.; BRAGA, F. G.; VOGLIOTTI, A. et al. Plano Nacional para a Conservação dos cervídeos ameaçados de extinção. Brasília: ICMBio, 2012. p. 66.
- BATTEN, C.; FROST, L.; OURA, C. Real-Time Reverse Transcriptase PCR for the Detection of Bluetongue Virus. In: CUNHA, M.; INÁCIO, J. (eds.). *Veterinary Infection Biology: Molecular Diagnostics and High-Throughput Strategies*. *Methods in Molecular Biology*, v.

1247. New York: Humana Press, 2015. p. 141-154. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2004-4_8.

BAYLIS, M. et al. The spatial and seasonal distribution of African horse sickness and its potential Culicoides vectors in Morocco. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 11, p. 203-212, 1997.

BELBIS, G.; ZIENTARA, S.; BRÉARD, E. et al. Bluetongue Virus: From VLA-1 to VLA-27. *Advances in Virus Research*, v. 99, p. 161-186, 2017.

BENSON, D. A.; CAVANAUGH, M.; CLARK, K.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; SAYERS, E. W. GenBank. *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. D1, p. D36–D42, 2013. DOI: 10.1093/nar/gks1195.

BERNES, C.; MACURA, B.; JONSSON, B. G.; JUNNINEN, K.; MULLER, J.; SANDSTRÖM, J. et al. Manipulating ungulate herbivory in temperate and boreal forests: effects on vegetation and invertebrates. A systematic review. *Environmental Evidence*, v. 7, p. 32, 2018.

BHANUPRAKASH, V.; INDRANI, B. K.; HOSAMANI, M. et al. Bluetongue vaccines: the past, present and future. *Expert Review of Vaccines*, v. 8, n. 2, p. 191-204, 2009.

BHATTACHARYA, B.; ROY, P. Bluetongue virus outer capsid protein VP5 interacts with membrane lipid rafts via a SNARE domain. *Journal of Virology*, v. 82, p. 10600-10612, 2008. DOI: 10.1128/JVI.01274-08.

BIANCHI, R. M.; PANZIERA, W.; FACCIN, T. et al. Aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos de surtos de língua azul em ovinos na Região Central do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 37, n. 37, p. 1443-1452, 2017.

BOYCE, M.; WEHRFRITZ, J.; NOAD, R.; ROY, P. Purified Recombinant Bluetongue Virus VP1 Exhibits RNA Replicase Activity. *Journal of Virology*, v. 78, n. 8, p. 3994–4002, 2004. DOI: 10.1128/JVI.78.8.3994-4002.2004.

BRASIL. Decreto nº 24.548, de 03 de julho de 1934. Aprova o Regulamento do Serviço de Defesa Sanitária Animal. Presidência da República - Casa Civil - Subchefia para Assuntos Jurídicos, Rio de Janeiro, 3 jul. 1934.

BRASIL. Farmacopéia Brasileira. 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 546 p.

BRASIL. Instrução Normativa nº 50, de 24 de setembro de 2013. Altera a lista de doenças passíveis da aplicação de medidas de defesa sanitária animal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 24 set. 2013.

BRASIL. Portaria nº 356, de 25 de julho de 2019. Aprova o Plano de Ação Nacional para a Conservação de Ungulados – PAN Ungulados. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 25 jul. 2019. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Portaria nº MMA Nº 148, de 7 de junho de 2022. Altera os Anexos referentes à atualização da Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 8 jun. 2022. Seção 1, Edição 108, p. 74.

BRÉARD, E.; SAILLEAU, C.; COUPIER, H.; RAVAUD, K. M.; HAMMOUMI, S.; GICQUEL, B.; ... & ZIENTARA, S. Molecular epidemiological analysis of genome segments 2, 7 and 10 of bluetongue virus in Corsica, and differentiation between field isolates and the vaccine strain by RT-PCR. *Virus Research*, v. 34, p. 1-13, 2003.

BROWN, C. C.; OLANDER, H. J.; CASTRO, A. E.; BEHYMER, D. E. Prevalence of antibodies in goats in north-eastern Brazil to selected viral and bacterial agents. *Tropical Animal Health and Production*, v. 21, p. 167-169, 1989.

BURLAND, T. G. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods in Molecular Biology*, v. 132, p. 71-91, 2000. DOI: 10.1385/1-59259-192-2:71.

CABRERA, A.; YEPEZ, J. Mamíferos sulamericanos. Buenos Aires: Cía. Argentina de Editores, 1960.

CAMPOS, M. T. G. Desenvolvimento de vacinas inativadas contra a Língua Azul e a Doença Epizootica Hemorrágica para cervídeos: ensaios pré-clínicos, Belo Horizonte – MG. 2020. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2020.

CARRERA, Liberato de Castro. História financeira e orçamentária do Império do Brasil. 158, 1889.

CASTRO, R. S.; LEITE, R. C.; ABREU, J. J.; LAGE, A. P.; FERRAZ, I. B.; LOBATO, Z. I. P.; BALSAMÃO, S. L. E. Prevalence of antibodies to selected viruses in bovine embryo donors and recipients from Brazil, and its implications in international embryo trade. *Tropical Animal Health and Production*, v. 24, p. 173-176, 1992.

CUBAS, Z. S. Special challenges of maintaining wild animals in captivity in South America. *Revista Científica Técnica de la Oficina Internacional de Epizootias*, v. 15, n. 1, p. 267-287, 1996.

CUNHA FILHO, Luiz Fernando Coelho da.; SBIZERA, Maria Carolina Ricciardi.; BARRETO, José Victor Pronievicz.; PITUCO, Edwiges Maristela.; LORENZETTI, Elis.; LUNARDI, Michele.; PATELLI, Thais Helena Constantino.; MATIAS, Bruna Fonseca. Bluetongue disease in sheep: a review. *Animal Pathology*, v. 2018, p. 1-10, 2018. DOI: 10.1590/1808-1657001342018.

CUNHA, R. G. Neutralizing antibodies for different serotypes of bluetongue virus in sera of domestic ruminants from Brazil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 12, p. 3-7, 1990.

CUNHA, R. G.; SOUZA, D. M.; SILVA PASSOS, W. Antibodies to bluetongue virus in sera from cattle of São Paulo's state and Brazil's south region. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 9, n. 6, p. 121-124, 1987.

CUNHA, R. G.; SOUZA, D. M.; TEIXEIRA, A. C. Incidência de anticorpos para o vírus da língua azul em soros de caprinos e ovinos do estado do Rio de Janeiro. *Arquivos Fluminenses de Medicina Veterinária*, v. 3, n. 2, p. 53-56, 1988.

- CUNHA, R. G.; SOUZA, D. M.; TEXEIRA, A. C. Anticorpos precipitantes para o vírus da língua azul em soros de bovinos do estado do Rio de Janeiro. *Biológico*, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 99-103, 1982.
- DA SILVA, J.; MODENA, C.; MOREIRA, E.; MACHADO, T.; VIANA, F.; ABREU, V. Frequency of foot and mouth disease, bluetongue and enzootic bovine leucosis in goats in the state of Minas Gerais, Brazil. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 40, n. 6, p. 393-403, 1988.
- DARPEL, K. E.; BATTEN, C. A.; VERONESI, E.; WILLIAMSON, S.; ANDERSON, P. et al. Transplacental transmission of bluetongue virus 8 in cattle, UK. *Emerging Infectious Diseases*, v. 15, p. 2025–2028, 2009.
- DONG, W.; PAN, Y.; LIU, J. The earliest Muntiacus (Artiodactyla, Mammalia) from the Late Miocene of Yuanmou, southwestern China. *Comptes Rendus Palevol*, v. 3, n. 5, p. 379-386, 2004.
- DUARTE, J. M. B. Guia de identificação de cervídeos brasileiros. Jaboticabal: FUNEP, 1996.
- DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J. E. The surprising evolutionary history of South American deer. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 49, n. 1, p. 17–22, 2008. DOI: 10.1016/j.ympev.2008.07.009.
- DUARTE, J. M. B.; MERINO, M. L. Taxonomia e evolução. In: DUARTE, J. M. B. (Ed.), *Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama*. Jaboticabal: FUNEP, 1997. p. 1–21.
- DUARTE, J. M. B.; VARELA, D.; PIOVEZAN, U.; BECCACECI, M. D.; GARCIA, J. E. *Blastocerus dichotomus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T2828A22160916.en>. Acesso em: 29 jun. 2024.
- DUARTE, J. M. B.; VOGLIOTTI, A.; CARTES, J. L.; OLIVEIRA, M. L. *Mazama nana*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T2828A22160916.en>. Acesso em: 29 jun. 2024.
- EISENBERG, J. F.; REDFORD, K. H. *Mammals of the Neotropics: The central Neotropics*. Chicago: The University of Chicago Press, 1999.
- ELBERS, A. R.; BACKX, A.; EKKER, H. M.; VAN DER SPEK, A. N.; VAN RIJN, P. A. Performance of clinical signs to detect bluetongue virus serotype 8 outbreaks in cattle and sheep during the 2006 epidemic in The Netherlands. *Veterinary Microbiology*, v. 129, p. 156-162, 2008.
- ENSMINGER, M. E.; PARKER, R. O. *Sheep and goat science*. ed. Danville, Illinois: The Interstate Printers and Publishers, 1986.
- FEENSTRA, F.; VAN GENNIP, R. G. P.; MARIS-VELDHUIS, M.; VERHEIJ, E.; VAN RIJN, P. A. Bluetongue virus without NS3/NS3a expression is not virulent and protects against virulent bluetongue virus challenge. *Journal of General Virology*, v. 95, p. 2019-2029, 2014.

FORZAN, M.; WIRBLICH, C.; ROY, P. A capsid protein of nonenveloped bluetongue virus exhibits membrane fusion activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, p. 2100–2105, 2004.

FTAICH, N.; CIANCIA, C.; VIAROUGE, C.; BARRY, G.; RATINIER, M.; VAN RIJN, P. A.; BREARD, E.; VITOUR, D.; ZIENTARA, S.; PALMARINI, M.; TERZIAN, C.; ARNAUD, F. Turnover rate of NS3 proteins modulates bluetongue virus replication kinetics in a host-specific manner. *Journal of Virology*, v. 9, p. 10467–10481, 2015. DOI: 10.1128/JVI.01541-15.

GÂNDAVO, P. M. *Tratado da Terra do Brasil - História da Província de Santa Cruz*. Belo Horizonte: Itatiaia, 1980. 150 p.

GIBBS, J.; GREINER, E.; ALEXANDER, F.; KING, H.; ROACH, C. Serological survey of ruminant livestock in some countries of the Caribbean region and South America for antibody to bluetongue virus. *Veterinary Record*, v. 114, n. 26, p. 635-638, 1984.

GILBERT, C.; ROPIQUET, A.; HASSANIN, A. Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae (Mammalia, Ruminantia): systematics, morphology, and biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 40, n. 1, p. 101-117, 2006.

GODOY, José Eduardo Pimentel de. *Evolução do sistema aduaneiro do Brasil*. Disponível em: <https://www.gov.br/receitafederal/pt-br/acao-a-informacao/institucional/memoria/aduana/evolucao-do-sistema-aduaneiro>. Acesso em: 27 nov. 2024.

GONZALEZ, M. C.; PEREZ, N.; SIGER, J. Serologic evidence of bluetongue virus in bovines from Aragua State, Venezuela. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias UCV*, v. 41, n. 1-3, p. 3-12, 2000.

GORSCH, C.; VAGNOZZI, A.; DUFFY, S.; MIQUET, J.; PACHECO, J.; BOLONDI, A.; DRAGHI, G.; CETRA, B.; SONI, C.; RONDEROS, M.; RUSSO, S.; RAMIREZ, V.; LAGER, I. Bluetongue: isolation and characterization of the virus and vector identification in the northeast of Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, v. 34, p. 150-156, 2002.

GOULD, A. R.; EATON, B. T. The amino acid sequence of the outer coat protein VP2 of neutralizing monoclonal antibody-resistant, virulent and attenuated bluetongue viruses. *Virus Research*, v. 17, p. 161–172, 1990.

GRUBB, P. List of deer species and subspecies. *Journal of the British Deer Society*, v. 8, p. 153-155, 1990.

GUMM, I. D.; TAYLOR, W. P.; ROACH, C. J.; ALEXANDER, F. C. M.; GREINER, E. C.; GIBBS, E. P. J. Serological survey of ruminants in some Caribbean and South American countries for type-specific antibody to bluetongue and epizootic hemorrhagic disease viruses. *Veterinary Record*, v. 30, p. 635-638, 1984.

HALL, T., BIOSCIENCES, I., & CARLSBAD, C. J. G. B. B. BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bull Biosci*, 2(1), 60-61, 2011.

HAMERS, C.; GALLEAU, S.; CHERY, R. et al. Use of inactivated bluetongue virus serotype 8 vaccine against virulent challenge in sheep and cattle. *Veterinary Record*, v. 1, n. 165, p. 369–373, 2009.

HAN, Z.; HARTY, R. N. The NS3 protein of bluetongue virus exhibits viroporin-like properties. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, p. 43092–43097, 2004. DOI: 10.1074/jbc.M403663200.

HOFMANN, M.; GRIOT, C.; CHAIGNAT, V. et al. Bluetongue disease reaches Switzerland. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, v. 150, n. 1, p. 49–56, 2008.

HOLMES, I. H. et al. in *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses* (MURPHY, F. A. et al., eds.), p. 208–237. Wien and New York: Springer, 1998.

HOMAN, E. J.; LORBACHER DE RUIZ, H.; DONATO, A. P.; TAYLOR, W. P.; YUILL, T. M. A preliminary survey of the epidemiology of bluetongue in Costa Rica and Northern Colombia. *Journal of Hygiene, Cambridge*, v. 94, p. 357–363, 1985.

HOMAN, E. J.; TAYLOR, W. P.; LORBACHER DE RUIZ, H.; YUILL, T. M. Bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease of deer virus serotypes in northern Colombian cattle. *Journal of Hygiene, Cambridge*, v. 95, p. 165–172, 1985.

ICTV (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES). *Orbivirus*. 2020. Disponível em: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsrna-viruses-2011/w/dsrna_viruses/188/reoviridae. Acesso em: 11 nov. 2021.

ICTV (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES). *Orbivirus*. 2024. Disponível em: https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202304879&taxon_name=Orbivirus%20caerulinguae. Acesso em: 30 jun. 2024.

IUCN (INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE). List of Threatened Species 2015: e.T29621A22154379. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T29621A22154379.en>. Acesso em: 29 jun. 2024.

JANOWICZ, A.; CAPORALE, M.; SHAW, A.; GULLETTA, S.; GIALLEONARDO, L. D.; RATINIER, M.; PALMARINI, M. Multiple genome segments determine virulence of bluetongue virus serotype 8. *Journal of Virology*, v. 89, p. 5238–5249, 2015. DOI: 10.1128/JVI.00395-15.

KARESH, B. W.; UHART, M.; DIERENFELD, E. S.; BRASELTON, W. E.; TORRES, A.; HOUSE, C.; PUCHE, H.; COOK, R. A. Health evaluation of free-ranging guanaco (*Lama guanicoe*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 29, n. 2, p. 134–141, 1998.

KUNDLACZ, C.; POURCELOT, M.; FABLET, A.; AMARAL DA SILVA MORAES, R.; LÉGER, T.; MORLET, B.; VIAROUGE, C.; SAILLEAU, C.; TURPAUD, M.; GORLIER, A.; BREARD, E.; LECOLLINET, S.; VAN RIJN, P. A.; ZIENTARA, S.; VITOUR, D.; CAIGNARD, G. Novel Function of Bluetongue Virus NS3 Protein in Regulation of the MAPK/ERK Signaling Pathway. *Journal of Virology*, v. 93, n. 16, p. e00336–19, 2019. DOI: 10.1128/JVI.00336-19.

LAGE, A. P.; CASTRO, R. S.; MELO, M. I. V.; AGUIAR, P. H. P.; BARRETO FILHO, J. B.; LEITE, R. C. Prevalence of antibodies to bluetongue, bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea/mucosal disease viruses in water buffaloes in Minas Gerais State, Brazil. *Revista Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, v. 49, n. 3, p. 195-197, 1996.

LAGER, I. A. Bluetongue virus in South America: overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. *Veterinary Italian*, v. 40, n. 3, p. 89-93, 2004. DOI: 20419641. Acesso em: 26 nov. 2024.

LEONI, L.; CHEETHAM, S.; LAGER, I.; PARREÑO, V.; FONDEVILA, N.; RUTTER, B.; MARTÍNEZ VIVOT, M.; FERNÁNDEZ, F.; SCHUDEL, A. Prevalencia de anticuerpos contra enfermedades virales del ganado, en llama (*Lama glama*), guanaco (*Lama guanicoe*) y vicuña (*Vicugna vicugna*) en Argentina. In: II CONGRESO LATINOAMERICANO DE ESPECIALIDAD EN PEQUEÑOS RUMIANTES Y CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS E XI CONGRESO NACIONAL DE OVINOCULTURA, 2001, Mérida, Yucatán, México. Proceedings CD, 2001.

LOBÃO, F. M.; MELO, C. B.; MENDONÇA, C. E. D. et al. Língua azul em ovinos: uma revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 38, n. 2, p. 69-74, 2014.

LOBATO, Z. I. P.; GUEDES, M. I. M. C.; MATOS, A. C. D. Bluetongue and other orbiviruses in South America: gaps and challenges. *Veterinary Italiana*, v. 51, p. 253–262, 2015.

LOPEZ, W. A.; NICOLETTI, P.; GIBBS, E. P. J. Antibody to bluetongue virus in cattle in Ecuador. *Tropical Animal Health and Production*, v. 17, p. 82, 1985.

LORCA-ORÓ, C.; LOPEZ-OLVERA, J. R.; FERNÁNDEZ-SIRERA, L. et al. Evaluation of the efficacy of commercial vaccines against bluetongue virus serotypes 1 and 8 in experimentally infected red deer (*Cervus elaphus*). *Veterinary Microbiology*, v. 154, n. 3-4, p. 240-246, 2012.

LUDT, C. J.; SCHROEDER, W.; ROTTMANN, O.; KUEHN, R. Mitochondrial DNA phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 31, n. 3, p. 1064-1083, 2004.

MAAN, N. S.; MAAN, S.; BELAGANAHALLI, M. N.; OSTLUND, E. N.; JOHNSON, D. J.; NOMIKOU, K.; MERTENS, P. P. Identification and differentiation of the twenty-six bluetongue virus serotypes by RT-PCR amplification of the serotype-specific genome segment 2. *PLoS One*, v. 7, n. 2, e32601, 2012.

MAAN, N. S.; MAAN, S.; BELAGANAHALLI, M.; PULLINGER, G.; MONTES, A. J. A.; GASPARINI, M. R.; GUIMERA, M.; NOMIKOU, K.; MERTENS, P. P. C. A quantitative real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) assay to detect genome segment 9 of all 26 bluetongue virus serotypes. *Journal of Virological Methods*, v. 213, p. 118-126, 2015.

MAAN, S.; MAAN, N. S.; BELAGANAHALLI, M. N.; POTGIETER, A. C.; KUMAR, V.; BATRA, K. et al. Development and evaluation of real-time RT-PCR assays for detection and typing of bluetongue virus. *PLoS One*, v. 11, n. 9, e0163014, 2016.

- MAAN, S.; MAAN, S. M.; NOMIKOU, K. et al. Molecular epidemiology studies of bluetongue virus. In: MELLOR, P.; BAYLIS, M.; MERTENS, P. (Eds.). *Bluetongue*. Paris: Elsevier, 2009. p. 135-156.
- MACEDO, L. B.; LOBATO, Z. I. P.; FIALHO, S. L. A. et al. Evaluation of different adjuvants formulations for bluetongue vaccine. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 56, n. 1, p. 932–941, 2013.
- MACLACHLAN, N. J.; GARD, G. Clinical signs and pathology. In: MELLOR, P.; BAYLIS, M.; MERTENS, P. (Eds.). *Bluetongue*. Paris: Elsevier, 2009. p. 197-212.
- MACLACHLAN, N. J.; GUTHRIE, A. J. Re-emergence of bluetongue, African horsesickness, and other orbivirus diseases. *Veterinary Research*, v. 41, p. 35, 2010.
- MARIANTE, A. S.; CAVALCANTE, N. *Animals of the Discovery: Domestic Breeds in the History of Brazil*. 2. ed. Brasília: EMBRAPA, 2006. 232 p.
- MARIANTE, A. S.; McMANUS, C.; MENDONÇA, J. F. Country report of animal genetic resources. Brasília: EMBRAPA, 2003. 91 p.
- MATOS, A. C. D.; GUEDES, M. I. M. C.; REHFELD, I. S. et al. Bovine vaccinia: Inactivated vaccinia virus vaccine induces protection in murine model. *Veterinary Microbiology*, v. 1, n. 204, p. 84–89, 2017.
- MATOS, A. C. D.; ROSA, J. C. C.; NOMIKOU, K.; GUIMARÃES, L. L. B.; COSTA, E. A. Genome sequence of bluetongue virus serotype 17 isolated in Brazil in 2014. *Genome Announcements*, v. 4, p. 4–5, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/genomeA.01359-15>. Acesso em: 30 nov. 2024.
- MAYO, C. E.; CROSSLEY, B. M.; HIETALA, S. K.; GARDNER, I. A.; BREITMEYER, R. E. et al. Colostral transmission of bluetongue virus nucleic acid among newborn dairy calves in California. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 57, p. 277–281, 2010.
- McMANUS, Concepta; PAIVA, Samuel Rezende; ARAÚJO, Ronyere Olegário de. Genetics and breeding of sheep in Brazil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, suppl. spe, p. 1-12, jul. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010001300026>. Acesso em: 27 nov. 2024.
- MECVEY, D. S.; MACLACHLAN, N. J. Vaccines for prevention of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease in livestock: A North American perspective. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 15, n. 6, p. 385-396, 2015.
- MEDEIROS NETO, José Bernardo de. *Desafio à Pecuária Brasileira*. Porto Alegre: Editora Sulina, 1970.
- MEENAMBIGAI, T.V.; PRABHAKAR, T.G.; GOVINDARAJAN, R.; NACHIMUTHU, K.; KOTEESWARAN, A. A comparative study of the inclusion bodies in BHK 21 and Vero cells infected with bluetongue virus, *Tamilnadu J. Vet. and Animal Sci.*, v.2, n.6, p.248-250, 2006.
- MELLOR, P. S.; BOORMAN, J.; BAYLIS, M. Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annual Review of Entomology*, v. 45, p. 307–340, 2000.

- MELLOR, P. S.; BOORMAN, J.; BAYLIS, M. Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annual Review of Entomology*, v. 45, p. 307-340, 2000.
- MELO, C. B.; OLIVEIRA, A. M.; AZEVEDO, E. O.; LOBATO, Z. I. P.; LEITE, R. C. Antibodies to bluetongue virus in bovines of Paraíba State, Brazil. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 52, n. 1, p. 19-20, 2000.
- MENZIES, F. D.; MCCULLOUGH, S. J.; MCKEOWN, I. M.; FORSTER, J. L.; JESS, S. et al. Evidence for transplacental and contact transmission of bluetongue virus in cattle. *Veterinary Record*, v. 163, p. 203–209, 2008.
- MERTENS, P. P. C.; ATTIOUI, H.; DUNCAN, R.; DERMODY, T. S. Reoviridae. In: Cox, M. L.; Zheng, Y.; Tickle, C.; Jansson, R.; Kehrer-Sawatzki, H.; Wood, B.; Cooper, D.; Melino, G.; Delves, P.; Battista, J.; Levitan, I.; Roberts, K.; Bynum, W. F.; Phillips, G.; Harper, D. (Eds.). *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London: Elsevier/Academic Press, 2005. p. 447–454.
- MERTENS, P. P. C.; DIPROSE, J. The bluetongue virus core: A nano-scale transcription machine. *Virus Research*, v. 2101, p. 29–43, 2004.
- MERTENS, P. P. C.; PEDLEY, S.; COWLEY, J.; BURROUGHS, J. N.; CORTEYN, A. H.; JEGGO, M. H.; JENNINGS, D. M.; GORMAN, B. M. Analysis of the roles of bluetongue virus outer capsid proteins VP2 and VP5 in determination of virus serotype. *Virology*, v. 170, p. 561–565, 1989.
- MERTENS, P. P.; DIPROSE, J.; MAAN, S. et al. Bluetongue virus replication, molecular and structural biology. *Veterinary Italiana*, n. 40, p. 426–437, 2004.
- MERTENS, P.; ROSS-SMITH, N.; DIPROSE, J. et al. The structure of bluetongue virus core and proteins. In: MELLOR, P.; BAYLIS, M.; MERTENS, P. (Eds.). *Bluetongue*. Paris: Elsevier, 2009. p. 197-212.
- MIKICH, S. B.; BÉRNILS, R. S. *Livro Vermelho da fauna ameaçada no Estado do Paraná*. Curitiba: Instituto Ambiental do Paraná, 2004.
- MULLENS, B. A. et al. Effects of temperature on virogenesis of bluetongue virus serotype 11 in *Culicoides variipennis sonorensis*. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 9, p. 71-76, 1995.
- MURPHY, M. D.; HOWERTH, E. W.; MACLACHLAN, N. J.; STALLKNECHT, D. E. Genetic variation among epizootic hemorrhagic disease viruses in the southeastern United States: 1978–2001. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 5, n. 2, p. 157-165, 2005.
- NOAD, R.; ROY, P. Bluetongue virus replication and assembly. In: MELLOR, P.; BAYLIS, M.; MERTENS, P. (Eds.). *Bluetongue*. Paris: Elsevier, 2009. p. 53-76.
- O'DEA, A. et al. Formation of the Isthmus of Panama. *Science Advances*, 17 aug. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600441>.
- OIE. *Bluetongue. Terrestrial Animal Health Code*. Paris, France: 25th Edition, 2016. Disponível em: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-code/>. Acesso em: 30 jun. 2023.

OLIVEIRA, M. L.; COUTO, H. T. Z.; DUARTE, J. M. B. Distribution of the elusive and threatened Brazilian dwarf brocket deer refined by non-invasive genetic sampling and distribution modelling. *European Journal of Wildlife Research*, v. 65, n. 2, 2019. DOI: 10.1007/s10344-019-1258-6.

PEARSON, J.; JOCHIM, M. Protocol for the immunodiffusion test for bluetongue. *Proceedings of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, v. 22, p. 463-471, 1979.

PERES, P. H. de F.; GROTTA-NETO, F.; LUDUVÉRIO, D. J.; OLIVEIRA, M. L. de; DUARTE, J. M. B. Implications of unreliable species identification methods for Neotropical deer conservation planning. *Perspectives in Ecology and Conservation*, v. 19, n. 4, p. 435–442, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2021.08.001>.

PINDER, L.; LEEUWENBERG, F. Veado-catingueiro. In: DUARTE, J. M. B. (Ed.). *Biologia e conservação de Cervídeos sul-americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama*. Jaboticabal: Funep, 1997. p. 59–68.

PRIMO, A. T. The discovery of Brazil and the introduction of domestic animals. In: *GLOBAL CONFERENCE ON CONSERVATION OF DOMESTIC ANIMAL GENETIC RESOURCE*, 5., 2000, Brasília. *Proceedings...* Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. (CD-ROM).

PRITCHARD, L. I.; DANIELS, P. W.; MELVILLE, L. F. et al. Genetic diversity of bluetongue viruses in Australasia. *Veterinary Italiana*, v. 40, p. 438–445, 2004.

PUNTEL, M.; FONDEVILA, N.; BLANCO VIERA, J.; MARCOVECCHIO, J.; CARRILLO, B.; SCHUDEL, A. Serological survey of viral antibodies in llamas (*Lama glama*) in Argentina. *Journal of Veterinary Medicine*, v. B46, p. 157-161, 1999.

PURSE, B. V. et al. Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n. 2, p. 171-181, 2005.

RAWLINGS, P. et al. The relationship between climate and the distribution of *Culicoides imicola* in Iberia. *Archives of Virology*, v. 14, p. 93-102, 1998.

REDFORD, K. H.; EISENBERG, J. F. *Mammals of the Neotropics: The southern cone*. Chicago: The University of Chicago Press, 1992.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, v. 27, n. 1, p. 493–497, 1938.

RIES, C.; SHARAV, T.; TSEREN-OCHIR, E. O. et al. Putative novel serotypes '33' and '35' in clinically healthy small ruminants in Mongolia expand the group of atypical VLA. *Viruses*, v. 13, n. 1, p. 42, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13010042>.

RIES, C.; VÖGTLIN, A.; HÜSSY, et al. Putative novel atypical VLA serotype '36' identified in small ruminants in Switzerland. *Viruses*, v. 13, n. 5, p. 721, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13050721>.

RIJN, P. A. V. Prospects of next-generation vaccines for bluetongue. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 6, p. 1-15, 2019.

RIVERA, H.; MADEWELL, B.; AMEGHINO, E. Serologic survey of viral antibodies in the Peruvian alpaca (*Lama pacos*). *American Journal of Veterinary Research*, v. 48, n. 2, p. 189-191, 1987.

RODERO, A.; DELGADO, J. V.; RODERO, E. Primitive Andalusian livestock and their implication in the Discovery of America. *Archivos de Zootecnia*, v. 41, n. 154, p. 383-400, 1992.

RODRÍGUEZ-MARTÍN, D.; LOULOUDÉS-LÁZARO, A.; AVIA, M.; MARTÍN, V.; ROJAS, J. M.; SEVILLA, N. The interplay between bluetongue virus infections and adaptive immunity. *Viruses*, v. 13, p. 1511, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13081511>.

ROGERS, D. J.; RANDOLPH, S. E. Studying the global distribution of infectious diseases using GIS and RS. *Nature Reviews Microbiology*, v. 1, p. 231-236, 2003.

ROJAS, J. M.; AVIA, M.; MARTÍN, V.; SEVILLA, N. Inhibition of the IFN response by bluetongue virus: The story so far. *Frontiers in Microbiology*, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.692069>.

ROSADIO, R. H.; EVERMANN, J. F.; DEMARTINI, J. C. A preliminary serological survey of viral antibodies in Peruvian sheep. *Veterinary Microbiology*, v. 10, n. 1, p. 91-96, 1984.

ROSS-SMITH, N.; DARPEL, K. E.; MONAGHAN, P. et al. Bluetongue virus: cell biology. In: MELLOR, P.; BAYLIS, M.; MERTENS, P. (Eds.). *Bluetongue*. Paris: Elsevier, 2009. p. 77-99.

ROY, P. Bluetongue virus structure and assembly. *Current Opinion in Virology*, v. 24, p. 115-123, 2017.

ROY, P.; MARSHALL, J. J. A.; FRENCH, T. J. Structure of the bluetongue virus genome and its encoded proteins. In: ROY, P.; GORMAN, B. M. (Eds.). *Bluetongue viruses*. Berlin: Springer, 1990. p. 43-87.

SAMY, A. M.; PETERSON, A. T. Climate change influences on the global potential distribution of bluetongue virus. *PLOS ONE*, v. 11, p. 1-12, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164026>. Acesso em: 30 nov. 2024.

SCHWARTZ-CORNIL, I.; MERTENS, P.; CONTRERAS, V.; HEMATI, B.; PASCALE, F. et al. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Veterinary Research*, v. 39, n. 5, p. 1, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1051/vetres:2008023>.

SELLERS, R. F. In: *BLUETONGUE, AFRICAN HORSE SICKNESS AND RELATED VIRUSES: Proceedings of the 2nd International Symposium*. Boca Raton: CRC Press, 1992. p. 284-290.

SHAH, K. R. et al. Role of NS2 specific RNA binding and phosphorylation in liquid-liquid phase separation and virus assembly. *Nucleic Acids Research*, v. 50, n. 19, p. 11273-11284, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac904>.

SINGER, J. B.; NOMIKOU, K.; HUGHES, J.; MERTENS, P.; GIFFORD, R.; PALMARINI, M. BTV-GLUE: a new bioinformatic resource for genomic studies of Bluetongue virus. *Meeting Report Microbiology Society*, v. 1, n. 1A, 2019. DOI: [10.1099/acmi.ac2019.po0399](https://doi.org/10.1099/acmi.ac2019.po0399).

- SMITH, M. S.; BARBARA, M. A.; KENNEDY, G. *Beginning shepherd's manual*. 2. ed. Ames: Iowa State University Press, 1997.
- SOUSA, G. S. *Tratado descritivo do Brasil em 1587*. 3. ed. São Paulo: Cia Editora Nacional/Brasiliense, 1938. 493 p.
- STEHLI, F. G.; WEBB, S. D. *The Great American Biotic Interchange*. New York: Plenum, 1985.
- STEWART, M.; HARDY, A.; BARRY, G.; et al. Characterization of a second open reading frame in genome segment 10 of bluetongue virus. *Journal of General Virology*, v. 96, p. 3280–3293, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000267>.
- SWINDELL, S. R.; PLASTERER, T. N. SEQMAN. In: SWINDELL, S. R. (Ed.). *Sequence Data Analysis Guidebook. Methods in Molecular Medicine™*, v. 70, Totowa, NJ: Springer, 1997. p. 75-91. DOI: <https://doi.org/10.1385/0-89603-358-9:75>.
- SWOFFORD, D. L. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4.0b10. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1999.
- TAMAYO, R.; SCHOEBITZ, R.; ALONSO, O.; WENZEL, J. First report of bluetongue antibody in Chile. *Progr. Clin. Biol. Res.*, v. 178, p. 555-558, 1983.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- THOMAS, C. P.; BOOTH, T. F.; ROY, P. Synthesis of bluetongue virus-encoded phosphoprotein and formation of inclusion bodies by recombinant baculovirus in insect cells: it binds the single-stranded RNA species. *Journal of General Virology*, v. 71, p. 2073-2083, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-9-2073>.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 22, p. 4673-4680, 1994.
- VAN DER SLUIJS, M. T. et al. Transplacental transmission of VLA-8 in sheep: VLA viraemia, antibody responses and vaccine efficacy in lambs infected in utero. *Vaccine*, v. 31, n. 36, p. 3726-3731, 2013.
- VERWOERD, D. W.; ELS, H. J.; DE VILLIERS, E.-M.; HUISMANS, H. Structure of the bluetongue virus capsid. *Journal of Virology*, v. 10, p. 783–794, 1972.
- VIEGAS DE ABREU, V. L. Prevalence of reactions to the immunodiffusion test for bluetongue antibodies among cattle and buffaloes in northern Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 35, n. 5, p. 759-760, 1983.
- VIEIRA, C. C. Lista Remissiva dos mamíferos do Brasil. *Arquivos de Zoologia*, v. 8, p. 458-464, 1955.

VILELA, L. C. V. Origem e situação dos ovinos no Brasil. Embrapa, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/ovinos-de-corte/pre-producao/caracteristicas/racas/origem-e-situacao-dos-ovinos-no-brasil>. Acesso em: 27 nov. 2024.

WADE-EVANS, A. M.; MERTENS, P. P. C.; BOSTOCK, C. J. Development of the polymerase chain reaction for the detection of bluetongue virus in tissue samples. *Journal of Virological Methods*, v. 30, n. 1, p. 15-24, 1990.

WALKER, P. J.; SIDDELL, S. G.; LEFKOWITZ, E. J. et al. Recent changes to virus taxonomy ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2022). *Archives of Virology*, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05516-5>.

WANG, L.-F.; KATTENBELT, J. A.; GOULD, A. R.; et al. Major core protein VP7 of Australian bluetongue virus serotype 15: sequence and antigenicity divergence from other VLA serotypes. *Journal of General Virology*, v. 75, n. 9, p. 2421-2428, 01 set. 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-9-2421>.

WEBB, S. D. Evolutionary history of new world deer. In: VRBA, E. S.; SHALLER, G. B. (Eds.). *Antelopes, Deer, and Relatives*. London: Yale University Press, 2000. p. 38–64.

WECHSLER, S. J.; MCHOLLAND, L. E. Susceptibilities of 14 cell lines to bluetongue virus infection. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 26, p. 2324-2327, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.26.11.2324-2327.1988>.

WHITE, J. R.; EATON, B. T. Conformation of the VP2 protein of bluetongue virus (VLA) determines the involvement in virus neutralization of highly conserved epitopes within the VLA serogroup. *Journal of General Virology*, v. 71, p. 1325–1332, 1990.

WILSON, A. J.; MELLOR, P. S. Bluetongue in Europe: past, present and future. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 364, p. 2669–2681, 2009.

WITTMAN, E. J.; MELLOR, P. S.; BAYLIS, M. Using climate data to map the potential distribution of *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae) in Europe. *Rev. Scientifique Technique Off. Int. Epizoot.*, v. 20, p. 731-740, 2001.