

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DETECÇÃO MOLECULAR DE ALFA INFLUENZAVÍRUS E CORONAVÍRUS EM MORCEGOS NÃO  
HEMATÓFAGOS COLETADOS NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL.

LINA MARCELA VIOLET LOZANO

Porto Alegre  
2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DETECÇÃO MOLECULAR DE ALFA INFLUENZAVÍRUS E CORONAVÍRUS EM MORCEGOS NÃO  
HEMATÓFAGOS COLETADOS NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL.

Autora: LINA MARCELA VIOLET LOZANO

Dissertação apresentada como requisito para a  
obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Veterinárias, na área de concentração de Medicina  
Veterinária Preventiva e Patologia, linha de pesquisa  
de Sanidade Animal e Saneamento, especialidade  
Microbiologia – Virologia

Orientadora: Prof. Dra. Ana Cláudia Franco

Porto Alegre  
2021

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

### CIP - Catalogação na Publicação

VIOLET LOZANO, LINA MARCELA  
DETECÇÃO MOLECULAR DE ALFA INFLUENZAVÍRUS E  
CORONAVÍRUS EM MORCEGOS NÃO HEMATÓFAGOS COLETADOS NO  
ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL / LINA MARCELA VIOLET  
LOZANO. -- 2021.  
57 f.  
Orientadora: ANA CLAUDIA FRANCO.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, , Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Influenza A. 2. RT-PCR. 3. quirópteros. 4.  
Coronaviridae. 5. spillover. I. FRANCO, ANA CLAUDIA,  
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

LINA MARCELA VIOLET LOZANO

DETECÇÃO MOLECULAR DE ALFA INFLUENZAVÍRUS E CORONAVÍRUS EM MORCEGOS NÃO  
HEMATÓFAGOS COLETADOS NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL.

Aprovada em 12 de março de 2021

BANCA AVALIADORA:

---

Prof. Dra. Ana Cláudia Franco  
Orientadora e presidente da comissão

---

Prof. Dra. Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista  
Membro da comissão

---

Prof. Dra. Ana Paula Frazzon  
Membro da comissão

---

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal  
Membro da comissão

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Ana Cláudia Franco pela oportunidade, confiança depositada, ajuda, experiência, preocupação, exemplo profissional e de tenacidade pessoal.

À Dra. Helena Batista, Camila Barboza, Raphaela Zamudio e toda a equipe do Instituto Pasteur por me ceder as amostras, me permitir trabalhar com elas, e me ajudar na identificação dos morcegos.

Aos professores Ana Frazzon e Fabricio Campos por me auxiliar nas dúvidas e problemas.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde/Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial ao Arthur, Nicole, Vanessa, Lucía e Daniela.

À Daniela Puhl e Rosana Huff pela amizade, ajuda incansável, apoio e disposição.

À minha mãe Aleida, meu Pai Marcos (*In memoriam*), meu irmão Marco Andrés (quem teve que ser hospitalizado por COVID-19 enquanto finalizava a dissertação de mestrado), meus padrinhos Aderlys y Cesar, e o resto da família por serem meus principais torcedores.

À Tommy, quem sempre será uma parte de mim.

Aos meus professores da Universidad de Córdoba (Colômbia) Jorge Miranda, Alfonso Calderón, Camilo Guzmán, Caty Martínez, Virginia Rodriguez, e Teresa Oviedo, os primeiros em acreditar em mim, em me ensinar o caminho da ciência, e também meus torcedores.

Aos membros da banca por aceitarem o convite e participarem deste processo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

À Universidade Federal Do Rio Grande do Sul (UFRGS), que agora é meu novo lar.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste estudo. Muito obrigada!

## RESUMO

Os quirópteros constituem um importante grupo de reservatórios de vírus de importância em saúde pública. As razões para isso são várias, tais como a ampla diversidade, extensa distribuição, longevidade, adaptação a ecossistemas alterados, grande diversidade trófica, diversidade de habitats, capacidade de voar longas distâncias, e a alta interação entre espécies tanto da mesma ordem como entre outras espécies de mamíferos, incluindo os humanos. Centenas de vírus tem sido associados a morcegos, entre os quais se encontram os influenzavírus e os coronavírus. Este tipo de associação vírus-hospedeiro de longa data pode ter se originado através de processos de co-evolução. Sendo assim, a detecção precoce e caracterização destes vírus em seus hospedeiros naturais poderia ajudar a entender melhor fenômenos *spillover* em humanos como o que aconteceu recentemente com o SARS-CoV-2. Este estudo teve como objetivo detectar por métodos moleculares a presença de alfa influenzavírus (IAV) e coronavírus (*Orthocoronavirinae*) em morcegos não hematófagos coletados no estado de São Paulo, Brasil. Assim, amostras de pulmão e intestino delgado de 111 morcegos oriundos de 23 municípios do estado de São Paulo foram obtidas e identificadas em 12 espécies diferentes pela amplificação e sequenciamento de 710 pb do gene mitocondrial COI. As amostras foram processadas buscando a amplificação por RT-PCR de um fragmento de 245 pb do gene da proteína da Matriz (M) dos IAV; e amplificação por RT-nPCR de um fragmento de 602 e 440 pb do gene que codifica a RNA polimerase dependente de RNA (RpRd) dos coronavírus. O limite de detecção de cada PCR também foi determinado. Não foi observada amplificação em nenhuma das amostras testadas para coronavírus e IAV. O limite inferior de detecção das reações foi determinado em 4,59 cópias genômicas/ $\mu\text{L}$  para a RT-PCR de IAV, e  $3,53 \times 10^3$  cópias genômicas/ $\mu\text{L}$  para a RT-nPCR de coronavírus. Embora tenha se demonstrado que os morcegos albergam um grande número de patógenos, os resultados do presente estudo apoiam a teoria de que a circulação de vírus em morcegos na natureza muitas vezes é baixa, e de que a nossa compreensão da complexa dinâmica infecciosa destes vírus em condições selvagens ainda é limitada.

**Palavras chave:** Influenza A, RT-PCR, quirópteros, *Coronaviridae*, RdRp, *spillover*.

## **ABSTRACT**

Bats constitute an important group of virus reservoirs of public health importance. The reasons for this are several, such as wide diversity, extensive distribution, longevity, adaptation to altered ecosystems, great trophic diversity, habitat diversity, ability to fly long distances, and the high interaction between species both of the same order and among others mammal species, including humans. Hundreds of viruses have been associated with bats, including influenza viruses and coronaviruses. This type of long-standing virus-host association may have originated through co-evolution processes. Thus, early detection and characterization of these viruses in their natural hosts could help to better understand spillover phenomena in humans, such as what happened recently with SARS-CoV-2. This study aimed to detect by molecular methods the presence of alpha influenza virus (IAV) and coronavirus (*Orthocoronavirinae*) in non-hematophagous bats collected in the state of São Paulo, Brazil. Thus, samples of lung and small intestine from 111 bats from 23 cities in the state of São Paulo were obtained and identified in 12 different species by amplification and sequencing of 710 bp of the mitochondrial COI gene. Samples were processed seeking amplification by RT-PCR of a 245 bp fragment of the IAV Matrix (M) protein gene; and amplification by RT-nPCR of a 602 and 440 bp fragment of the gene encoding the RNA-dependent RNA polymerase (RpRd) of the coronaviruses. The detection limit of each PCR was also determined. Amplification was not observed in any of the samples tested for coronavirus and IAV. The lower limit of detection of reactions was determined as 4.59 genomic copies/ $\mu$ L for IAV RT-PCR, and  $3.53 \times 10^3$  genomic copies/ $\mu$ L for coronavirus RT-nPCR. Although bats have been shown to harbor a large number of pathogens, the results of the present study support the theory that virus circulation in bats in the wild is often low, and that our understanding of the complex infectious dynamics of these viruses in wild conditions is still limited.

**Keywords:** Influenza A, RT-PCR, chiropterans, *Coronaviridae*, RdRp, spillover.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação da estrutura pleomórfica dos alfa influenzavírus.....	15
Figura 2. Ciclo de multiplicação dos alfa influenzavírus .....	20
Figura 3. Rearranjo que originou a pandemia de H1N1 do 2009.....	22
Figura 4. Ciclos de transmissão entre os diferentes hospedeiros de alfa influenzavírus.....	24
Figura 5. Morfologia do vírion dos coronavírus.....	27
Figura 6. Organização do genoma dos coronavírus.....	28
Figura 7. Ciclo de multiplicação dos coronavírus.....	31
Figura 8. Transcrição contínua e descontínua nos coronavírus.....	32
Figura 9. Vias de transmissão dos coronavírus humanos de origem zoonótico. ....	34
Figura 10. Distribuição global de coronavírus humanos.....	36
Figura 11. Mapa com os municípios de origem dos morcegos.....	43
Figura 13. Limite de detecção (LD) da RT-PCR para a detecção de alfa influenzavírus.....	44
Figura 14. Eletroforese em gel de agarose para a PCR para alfa influenzavírus . ....	45
Figura 15. Limite de detecção (LD) da RT-PCR para a detecção de coronavírus. ....	46
Figura 16. Eletroforese em gel de agarose para a PCR para a detecção de coronavírus.. ....	46



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Segmentos genômicos, proteínas codificadas e suas funções principais dos alfa influenzavírus.....	15
Tabela 2. Hospedeiros dos diferentes subtipos de Hemaglutinina (H) e Neuraminidase (N) dos alfa influenzavírus.....	17
Tabela 3. Funções das proteínas dos coronavírus. ....	28
Tabela 4. Receptores de diferentes coronavírus em alguns dos seus hospedeiros.....	29
Tabela 5. Principais coronavírus patogênicos e seus sintomas. ....	33
Tabela 6. Reagentes da PCR para amplificação do gene COI de morcegos .....	38
Tabela 7. Condições de ciclagem da PCR para amplificação do gene COI de morcegos .....	38
Tabela 8. Mistura de reagentes da PCR para amplificação do gene da Beta actina. ....	39
Tabela 9. Condições de ciclagem da PCR para amplificação do gene da Beta actina. ....	39
Tabela 10. Mistura de reagentes da PCR para amplificação do gene para a proteína da Matriz dos alfa influenzavírus.....	40
Tabela 11. Condições de ciclagem da PCR para amplificação de um fragmento do gene da proteína Matriz dos alfa influenzavírus. ....	40
Tabela 12. Iniciadores para a detecção de Coronavírus .....	41
Tabela 13. Mistura de reagentes da PCR para a detecção dos Coronavírus.....	41
Tabela 14. Condições de ciclagem da PCR para amplificação dos Coronavírus.....	41
Tabela 15. Descrição das espécies de morcegos identificados e órgãos testados por RT-PCR para alfa influenzavírus e coronavírus. ....	44

## SUMARIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>14</b>
2.1	Alfa influenzavírus .....	14
2.1.1	Caraterísticas genômicas .....	14
2.1.2	Fisiopatologia da infecção por Alfa influenzavírus .....	18
2.1.2.1	Ciclo de multiplicação dos Alfa influenzavírus .....	18
2.1.2.2	Mecanismos de variação antigênica .....	21
2.1.3	Sintomatologia .....	22
2.1.4	Transmissão.....	23
2.1.5	Epidemiologia.....	25
2.2	Coronavírus ( <i>Orthocoronavirinae</i> ).....	26
2.2.1	Caraterísticas genômicas .....	26
2.2.2	Fisiopatologia da infecção por coronavírus .....	29
2.2.2.1	Ciclo de multiplicação dos coronavírus.....	29
2.2.2.2	Sintomatologia.....	33
2.2.3	Transmissão.....	34
2.2.4	Epidemiologia.....	35
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
3.1	Caraterísticas do estudo e localização .....	37
3.2	Identificação das espécies de morcegos.....	37
3.3	Extração de RNA e síntese de cDNA .....	38
3.4	Controle interno .....	38
3.5	PCR para a detecção de Alfa influenzavírus.....	39
3.6	nPCR para a detecção de coronavírus ( <i>Orthocoronavirinae</i> ).....	41
3.7	Visualização dos produtos .....	42
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
4.1	Municípios de origem dos morcegos.....	43
4.2	Identificação das espécies de morcegos.....	43
4.3	Limite de detecção da PCR para Alfa influenzavírus.....	44
4.4	Amplificação de coronavírus ( <i>Orthocoronavirinae</i> ).....	45
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>52</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As zoonoses são classificadas como doenças infecciosas transmitidas por animais ao homem. Estima-se que mais de 70 % tenham origem em animais silvestres, sendo boa parte de origem viral (JONES et al., 2008). Entre esses agentes etiológicos, entorno de 200 vírus, algum deles mortais, tem sido encontrados ou relacionados com diferentes espécies de morcegos, os quais provavelmente abrigam mais vírus zoonóticos por espécie do que os roedores (LUIS et al., 2013; MORATELLI; CALISHER, 2015). Os morcegos representam 20% das espécies de mamíferos do mundo (WILSON; REEDER, 2005), estão amplamente distribuídos em todos os continentes, exceto na Antártica, e tem colonizado ilhas oceânicas, sendo em algumas delas os únicos mamíferos nativos (MORATELLI; CALISHER, 2015). A ampla diversidade, extensa distribuição, longevidade, adaptação a ecossistemas alterados, grande diversidade trófica, diversidade de habitats, capacidade de voar longas distancias, alta interação entre espécies tanto da mesma ordem como entre espécies de mamíferos, incluindo os humanos, são fatores que fazem com que os quirópteros constituam um reservatório representativo para a transmissão de vírus de importância em saúde pública (JONES et al., 2009).

Recentemente foi demonstrado uma estreita relação filogenética entre os morcegos e diversos vírus zoonóticos, como os lissavírus, paramixovírus, influenzavírus e coronavírus (SMITH; WANG, 2013; WYNNE; WANG, 2013). Essa relação provavelmente resulta de processos de co-evolução, nos quais as infecções podem ocorrer sem o desenvolvimento de sintomatologia clínica aparente, pelo que se estima que estes animais desenvolveram mecanismos que permitem uma tolerância imunológica a esses agentes infecciosos (BROOK; DOBSON, 2015). Embora também tenha se reportado em diversos estudos que durante a infecção pelo vírus da raiva os morcegos podem apresentar comportamentos atípicos na espécie, como descoordenação, dificuldade de voo, se arrastar no chão, procura de lugares iluminados e concorridos por humanos, e em alguns casos o indivíduo vem o óbito (UIEDA; HARMANI; SILVA, 1995). Os fatores indicativos de doença em morcegos são controversias, pois não existe uma guia clara sobre como avaliar o estado de saúde e as constantes fisiológicas normais destes indivíduos, especialmente em vida selvagem, onde indivíduos podem morrer por raiva sem que isto seja registrado.

Entre os vírus de origem animal, os influenzavírus foram os responsáveis pelas últimas três principais pandemias de gripe em humanos (TONG et al., 2013). As aves aquáticas e/ou migratórias são consideradas o principal reservatório natural desses vírus, e os mamíferos como os suínos são hospedeiros importantes na circulação e dinâmica dos vírus influenza, já que possuem receptores para a ligação de vírus influenza de origem aviária e mamífera no trato respiratório. Sendo assim, suínos podem ser infectados por vírus de ambas origens de forma simultânea, propiciando assim rearranjos gênicos e, conseqüentemente, o surgimento de novos vírus emergentes (PAULES; SUBBARAO, 2017; KRAMMER et al., 2018). Recentemente, foram descritos os subtipos H17N10 e H18N11, estes dois novos subtipos de vírus influenza foram descobertos em morcegos frugívoros da Guatemala e o Peru e apresentam maior diversidade genética do que todos os outros influenzavírus de mamíferos e aves combinados, o que indica uma associação vírus-hospedeiro de longa data (TONG et al., 2012, 2013).

Entre os vírus com potencial pandêmico associados a diferentes espécies de morcegos destacam-se os vírus Hendra (1994), Nipah (1998), coronavírus associado à síndrome respiratória aguda severa (SARS-CoV) (2002), coronavírus associado à síndrome respiratória do oriente médio (MERS-CoV) (2012), e o responsável pela atual Pandemia, o coronavírus associado à síndrome respiratória aguda severa tipo 2 SARS-CoV-2 (WANG; ANDERSON, 2019; LETKO et al., 2020). O fato de que três destes principais vírus causadores de surtos e/ou pandemias sejam parte da subfamília *Orthocoronavirinae* faz dela um importante alvo de monitoramento em saúde pública, cujo principal objetivo é a detecção precoce que permita caracterizar e avaliar estes vírus em seus hospedeiros animais antes que sejam transmitidos para os humanos, fenômeno conhecido como "spillover".

Embora o desenvolvimento de técnicas moleculares e imunológicas tenham avançado significativamente nos últimos 20 anos, a atual pandemia causada pelo SARS-CoV-2 causou uma grave crise sanitária a nível mundial, demonstrado assim o quão devastador pode ser a emergência causada pelos vírus com potencial pandêmico, em especial os vírus respiratórios (AQUINO et al., 2020). O Brasil, além de ser um dos países com umas das maiores diversidades do mundo, também lidera quanto à destruição de biomas, a redução, fragmentação, e perda de habitats; ações que contribuem significativamente com a

emergência e re-emergência de vírus zoonóticos, assim como a disseminação de vírus já conhecidos para áreas onde não se encontravam distribuídos (JOLY; QUEIROZ, 2020).

Este estudo teve como objetivo detectar por métodos moleculares a presença de alfa influenzavírus e coronavírus (*Orthocoronavirinae*) em morcegos não hematófagos coletados no estado de São Paulo, Brasil.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Alfa influenzavírus

O gênero *Aphainfluenzavirus*, até recentemente chamados de *Influenzavirus A*, fazem parte da família *Orthomyxoviridae* (Ordem: *Articulavirales*), e junto aos gêneros *Betainfluenzavirus* (*Influenzavirus B*), e *Deltainfluenzavirus* (*Influenzavirus D*) são responsáveis por causar infecções agudas no trato respiratório, comumente chamadas de gripes sazonais (ICTV, 2019); Em particular os Alfa influenzavírus se destacam por causar sintomas clínicos mais graves e por ter o potencial para se espalhar até atingir o nível pandêmico (GHEBREHEWET; MACPHERSON; HO, 2016; PAULES; SUBBARAO, 2017).

#### 2.1.1 Características genômicas

Os alfa influenzavírus (IAV), são vírus envelopados de formato pleomórfico, sendo que os adaptados as condições de laboratório são comumente esféricos com tamanho entre 80 e 170 nm de diâmetro (HARRIS et al., 2006). Os isolados clínicos podem ser esféricos com diâmetros de 120 nm, bacilos com comprimento de 200 nm e filamentos com comprimento de mais de 30.000 nm (VIJAYAKRISHNAN et al., 2013; DADONAITE et al., 2016; HIRST; HUTCHINSON, 2019). Na figura 1 se representa a característica pleomórfica dos vírus Influenza (esquerda), e do lado direito uma tomografia crioeletrônica da cepa PR8 de alfa influenzavírus (Escala 50 nm), ilustrações modificadas de (NAYAK et al., 2009; DADONAITE et al., 2016).

Os IAV possuem nucleocapsídeo helicoidal e genoma RNA de fita simples (-ss) em sentido negativo de aproximadamente 13 kb, constituído por 8 moléculas de RNA (segmentos) que possuem sequências promotoras conservadas e parcialmente complementares nas extremidades 5'-AGUAGAAACAAGG e 3'-UCG(U/C)UUUCGUCC (LAMB; HORVATH, 1991; MOSTAFA et al., 2018). O genoma codifica 10 proteínas principais: hemaglutinina (HA), neuraminidase (NA), proteína da matriz (M1), proteína do canal iônico (M2), proteína nuclear (NP), proteína não estrutural NS1, proteína não estrutural NS2, e o complexo polimerase (polimerase básica 1 (PB1), polimerase básica 2 (PB2), e polimerase ácida (PA)); além de cerca de 10 proteínas auxiliares (Tabela 1) (LABELLA; MEREL, 2013; MOSTAFA et al., 2018).

Figura 1. Representação da estrutura pleomórfica dos alfa influenzavírus. Adaptado de DADONAITE et al., 2016 (esquerda); e NAYAK et al., 2009 (micrografias crioelétrônicas). Escala 50 nm (barra).

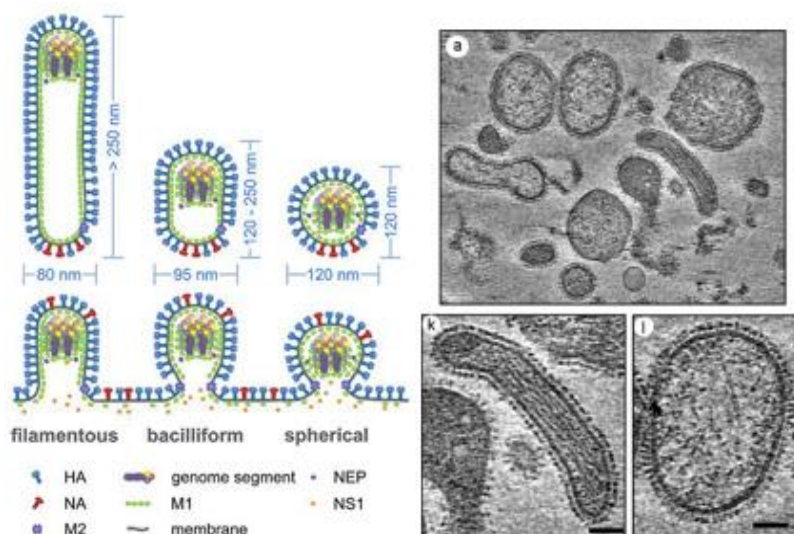


Tabela 1. Segmentos genômicos, proteínas codificadas e suas funções principais dos alfa influenzavírus. Adaptado de LABELLA; MEREL, 2013 e MOSTAFA et al., 2018.

Segmento	vRNA (nt)	Proteína viral	Proteína (aa)	Proteína (kD)	Moléculas por Vírion	Funções principais
1	2341	PB2	759	80	30-60	(i) reconhecimento e ligação à sequência cap do mRNA celular; (ii) expressão de IFN mediada por RIG-I causada pela ligação à proteína de sinalização antiviral mitocondrial (MAVS).
		PB2-S1* †	508	55	N/D	(i) inibição da via de sinalização de interferon dependente de RIG-I, (ii) interferência com a atividade de RdRp via ligação competitiva a PB1.
2	2341	PB1	757	90	30-60	(i) captura de estrutura Cap para iniciar a transcrição de mRNA viral, (ii) transcreve vRNA em RNA complementar (cRNA) como molde para a síntese de vRNA adicional, (iii) inicia a síntese de vRNA
		PB1-F2†	87-90	10,5	N/D	(i) induz apoptose, (ii) modula a resposta do interferon do hospedeiro, (iii) modula

						a susceptibilidade à infecção bacteriana secundária
		PB1-N40	718	≈80	N/D	Mantém o equilíbrio entre a expressão PB1 e PB1-F2
<b>3</b>	2233	† PA	716	83	30-60	Endonuclease de RNA para clivar pequenas estruturas de RNA encapsuladas a serem utilizadas para a síntese de mRNA viral
		PA-X †	252	29	N/D	Modulação da resposta do hospedeiro e virulência viral
		PA-N155	561	62	N/D	
		† PA-N182	534	60	N/D	Promoção da replicação viral e a patogenicidade do IAV
<b>4</b>	1778	† HA	566	77	500	(i) Principal componente do envelope (ii) ligação ao receptor; (iii) fusão das membranas viral e endosomal; (iiii) antígeno principal
<b>5</b>	1565	NP	498	55	1000	(i) ligação e proteção de vRNA; (ii) síntese de vRNA pelo complexo vRNP; (iii) importação nuclear de vRNP
<b>6</b>	1413	NA	454	56	100	(i) clivagem da ligação como o ácido sálico para liberar a progênie do vírion; (ii) ajudar a partícula viral a penetrar na barreira de muco do trato respiratório para alcançar e infectar a célula hospedeira
<b>7</b>	1027	M1	252	28	3000	(i) importação e exportação nuclear de vRNPs; (ii) montagem viral, brotamento e morfogênese (iii) proteína mais abundante do vírion
		M2 *	97	15	20-60	(i) Atividade do canal iônico no envelope; (ii) processo de remoção de revestimento
		M3 * †	9	N/D	N/D	N/D
		M4 * †	54	N/D	N/D	N/D
		M42 * †	99	N/D	N/D	Complementa funcionalmente M2
<b>8</b>	890	NS1	230	26		(i) entrada vRNP por sequestro importin- $\alpha$ ; (ii) antagonizar as respostas antivirais celulares, incluindo interferões; (iii) suporte para processamento, maturação e tradução de mRNA viral; (iv) inibe a maturação e tradução do mRNA celular



NEP/NS2 *	121	14	130–200	(i) importante para a exportação nuclear de vRNP; (ii) regula a transcrição / replicação de vRNA
NS3 * †	187	20	0	N/D

N/D: Desconhecido; †: Proteínas virais auxiliares; \*: Proteínas virais traduzidas do mRNA pós *Splicing*.

As proteínas hemaglutinina e neuraminidase, além de serem as mais abundantes do envelope, também são utilizadas para classificar os IAV em subtipos de acordo com as propriedades antigênicas (PAULES; SUBBARAO, 2017). Até o momento foram descritos 18 tipos de hemaglutinina e 9 de tipos de neuraminidase. Os primeiros subtipos de IAV a serem identificados foram de origem aviária, posteriormente foi observado que esses vírus também são encontrados em mamíferos como suínos, humanos, cavalos, e mais recentemente em morcegos (PAULES; SUBBARAO, 2017; MOSTAFA et al., 2018). Os subtipos virais e os hospedeiros com os quais estes estão relacionados são apresentados na Tabela 2, descrita por (MOSTAFA et al., 2018).

Tabela 2. Hospedeiros dos diferentes subtipos de Hemaglutinina (H) e Neuraminidase (N) dos alfa influenzavírus. Autor: MOSTAFA et al., 2018.

HA- Subtipo	NA- Subtipo	Humano	Suíno	Equino	Aves		Mamíferos marinhos	Morcego
					Domésti cas	Aves aquáticas		
H1	N1	H1/H1	H1/N1		H1/N1	H1/N1	H1	
H2	N2	H2/N2	H2/N2		H2/N2	H2/N2	N2	
H3	N3	H3/N3	H3	H3	H3/N3	H3/N3	H3/N3	
H4	N4	N4	H4		H4/N4	H4/N4	H4	
H5	N5	H5	H5		H5/N5	H5/N5	N5	
H6	N6	H6/N6	H6/N6		H6/N6	H6/N6		
H7	N7	H7/N7		H7/N7	H7/N7	H7/N7	H7/N7	
H8	N8	N8		N8	H8/N8	H8/N8		
H9	H9	H9/H9	H9		H9/N9	H9/N9	N9	
H10	N10	H10			H10	H10	H10	N10
H11	N11				H11	H11		N11
H12					H12	H12		
H13					H13	H13	H13	

<b>H14</b>	H14	H14	
<b>H15</b>	H15	H15	
<b>H16</b>	H16	H16	
<b>H17</b>			H17
<b>H18</b>			H18

### 2.1.2 Fisiopatologia da infecção por alfa influenzavírus

Nos mamíferos os IAV ingressam no hospedeiro principalmente pelas vias aéreas e tem como alvo as células epiteliais do trato respiratório, já nas aves também ingressam pela via oral e, além do trato respiratório, também se multiplicam nas células epiteliais do trato digestivo (REPERANT; KUIKEN; OSTERHAUS, 2012; THOMPSON; PAULSON, 2021).

#### 2.1.2.1 Ciclo de multiplicação dos alfa influenzavírus

Os IAV penetram na célula através da ligação da proteína hemaglutinina (HA) com o receptor ácido N-acetilneuramínico (sálico) da célula hospedeira. Este receptor apresenta diferentes formas químicas que variam segundo o hospedeiro. As principais formas são a  $\alpha$ -2,6-SA presente no trato respiratório de mamíferos, e a forma  $\alpha$ -2,3-AS presente no trato respiratório e digestivo das aves. Algumas espécies como os suínos possuem as duas formas e servem de "recipiente de mistura" para rearranjos entre vírus provenientes de diferentes espécies (MEDINA; GARCÍA-SASTRE, 2011; WEBSTER; GOVORKOVA, 2014; KRAMMER et al., 2018). Os IAV possuem diferentes graus de afinidade por determinadas formas químicas do ácido sálico, e as diferenças de afinidade destas ligações determinam a especificidade do vírus ao hospedeiros (SHAO et al., 2017).

Múltiplas ligações da hemaglutinina com o ácido sálico da célula hospedeira permitem que o vírus seja internalizado por endocitose mediada principalmente por claritina (DOU et al., 2018). O endossomo contendo o vírion migra em direção ao citoplasma e no caminho passa por processos graduais de acidificação por prótons H<sup>+</sup>, os quais também ingressam no vírion através dos canais formados pela membrana M2. Isso resulta em mudanças na conformação da proteína HA, exposição do peptídeo de fusão - que permite que o envelope se fusione com a membrana endossomal - e a dissociação da proteína de

matriz, desencadeando a liberação dos complexos de ribonucleoproteína viral (vRNP) no citoplasma (NEUMANN; NODA; KAWAOKA, 2009; SAMJI, 2009; DOU et al., 2018).

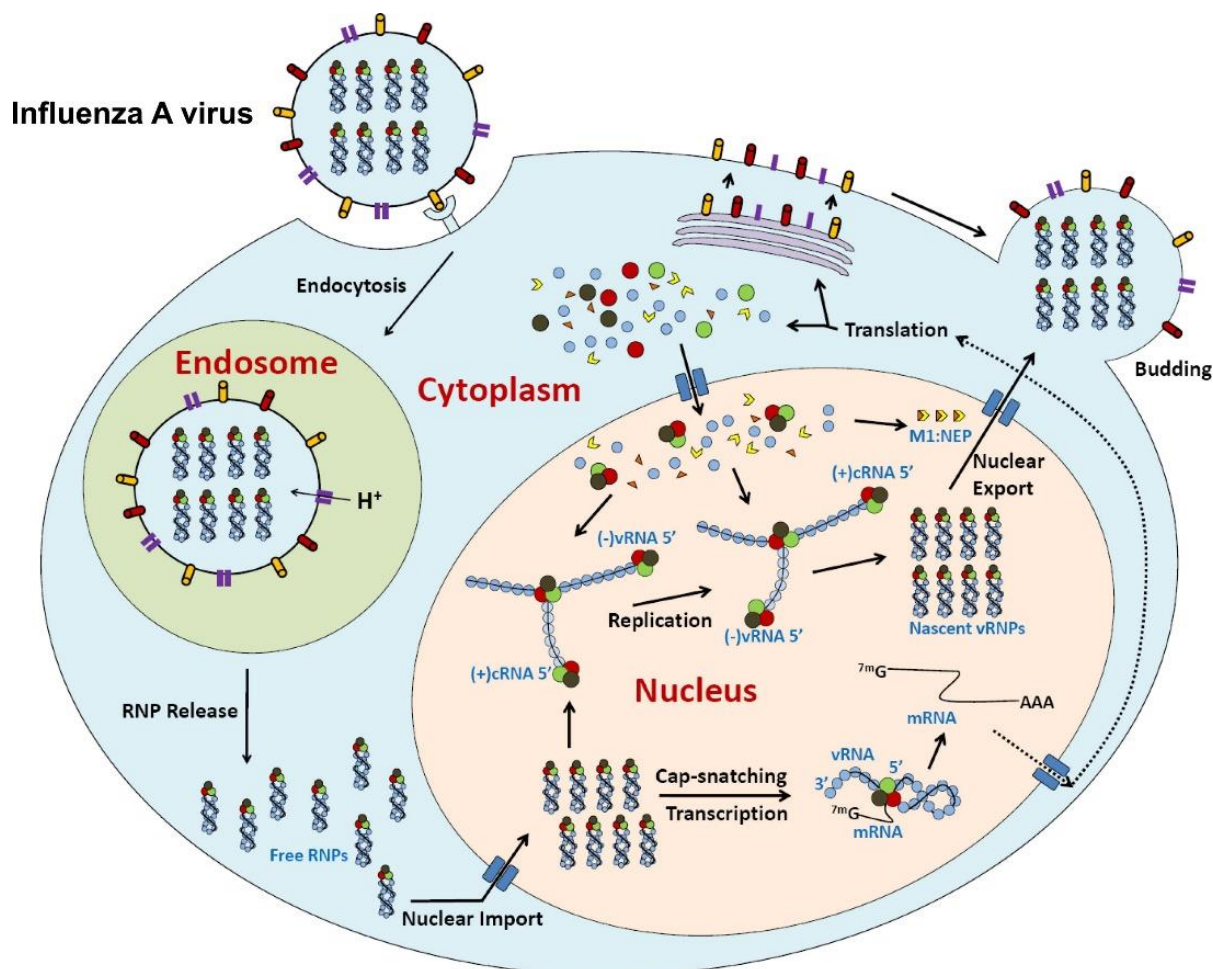
Os complexos de vRNP, formados pelo RNA(-) genômico viral, e as proteínas NP, PA, PB1 e PB2 (SAMJI, 2009), são conduzidos até o núcleo através das proteínas importinas do hospedeiro e sinais de localização nuclear (NLSs) virais, responsáveis pela transcrição e a replicação (OZAWA et al., 2007; STUBBS; TE VELTHUIS, 2014; DOU et al., 2018; KRAMMER et al., 2018). Durante a transcrição, segmentos Cap do RNAm celular são clivados, subtraídos, e pareados com a extremidade 3' do RNA genômico (RNAv) onde desempenham a função de iniciador. A transcrição é interrompida 15 nucleotídeos antes de atingir a extremidade 5' para adicionar uma cauda de poli adenina subtraída do RNAm do hospedeiro. Desta forma, o resultado da transcrição dos IAV é um RNAm com Cap e poli A que não é 100% complementar ao vRNA (ZHENG; TAO, 2013; DOU et al., 2018; KRAMMER et al., 2018).

Devido ao sentido negativo do RNA viral, é necessário sintetizar RNA complementar (RNAc) de sentido positivo que serve de molde para sintetizar novas cópias do vRNA (DOU et al., 2018). Durante o curso da infecção a transcrição (síntese de RNAm viral), ocorre em primeiro lugar e de forma mais abundante do que a replicação do RNAv e RNAc, possivelmente devido a eficiência das sequências iniciadoras no RNAm (NEUMANN; NODA; KAWAOKA, 2009). Os RNAm são exportados para o citoplasma em direção aos ribossomos onde é feita a tradução. O RNAm das proteínas NS2 e M2 passa por modificações pós transicionais no *spliceosome* da célula hospedeira antes de ser exportado em direção dos ribossomos (DOU et al., 2018).

A tradução dos RNAm das proteínas PB1, PB2, PA, NP, NS1, NS2 e M1 é feita nos ribossomos citosólicos e o das proteínas de membrana HA, NA, e M2 no ribossomos associados ao retículo endoplasmático (RE) (DOU et al., 2018). Nucleoproteínas (NP) recém sintetizadas e as proteínas que conformam a polimerase de RNA dependente de RNA, também chamada de RdRp (PA, PB1 e PB2) voltam para o núcleo para auxiliar na transcrição e replicação (NEUMANN; NODA; KAWAOKA, 2009; STUBBS; TE VELTHUIS, 2014); enquanto que proteínas de membrana HA, NA, e M2 migram desde o RE em direção da membrana plasmática onde vão se inserir, durante este processo a proteína HA é clivada em polipeptídios HA1 e HA2 que permanecem unidos por pontes bissulfeto (DOU et al., 2018).

O sítio da clivagem da HA pode ser monobásico (clivado por proteases de tipo tripsina) ou multibásico (clivado por proteases ubíquas de tipo furina), esta variação é determinante na patogenicidade de alguns Influenzavirus aviários devido a que as proteases de tipo tripsina só estão presentes no trato digestivo e respiratório, em quanto que as de tipo furina estão presentes em vários órgãos pelo que podem desencadear uma infecção sistêmica com maior facilidade (NAYAK et al., 2009; MEDINA; GARCÍA-SASTRE, 2011; WAHLGREN, 2011; LUO, 2012; DOU et al., 2018; KRAMMER et al., 2018). Na Figura 2 se apresenta o ciclo de multiplicação dos alfa influenzavírus. Os vRNPs são representados por grupos de cabelo helicoidais. as subunidades da RdRp (vermelho, marrom e verde) e NP mostradas em cores diferentes (ZHENG; TAO, 2013).

Figura 2. Ciclo de multiplicação dos alfa influenzavírus. Autor: ZHENG; TAO, 2013.

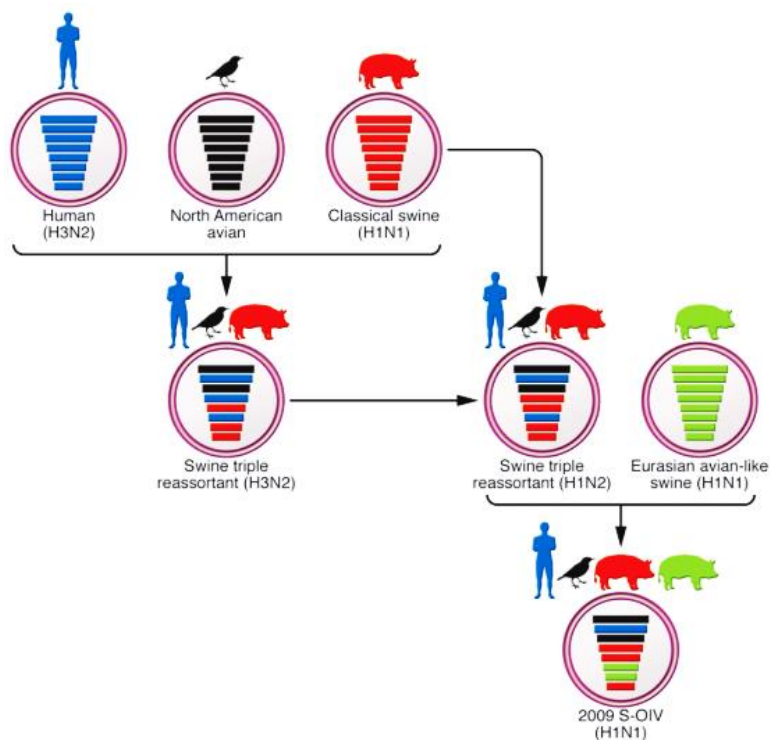


### 2.1.2.2 Mecanismos de variação antigênica

Existem dois mecanismos genéticos principais pelos quais os IAV evoluem e se diversificam: a deriva antigênica (*antigenic drift*) e o rearranjo ou ressortimento (*antigenic shift*) (KRAMMER et al., 2018; MOSTAFA et al., 2018). A deriva antigênica é um processo contínuo que ocorre nos *Alphainfluenzavirus* e *Betainfluenzavirus*, onde mutações pontuais nos genes recém transcritos se acumulam devido à erros induzidos pela baixa fidelidade da RNA polimerase viral, enzima que não tem a capacidade de corrigir nucleotídeos inseridos de forma errônea (*proofreading*) (PAULES; SUBBARAO, 2017; SHAO et al., 2017). A deriva antigênica ocorre com maior frequência nas proteínas HA e NA, alterando assim o sitio de reconhecimento dos anticorpos neutralizantes, o que permite o escape da imunidade induzida por exposição ou vacinação prévia (pressão de seleção), representando assim uma vantagem evolutiva (GHEBREHEWET; MACPHERSON; HO, 2016; PETERANDERL; HEROLD; SCHMOLDT, 2016; SHAO et al., 2017).

A natureza segmentada dos alfa influenzavírus permite o rearranjo ou intercâmbio de segmentos de RNA genômico a partir de dois vírus do mesmo gênero que infectam a mesma célula (KRAMMER et al., 2018). O resultado do rearranjo pode ser novas cepas/subtipos com características antigênicas diferentes que passam a circular em populações que não possuem imunidade previa, e que tem o potencial de se espalhar a nível pandêmico (GHEBREHEWET; MACPHERSON; HO, 2016). Pelo menos 3 pandemias têm se originado devido aos rearranjos em IAV, a mais recente ocorrida no 2009 foi causada por um rearranjo múltiplo entre o vírus da influenza suína H1N1 europeu, o vírus da influenza suína H1N2 da América do Norte, o vírus da influenza aviária norte-americana e o vírus da influenza H3N2 (PETERANDERL; HEROLD; SCHMOLDT, 2016; SHAO et al., 2017). Na Figura 3 se apresenta o rearranjo do vírus H3N2 e H1N2, um triplo-rearranjo de suínos norte-americanos (de aves norte americanas, H2N3 humano de origem aviaria, e H1N1 suíno clássico de origem aviaria) com H1N1 suíno de origem aviaria da Eurásia. O resultado foi o vírus pandêmico S-OIV de 2009 (TSCHERNE; GARCÍA-SASTRE, 2011).

Figura 3. Rearranjo que originou a pandemia de H1N1 do 2009 (Autor: TSCHERNE; GARCÍA-SASTRE, 2011).



### 2.1.3 Sintomatologia

O período de incubação da influenza é de 1 a 4 dias e o vírus é eliminado desde um dia antes do início dos sintomas até 5 - 7 dias depois (GHEBREHEWET; MACPHERSON; HO, 2016). Em humanos os IAV podem cursar de forma assintomática ou com sintomas que incluem febre abrupta, mialgia, dor de cabeça, mal-estar, tosse seca, dor de garganta, congestão nasal e em menor medida náuseas, vômitos e diarreia (GHEBREHEWET; MACPHERSON; HO, 2016); em alguns indivíduos com doenças crônicas subjacentes e sistema imune comprometido a infecção do trato respiratório inferior pode causar pneumonia com progressão para síndrome respiratória aguda grave (SRAG) e morte por insuficiência respiratória (GHEBREHEWET; MACPHERSON; HO, 2016; PETERANDERL; HEROLD; SCHMOLDT, 2016; CLOHISEY; BAILLIE, 2019).

Em aves os sintomas vão depender do tipo de ave e da patogenicidade da cepa com que são infectados. Os IAV com sítio de clivagem da HA monobásico são de baixa patogenicidade e podem cursar de forma assintomática ou apresentar só penas eriçadas, queda na produção de ovos, sintomas respiratório e digestivos leves; em tanto que os IAV com sítio de clivagem da HA multibásico são de alta patogenicidade e podem causar infecção

sistêmica com mortalidade acima do 90% em 48 horas (KALTHOFF; GLOBIG; BEER, 2010; DOU et al., 2018; KRAMMER et al., 2018).

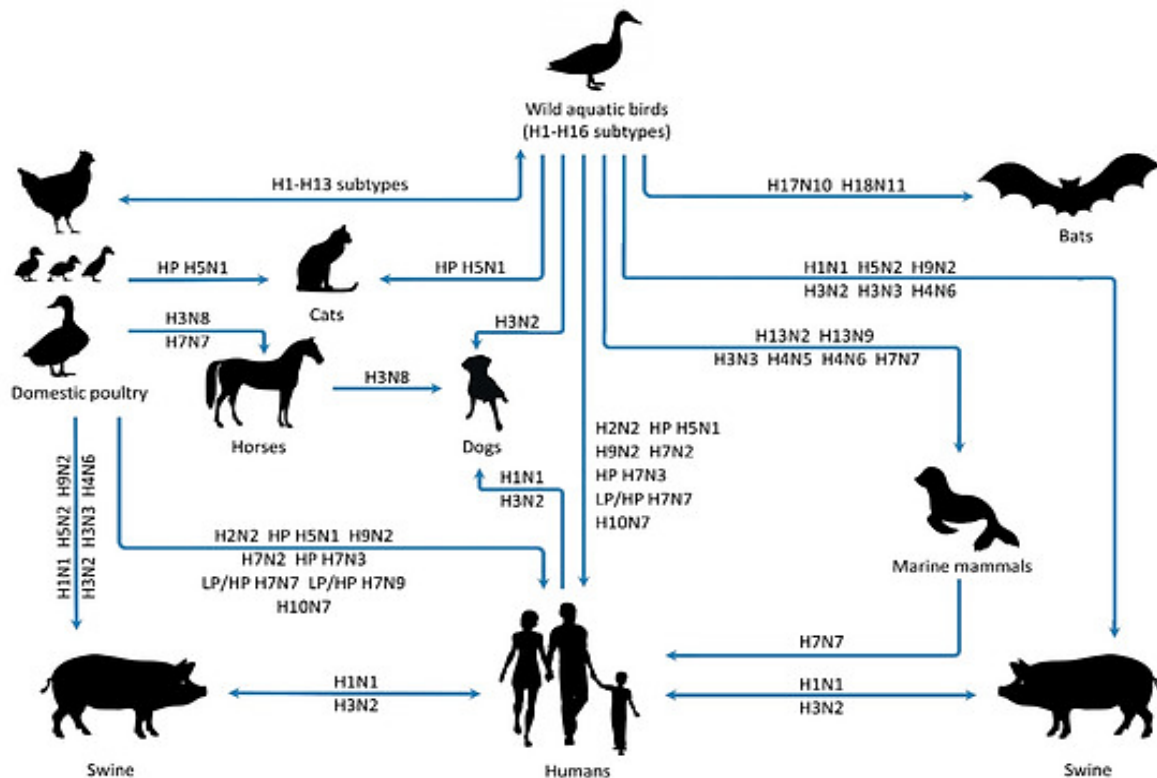
#### 2.1.4 Transmissão

Os IAV se distribuem amplamente entre vários táxons, sendo as aves aquáticas e/ou silvestres da ordem *Anseriformes* (patos, gansos e cisnes), e *Charadriiformes* (gaivotas, limícolas e andorinhas) o reservatório primário e as responsáveis por espalhar e transmitir IVA para outras espécies (KALTHOFF; GLOBIG; BEER, 2010). A transmissão entre aves silvestres e aves domésticas e outros hospedeiros se dá por contato direto com secreções orais, fecais, ou por ingestão de água contaminada (KALTHOFF; GLOBIG; BEER, 2010). O comportamento social, alimentício e densidade populacional das aves silvestres que compartilham habitat e interagem livremente com animais domésticos de sistemas de produção abertos-extensivos favorece quebra da barreira interespecie (REPERANT; KUIKEN; OSTERHAUS, 2012).

Os IAV de origem aviária são os precursores dos subtipos encontrados em aves domésticas, mamíferos marinhos, humanos, suínos, cavalos, felinos e caninos (REPERANT; KUIKEN; OSTERHAUS, 2012). Estes subtipos superaram a barreira interespecie e causaram casos isolados, surtos esporádicos autolimitados ou se estabeleceram com êxito e se tornaram endêmicos nestes novos hospedeiros, apresentando-se novos ciclos de transmissão que podem eventualmente evoluir para epidemias recorrentes (Figura 4) (REPERANT; KUIKEN; OSTERHAUS, 2012; YOON; WEBBY; WEBSTER, 2014).

Os suínos são considerados hospedeiros intermediários, pois embora a maioria dos subtipos aviários se adaptam de forma imperfeita neles, aqueles subtipos que conseguem se adaptar tem o potencial para se estabelecer com consequências importantes para a saúde humana e animal (BOURRET, 2018). Pessoas em constante contato com suínos podem ser contaminadas através deles, embora seja muito mais frequente a transmissão de humanos para suínos (YOON; WEBBY; WEBSTER, 2014; JILANI; JAMIL; SIDDIQUI, 2020). A transmissão de IAV entre humanos pode ocorrer por meio de contato direto, contato indireto via fômites, e aspiração de gotículas respiratórias (SCHRAUWEN et al., 2014).

Figura 4. Ciclos de transmissão entre os diferentes hospedeiros de alfa influenzavírus. Autor: BISSET; HOYNE, 2020. Quem adaptou com autorização da Springer Nature: Springer, Springer eBook (YOON; WEBBY; WEBSTER, 2014), Copyright (2014).



Alfa influenzavírus de humanos também podem ser transmitidos para animais de estimação como cachorros e gatos, não entando este tipo de transmissão é pouco frequente (YOON; WEBBY; WEBSTER, 2014). O contato próximo de caninos com cavalos em estábulos se considera a via pela qual o vírus H3N8 que circulava entre equinos passou a circular também em cachorros; o consumo e/ou caça de animais infetados (aves e equinos) também tem se demonstrado como uma forma de transmissão para caninos e felinos selvagens e domésticos (HARRIS et al., 2017). Os mercados de aves vivas oferecem condições ótimas para a transferência de vírus da gripe de aves para mamíferos (YOON; WEBBY; WEBSTER, 2014); a exposição por meio de visitas mostrou aumentar de 3 a 9 vezes mais as chances de contrair alfa influenzavírus, pelo que passou a ser considerado como um fator chave na transmissão destes vírus (AI et al., 2013; LIU et al., 2014; HARRIS et al., 2017).

As aves aquáticas silvestres eram consideradas o único reservatório natural de IAV (MOSTAFA et al., 2018), até que em 2009 - 2010 foram descobertos os subtipos H17N10 em morcegos da espécie *Sturnira lilium* na Guatemala, e H18N11 em morcegos da espécie



*Artibeus planirostris* no Perú (TONG et al., 2012, 2013). A semelhança das sequências de HA e NA destes vírus em comparação com os Influenzavirus já conhecidos mostrou ser só de 45% e 24% respectivamente. Esta semelhança na sequência da NA é menor do que a semelhança entre a NA de influenza A e influenza B. No entanto, as análises filogenéticas da HA mostraram que estes novos vírus estão intimamente relacionados com o grupo 1 (subtipos H1, 2, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13 e 16), e que provavelmente formam um grupo monofilético ancestral (TONG et al., 2012).

Os IAV H17N10 e H18N11 descobertos em morcegos têm apresentado características completamente atípicas, estes não se ligam aos receptores de ácido sálico aviários (SA $\alpha$ 2,3-Gal) ou humanos (SA $\alpha$ 2,6-Gal) (TONG et al., 2012), mas utilizam a proteína do complexo principal de histocompatibilidade MHC de classe II para entrar na célula hospedeira (KARAKUS et al., 2019). Outra particularidade dos Influenzavirus de morcegos é que aparentemente iniciam a infecção na membrana basolateral das células, diferente dos IAVs convencionais que preferencialmente iniciam a infecção na superfície apical das células (CIMINSKI et al., 2017). Experimentos in vitro demonstraram que alfa influenzavírus de morcegos conseguiram trocar segmentos entre eles mas não com outros IAV de origem diferente (CIMINSKI et al., 2017).

### **2.1.5 Epidemiologia**

Os IAV tem distribuição mundial e são reconhecidos por causar importantes pandemias no último século, como o foram a gripe espanhola causada pelo vírus H1N1 em 1918, a pandemia asiática por H2N2 em 1957, a pandemia de Hong Kong causada por H3N2 em 1968, a pandemia russa por H1N1 em 1977, e a de origem norte-americana por H1N1 em 2009 (SCHRAUWEN et al., 2014; PAULES; SUBBARAO, 2017; THOMPSON; PAULSON, 2021). Cada novo genótipo que surgiu substituiu o anterior até o surgimento da gripe russa em 1977, a partir da qual os subtipos H1N1 e H3N2 passaram a circular de forma conjunta (YOON; WEBBY; WEBSTER, 2014; MOSTAFA et al., 2018; THOMPSON; PAULSON, 2021). Pelo menos três destas pandemias surgiram a partir de rearranjos de alfa influenzavírus de origem animal (SCHRAUWEN et al., 2014). Além destas pandemias ocasionais, as epidemias anuais que ocorrem aproximadamente a cada 15-20 anos resultam em cerca de três a cinco milhões de casos de doenças graves e cerca de 250.000 a 500.000 mortes em todo o mundo (SCHRAUWEN et al., 2014; PETERANDERL; HEROLD; SCHMOLDT, 2016; KRAMMER et al., 2018).

Os IAV circulam amplamente no Brasil. Os primeiros relatos de surtos de influenza datam de 1552 nos estados de Pernambuco e Bahia, as pandemias subsequentes de 1918 até 1977 chegaram no Brasil pelos portos através de navios, já a última pandemia de influenza H1N1 de 2009 se espalhou pelo mundo por transporte aéreo e chegou no Brasil em maio daquele ano. Entre 2009 e 2010 se confirmaram 44.544 casos e 2.051 mortes (COSTA; MERCHAN-HAMANN, 2016; FERNANDA; MEDEIROS ANDRADE, 2020). O H1N1pdm09 passou então a ser endêmico no Brasil e passou a ser reportado em hospedeiros animais, principalmente em suínos (SCHAEFER et al., 2011; RAJÃO et al., 2013).

## **2.2 Coronavírus (*Orthocoronavirinae*)**

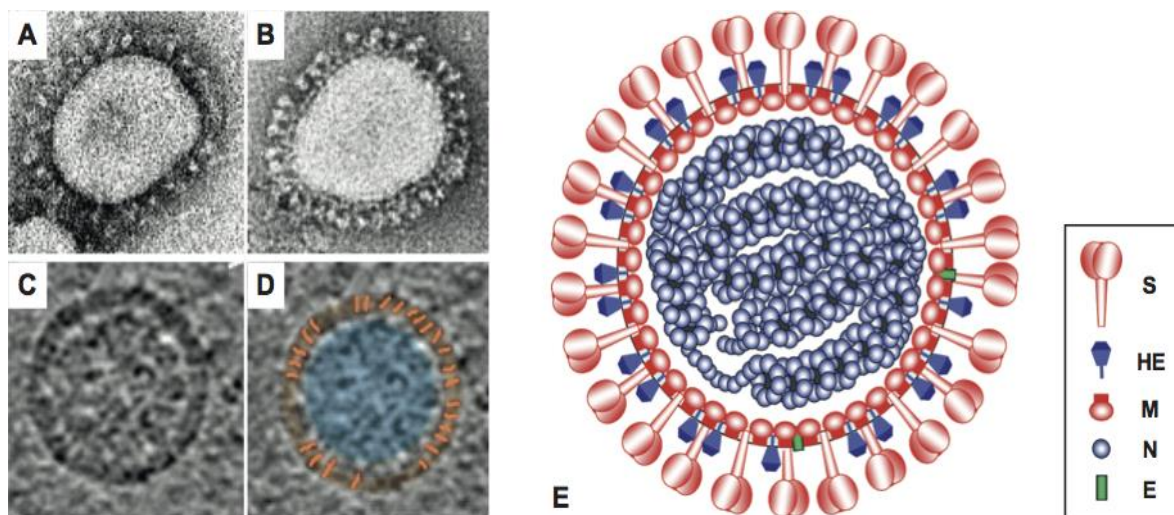
Os vírus da subfamília *Orthocoronavirinae* são chamados genericamente de coronavírus, estes estão classificados na ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*. Essa família é formada pelos gêneros *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*; os dois primeiros gêneros infectam principalmente mamíferos, entre os quais se destacam os morcegos, com aproximadamente 20 espécies de vírus associados, e os humanos. Existem sete espécies principais de coronavírus humanos (coronavírus humano 229E (HCoV-229E), coronavírus humano NL63 (HCoV-NL63), coronavírus humano HKU1 (HCoV-HKU1), coronavírus humano OC43 (*Betacoronavirus 1*), coronavírus associado à síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), coronavírus associado à síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV), e o coronavírus associado à síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2). Os dois gêneros restantes (gama e delta) infectam principalmente aves e mamíferos marinhos (HARTENIAN et al., 2020; ICTV, 2020).

### **2.2.1 Características genômicas**

Os coronavírus são vírus de formato pleomórfico e são envelopados por uma bicapa lipídica que contém três proteínas de membrana: Spike (S), a Membrana (M) e envelope (E). Em alguns coronavírus há uma quarta proteína de membrana hemaglutinina-esterase (HE). O diâmetro do vírion varia entre 100 a 160 nanômetros e apresenta diferentes projeções ou espiculas da proteína S que lhe dão aparência de coroa solar em microscopia eletrônica (FEHR; PERLMAN, 2015; CUI; LI; SHI, 2019). Possuem nucleocapsídeo helicoidal e genoma RNA de fita simples em sentido positivo (+ss) com 20 a 32 kb, sendo o maior genoma entre os vírus RNA. Esse RNA se encontra associado com as proteínas do nucleocapsídeo (N) e esta constituído

por uma única molécula não segmentada que, igual que o RNAm do hospedeiro possui sequências Cap na extremidade 5' e Poly A na extremidade 3' (Figura 5) (HARTENIAN et al., 2020).

Figura 5. Morfologia do vírion de coronavírus. Micrografias eletrônicas de coloração negativa em coronavírus murino A59 (MHV-59) sem expressão da proteína HE (A) e com a proteína HE (B). Tomografia crioelétrica do MHV-59 (C), envelope colorido com estrias laranjas e a região do nucleocapsídeo colorida em azul (D). Adaptado de ICTV, 2020; quem adaptou parcialmente de BÁRCENA et al., 2009.



O genoma está flanqueado nas extremidades 5' e 3' por regiões não traduzidas (UTRs), sendo que a da região 3' auxilia no início da replicação. Na extremidade 5' se encontra uma sequência *leader* (L) de 70-100 nucleotídeos, seguida de uma sequência reguladora de transcrição (TRS) que também está presente no início de cada gene. As sequências ORF1a e ORF1b codificam as poliproteínas não estruturais PP1a (nsps 1-11) e PP1b (nsps 1-16). A seguir encontram-se as sequências que codificam as proteínas estruturais HE, S, E, M e N, e as sequências das proteínas acessórias 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b e 9 (Figura 6) (HARTENIAN et al., 2020). A função destas aproximadamente 28 proteínas traduzidas é descrita na tabela 3. (CHEN; LIU; GUO, 2020; HARTENIAN et al., 2020; SIMABUCO et al., 2021).

Figura 6. Organização do genoma dos coronavírus e estrutura do complexo de replicação - transcrição (RTC). Adaptado de HARTENIAN et al., 2020.

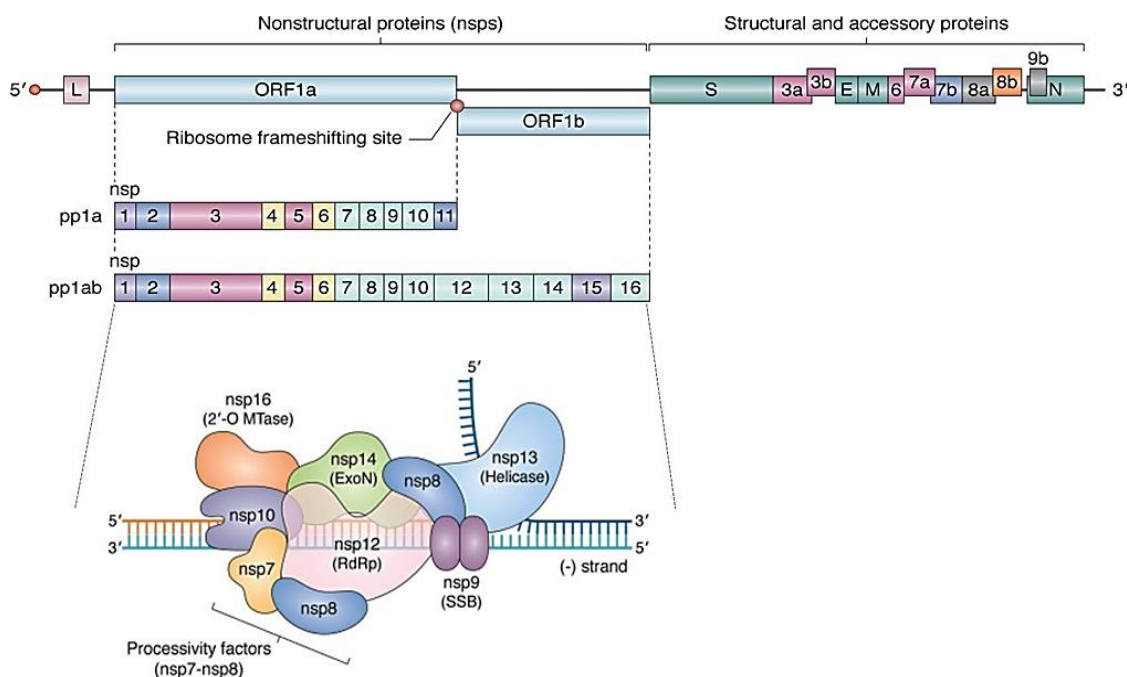


Tabela 3. Funções das proteínas dos coronavírus. Adaptado de CHEN; LIU; GUO, 2020; HARTENIAN et al., 2020; SINAMBUCO et al., 2021.

Proteínas estruturais	Funções
S	Proteína de pico, ligação ao receptor da célula hospedeira para entrada viral
E	Proteína do envelope, montagem e liberação viral
M	Proteína de membrana, forma de vírion, curvatura de membrana
N	Proteína de nucleocapsídeo, ligação ao genoma de RNA, amarração do genoma a RTCs, produção de IFN tipo I e inibição de sinalização, supressor viral de silenciamento de RNA
<b>II. Proteínas não estruturais</b>	
Nsp1	Degradação de mRNA celular, inibição de tradução do hospedeiro e inibição da via de IFN tipo I
Nsp2	Desconhecido
Nsp3	Protease semelhante à papaína (PL <sup>pro</sup> ), clivagem de polipeptídeo, e interfere na produção de IFN tipo I e inibição de sinalização
Nsp4	Proteína transmembrana, Formação de vesículas de membrana
Nsp5	Proteína semelhante a 3C (3CL <sup>pro</sup> ) clivagem de polipeptídeos, inibição de sinalização de IFN tipo I
Nsp6	Restringindo a expansão do autofagossomo, formação de vesículas de membrana
Nsp7	Fator de processividade para RdRp, cofator com nsp8 e nsp12 (RdRp)
Nsp8	Fator de processividade para RdRp, cofator com nsp7 e nsp12 (RdRp)
Nsp9	Proteína de ligação e dimerização do RNA
Nsp10	Atividade catalítica de Nsp14-ExoN, proteína-esqueleto e cofator para nsp14 e nsp16

Nsp11	Desconhecido
Nsp12	RNA polimerase dependente de RNA (RdRp)
Nsp13	SF1 5' a 3' RNA helicase, atividade 5'-trifosfatase
Nsp14	Exonuclease de revisão, N7- metiltransferase
Nsp15	Endoribonuclease, evasão de sensores dsRNA
Nsp16	2'- O- metiltransferase, regula negativamente as atividades da resposta imune
<b>III. Proteínas acessórias</b>	
3a	Atividade de canal iônico, necrose, piroptose, indução de apoptose e parada do ciclo celular
3b	Inibição de produção e sinalização de IFN tipo I, indução de apoptose e necrose e parada do ciclo celular
6	Produção de IFN tipo I e inibição de sinalização e síntese de DNA celular
7a	Inibição da tradução do hospedeiro, indução de apoptose e parada do ciclo celular
7b	Desconhecido
8a	Indução de apoptose dependente de caspase
8b	Síntese de DNA celular
9b	Indução de apoptose dependente de caspase

## 2.2.2 Fisiopatologia da infecção por coronavírus

### 2.2.2.1 Ciclo de multiplicação dos coronavírus

Para ingressar na célula os coronavírus utilizam a proteína *spike* (S) do envelope para se ligar com o receptor na membrana da célula hospedeira, esse receptor determina o tropismo celular e varia segundo a espécie de coronavírus (Tabela 4). Os HCoV-229E se ligam à enzima de superfície celular amino peptidase N (APN), os HCoV-NL63 e SARS-CoV usam a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), os MERS-CoV se ligam através da dipeptidil peptidase 4 (DPP4), e os HCoV-OC43 e HCoV-HKU1 usam ácido siálico 9-O-acetilado (FUNG; LIU, 2019; LIN et al., 2020).

Tabela 4. Receptores de diferentes coronavírus em alguns dos seus hospedeiros. Adaptado de FUNG; LIU, 2019.

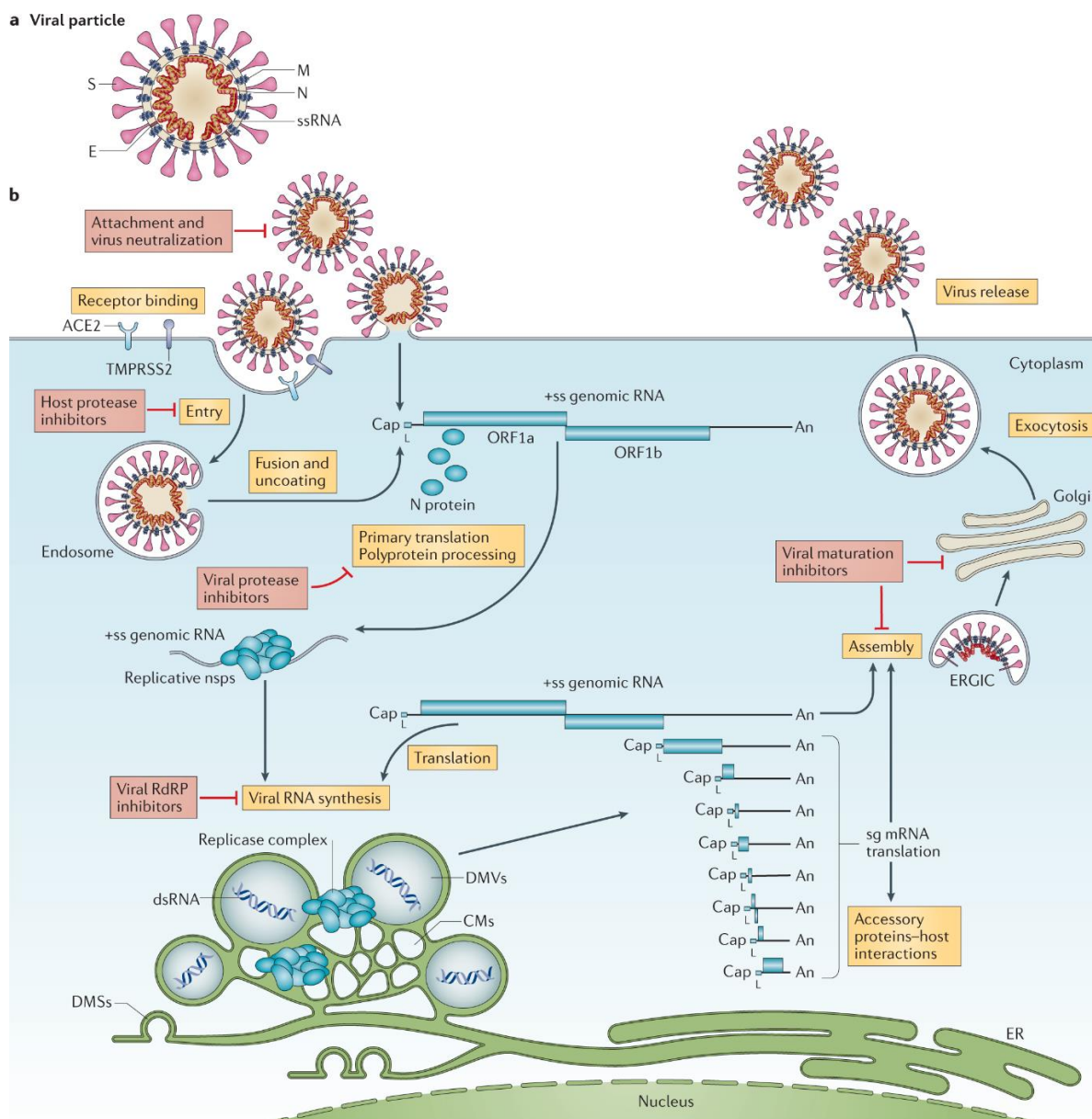
	HCoV-229E	HCoV - NL63	HCoV-OC43	HCoV-HKU1	SARS - CoV	MERS - CoV	SARS-CoV-2
<b>Gênero</b>	Alfa-CoVs	Alfa-CoVs	Beta-CoVs	Beta-CoVs	Beta-CoVs	Beta-CoVs	Beta-CoVs
<b>Reservatório natural</b>	N/A	N/A	N/A	N/A	Morcegos	Morcegos	Morcegos
<b>Hospedeiro intermediário</b>	N/A	N/A	N/A	N/A	Civeta de palma	Camelo dromedário	Pangolin
<b>Receptor alvo</b>	APN	ACE2	Ácido siálico 9-O-acetilado	Ácido siálico 9-O-acetilado	ACE2	DPP4	ACE2
<b>Distribuição de receptor</b>	Células epiteliais, células endoteliais, leucócitos e fibroblastos	Endotélio cardíaco e vascular, epitélio do intestino delgado, macrófagos e	Mucina submaxilar	Mucina submaxilar	Endotélio cardíaco e vascular, epitélio do intestino delgado, macrófagos	Células endoteliais, células epiteliais, células inflamatórias do pulmão e	Endotélio cardíaco e vascular, epitélio do intestino delgado, macrófagos

		monócitos alveolares, células epiteliais da traqueia, brônquios e alvéolos			alveolares e monócitos, células epiteliais da traqueia, brônquios e alvéolos	células do músculo liso	alveolares e monócitos, células epiteliais da traqueia, brônquios e alvéolos
<b>Síndromes</b>	Doenças respiratórias superiores leves, semelhantes à gripe comum	Doenças respiratórias superiores leves, semelhantes à gripe comum	Doenças respiratórias superiores leves, semelhantes à gripe comum	Doenças respiratórias superiores leves, semelhantes à gripe comum	Síndromes SARS	Síndromes MERS	COVID-19

A ligação do domínio de receptor de ligação (DRL) da subunidade S1 da proteína *spike* resulta na mudança conformacional da proteína S, a qual é subsequentemente clivada e ativada pela protease da superfície da célula hospedeira TMPRSS2 nos locais S1/S2 e S2'. Isso permite a fusão do vírion com a membrana e a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma (Figura 7) (HARTENIAN et al., 2020; LIN et al., 2020; V'KOVSKI et al., 2021).

Uma vez no citoplasma o gene ORF1 com Cap do genoma viral é traduzido para produzir as poliproteínas pp1A que abarca desde a nsps1 até a nsp11, ou a pp1ab, um polipeptídeo mais longo que traduz desde a nsps1 até a nsp16 (CHEN; LIU; GUO, 2020). Para expressar ambas poliproteínas o vírus utiliza uma sequência escorregadia (5'-UUUAAAC-3') e uma estrutura em pseudo-nó de RNA a qual, na maioria dos casos, o ribossomo desenrola e continua a tradução até encontrar o códon de parada rep1a. Em 25-50% das vezes o pseudo-nó bloqueia o alongamento contínuo do ribossomo fazendo com que ele pause na sequência escorregadia. Essa pausa muda o quadro de leitura e o ribossomo se move um nucleotídeo para trás no que seria o deslocamento de uma base (-1), estendendo assim a tradução para rep1b e resultando na tradução de uma proteína de maior tamanho chamada de pp1ab (Figura 6) (WEISS; NAVAS-MARTIN, 2005; FEHR; PERLMAN, 2015; CHEN; LIU; GUO, 2020; HARTENIAN et al., 2020).

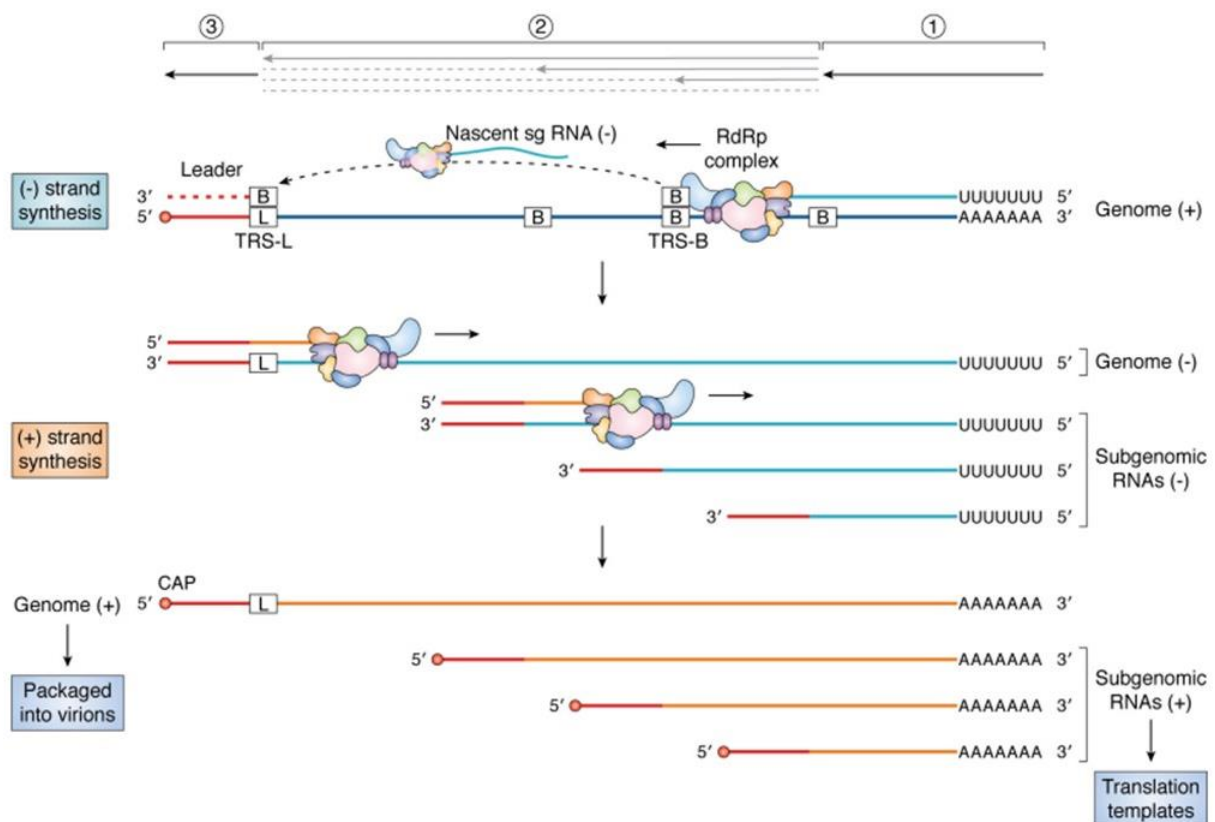
Figura 7. Ciclo de multiplicação dos coronavírus. A partícula viral (a) se liga aos receptores e mediadores celulares que promovem a absorção e fusão viral (b). O RNA viral é liberado e consequentemente se dão os processos de tradução, transcrição, e ensamble dos novos vírions que serão liberados por exóticos. Autor: V'KOVSKI et al., 2021.



As poliproteínas não estruturais PP1a e PP1b são clivadas por protease semelhantes à papaína (PLpro1 e PLpro2), e protease de cisteína semelhante à quimiotripsina (3CLpro). Essas clivagens resultam em 16 proteínas individuais que vão formar o complexo de replicação - transcrição (RTC) Figura 6 (TONG et al., 2012; FEHR; PERLMAN, 2015; HARTENIAN et al., 2020).

Para se multiplicarem, os coronavírus sintetizam RNA de sentido negativo ((-)ssRNA) para usar como modelo na síntese de novas cópias de RNA de sentido positivo ((+)ssRNA) de comprimento completo ou segmentados. A replicação inicia na extremidade 3' do (+)ssRNA viral com a síntese da uma fita nascente de (-)ssRNA até que uma sequência TRS é copiada. Devido à complementariedade da cópia do TRS com o TRS *leader*, o complexo RTC pode “pular” em direção à extremidade 5' onde a sequência líder também é copiada. O complexo RTC pode pular durante a cópia de qualquer dos TRS ao longo do genoma (transcrição descontínua) ou pode não pular (transcrição contínua), resultando em cópias de RNA (+ss) de tamanho completo (genômico) ou subgenômicos de diferentes tamanhos. Estruturalmente os RNAs subgenômicos são policistrônicos, mas funcionalmente são monocistrônicos pois apenas o primeiro fragmento codificante da extremidade 5' é traduzido pelo RTC (Figura 8) (HARTENIAN et al., 2020; ICTV, 2020; V'KOVSKI et al., 2021)

Figura 8. Transcrição contínua e descontínua nos coronavírus. O RNA(-) serve de molde para sintetizar RNA(+) íntegro (transcrição contínua), ou só fragmentos de RNA(+) (transcrição descontínua), estes RNA(+) servem de molde para a síntese mais de RNA(-) e como *templete* para a tradução. Autor: HARTENIAN et al., 2020.





As novas cópias de RNA de sentido positivo vão servir de molde para a tradução de novas proteínas nas vesículas de membrana dupla no retículo endoplasmático (RE), e os RNA de tamanho completo vão se ligar com a proteína N para formar o nucleocapsídeo e adquirir as proteínas do envelope por brotamento das membranas do RE. O vírion envelopado é exteriorizado da célula por exocitose (Figura 7) (WEISS; NAVAS-MARTIN, 2005; HARTENIAN et al., 2020; V'KOVSKI et al., 2021).

### 2.2.2.2 Sintomatologia

Os sintomas apresentados pela infecção por coronavírus vão depender da espécie do vírus, o hospedeiro, o receptor utilizado pelo vírion para ingressar na célula, a distribuição desse receptor nas diferentes células/órgãos do hospedeiro, da imunidade previa, idade e das doenças concomitantes (FEHR; PERLMAN, 2015; CHEN; LIU; GUO, 2020). Na tabela 5 se descrevem os coronavírus patogênicos de diferentes hospedeiros e os sintomas que cada um destes apresenta.

Tabela 5. Principais coronavírus patogênicos e seus sintomas. Adaptado de (CHEN; LIU; GUO, 2020)

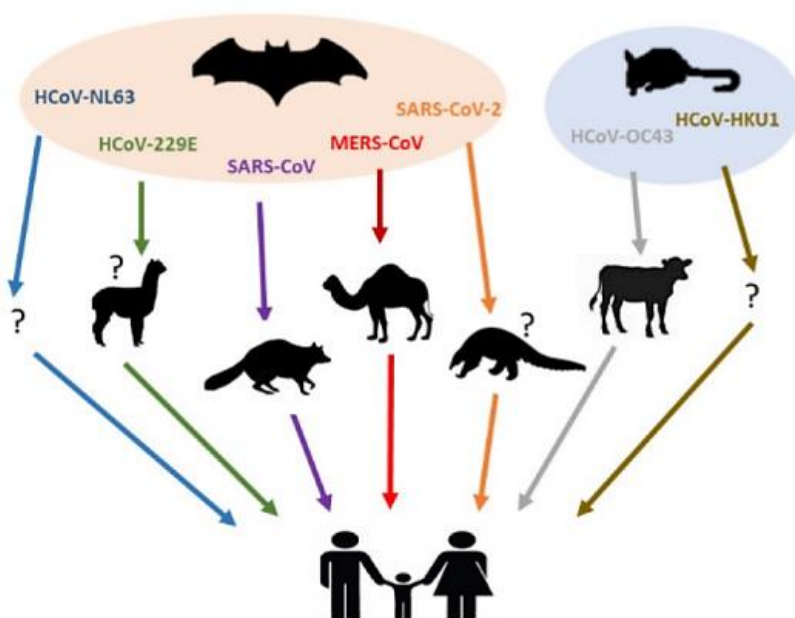
Vírus	Gênero	Hospedeiro	Sintomas
CoV-229E humano	Alfa	Humano	Infecções leves do trato respiratório
CoV - NL63 humano	Alfa	Humano	Infecções leves do trato respiratório
PRCV/ISU - 1	Alfa	Porco	Infecções leves do trato respiratório
TGEV/PUR46-MAD	Alfa	Porco	Diarreia, com mortalidade de 100% em leitões com menos de 2 semanas de idade
PEDV/ZJU - G1-2013	Alfa	Porco	Diarreia aquosa severa
SeACoV - CH/GD - 01	Alfa	Porco	Diarreia severa e aguda e vômitos agudos
Canine CoV /TU336 /F/ 2008	Alfa	Cão	Sinais clínicos leves, diarreia
Camel <i>alphacoronavirus</i> isolate camel / Riyadh	Alfa	Camelo	Assintomático
Vírus da peritonite infecciosa felina	Alfa	Gato	Febre, vasculite e serosite, com ou sem efusões
CoV - HKU1 humano	Beta	Humano	Pneumonia
CoV - OC43 humano	Beta	Humano	Infecções leves do trato respiratório
SARS - CoV	Beta	Humano	Síndrome respiratória aguda grave, taxa de mortalidade de 10%
MERS - CoV	Beta	Humano	Síndrome respiratória aguda grave, taxa de mortalidade de 37%
Bovino CoV / ENT	Beta	Vaca	Diarréia

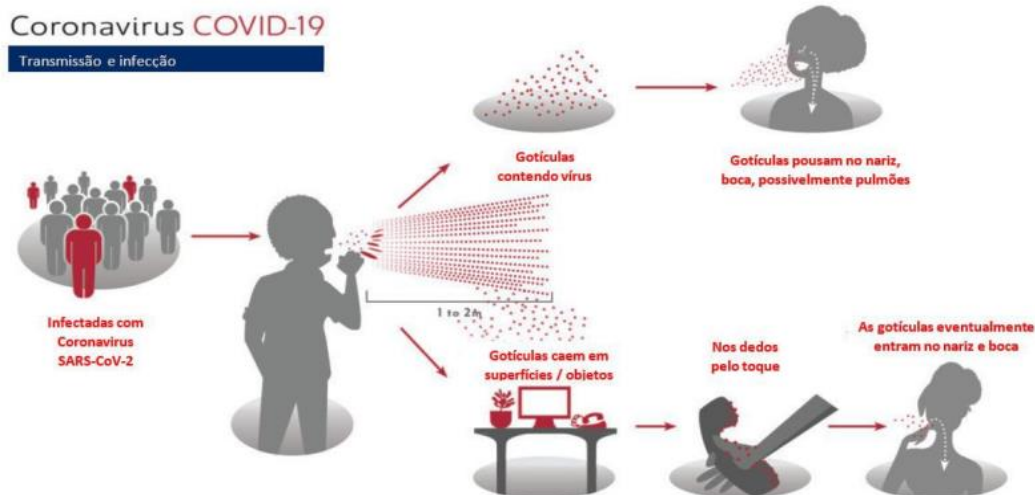
Vírus	Gênero	Hospedeiro	Sintomas
Equine CoV / Obihiro12-1	Beta	Cavalo	Febre, anorexia, leucopenia
MHV-A59	Beta	Mouse	Pneumonia aguda e lesões pulmonares graves
Beluga Whale CoV / SW1	Gama	Baleia	Doença pulmonar, insuficiência hepática aguda terminal
IBV	Gama	Frango	Doença respiratória grave
Bulbul coronavirus HKU11	Delta	Bulbul	Doença respiratória (coletada do trato respiratório de aves selvagens mortas)
Sparrow coronavirus HKU17	Delta	Pardal	Doença respiratória (coletada do trato respiratório de aves selvagens mortas)

### 2.2.3 Transmissão

Os coronavírus são eliminados por via respiratória e oral-fecal. Sendo assim, a principal forma de contágio é por meio de inalação nasal/oral ou por contato direto com fômites contaminados com gotículas respiratórias expelidas por hospedeiros infectados ao tossir, espirrar, falar, cantar ou respirar pesadamente (TONG et al., 2013; WHO, 2020). Em alguns coronavírus a transmissão fecal é a principal via de transmissão. O consumo de animais infectados se considera uma forma de transmissão do vírus de animal para humano devido ao contato próximo durante o manuseio (HELLER; MOTA; GRECO, 2020; SHEREEN et al., 2020; WHO, 2020; YE et al., 2020). Na Figura 9 (superior) se apresenta a transmissão entre diferentes hospedeiros, e (inferior) a transmissão entre humanos.

Figura 9. Vias de transmissão dos coronavírus humanos de origem zoonótica. Autores: YE et al., 2020 (superior), WHO, 2020 (inferior)



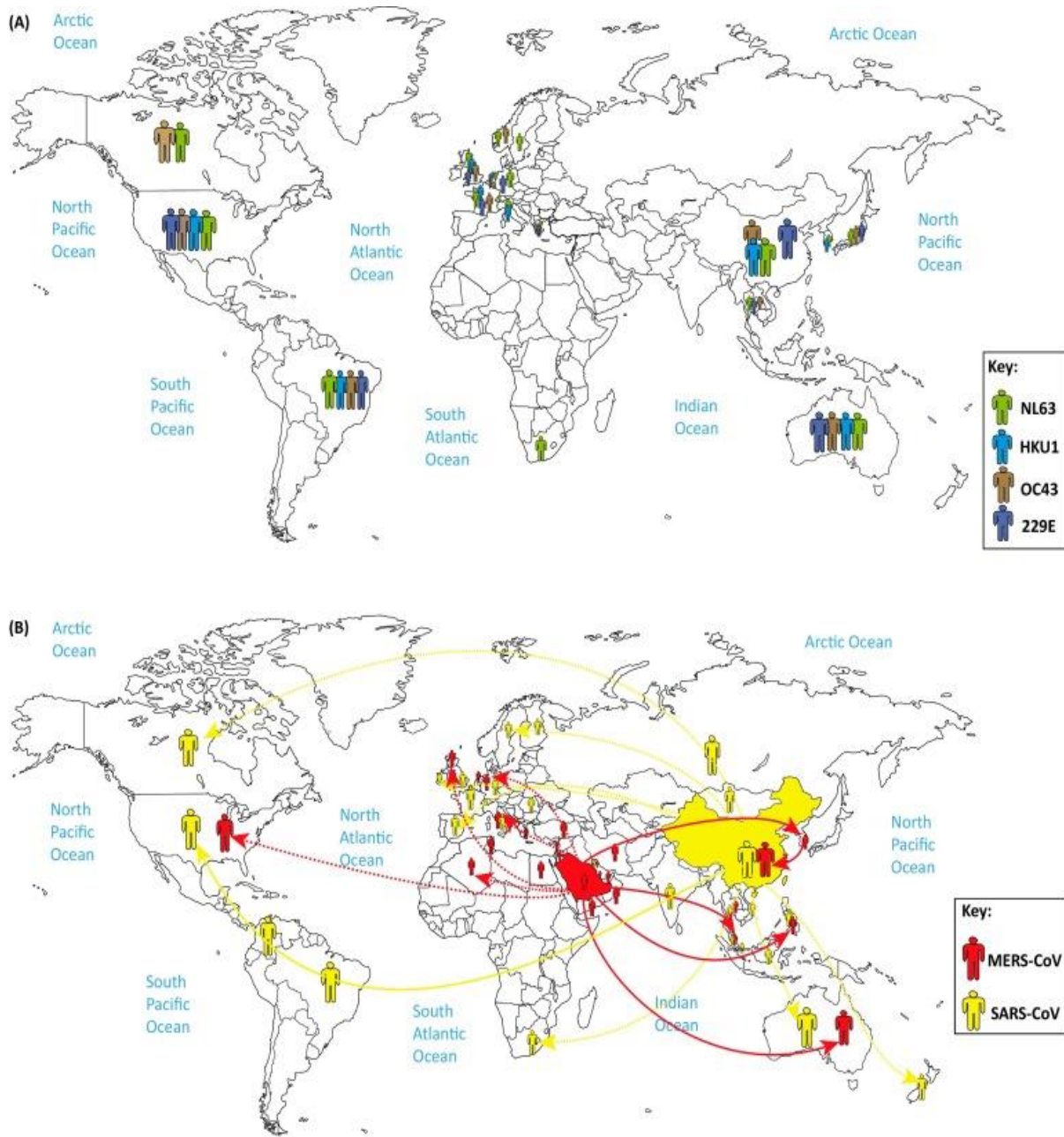


### 2.2.4 Epidemiologia

Os coronavírus humanos (HCoVs) foram descritos pela primeira vez na década de 1960 em pacientes com resfriado comum. A partir desse momento têm sido descritas as espécies HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 e HCoV-HKU1, as quais tem distribuição mundial e geralmente causam doença respiratória superior leve (Figura 10-A). Os coronavírus altamente patogênicos surgiram na população humana como resultado de eventos de transbordamento da vida selvagem, o SARS-CoV (2002) foi identificado na China e se espalhou para 29 países durante o período de novembro de 2002 a julho de 2003. Durante esse período, houve 8096 casos confirmados e 774 mortes (letalidade de 9,6%). O MERS-CoV (2011) foi identificado na Arábia Saudita e se espalhou para 27 países em abril de 2012, infectando 2.502 pessoas, com 861 mortes (letalidade de 34,4%) (Figura 10-B)(SU et al., 2016; MACHHI et al., 2020).

O mais recente, SARS-CoV-2 (2019), tem distribuição mundial e é o agente causal da atual pandemia de COVID-19 (HARTENIAN et al., 2020). Até o final da Semana Epidemiológica (SE) 5 de 2021, no dia 6 de fevereiro de 2021, foram confirmados 105.764.730 casos e 2.309.346 óbitos por COVID-19 no mundo. No Brasil foram confirmados 9.497.795 casos e 231.012 óbitos (MINISTERIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2021).

Figura 10. Distribuição global de coronavírus humanos. Coronavirus NL63, HKU1, OC43, 229E (A), e coronavírus MERS-CoV e SARS-CoV (b). (SARS-CoV-2 não incluído). Autor SU et al., 2016.



### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Características do estudo e localização**

O estudo foi de tipo descritivo, de corte transversal, e a amostragem de tipo não probabilístico, uma vez que os indivíduos foram coletados por conveniência e sem considerar aspectos como idade ou sexo. Amostras de pulmão e intestino delgado de morcegos de diferentes espécies e municípios do estado de São Paulo foram encaminhados ao Laboratório de Virologia (LabVir) do Instituto de Ciências Básicas e da Saúde (ICBS), como parte de uma parceria com o programa de diagnóstico de raiva do Instituto Pasteur. Todos os indivíduos usados em este trabalho foram previamente testados com resultado negativo para o vírus da Raiva segundo protocolo do Instituto Pasteur. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de ética no Uso de Animais do Instituto Pasteur (CEUA-IP), aprovação 04/2020.

#### **3.2 Identificação das espécies de morcegos**

Os indivíduos foram identificados geneticamente por sequenciamento do gene mitocondrial Citocromo C Oxidase subunidade I (COI). Sendo assim, o DNA total de fígado foi extraído usando o kit RTP® DNA/RNA viroses Mini Kit (Strattec), seguindo as instruções do fabricante. Um fragmento de aproximadamente 710 pb do gene COI foi amplificado por PCR, usando os iniciadores universais LCO 1490 (5'- GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') e HCO 2198 (5'- TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA -3'), seguindo condições previamente descritas (Tabela 1 e 2) (HEBERT et al., 2003).

Os produtos da amplificação foram purificados usando o kit MinElute® (QUIAGEN) e encaminhados para sequenciamento por método de Sanger. As sequências obtidas foram editadas usando CHROMAS 2.6.5 e em seguida comparadas com sequências disponíveis no GenBank® para a identificação por homologia de sequências.

Tabela 6. Reagentes da PCR para amplificação de um fragmento do gene COI de morcegos

Reagente	Concentração	Volume	Concentração final
Tampão sem Mg	10x	5 µL	1X
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2,5 µL	2,5 mM
dNTPS	10 mM	8 µL	1,6 mM
LCO 1490	10 pmol	2,5 µL	0,5 pmol
HCO 2198	10 pmol	2,5 µL	0,5 pmol
<i>Taq</i> DNA polymerase	5 U/ µL	0,5 µL	0,05 U/ µL
Água ultrapura	--	24 µL	----
DNA	100 ng/µL	5 µL	10 ng/µL
Volume final	--	50 µL	

Tabela 7. Condições de ciclagem da PCR para amplificação de um fragmento do gene COI de morcegos

Fase	Temperatura °C	Duração	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5 minutos	1
Desnaturação	94°C	45 segundos	35
Anelamento	55°C	45 segundos	
Extensão	72°C	2 minutos	
Extensão final	72°C	10 minutos	1

### 3.3 Extração de RNA e síntese de cDNA

Fragmentos de pulmão e/ou intestino (50-100 mg) foram submetidos à extração de RNA total usando o reagente Trizol® (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante; o RNA foi diluído em 50 µL de TE e quantificado por fluorometria no Quibit™ 2.0. A concentração do RNA foi ajustada para aproximadamente 100 ng/µL, e a partir de 10 µL de RNA foi sintetizado o DNA complementar usando o kit de transcrição reversa High Capacity (Applied Biosystems™), e 15 pmol uma mistura de dois iniciadores *anti-sense* universais para alfa influenzavírus Uni12 (5'-AGC AAA AGC AGG-3') e Uni12G (5'- AGC GAA AGC AGG -3') (HOFFMANN et al., 2001).

### 3.4 Controle interno

Com o objetivo de obter um controle interno da reação de transcrição reversa e PCR, foi amplificado um fragmento de 127 pb do transcrito do gene que codifica a Beta actina.

Sendo assim, os iniciadores Bat/ $\beta$ -actin/F (5'-TCC TGG GYA TGG ART CCT GT-3') e Bat/ $\beta$ -actin/R (5'-CCK GGG TAC ATG GTG GTY CC-3'), foram desenhados usando sequencias de morcegos disponíveis no Genbank®. Os acessos utilizados foram: XM\_028527288.1, XM\_028527287.1, XM\_024576734.1, GU134954.1, GU134949.1, XM\_023532794.1, XM\_019637557.1, XM\_011363829.2, XM\_008156007.2, XM\_005878947.2, JN613817.1, JN613816.1. As condições e componentes nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8. Mistura de reagentes da PCR para amplificação de um fragmento do transcrito do gene que codifica para Beta actina.

Reagente	Concentração final	Volume	Concentração final
Buffer sem Mg	10x	2,5 $\mu$ L	1X
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	0,75 $\mu$ L	1,5 mM
dNTPS	10 mM	1 $\mu$ L	0,4 mM
Bat/ $\beta$ -actin/F	10 pmol	0,5 $\mu$ L	0,2 pmol
Bat/ $\beta$ -actin/R	10 pmol	0,5 $\mu$ L	0,2 pmol
<i>Taq</i> DNA polymerase	5 U/ $\mu$ L	0,2 $\mu$ L	0,05 U/ $\mu$ L
Agua ultrapura	--	17,55 $\mu$ L	----
cDNA	--	2 $\mu$ L	----
Volume final	--	25 $\mu$ L	----

Tabela 9. Condições de ciclagem da PCR para amplificação de um fragmento do transcrito do gene que codifica para Beta actina.

Fase	Temperatura °C	Duração	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5 minutos	1
Desnaturação	94°C	30 segundos	35
Anelamento	60°C	45 segundos	
Extensão	72°C	50 segundos	
Extensão final	72°C	10 minutos	1

### 3.5 PCR para a detecção de alfa influenzavírus

Para a detecção de alfa influenzavírus foram utilizados iniciadores anteriormente descritos (FOUCHIER et al., 2000) M52C (5'-CTT CTA ACC GAG GTC GAA ACG-3 ') e M253R (5'-AGG GCA TTT TGG ACA AAG/T CGT CTA-3 '), os quais amplificam um fragmento de 245 pb de

uma região conservada do gene da proteína da Matriz (M). Condições e concentrações dos reagentes da reação estão descritos nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10. Mistura de reagentes da PCR para amplificação de um fragmento do gene que codifica para a proteína da Matriz dos alfa influenzavírus.

Reagente	Concentração	Volume	Concentração final
Buffer sem Mg	10x	2,5 µL	1X
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1 µL	2,5 mM
dNTPS	10 mM	1 µL	0,4 mM
M52C	10 pmol	0,6 µL	0,24 pmol
M253R	10 pmol	0,6 µL	0,24 pmol
<i>Taq</i> DNA polymerase	5 U/ µL	0,3 µL	0,05 U/ µL
Água ultrapura	--	17 µL	----
cDNA	--	2 µL	----
Volume final	--	25 µL	----

Tabela 11. Condições de ciclagem da PCR para amplificação de um fragmento do gene que codifica para a proteína da Matriz dos alfa influenzavírus.

Fase	Temperatura °C	Duração	Ciclos
Desnaturação inicial	94°C	3 minutos	1
Desnaturação	94°C	1 minuto	40
Anelamento	57°C	1 minuto	
Extensão	72°C	30 segundos	
Extensão final	72°C	15 minutos	1

Como controle positivo, foi utilizado RNA de vírus influenza H1N1 isolado de pulmão de suíno e confirmado por sequenciamento. Amplicões positivos foram inseridos em um plasmídeo pCR2.1 TOPO TA (Invitrogen), e transformados quimicamente em células *Escherichia coli* NEB® 10-beta competentes (New England Biolabs). O DNA plasmidial foi purificado pelo método de lise alcalina (GREEN; SAMBROOK, 2012) clivado com a enzima *EcoRI* (Jena Bioscience), e os clones contendo as sequências alvo foram confirmados por PCR e sequenciamento. Para determinar o limite de detecção da PCR, diluições em base dez do DNA plasmidial contendo  $3,53 \times 10^8$  até  $3,53 \times 10^{-2}$  cópias com o inserto do gene que codifica a proteína M do vírus H1N1 também foram testadas por PCR para IAV.



### 3.6 nPCR para a detecção de coronavírus (*Orthocoronavirinae*)

Para a detecção de coronavírus foi utilizada uma RT-nPCR com iniciadores previamente descritos (POON et al., 2005; CHU et al., 2011), Os quais amplificaram um fragmento do gene da RNA polimerase dependente de RNA (RpRd). Os iniciadores, concentrações dos reagentes, e as condições de ciclagem são descritos nas Tabelas 12, 13 e 14 respetivamente. As concentrações dos reagentes e as condições de ciclagem foram iguais na primeira e segunda rodada.

Tabela 12. Iniciadores para a detecção de Coronavírus

Iniciadores	Sequência (5' → 3')	Tamanho do fragmento
RdRp-N1-F	GGK TGG GAY TAY CCK AAR TG	602 pb
RdRp-N1-R	TGY TGT SWR CAR AAY TCR TG	
RdRp-N2-F	GGTTGGGACTATCCTAAGTGTGA	440 pb
RdRp-N2-R	CCATCATCAGATAGAATCATCATA	

Tabela 13. Mistura de reagentes da PCR para a detecção de Coronavírus

Reagente	Concentração	Volume	Concentração final
Buffer sem Mg	10x	2,5 µL	1X
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	0,75 µL	1,5 mM
dNTPS	10 mM	1 µL	0,4 mM
M52C	10 pmol	0,3 µL	0,12 pmol
M253R	10 pmol	0,3 µL	0,12 pmol
<i>Taq</i> DNA polymerase	5 U/ µL	0,2 µL	0,05 U/ µL
Água ultrapura	--	17,95 µL	----
cDNA	--	2 µL	----
Volume final	--	25 µL	----

Tabela 14. Condições de ciclagem da PCR para amplificação de Coronavírus

Fase	Temperatura °C	Duração	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	10 minutos	1
Desnaturação	95°C	30 segundos	40
Anelamento	48°C	45 segundos	
Extensão	72°C	50 segundos	
Extensão final	72°C	10 minutos	1

Como controle positivo foi utilizado RNA do vírus SARS-CoV-2 cultivado e cedido pelo Instituto de Ciências Biológicas da Universidade São Paulo (USP). Amplicões positivos da segunda rodada foram inseridos em um plasmídeo pCR2.1 TOPO TA (Invitrogen), e transformados quimicamente em células *Escherichia coli* NEB® 10-beta competentes (New England Biolabs). O DNA plasmidial foi extraído pelo método de lise alcalina com SDS (GREEN; SAMBROOK, 2012), clivado com a enzima *EcoRI* (Jena Bioscience), e os clones contendo as sequências alvo foram confirmados por PCR e sequenciamento. Para determinar o limite de detecção da PCR, diluições em base dez do DNA plasmidial contendo  $4,59 \times 10^8$  até  $4,59 \times 10^{-2}$  cópias com o inserto do gene que codifica a RpRd do SARS-CoV-2 também foram testadas por PCR para a subfamília *Orthocoronavirinae*.

### **3.7 Visualização dos produtos**

Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose ao 1% P/V colorido com 0,5 µg/mL de brometo de etídio a 50V durante 1 hora e corridos em paralelo com um marcador de 100 pb (Ludwig Biotec).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Municípios de origem dos morcegos.

Foram avaliados cento e onze indivíduos provenientes 23 municípios São Paulo: Araraquara (n: 8), Campinas (n: 31), Caraguatatuba (n: 1), Catanduva (n: 3), Diadema (n: 2), Holambra (n: 2), Itapira (n: 4), Jarinu (n: 1), Louveira (n: 4), Marília (n: 5), Olímpia (n: 2), Ribeirão Preto (n: 22), Rio Claro (n: 3), Santa Cruz das Palmeiras (n: 1), Santa fé do Sul (n: 1) São Bernardo do Campo (n: 3), São Carlos (n: 1), São João de Boa Vista (n: 1), Sumaré (n: 2), Tatuí (n: 1), Ubatuba (n: 2), Valinhos (n: 2), são Paulo (n: 2) (Figura 11).

Figura 11. Mapa com os municípios de origem dos morcegos.



### 4.2 Identificação das espécies de morcegos

Os morcegos foram classificados em 12 espécies diferentes: *Artibeus lituratus* (n: 6), *Cynomops planirostris* (n: 16), *Eumops glaucinus* (n: 10), *Eumops perotis* (n: 1), *Glossophaga soricina* (n: 5), *Molossus molossus* (n: 36), *Molossus rufus* (n: 7), *Myotis riparius* (n: 1), *Myotis* sp. (n:1), *Stenodermatinae* (n:2). Vinte e quatro amostras não foram identificadas. As espécies e o teste feito para cada órgão estão descritos na Tabela 15.

Tabela 15. Descrição das espécies de morcegos identificados e órgãos testados por RT-PCR para alfa influenzavírus e coronavírus.

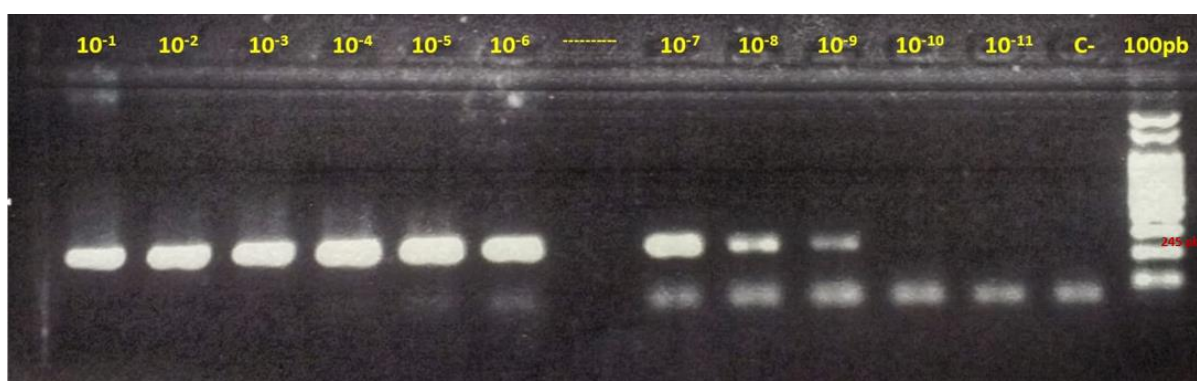
Espécie	Número de indivíduos testados e tipo de amostra testada			
	ID	P	P e ID	Total
<i>Artibeus lituratus</i>	1	1	4	6
<i>Cynomops planirostris</i>	9	3	4	16
<i>Eumops glaucinus</i>	4	3	3	10
<i>Eumops perotis</i>	1	0	0	1
<i>Eumops sp</i>	0	0	1	1
<i>Glossophaga soricina</i>	3	1	1	5
<i>Lasiurus ega</i>	0	1	0	1
<i>Molossus molossus</i>	20	2	14	36
<i>Molossus rufus</i>	2	1	4	7
<i>Myotis riparius</i>	1	0	0	1
<i>Myotis sp</i>	1	0	0	1
<i>Stenodermatinae</i>	1	0	0	2
Não identificada	23	0	1	24

ID: Intestino delgado; P: Pulmão

### 4.3 Limite de detecção da PCR para alfa influenzavírus

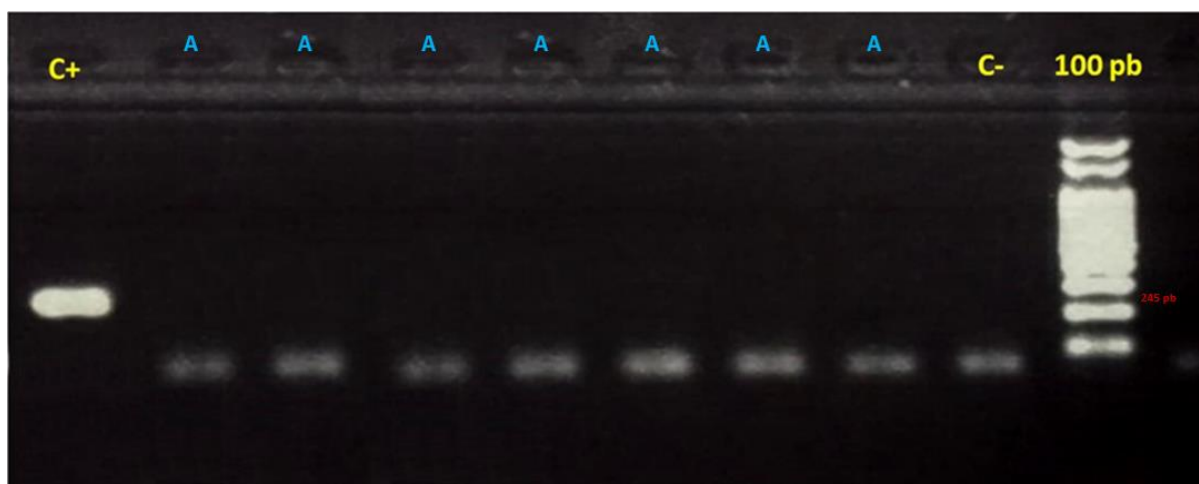
Quando as diluições em base dez do DNA plasmidial foram submetidas a reações de amplificação, resultados positivos foram obtidos até a diluição  $10^{-9}$ , a qual corresponde a 4,59 cópias genômicas por microlitro do Plasmídeo TOPO TA contendo um fragmento de 245 pb do gene que codifica a proteína M do vírus H1N1 (Figura 13).

Figura 12. Foto da eletroforese em gel de agarose do limite de detecção (LD) da RT-PCR para a detecção de alfa influenzavírus. C+: Controle positivo (245 pb), C-: controle negativo.



Quando as amostras de tecidos de pulmão e intestino delgado dos cento e onze indivíduos apresentados na Tabela 15 foram submetidas às RT-PCR do gene que codifica a proteína de matriz dos IAV, não foi observada amplificação em nenhuma das amostras testadas. A figura 14 apresenta o gel de eletroforese correspondente detecção de RNA dos IAV. A primeira coluna é o controle positivo, seguido de amostras de tecidos de pulmão e intestino, o controle de reação contendo água livre de nucleasse no lugar da amostra e o marcador de peso molecular de 100 pb.

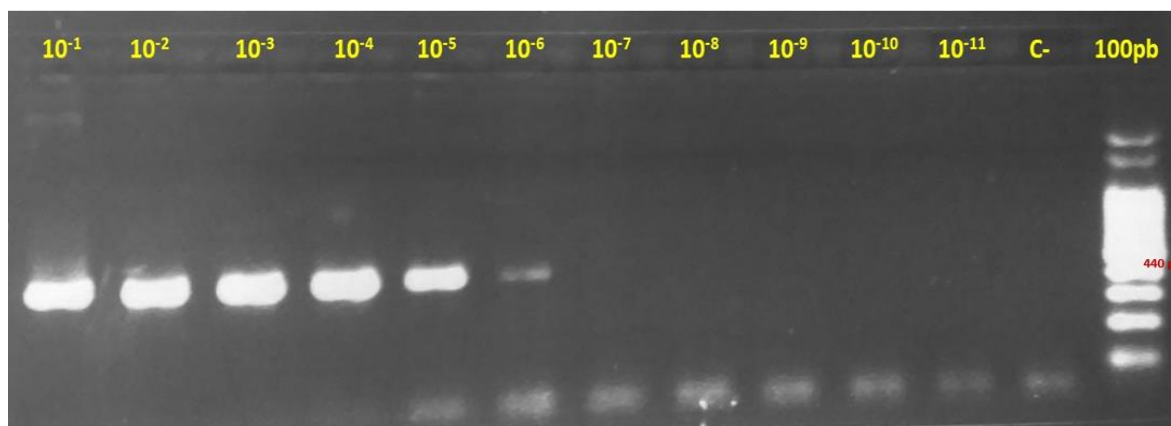
Figura 13. Foto da eletroforese em gel de agarose para a PCR para alfa influenzavírus nas amostras de morcegos. C+: Controle positivo (245 pb), A: amostra, C-: controle negativo.



#### 4.4 Amplificação de coronavírus (*Orthocoronavirinae*)

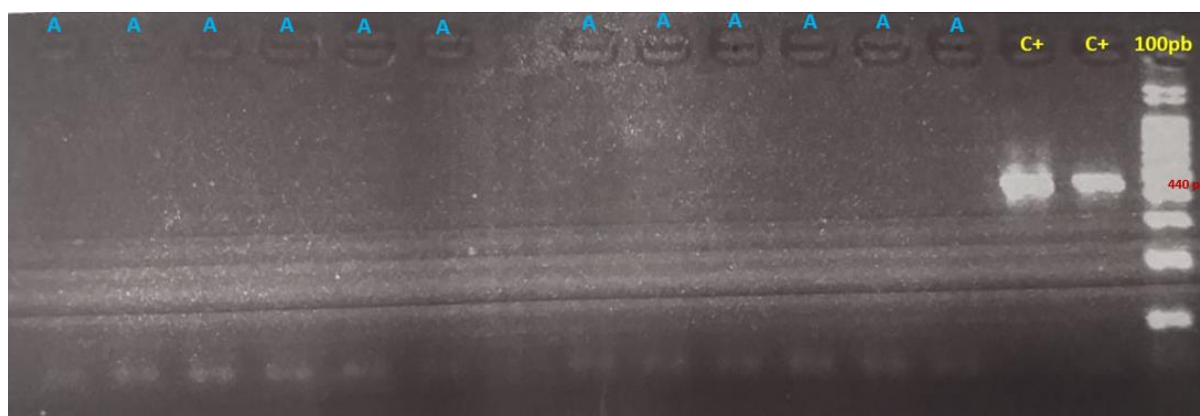
A PCR das diluições em base dez do DNA plasmidial amplificou até a diluição  $10^{-6}$  contendo  $3,53 \times 10^3$  cópias genômicas por microlitro do Plasmídeo TOPO TA contendo um fragmento de 440 pb do gene que codifica para a proteína RdRp do vírus SARS-CoV-2 (Figura 14).

Figura 14. Foto da eletroforese em gel de agarose do LD da PCR para a detecção de coronavírus nas amostras de morcegos. C+: Controle positivo (440 pb), C-: controle negativo.



Quando as diferentes amostras de tecidos foram submetidas a RT-nPCR, não foi observada amplificação para o gene da RdRp dos coronavírus (*Orthocoronavirinae*). Na figura 16 se apresenta a eletroforese, nos primeiros 12 poços foram corridas amostras, seguido do controle negativo contendo água livre de nucleasse no lugar de amostra, controle positivos, controle positivo diluído e por último o marcador de peso molecular de 100 pb.

Figura 15. Foto da eletroforese em gel de agarose para a PCR para a detecção de coronavírus. C+: Controle positivo (440pb), A: amostra.



## 5 DISCUSSÃO

Os morcegos possuem diversas características biológicas que os tornam um reservatório/hospedeiro fascinante e ideal para um grande número de microrganismos potencialmente patogênicos e de interesse em saúde pública (JONES et al., 2009; MORATELLI; CALISHER, 2015). Muitos destes microrganismos são de origem viral, infectam morcegos há milhares de anos e atualmente circulam sem causar nenhum tipo de sintomatologia nesses hospedeiros, provavelmente por desenvolveram uma estreita relação de co-evolução e mecanismos de tolerância imunológica (SMITH; WANG, 2013; WYNNE; WANG, 2013; BROOK; DOBSON, 2015). Por este motivo o objetivo deste estudo foi detectar, por métodos moleculares, a presença de IAV e coronavírus em morcegos coletados no Estado de São Paulo, Brasil.

Neste estudo foram utilizadas uma RT-PCR para um fragmento da região conservada do gene da proteína da Matriz (M) dos alfa influenzavírus, e uma RT-nPCR para um fragmento do gene que codifica a RNA polimerase dependente de RNA (RpRd) dos coronavírus. O limite inferior de detecção das reações foi determinado em 4,59 cópias genômicas/ $\mu\text{L}$  para a RT-PCR de IAV, e  $3,53 \times 10^3$  cópias genômicas/ $\mu\text{L}$  para a RT-nPCR de coronavírus. Não foi observada amplificação quando as cento e onze amostras de pulmão e intestino de morcegos provenientes do estado de São Paulo foram submetidas às RT-PCRs.

Dada a importância de algumas espécies de morcegos na manutenção da circulação de coronavírus na Ásia, a grande maioria dos estudos de detecção destes em morcegos tem sido feita a partir de espécies que ocorrem nessa região geográfica, especialmente na busca de vírus pertencentes à subfamília *Betacoronavirinae*, de altíssima relevância em saúde pública. De forma geral, tem se reportando alta positividade (de 23% e 63%) (POON et al., 2005; AUGUST; MATHEWS; NUNN, 2012), mas em um número maior de estudos a positividade não superou os 14% (CHU et al., 2006; TANG et al., 2006; GLOZA-RAUSCH et al., 2008; ASANO et al., 2016; GÓES et al., 2016; BITTAR et al., 2020). Apesar de não terem sido detectados morcegos positivos para coronavírus no presente estudo, este resultado não está muito distante do que tem sido registrado no Brasil. Buscando identificar a presença de coronavírus em morcegos *Desmodus rotundus*, foi reportada uma frequência de positividade de 14% (1/7) em três morcegos *D. rotundus* e quatro morcegos insetívoros não identificados (BRANDÃO et al., 2008). Em outro estudo, foram encontrados 11,6% de animais positivos

(12/103), sendo cinco indivíduos da espécie *Molossus rufus*, dois *Molossus molossus*, *Phyllostomus discolor* e um indivíduo das espécies, *Glossophaga soricina*, *Artibeus literatus* e *Eptesicus* sp. (BITTAR et al., 2020). GÓES et al., em 2016, encontrou 3,7% de positividade (15/401) em três indivíduos das espécies *Artibeus lituratus*, *Carollia perspicillata* e *Sturnira lilium*, dois indivíduos *M. rufus* e um indivíduo das espécies *Eumops glaucinus*, *Glossophaga soricina*, *Myotis nigricans*, *Myotis riparius*, *Sturnira lilium*. Ainda em 2016, ASANO et al. Identificou 2,9% (9/305) de animais positivos para coronavírus em três morcegos *Cynomops abrasus*, *Cynomops planirostris*, e um morcego da espécie *Desmodus rotundus*, *Glossophaga soricina*, e *Platyrrhinus lineatus* (ASANO et al., 2016). E por último, GOÉS et al., (2013) encontrou frequência de positividade de 1% (2/197) em um indivíduo das espécies *Molossus molossus* e um *M. rufus*.

A divergência na detecção de coronavírus entre os diferentes estudos, incluindo o presente, pode ter diferentes explicações. Embora o controle interno tenha amplificado corretamente em todas as mostras aqui testadas, não foi possível controlar e garantir a cadeia de refrigeração dos indivíduos/amostras antes de serem ingressadas no Instituto Pasteur. O limite inferior de detecção da RT-nPCR aplicada aqui para identificação de coronavírus foi alto, o que pode ter influenciado na falta de detecção desse vírus nas amostras avaliadas. Não entanto, o limite foi estimado a partir da segunda rodada da RT-nPCR devido a que não foi possível clonar o produto da primeira rodada, cuja função seria a de enriquecimento, pelo que é possível que a sensibilidade seja menor do aqui estimado. Não foi possível comparar a sensibilidade com a de outros estudos pois esta não se encontra disponível. Por outro lado, é possível que o número de indivíduos testados por espécie não tenha sido suficiente para uma adequada detecção de coronavírus, considerando-se que, para algumas espécies, somente um indivíduo foi testado. Deste modo, a aplicação de uma técnica mais sensível, como PCR em tempo real, sequenciamento de alto desempenho, ou testar um maior número de indivíduos de cada espécie, possibilite a identificação de coronavírus circulantes em morcegos que ocorrem no Brasil.

A ausência de evidência molecular de alfa influenzavírus nos morcegos deste estudo concorda com resultados obtidos previamente por outros autores, uma vez que a frequência de positividade dos IAV em diferentes espécies de morcegos tem se mostrado ainda mais baixa do que a frequência dos coronavírus. No primeiro estudo que evidenciou a presença de



HL17NL10, em 2012, a frequência de positividade foi de 0,94% (3/316) em morcegos da espécie *Sturnira lillium* na Guatemala. Um ano depois disso, foi identificado o vírus HL18NL11, com uma frequência de positividade de 0,90% (1/110) em indivíduos da espécie *Artibeus lituratus* no Peru (TONG et al., 2013). Em 2015, 1369 morcegos de 26 espécies diferentes da Europa central foram testados para IAV sem que fosse achado evidência molecular da presença desse vírus (FEREIDOUNI et al., 2015). No Brasil foi demonstrado em 2019 por primeira vez o HL18NL11 em morcegos da espécie *A. lituratus* com uma frequência de 0,4% (2/533), mesma espécie de morcego na qual o vírus foi reportado no Peru (CAMPOS et al., 2019). Recentemente, uma frequência de positividade de IAV relativamente alta de 5,4% (33/601) foi encontrada em morcegos *Rousettus aegyptiacus* no Egito; o tipo de IAV foi cultivável, distinto dos já conhecidos, mas 73% similar ao H9N2 (KANDEIL et al., 2019). O limite inferior de detecção da RT-PCR aplicada aqui para alfa influenzavírus mostrou ser muito baixo (4,59 cópias genômicas/ $\mu$ L), correspondendo a uma alta sensibilidade da técnica. No presente estudo, o número de indivíduos *S. lillium* e *A. lituratus* analisados, (espécies em que já foi identificada a circulação de IAVs) foi baixo (Nenhum *S. lillium* e seis *A. lituratus*). Logo, é possível que estudos mais amplos, utilizando um número maior de indivíduos dessas espécies, possibilitem a detecção de IAVs em regiões geográficas diferentes das anteriormente avaliadas (Peru e Guatemala).

Os resultados consideravelmente variáveis e distantes do que se esperaria achar em espécies com tão má reputação quanto os morcegos, demonstram que, apesar de saber que que os morcegos albergam um grande número de patógenos (LUIS et al., 2013), conhecemos muito pouco da dinâmica infecciosa e da forma em que estes vírus circulam em eles (BANERJEE et al., 2019). Em diferentes estudos foi descrita a infecção em morcegos por diferentes patógenos sem que fosse observado sintomatologia aparente (BROOK; DOBSON, 2015); embora os sinais indicativos de doença em morcegos são controversas, se demonstrou que há flutuações sazonais na replicação e subsequentemente nas cargas virais e na frequência de positividade, a qual é influenciada por diferentes fatores biológicos (WANG et al., 2016). Os fatores biológicos que podem influenciar na carga viral e coincidem com o aumento na circulação de vírus são o estresse reprodutivo e nutricional, infecções secundárias por fungos, e presença de grande número de indivíduos juvenis cuja imunidade materna encontra-se reduzida. Estes tipos de fenômenos na biologia do hospedeiro estão

correlacionados positivamente com um aumento na incidência de eventos de transbordamento de vírus para humanos (AMMAN et al., 2012; PLOWRIGHT et al., 2016; SCHUH et al., 2017; BANERJEE et al., 2019; LETKO et al., 2020).

A diversidade de alguns táxons de hospedeiros esta altamente relacionada com a riqueza de vírus associados (BANERJEE et al., 2019), consequentemente os quirópteros e os roedores acabam por abrigar uma riqueza de vírus proporcional com sua diversidade (PEREIRA; BERNARD; AGUIAR, 2020). Nos últimos 20 anos os morcegos têm se convertido no foco das pesquisas em virologia; como resultado disso, foram reportadas mais de 30 novas espécies de coronavírus e ao redor de 200 novas espécies de vírus nesse mesmo período de tempo. Sendo assim, atualmente considera-se que esses animais albergam maior diversidade de patógenos por espécie do que os roedores (LUIS et al., 2013; CHEN et al., 2014; MORATELLI; CALISHER, 2015; BANERJEE et al., 2019). Por outro lado, é possível que a notória riqueza de patógenos que albergam os morcegos esteja superestimada pela atenção que o grupo tem recebido, já que o monitoramento de agentes infecciosos em animais pertencentes a outros táxons não tem sido representativo (BANERJEE et al., 2019; PEREIRA; BERNARD; AGUIAR, 2020).

Todo este interesse começou no ano 2003 com o surgimento do SARS coronavírus, mesma época que o Projeto Genoma Humano estimulou o desenvolvimento de novas tecnologias de sequenciamento de DNA, permitindo a expansão da aplicação da análise de genomas e impulsionando a descoberta de novos vírus em morcegos (SCHLOSS et al., 2020). Apesar de que a riqueza dos vírus associados a morcegos é indiscutivelmente alta, os resultados do presente estudo apoiam a teoria de que a frequência deles na natureza muitas vezes é baixa. Além disso, a nossa compreensão da complexa dinâmica de transmissão de alfa influenzavírus e coronavírus em morcegos e em outros indivíduos de vida selvagem ainda é limitada. Sendo assim, a vigilância epidemiológica e estudos longitudinais futuros poderiam ajudaram a entender melhor os eventos biológicos que propiciam fenômenos de *spillover* para humanos ou animais de interesse produtivo.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os quirópteros constituem um reservatório representativo de vírus de importância em saúde pública graças a sua ampla diversidade, extensa distribuição, longevidade, adaptação a ecossistemas alterados, grande diversidade trófica, diversidade de habitats, capacidade de voar longas distâncias, alta interação entre espécies tanto da mesma ordem como entre espécies de mamíferos, incluindo os humanos. Os alfas influenzavírus e os coronavírus são responsáveis pelas últimas cinco pandemias, e nos últimos 30 anos a emergência de vírus destes vírus aumento de forma alarmante.

Neste trabalho, não foi observada evidência molecular de alfa influenzavírus e coronavírus em intestino e/ou pulmão de morcegos não hematófagos coletados no Estado de São Paulo, Brasil. Embora tenha se demonstrado que os morcegos albergam um grande número de patógenos, os resultados do presente estudo apoiam a teoria de que a circulação de alfa influenzavírus e os coronavírus em morcegos na natureza muitas vezes é baixa, e altamente influenciada por fatores biológicos como o estresse reprodutivo e nutricional, infecções secundárias por fungos, e presença de grande número de indivíduos juvenis cuja imunidade materna encontra-se reduzida.

A nossa compreensão da complexa dinâmica infecciosa e de transmissão dos alfa influenzavírus e os coronavírus em morcegos e em outros indivíduos de vida selvagem ainda é limitada, pelo que é necessária a vigilância epidemiológica e estudos longitudinais futuros que possam ajudar a esclarecer a origem e causal de fenômenos de *spillover* para humanos ou animais de interesse produtivo.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AI, J. et al. Case-control study of risk factors for human infection with influenza A(H7N9) virus in Jiangsu Province, China, 2013. **Eurosurveillance**, v. 18, n. 26, p. 20510, 27 jun. 2013. Disponível em: <<https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2013.18.26.20510>>.

AQUINO, E. M. L. et al. Medidas de distanciamento social no controle da pandemia de COVID-19: potenciais impactos e desafios no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, n. suppl 1, p. 2423–2446, jun. 2020.

BÁRCENA, M. et al. Cryo-electron tomography of mouse hepatitis virus: insights into the structure of the coronavirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 2, p. 582–587, 2009.

BOURRET, V. Avian influenza viruses in pigs: An overview. **The Veterinary Journal**, v. 239, p. 7–14, set. 2018.

BROOK, C. E.; DOBSON, A. P. Bats as ‘special’ reservoirs for emerging zoonotic pathogens. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 172–180, mar. 2015.

CHEN, Y.; LIU, Q.; GUO, D. Emerging Coronaviruses: Genome Structure, Replication, and Pathogenesis. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 4, p. 418–423, 7 abr. 2020.

CHU, D. K. W. et al. Avian Coronavirus in Wild Aquatic Birds. **Journal of Virology**, v. 85, n. 23, p. 12815–12820, 1 dez. 2011.

CIMINSKI, K. et al. Novel Insights into Bat Influenza A Viruses. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 10, p. 2393–2400, 1 out. 2017.

CLOHISEY, S.; BAILLIE, J. K. Host Susceptibility to Severe Influenza A Virus Infection. **Critical Care**, v. 23, n. 1, p. 303, 5 dez. 2019.

COSTA, L. M. C. da; MERCHAN-HAMANN, E. Pandemias de influenza e a estrutura sanitária brasileira: breve histórico e caracterização dos cenários. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7, n. 1, p. 11–25, mar. 2016.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z.-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 181–192, 10 mar. 2019.

DADONAITE, B. et al. Filamentous Influenza Viruses. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 8, p. 1755–1764, 1 ago. 2016.

DOU, D. et al. Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1581, 20 jul. 2018.

FEHR, A. R.; PERLMAN, S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l.: s.n.]1282p. 1–23.

FERNANDA, G.; MEDEIROS ANDRADE, V. R. O VÍRUS INFLUENZA: REVISÃO NARRATIVA DA

LITERATURA. **REVISTA INTERDISCIPLINAR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE E BIOLÓGICAS – RICSB**, v. 3, n. 2, p. 74, 8 jan. 2020.

FOUCHIER, R. A. M. et al. Detection of Influenza A Viruses from Different Species by PCR Amplification of Conserved Sequences in the Matrix Gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4096–4101, nov. 2000.

FUNG, T. S.; LIU, D. X. Human Coronavirus: Host-Pathogen Interaction. **Annual Review of Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 529–557, 8 set. 2019.

GHEBREHEWET, S.; MACPHERSON, P.; HO, A. Influenza. **BMJ**, v. 355, p. i6258, 7 dez. 2016.

GREEN, M.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual 4th edition ed.** [s.l: s.n.]

HARRIS, A. et al. Influenza Virus Pleiomorphy Characterized by Cryoelectron Tomography. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 50, p. 19123–19127, dez. 2006.

HARRIS, K. A. et al. Epidemiological Risk Factors for Animal Influenza A Viruses Overcoming Species Barriers. **EcoHealth**, v. 14, n. 2, p. 342–360, 18 jun. 2017.

HARTENIAN, E. et al. The molecular virology of coronaviruses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 37, p. 12910–12934, set. 2020.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological Identifications through DNA Barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313–321, 7 fev. 2003.

HELLER, L.; MOTA, C. R.; GRECO, D. B. COVID-19 faecal-oral transmission: Are we asking the right questions? **Science of The Total Environment**, v. 729, p. 138919, ago. 2020.

HIRST, J. C.; HUTCHINSON, E. C. Single-Particle Measurements of Filamentous Influenza Virions Reveal Damage Induced by Freezing. **Journal of General Virology**, v. 100, n. 12, p. 1631–1640, 1 dez. 2019.

HOFFMANN, E. et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. **Archives of Virology**, v. 146, n. 12, p. 2275–2289, 1 dez. 2001.

ICTV. **Virus Taxonomy 2019 Release: Orthomyxoviridae**. Disponível em: <[https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna\\_viruses/209/orthomyxoviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna_viruses/209/orthomyxoviridae)>. Acesso em: 2 fev. 2021.

ICTV. **Virus Taxonomy 2019 Release: Coronaviridae**.

JILANI, T.; JAMIL, R. T.; SIDDIQUI, A. H. H1N1 influenza (swine flu). **StatPearls [Internet]**, 2020.

JOLY, C. A.; QUEIROZ, H. L. de. Pandemia, biodiversidade, mudanças globais e bem-estar humano. **Estudos Avançados**, v. 34, n. 100, p. 67–82, dez. 2020.

JONES, G. et al. Carpe noctem: the importance of bats as bioindicators. **Endangered species**

**research**, v. 8, n. 1–2, p. 93–115, 2009.

JONES, K. E. et al. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 990–993, fev. 2008.

KALTHOFF, D.; GLOBIG, A.; BEER, M. (Highly pathogenic) avian influenza as a zoonotic agent. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 237–245, jan. 2010.

KARAKUS, U. et al. MHC class II proteins mediate cross-species entry of bat influenza viruses. **Nature**, v. 567, n. 7746, p. 109–112, 20 mar. 2019.

KRAMMER, F. et al. Influenza. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 3, 28 dez. 2018.

LABELLA, A. M.; MEREL, S. E. Influenza. **Medical Clinics of North America**, v. 97, n. 4, p. 621–645, jul. 2013.

LAMB, R. A.; HORVATH, C. M. Diversity of Coding Strategies in Influenza Viruses. **Trends in Genetics**, v. 7, n. 8, p. 261–266, ago. 1991.

LETKO, M. et al. Bat-Borne Virus Diversity, Spillover and Emergence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 8, p. 461–471, 11 ago. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32528128>>.

LIN, P. et al. Coronavirus in human diseases: Mechanisms and advances in clinical treatment. **MedComm**, v. 1, n. 3, p. 270–301, dez. 2020.

LIU, B. et al. Risk Factors for Influenza A(H7N9) Disease—China, 2013. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 6, p. 787–794, 15 set. 2014.

LUIS, A. D. et al. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 280, n. 1756, p. 20122753, 7 abr. 2013. Disponível em: <<https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.2012.2753>>.

LUO, M. Influenza Virus Entry. In: **Advances in experimental medicine and biology**. [s.l.: s.n.]726p. 201–221.

MACHHI, J. et al. The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 15, n. 3, p. 359–386, 21 set. 2020.

MEDINA, R. A.; GARCÍA-SASTRE, A. Influenza A viruses: new research developments. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 590–603, 11 ago. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrmicro2613>>.

MINISTERIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **49 Boletim epidemiológico especial**. Disponível em: <[https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/fevereiro/13/boletim\\_epidemiologico\\_covid\\_49\\_13fev21.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/fevereiro/13/boletim_epidemiologico_covid_49_13fev21.pdf)>. Acesso em: 2 fev. 2021.

MORATELLI, R.; CALISHER, C. Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with

- emerging deadly viruses? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 1–22, 2015.
- MOSTAFA, A. et al. Zoonotic Potential of Influenza A Viruses: A Comprehensive Overview. **Viruses**, v. 10, n. 9, p. 497, 13 set. 2018.
- NAYAK, D. P. et al. Influenza virus morphogenesis and budding. **Virus Research**, v. 143, n. 2, p. 147–161, ago. 2009.
- NEUMANN, G.; NODA, T.; KAWAOKA, Y. Emergence and Pandemic Potential of Swine-Origin H1N1 Influenza Virus. **Nature**, v. 459, n. 7249, p. 931–939, 14 jun. 2009.
- OZAWA, M. et al. Contributions of Two Nuclear Localization Signals of Influenza A Virus Nucleoprotein to Viral Replication. **Journal of Virology**, v. 81, n. 1, p. 30–41, 1 jan. 2007.
- PAULES, C.; SUBBARAO, K. Influenza. **The Lancet**, v. 390, n. 10095, p. 697–708, ago. 2017.
- PETERANDERL, C.; HEROLD, S.; SCHMOLDT, C. Human Influenza Virus Infections. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 37, n. 04, p. 487–500, 3 ago. 2016.
- POON, L. L. M. et al. Identification of a Novel Coronavirus in Bats. **Journal of Virology**, v. 79, n. 4, p. 2001–2009, 15 fev. 2005.
- RAJÃO, D. S. et al. Genetic Characterization of Influenza Virus Circulating in Brazilian Pigs during 2009 and 2010 Reveals a High Prevalence of the Pandemic H1N1 Subtype. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v. 7, n. 5, p. 783–790, set. 2013.
- REPERANT, L. A.; KUIKEN, T.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Adaptive pathways of zoonotic influenza viruses: From exposure to establishment in humans. **Vaccine**, v. 30, n. 30, p. 4419–4434, jun. 2012.
- SAMJI, T. Influenza A: Understanding the Viral Life Cycle. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 82, n. 4, p. 153–159, dez. 2009.
- SCHAEFER, R. et al. Isolamento e caracterização do vírus da influenza pandêmico H1N1 em suínos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 9, p. 761–767, set. 2011.
- SCHRAUWEN, E. J. A. et al. Determinants of virulence of influenza A virus. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 33, n. 4, p. 479–490, 29 abr. 2014.
- SHAO, W. et al. Evolution of Influenza A Virus by Mutation and Re-Assortment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1650, 7 ago. 2017.
- SHEREEN, M. A. et al. COVID-19 infection: Emergence, transmission, and characteristics of human coronaviruses. **Journal of Advanced Research**, v. 24, p. 91–98, jul. 2020.
- SIMABUCO, F. M. et al. Molecular mechanisms and pharmacological interventions in the replication cycle of human coronaviruses. **Genetics and Molecular Biology**, v. 44, n. 1 suppl 1, 2021.
- SMITH, I.; WANG, L.-F. Bats and their virome: an important source of emerging viruses capable

of infecting humans. **Current Opinion in Virology**, v. 3, n. 1, p. 84–91, fev. 2013.

STUBBS, T. M.; TE VELTHUIS, A. J. The RNA-Dependent RNA Polymerase of the Influenza A Virus. **Future Virology**, v. 9, n. 9, p. 863–876, set. 2014.

SU, S. et al. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. **Trends in microbiology**, v. 24, n. 6, p. 490–502, 2016.

THOMPSON, A. J.; PAULSON, J. C. Adaptation of influenza viruses to human airway receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 296, p. 100017, 2021.

TONG, S. et al. A Distinct Lineage of Influenza A Virus from Bats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 11, p. 4269–4274, 13 mar. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22371588>>.

TONG, S. et al. New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003657, 10 out. 2013.

TSCHERNE, D. M.; GARCÍA-SASTRE, A. Virulence determinants of pandemic influenza viruses. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 1, p. 6–13, 4 jan. 2011. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/44947>>.

UIEDA, W.; HARMANI, N.; SILVA, M. Raiva em morcegos insetívoros (Molossidae) do Sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, p. 393–397, 1995.

V'KOVSKI, P. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 155–170, 28 mar. 2021.

VIJAYAKRISHNAN, S. et al. Cryotomography of Budding Influenza A Virus Reveals Filaments with Diverse Morphologies That Mostly Do Not Bear a Genome at Their Distal End. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 6, p. e1003413, 6 jun. 2013.

WAHLGREN, J. Influenza A viruses: an ecology review. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 1, n. 1, p. 6004, 10 jan. 2011.

WANG, L.-F.; ANDERSON, D. E. Viruses in bats and potential spillover to animals and humans. **Current Opinion in Virology**, v. 34, p. 79–89, fev. 2019.

WEBSTER, R. G.; GOVORKOVA, E. A. Continuing Challenges in Influenza. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1323, n. 1, p. 115–139, set. 2014.

WEISS, S. R.; NAVAS-MARTIN, S. Coronavirus Pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 4, p. 635–664, dez. 2005.

WHO. **Coronavirus disease (COVID-19): How is it transmitted?** Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-covid-19-how-is-it-transmitted>>. Acesso em: 2 fev. 2021.

WILSON, D.; REEDER, D. **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic**



**reference.** 3. ed. Baltimore: JHU Press, 2005. v. 1

WYNNE, J. W.; WANG, L.-F. Bats and Viruses: Friend or Foe? **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003651, 31 out. 2013.

YE, Z.-W. et al. Zoonotic Origins of Human Coronaviruses. **International journal of biological sciences**, v. 16, n. 10, p. 1686–1697, 15 mar. 2020.

YOON, S.-W.; WEBBY, R. J.; WEBSTER, R. G. Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. In: COMPANS, R. W.; OLDSTONE, M. B. A. (Ed.). **Influenza Pathogenesis and Control - Volume I**. Cham: Springer International Publishing, 2014. p. 359–375.

ZHENG, W.; TAO, Y. J. Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex. **FEBS Letters**, v. 587, n. 8, p. 1206–1214, 17 abr. 2013.