SIBELE PINHEIRO DE SOUZA

**Um estudo sobre a diversidade molecular dos genes
S e HE de Coronavírus bovino (BCoV)**

São Paulo

2013

SIBELE PINHEIRO DE SOUZA

Um estudo sobre a diversidade molecular dos genes S e HE de Coronavírus bovino (BCoV)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Epidemiologia Experimental Aplicada às
Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

4/2/13

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2760
FMVZ

Souza, Sibele Pinheiro de
Um estudo sobre a diversidade molecular dos genes S e HE de Coronavírus bovino
(BCoV) / Sibele Pinheiro de Souza. – 2013.
81 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo,
2013.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão.

1. Coronavírus bovino. 2. Diversidade. 3. Gene S (espícula) Gene HE (hemaglutinina-
esterase). I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Coronavírus bovino (BCoV): um estudo filogeográfico de amostras entéricas e respiratórias detectadas em bovinos nas regiões sul e sudeste do Brasil", protocolado sob o nº 2043/2010, utilizando amostras de trato respiratório e de fezes de bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 29/09/2010.

We certify that the Research "Bovine coronavirus (BCoV): a phylogeographic study of enteric and respiratory strains detected in bovines in the southeastern and southern regions of Brazil", protocol number 2043/2010, under the responsibility Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 09/29/2010.

São Paulo, 30 de setembro de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
Fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SOUZA, Sibele Pinheiro de

Título: Um estudo sobre a diversidade molecular dos genes S e HE de Coronavírus
bovino (BCoV)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Epidemiologia Experimental Aplicada às
Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Quid est veritas?

À **raposa** de Antoine de Saint-Exupéry.

À Universidade de São Paulo,

“O nosso verdadeiro lugar de nascimento é aquele em que lançamos pela primeira vez um olhar de inteligência sobre nós próprios”.

Marguerite Yourcenar

*And now the end is near
And so I face the final curtain
My friend, I'll say it clear
I'll state my case of which I'm certain*

*I've lived a life that's full
I traveled each and every highway
And more, much more than this
I did it my way*

*Regrets, I've had a few
But then again, too few to mention
I did what I had to do
And saw it through without exemption*

*I've planned each charted course
Each careful step along the byway
And more, much more than this
I did it my way*

*Yes there were times, I'm sure you
knew
When I bit off more than I could chew
But through it all when there was doubt
I ate it up and spit it out*

*I faced it all and I stood tall
And did it my way*

*I've loved, I've laughed and cried
I've had my fill, my share of losing
And now as tears subside
I find it all so amusing*

*To think I did all that
And may I say, not in a shy way
Oh no, oh no, not me
I did it my way*

*For what is a man, what has he got?
If not himself, than he has naught
To say the things he truly feels
And not the words of one who kneels*

*The record shows, I took the blows
And did it my way*

Paul Anka

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Paulo Eduardo Brandão**, exemplo de amor à ciência, por todos esses anos de convivência.

Ao Prof. Dr. **Fernando Ferreira**, pela dedicação à Pós-graduação do VPS.

Aos **Professores do VPS**, pelos ensinamentos e amizade ao longo desses anos.

Aos Professores da USP, **Arthur Gruber, Joseph Harari, Jeffrey Jon Shaw, Paulo Alberto Otto, Paolo Marinho de Andrade Zanotto, Sergio Russo Mاتيoli, Francisca Carolina do Val e Alan Mitchell Durham**, pelo aprendizado e ideias em aulas inspiradoras.

Ao Prof. Dr. **Carlos José de Pereira da Cunha de Araujo Coutinho**, grande amigo e professor.

À **Tânia Delonero** e ao **Pedro César Ferreira da Silva** pelas risadas, durante esses anos.

Ao **Danival Lopes Moreira, Maria Cristina Paick e Ana Virginia Pacheco de Almeida Prado Chacur**, por toda ajuda.

Aos funcionários da **Biblioteca Virginie Buff D'Ápice**.

Ao **Rafael de Novaes Oliveira**, amigo, colaborador, sempre ao meu lado.

À **Anaiá da Paixão Sevá e Vivianne Cambuí Figueiredo Rocha**, pela amizade e por todos nossos momentos no Velho Mundo.

Ao **Maurício Claudio Horta**, amigo que sempre faz falta.

À **Vanessa Riesz Salgado**, irmã que eu ganhei da USP.

Ao **Willian de Oliveira Fahl**, por ser sempre fazer “mí ou mú” e estar comigo.

À **Thaís Lucas Sandri e Estela Gallucci Lopes**, por participarem de minhas maluquices e por nossa irmandade.

À **Ekaterina A. Durymanova Ono**, pelos nossos chás, pelas conversas interessantes.

À **Karen Miyuki Asano, Juliana Nogueira Silva, Nadia Martínez e Iracema Nunes de Barros**, amigas e colaboradoras.

À **Maria Halina Ogrzewalska**, pelo carinho.

À **Paula Beatriz Munhoz Soares**, minha grande amiga, por tudo que fez e faz por mim.

Ao **Alexandre Rossi Paschoal** e à **Flávia Sabino Cal**, meus bons amigos.

Ao **Carlos Roberto Prudêncio** e **Elizabeth Mota Marconi**, pelas risadas e ajuda durante o caminho.

Aos amigos do **Instituto Pasteur**.

Ao **André Becker Simões Saidenberg**, por nossos chás introspectivos.

Aos ávidos **estudantes e funcionários do VPS**, pelo aprendizado em relação à etologia de primatas.

À **Juliana Levino Pereira**, amiga-irmã, comigo em todos os momentos, por compartilhar comigo sua linda família.

Ao **Leandro de Oliveira Gonzaga**, **Monalyssa Camandaroba** e **Juliana Cupolillo Coelho**, meus amigos de muitos carnavais.

Ao **Lucas de Souza Gonçalves**, “Smirilim”, meu amado afilhado, por ser meu companheiro de aventuras.

Aos meus amados avós **Izaura Pinheiro Augusto** (Lolinha) *in memoriam* e **José Augusto de Souza** (Vozinho), por toda perã e leite que me deram.

A toda minha amada Grande Família, “**Pinheiro de Souza, Gonçalves, Ricca e Levino Pereira**” pelo carinho e amor infinito.

À **Gorda & Magra**, “minhas belas gatas”.

Aos amigos da “**Lemon Party**”, por toda torcida para o meu sucesso.

Ao **Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia-LABMAS** e ao **Laboratório de Raiva** da FMVZ/USP, minhas oficinas de experimentos.

À **Sheila Oliveira Silva e Souza** e **Rosana Paick Utiana**, pela ajuda no laboratório.

À **Maria Inez de Almeida Leme Guimarães**, pelas conversas e introspecções.

Ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa concedida.

A **CAPES** (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida para a realização do estágio de doutorado sanduíche.

Aos cientistas-amigos do **INTA-Argentina** (**Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria**) e do **CNB-Espanha** (**Centro Nacional de Biotecnología**), pela troca de conhecimento e risadas durante meus períodos de *estancia*.

RESUMO

SOUZA, S. P. **Um estudo sobre a diversidade molecular dos genes S e HE de Coronavírus bovino (BCoV)** [A study on the molecular diversity of S and HE genes of Bovine coronavirus (BCoV)]. 2013. 81f. f.Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Coronavírus bovino (BCoV) é o agente causador de doença, tanto entérica como respiratória em bovinos, mas até agora existem controvérsias sobre a relação genealógica entre as amostras de BCoV em diferentes tecidos. Neste estudo, amostras de fezes e secreções nasais de 14 vacas de um mesmo rebanho apresentando simultaneamente disenteria epizootica e doença respiratória foram estudados quanto a presença de BCoV. As amostras virais detectadas tiveram tanto o gene de espícula (S) como o gene hemaglutinina-esterase (HE) parcialmente sequenciados. Para o gene HE, foram obtidas 12 sequências de secreções nasais e 12 de amostras de fezes e para o gene S, foram obtidas 14 sequências de secreções nasais e 12 de amostras de fezes, com 100% de identidade nucleotídica para cada gene para as amostras deste estudo. Estes resultados apresentam algumas divergências com estudos anteriores os quais relatam que linhagens diferentes de BCoV podem ser esperados em casos de disenteria e doença respiratória em vacas, pois linhagens com sequências idênticas dos genes S e HE podem não mostrar diferenças em relação tropismo pelos diferentes tecidos. Sequências completas de duas amostras brasileiras de BCoV mostram que o já descrito padrão filogeográfico baseado no sequenciamento do gene S parcial foi mantido, foram encontradas substituições de aminoácidos específicos.

Palavras-chave: Coronavírus Bovino (BCoV). Diversidade. Gene S (espícula). Gene HE (hemaglutinina – esterase).

ABSTRACT

SOUZA, S. P. **A study on the molecular diversity of S and HE genes of Bovine coronavirus (BCoV).** [Um estudo sobre a diversidade molecular dos genes S e HE de Coronavírus bovino (BCoV)]. 2013. 81f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Bovine coronavirus (BCoV) is the causative agent of both enteric and respiratory disease in cattle, but hitherto there were some controversy on the genealogic relationship amongst strains from these different tissues. In this study, samples of feces and nasal secretions of 14 cows from a same herd simultaneously presenting epizootic dysentery and respiratory disease were screened for BCoV and the strains detected had both the spike (S) and hemagglutinin-esterase (HE) genes partially sequenced. For HE gene, 12 sequences from nasal secretions and 12 from fecal samples were obtained and for S gene, 14 sequences from nasal secretions and 12 from fecal samples were obtained, with 100% nucleotide identities for each gene for the strains of this study. These results have some disagreements with previous reports which try to put forward that divergent BCoV strain should be expected in cases of dysentery and respiratory disease in cows, showing that strain with identical S and HE sequences might show no differences in tropisms. Complete S gene sequences of two Brazilian BCoV strains show that the already described phylogeographic pattern based on partial S gene is sustained, though specific amino acids substitutions are found.

Keywords: Bovine coronavirus (BCoV). Diversity. S Gene (spike). HE Gene (hemagglutinin - esterase).

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
%	Porcento
BLAST/n	Basic Local Alignment Search Tool
BCoV	coronavírus bovino
BVD	diarreia viral bovina
°C	graus Celsius
cDNA	DNA complementar
dNTP	deoxinucleosídeo-trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucleico
DEPC	dietil-pirocarbonato
et al.	e colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
G	aceleração da gravidade terrestre ($9,8 \text{ m/s}^2$)
HE	hemaglutinina esterase
HmLu-1	hamster lung cell line
IBR	rinotraqueite infecciosa bovina
kDa	QuiloDalton
M	Molar
mM	Milimolar
Ng	Nanogramas
mL	Mililitro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
MHV	murine hepatitis virus
ORF	open reading frame
Pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia pela polimerase
Pmol	Picomoles
RNA	ácido nucleico
RT	transcrição reversa
S	Espícula
U	unidade internacional
L	leucina
N	asparagina
T	treonina
I	isoleucina
D	ácido aspártico
H	histidina
G	glicina
A	alanina
Q	glutamina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
	Capítulo 1 – Filogenia de Amostras de Entéricas e Respiratórias de BCoV (Coronavírus bovino) Baseados na Análise Parcial dos genes HE (Hemaglutinina-esterase) e S (Espícula)	20
2	OBJETIVOS.....	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1	AMOSTRAS.....	24
3.2	CONTROLES POSITIVO E NEGATIVO.....	26
3.3	PREPARO DAS AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DE RNA.....	26
3.4	APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE NESTED RT-PCR PARA DETECÇÃO DO GENE RdRp DE <i>Betacoronavirus</i>	26
3.5	APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE HEMI-NESTED (HEMI-NESTED RT-PCR) PARA O GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA HEMAGLUTININA-ESTERASE (HE) DO CORONAVÍRUS BOVINO (BCoV)	28
3.6	APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA SUBUNIDADE S1 DA PROTEÍNA S DO BCoV	29
3.7	SEQUENCIAMENTO DE DNA	31
3.8	EDIÇÃO DE SEQUÊNCIAS	32
3.9	ANÁLISE FILOGENÉTICA E DE DIVERSIDADE MOLECULAR	32
4	RESULTADOS.....	36
4.1	NESTED RT-PCR PARA DETECÇÃO DO GENE RdRp DE <i>Betacoronavirus</i>	37
4.2	HEMI-NESTED RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA PROTEÍNA HEMAGLUTININA ESTERASE (HE) DO BCoV	37
4.3	NESTED RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA SUBUNIDADE S1 DA PROTEÍNA DE ESPÍCULA (S) DO BCoV	38
4.4	SEQUENCIAMENTO DE DNA	39
4.5	ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	40
4.6	ANÁLISE DE DIVERSIDADE MOLECULAR.....	44
4.6.1	Gene S.....	44
4.6.2	Gene HE.....	44
5	DISCUSSÃO.....	45
6	CONCLUSÕES.....	50

	CAPÍTULO 2 – Diversidade molecular de amostras brasileiras de BCoV baseadas em sequências completas do gene S.....	54
--	---	-----------

7	OBJETIVOS.....	53
8	MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
8.1	PRIMERS UTILIZADOS.....	56
8.2	AMOSTRAS.....	58
8.3	APLICAÇÃO DA PCR PARA O GENE S COMPLETO DO BCoV.....	59
8.4	ANÁLISE FILOGENÉTICA E DE DIVERSIDADE MOLECULAR	60
9	RESULTADOS.....	63
9.1	DESENHO DE PRIMERS	64
9.2	RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE S COMPLETO DO BCoV.....	64
9.3	SEQUENCIAMENTO DE DNA E ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	65
10	DISCUSSÃO.....	68
11	CONCLUSÕES.....	72
12	REFERÊNCIAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

“As pessoas não nascem com estrela na testa.”

(Izaura Pinheiro Augusto)

1 INTRODUÇÃO

O coronavírus bovino (BCoV), agente etiológico da disenteria sazonal em bovinos adultos, diarreia neonatal em bezerros e doenças respiratórias em ambos, conhecido atualmente como *Betacoronavirus 1*, pertence a ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, subfamília *Coronavirinae*, dentro do gênero *Betacoronavirus*, (ICTV, 2009). Neste trabalho, Betacoronavírus detectados em bovino serão nomeados apenas de coronavírus bovino ou BCoV.

A infecção em bovinos adultos foi primeiramente descrita em 1975 por Horner e colaboradores. Desde então, foi relatada na Austrália, Suécia, Inglaterra, Israel, França, Bélgica, Japão e Canadá (CAMPBELL; COOKINGHAM, 1978; DURHAM et al., 1989). Em 2004, surtos foram relatados também em bovinos leiteiros em Cuba (MARTÍNEZ et al., 2011; BARRERA et al., 2006).

No Brasil, o primeiro relato da doença ocorreu em 2002, envolvendo um surto em bovinos leiteiros no Estado de São Paulo em 2001 (BRANDÃO et al., 2002). A partir desta data, foram descritos surtos nos Estados de São Paulo (MONTELEONE et al., 2002) e Minas Gerais (TAKIUCHI et al., 2008).

Os coronavírus são vírus envelopados pleomórficos aproximadamente arredondados com até 220nm de diâmetro, com cinco ou seis proteínas estruturais (nucleocapsídeo N, matriz ou membrana M, proteína pequena de membrana/*Small membrane protein* sM, hemaglutinina esterase HE, espícula/*spike* S e interna I), dependendo do gênero. O genoma é constituído por um RNA de fita simples não-segmentado de sentido positivo com até 32 kb, originando um nucleocapsídeo de simetria helicoidal em associação com a nucleoproteína N, uma fosfoproteína de 50-60kDa rica em aminoácidos básicos (HOLMES; LAI, 1996; LAI; CAVANAGH, 1997; MASTERS, 2006).

O envelope viral é formado por uma camada dupla de lipídios com cinco proteínas estruturais (M, sM, HE, S e I) dela se projetando, resultando no aspecto de uma coroa (do latim *corona*). Apresentam uma proteína de envelope denominada de hemaglutinina-esterase (HE), com cerca de 65 kDa, sob a forma de dímeros, encontrada apenas em algumas espécies do gênero *Betacoronavirus* (MASTERS 2006). KING et al., 1985). Apesar de sua denominação, a HE tem uma atividade hemaglutinante fraca quando comparada à da proteína S (SCHULTZE et al., 1991;

FUKUTOMI et al., 1999) e contém uma enzima destruidora de receptores (esterase) que cliva resíduos 9-O-acetil de ácidos siálicos (CLARK, 1993; KOURTESIS; GÉLINAS; DEA, 2001).

Interessantemente, a proteína HE dos coronavírus guarda similaridade com a HE dos vírus influenza C, o que indica uma possível recombinação entre estes dois vírus (LUYTJES et al., 1988), apesar de alguns *betacoronavirus* apresentarem uma especificidade por substratos diferentes quando comparados aos vírus influenza C e ao BCoV (KLAUSEGGER et al., 1999).

A principal proteína estrutural de envelope dos coronavírus é a proteína S (“spike”, espícula), forma projeções de cerca de 20nm de comprimento responsáveis pela aparência espiculada do vírion e pela atividade hemaglutinante e é o principal alvo para anticorpos neutralizantes, seguida pela proteína HE; ambas podem estar envolvidas no tropismo pelo tecido do hospedeiro (COLLINS et al., 1982; GÉLINAS et al., 2001), sendo a proteína mais polimórfica entre os coronavírus, organizada como dímeros ou trímeros. A proteína completa tem 180 kDa, mas, em algumas espécies virais, como o BCoV, é clivável nas subunidades S1 e S2, com cerca de 90 kDa cada (CAVANAGH, 1995).

A subunidade carboxi-terminal S2 forma a haste da espícula, responsável pela fusão de membranas e formação de sincícios; em função de não apresentar domínios hidrofóbicos, esta atividade fusogênica pode ser devida a alterações conformacionais causadas pela subunidade S1 (LAI; CAVANAGH, 1997). O peptídeo de fusão da S2 é sugerido como sendo PEP1, localizado na mais longa das repetições heptádicas da estrutura da mesma (LUO; WEISS, 1998). A clivagem proteolítica da proteína S pode ser um passo necessário à formação de sincícios, mas esta é ainda uma hipótese controversa (TOTH, 1982; CYR-COATS; STORZ, 1988; HONDA et al., 1990). No coronavírus MHV (Vírus da Hepatite Murina), substituições de aminoácidos no códon de iniciação e no grupo de aminoácidos básicos do sítio de clivagem levam à perda da capacidade de clivagem e de formação de sincícios (YAMADA et al., 1997). A subunidade S2 não é envolvida na ligação ao receptor celular (TAGUCHI 1995).

A subunidade S1, ectodomínio aminoterminal da proteína S, muito mais variável do que a subunidade S2, apresenta atividade de ligação a receptores celulares e forma o bulbo da espícula dos coronavírus (LAI; CAVANAGH, 1997). No MHV, o sítio de ligação ao receptor localiza-se no domínio amino-terminal de S1,

composto de 330 aminoácidos (KUBO et al., 1994), sendo os aminoácidos 33 a 40 os diretamente envolvidos na atividade de ligação a receptores (SAEKI et al., 1997). Por formar a porção bulbar da proteína S, que contém a maior parte dos sítios antigênicos, a subunidade S1 e o segmento do genoma dos coronavírus que a codifica são mais expostos a pressões seletivas imunológicas e, assim, mais propensos ao encontro de polimorfismos do que os demais genes e proteínas dos coronavírus (ABRAHAM et al., 1990). Variações no tropismo tecidual e diversidade de hospedeiros nos coronavírus estão relacionadas principalmente a mudanças na proteína S (MASTERS, 2006).

O BCoV replica-se nos vilos das células absortivas do intestino delgado e em células não diferenciadas encontradas nas criptas do cólon, resultando em descamação, encurtamento dos vilos e diarreia mal-absortiva (PENSAERT et al., 1994). Além da disenteria sazonal observada em bovinos adultos, causa também diarreia neonatal em bovinos e ainda processos patológicos do trato respiratório superior em bezerros por volta dos 3 meses de idade, o que levou à hipótese de que uma infecção respiratória pudesse desencadear enterites por ingestão do vírus (MCNULTY et al., 1984; HECKERT et al., 1990; HECKERT et al., 1991; TSUNEMITSU et al., 1991). Infecções respiratórias podem também ocasionar broncopneumonia em bovinos (TEGTMEIER et al., 1999).

Uma das discussões atuais em termos de diversidade de amostras de BCoV refere-se à existência de marcadores moleculares para a diferenciação entre amostras recuperadas de processos respiratórios e entéricos, bem com daquelas recuperadas de animais adultos e de neonatos.

Pesquisas referentes à diversidade entre amostras entéricas e respiratórias usando como ferramenta a análise parcial ou total do gene S tem sido realizadas comparações com amostras disponíveis nos bancos de dados, incluindo amostras isoladas em cultivo celular e isolados de um mesmo animal com sintomas respiratórios e entéricos (ZHANG et al., 1994; CHOULJENKO et al., 1998; GÉLINAS et al., 2001; HASOKSUZ et al., 2002; JEONG et al., 2005; LIU et al., 2006; KANNO et al., 2007; ZHANG et al., 2007) não chegam de fato a um consenso.

Até o momento as diferenças antigênicas e biológicas observadas entre esses isolados de BCoV, não foram necessariamente relacionadas com a origem clínica dos isolados.

As análises de comparação entre amostras entéricas e respiratórias são comprometidas devido à escassez de dados, seja pela falta de sequências completas do gene S ou por sucessivas passagens em células antes do sequenciamento.

No Brasil foram descritos diferentes genótipos de BCoV por Brandão, et al., 2006, sendo um com uma deleção de 18 nucleotídeos na região da subunidade S1 do gene S e outros 3 sem a deleção (TAKIUCHI et al., 2008; SOUZA, 2009; BARROS, 2011).

Em estudos de diversidade analisando regiões parciais do gene S e HE Souza, 2009, sugere a presença de marcadores regionais para BCoV no Brasil.

Baseado nas pesquisas até o presente momento, fica evidente a necessidade de um estudo mais amplo em relação à questão sobre se há ou não linhagens tecido-específicas de BCoV.

**Capítulo 1 – Filogenia de Amostras de
Entéricas e Respiratórias de BCoV
(Coronavírus bovino) Baseados na Análise
Parcial dos genes HE (Hemaglutinina-esterase)
e S (Espícula)**

*"We make our world significant by the courage of our
questions, and the depth of our answers."*

(Carl Sagan)

2 OBJETIVOS

“Dos nossos prazeres e das nossas dores só quem sabe somos nós.”

(Edivaldo José Pinheiro de Souza)

2 OBJETIVOS

Tendo em vista as questões sobre o tropismo entérico e respiratório de BCoV ainda não esclarecidas, o presente trabalho teve os seguintes objetivos:

- Estudar as relações filogenéticas de amostras de BCoV respiratórias e entéricas durante um único surto de disenteria sazonal associada a processos patológicos de trato respiratório em uma propriedade leiteira com base em sequenciamento parcial das regiões codificadoras das proteínas HE e S em comparação com sequências disponíveis em bancos de dados.
- Verificar se há distinção nos genes de maior polimorfismo do BCoV que possa justificar o tropismo do vírus por epitélio respiratório e entérico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

“Todo cambia, brasileña. La vida cambia y la ciencia cambia.”

(Marcelo Dario Golemba)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

Foram amostradas 14 vacas adultas, colhendo-se 14 amostras de secreções nasais e 13 fecais (Quadro 1) da raça holandesa preto e branca, com sintomas respiratórios e entéricos, durante um surto de disenteria ocorrido no mês de outubro de 2007, em uma propriedade leiteira localizada no município de Vespasiano Corrêa, no Estado do Rio Grande do Sul, com 130 bovinos leiteiros, dos quais 90% apresentavam graus variáveis de diarreia e secreção nasal (PAVARINI, 2009).

O rebanho encontrava-se vacinado contra febre aftosa, leptospirose, carbúnculo hemático e BVD.

Todas as amostras foram mantidas a -80°C no Laboratório de Biologia Molecular e Aplicada à Sorologia (LABMAS) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) até o momento das análises.

Quadro 1 – Amostras de secreções nasais e fecais de vacas utilizadas no presente estudo para a pesquisa de diversidade molecular de coronavírus bovino (BCoV) - São Paulo-2013

Identificação	Tipo
31	R -
34	R E
37	R E
54	R E
58	R E
67	R E
573	R E
577	R E
715	R E
725	R E
729	R E
749	R E
766	R E
Leona	R E

R = Respiratório E = Entérico = colheita não realizada

3.2 CONTROLES POSITIVO E NEGATIVO

Como amostra de referência de BCoV, foi utilizada a amostra Kakegawa (AKASHI et al., 1980), previamente produzida em cultura de células da linhagem HmLu-1 (pulmão de hamster) em monocamadas em sistema rotativo, com o título hemaglutinante de 256 como controle negativo foi utilizada água ultra-pura tratada com 0,1% de dietil pirocarbonato (água DEPC).

3.3 PREPARO DAS AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DE RNA

As amostras fecais foram preparadas como suspensões a 20% em água ultra-pura tratada com 0,1% de dietil-pirocarbonato (água DEPC), mantidas a 4°C durante 30 min com agitações em vortex a cada 10 min e, a seguir, clarificadas a 12.000 x g/ 30 min a 4°C, tomando-se o sobrenadante como amostra. A extração do RNA total das suspensões fecais, das secreções nasais, da amostra viral de referência e do controle negativo (água DEPC) foi realizada com TRIzol *Reagent* (Invitrogen®), segundo as instruções do fabricante.

3.4 APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE NESTED RT-PCR PARA DETECÇÃO DO GENE RdRp DE *Betacoronavirus*

Todas as 27 amostras do presente estudo (Quadro 1) foram submetidas a nested RT-PCR para a amplificação de um fragmento de 136 pares de base (pb) da região codificadora RNA-polimerase RNA-dependente (RdRp) dos *Betacoronavirus* segundo Brandão et al. (2005), como teste de triagem.

A síntese de cDNA foi realizada a 42°C por 60 min em um mix contendo 1 x *First Strand Buffer* (Invitrogen™), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1μ μM de cada *primer* 4Bm e 2Bp (Quadro 2) e 200U de M-MLV *Reverse Transcriptase* (Invitrogen™), 3,5μL do RNA extraído, para um volume final de 10μL.

A primeira amplificação foi realizada adicionando-se 2,5µL do produto de cDNA ao *mix* de PCR (1 x PCR *Buffer* (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada primer 4Bm e 2Bp, (Quadro 2), 1,5mM MgCl₂, 12,625 µL de água ultra-pura esterilizada e 0,625U de *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen™), para uma reação final de 25µL) submetidos a 6 ciclos de 94°C/1min, 40°C/2min, 72°C/1min e 36 ciclos de 94°C/1min 50°C/1,5min e 72°C/1min para extensão de DNA e finalizando, 72°C/10min para extensão final.

A segunda amplificação foi realizada adicionando-se 5µL do produto da primeira amplificação ao *mix* de PCR (1 x PCR *Buffer* (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada primer CV2L e CV2U, (Quadro 2), 1,5mM MgCl₂, 25,25µL água DEPC e 1,25U de *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen™), para uma reação final de 50µL) submetidos a 26 ciclos 94°C/1min, 54,8°C/1,5min e 72°C/1min para extensão de DNA e 72°C/10min para extensão final.

Um tubo contendo água DEPC foi adicionado a cada 3 amostras na reação de *nested* para o monitoramento de contaminações por DNA amplificado, também adicionado de *mix* e levado ao termociclador. Todas as reações foram feitas em salas separadas com intuito de evitar possíveis contaminações.

A seguir cinco microlitros do produto do *nested* foram analisados em gel de eletroforese com agarose a 1,5 %, corados com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL e observados sob luz ultra-violeta. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram a banda de 136 pb quando comparadas visualmente com 100bp *Ladder* (Invitrogen®).

Quadro 2 – *Primers* utilizados no presente estudo para a detecção do gene codificador da RNA-polimerase RNA-dependente - São Paulo-2013

Primer	Sequência	Posição genoma
4Bm	5' TCACAYTTWGGATARTCCCA 3'	15093-15116
2Bp	5' ACTCARWTRRAATYTNAAATAYGC 3'	
CV2U	5' TCATATGACTGGCAGAATGTTTCA 3'	14984-15004
CV2L	5' AACATCTTTAATAAGGCGRCGTAA 3'	

* Em relação à amostra Mebus de BCoV (número de acesso *Genbank* U00735).

3.5 APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE HEMI-NESTED (HEMI-NESTED RT-PCR) PARA O GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA HEMAGLUTININA-ESTERASE (HE) DO CORONAVÍRUS BOVINO (BCoV)

Todas as 27 amostras descritas no quadro 1 foram preparadas conforme o item 3.3 submetidas à extração de *RNA*, síntese de cDNA (transcrição-reversa), primeira amplificação (PCR) e segunda amplificação (hemi-nested PCR) conforme o protocolo descrito por Souza et al. (2010b).

A síntese de cDNA foi realizada a 42°C por 60 min em um mix contendo 1 x *First Strand Buffer* (Invitrogen™), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1µ µM de cada *primer* CHES e CHEA (Quadro 3) e 200U de M-MLV *Reverse Transcriptase* (Invitrogen™), 3,5µL do *RNA* extraído, para um volume final de 10µL.

A primeira amplificação foi realizada adicionando-se 5µL do produto de cDNA ao *mix* de PCR (1 x PCR *Buffer* (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada *primer* CHES e CHEA, (Quadro 3), 1,5mM MgCl₂, 25,25 µL de água ultra-pura esterilizada e 1,25U de *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen™), para uma reação final de 50µL) submetidos a 94°C/4min 35 ciclos de 94°C/1min 58,5°C /1,5 min e 72°C/1min para extensão de DNA e finalizando, 72°C/10min para extensão final.

A segunda amplificação foi realizada adicionando-se 5µL do produto da primeira amplificação ao *mix* de PCR (1 x PCR *Buffer* (Invitrogen™), 0,2mM

de cada dNTP, 0,5 μ M de cada primer CHES e HE-NA, (Quadro 3), 1,5mM $MgCl_2$, 25,25 μ L água DEPC e 1,25U de *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen™), para uma reação final de 50 μ L) submetidos a 94°C/3min e 25 ciclos de 94°C/45seg, 53,4°C/45seg e 72°C/45seg para extensão de DNA e 72°C/10min para extensão final.

Um tubo contendo água DEPC foi adicionado a cada 3 amostras na reação de nested para o monitoramento de contaminações por DNA amplificado, também adicionado de mix e levado ao termociclador. Todas as reações foram feitas em salas separadas com intuito de evitar possíveis contaminações.

A seguir cinco microlitros do produto do *nested* foram analisados em gel de eletroforese com agarose a 1,5 %, corados com brometo de etídeo a 0,5 μ g/mL e observados sob luz ultra-violeta. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram a banda de 441 pb quando comparadas visualmente com 100bp *Ladder* (Invitrogen®).

Quadro 3 – Primers utilizados no presente estudo para a detecção do gene codificador da proteína Hemaglutinina esterase - São Paulo-2013

Primer	Sequência	Posição em HE*
CHES	5' TMT TTG GYG ACA GTC GTT C 3'	122-140
CHEA	5' TTA TCM GAM TGC YTR GCA TT 3'	898-917
HE-NA	5' CCCCAAATTAGCTTCACGA 3'	543-562

* Em relação à amostra DB de BCoV (número de acesso Genbank DQ811784).

3.6 APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA SUBUNIDADE S1 DA PROTEÍNA S DO BCoV

Todas as 27 amostras (Quadro 1) foram submetidas a uma nested RT-PCR dirigida à amplificação de um segmento de 488 pares de bases contendo a região hipervariável do segmento codificador da subunidade S1 da proteína S do

coronavírus bovino, conforme protocolo descrito por Brandão et al. (2006), utilizando-se a amostra Kakegawa como controle positivo e água DEPC como negativo, para a produção de fragmentos a serem submetidos ao sequenciamento de DNA.

A transcrição reversa foi realizada a 42°C por 60 min em um mix contendo 1 x *First Strand Buffer* (Invitrogen™), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1 µM de cada *primer* S1HS e S1HA (Quadro 4) e 200U de M-MLV *Reverse Transcriptase* (Invitrogen™), com 3,5µL do RNA extraído, para um volume final de 10µL.

Após a obtenção do DNA complementar, foi realizada a reação de PCR pela adição de 5µL de cada *c-DNA* ao *mix* de PCR (1 x PCR *Buffer* (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada *primer* S1HS e S1HA (Quadro 4), 1,5mM MgCl₂, 25,25µL água DEPC e 1,25U de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen™) para um volume final de 50µL), submetidos a 35 ciclos de 94°C/1 min, 53,4°C /1,5 min e 72°C/1 min e 72°C/10 min para a extensão final.

A segunda amplificação foi realizada adicionando-se 5µL do produto da primeira amplificação ao *mix* de PCR (1 x PCR *Buffer* (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada *primer* S1NS e S1NA, 1,5mM MgCl₂, 25,25µL água DEPC e 1,25U de *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen™), para uma reação final de 50µL) submetidos a 25 ciclos de 94°C/1 min, 58,4°C /1,5 min e 72°C/1min para extensão de DNA e 72°C/10' para extensão final.

Cinco microlitros do produto do *nested* foram analisados em gel de eletroforese com agarose a 1,5 %, corados com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL e observados sob luz ultra-violeta. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram a banda de 488 pb quando comparadas visualmente com 100bp *Ladder* (Invitrogen®).

Um tubo contendo água DEPC foi adicionado a cada 3 amostras na reação de *nested* para o monitoramento de contaminações por DNA amplificado, também adicionado de *mix* e levado ao termociclador. Todas as reações foram feitas em salas separadas com o intuito de evitar possíveis contaminações.

Quadro 4 – Primers utilizados no presente estudo para a detecção do gene codificador da proteína de espícula S - São Paulo-2013

Primer	Sequência	Posição em S*
S1HS	5' CTATACCCAATGGTAGGA 3'	1024-2088
S1HA	5' CTGAAACACGACCGCTAT 3'	
S1NS	5' GTTCTGTAGCAGGTTTAA 3'	1329-1816
S1NA	5' ATATTACACCTATCCCCTTG 3'	

* Em relação à amostra Mebus de BCoV (número de acesso Genbank U00735).

3.7 SEQUENCIAMENTO DE DNA

Os fragmentos correspondentes aos genes *HE* (441 pb) e *S* (488 pb) obtidos conforme os itens 3.4 e 3.5 foram purificados dos géis de agarose com *GFX™ PCR DNA and GEL BAND Purification Kit* (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante e submetidos ao sequenciamento bi-direcional de *DNA* em sequenciador automático ABI-377 (Applied Biosystems™).

A reação de sequenciamento consistiu em 4 µL de BigDye 3.1 (Applied Biosystems™), 4 µL de 5x *Sequencing buffer* (Applied Biosystems™), 4 pmol de cada primer senso e antisenso referentes a cada gene em reações separadas e 20 ng do DNA alvo para uma reação final de 20µL, levando-se ao termociclador PTC-200 (MJ Research™) para 35 ciclos de 96°C/30 segundos, 50°C/15 segundos e 60°C/4 minutos, com rampa de 0,7°C/segundo entre cada temperatura.

A seguir, o produto desta reação foi precipitado à temperatura ambiente com 80µL de isopropanol a 75%, incubando-se durante 20 minutos, centrifugando-se a 12.000 x g/ 25min, removendo-se o sobrenadante e adicionando-se 250µL de etanol a 70%, centrifugando-se a 12.000 x g por 5min e secando-se o precipitado a 95°C/5min, levando-se as amostras ao sequenciador.

3.8 EDIÇÃO DE SEQUÊNCIAS

Os cromatogramas gerados para cada uma das sequências senso e antisenso de cada amostra e gene foram submetidos ao aplicativo Phred online em <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>¹ para avaliação da qualidade das bases dos mesmos, sendo utilizadas apenas as posições com escore maior do que 20, ou seja, menos de um erro a cada 100 bases sequenciadas.

A sequência final de cada amostra e gene foi obtida com o aplicativo Cap-Contig do programa Bioedit versão 7.0 9.0 (HALL, 1999), sendo a mesma submetida à BLAST/n para confirmação do sequenciamento em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>².

3.9 ANÁLISE FILOGENÉTICA E DE DIVERSIDADE MOLECULAR

As sequências finais de cada gene para cada amostra foram alinhadas com sequências homólogas dos genes *HE* e *S* de coronavírus bovino recuperadas do *GenBank* (Quadros 5 e 6), com o algoritmo CLUSTAL/W dentro do programa *Bioedit* versão 7.0 9.0 (HALL, 1999).

¹ Phred Aplicativo disponível em: <<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>>.

² BLAST Aplicativo disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>>.

Quadro 5 – Sequências do gene *HE* de coronavírus bovino e do gene *HE* de influenza C recuperadas do *GenBank* utilizadas para a reconstrução da filogenia de coronavírus detectados em vacas na cidade de Vespasiano Corrêa no Estado do Rio Grande do Sul, segundo o número de acesso do *GenBank*, nomenclatura da amostra, tipo de amostra e cidade e/ou país de origem - São Paulo-2013

GENBANK	AMOSTRA	TIPO	ESTADO/PAÍS
EF424615	E-AH 65	Entérico	EUA
AF230524	BCQ.2442	Entérico	Canadá
AF230523	BCQ.2508	Entérico	Canadá
AF239309	BCO.44175	Respiratório	Canadá
AF239308	BCQ.43277	Respiratório	Canadá
AF339836	BCQ.3994	Respiratório	Canadá
AF230527	BCQ.701	Entérico	Canadá
AF230526	BCQ.376	Entérico	Canadá
DQ389651	KCD10	Entérico	Coreia do Sul
DQ389649	KCD8	Entérico	Coreia do Sul
DQ389645	KCD4	Entérico	Coreia do Sul
DQ389644	KCD3	Entérico	Coreia do Sul
DQ389642	KCD1	Entérico	Coreia do Sul
AF239307	BCQ1523	Entérico	Canadá
AF230528	BCQ708	Entérico	Canadá
AF058944	OK – 0514 – 3	Respiratório	EUA
EF445634	339 / 06	Entérico	Itália
DQ994170	KWD19	Entérico	Coreia do Sul
DQ994169	KWD18	Entérico	Coreia do Sul
EF424620	R-AH187	Respiratório	Ohio – EUA
EF424618	R-AH65-TC	Isolado HRT-18	Ohio – EUA
EF424616	E-AH65-TC	Isolado HRT-18	Ohio – EUA
AF239306	BCQ7373	Entérico	Canadá
DQ811784	DB2	Entérico	EUA
U00735	Mebus	Isolado HRT-18	EUA
AF220295	Quebec	Respiratório	Canadá
AF058943	LSU-94LSS-051-2	Respiratório	EUA
AB354579	Kakegawa	Entérico	Japão
GU214757	96	Entérico	SP – Brasil
GU241758	587	Entérico	SP – Brasil
GU 214763	841	Entérico	SP – Brasil
GU241759	868	Entérico	SP – Brasil
GU 214765	887	Entérico	SP – Brasil
GU214769	923	Entérico	SP – Brasil
GU214770	934	Entérico	SP – Brasil
GU214760	938	Entérico	SP – Brasil
GU214764	972	Entérico	SP – Brasil
GU214766	1275	Entérico	SP – Brasil
GU214767	9146	Entérico	SP – Brasil
GU214761	9215	Entérico	SP – Brasil
GU214762	9219	Entérico	SP – Brasil
GU214768	9224	Entérico	SP – Brasil
M17868	Influenza C	Respiratório	EUA

Quadro 6 – Sequências do gene S de coronavírus bovino e de bredavírus recuperadas do GenBank utilizadas para a reconstrução da filogenia de coronavírus detectados em vacas na cidade de Vespasiano Corrêa no Estado do Rio Grande do Sul, segundo o número de acesso do *GenBank*, nomenclatura da amostra, tipo de amostra e cidade e/ou país de origem - São Paulo-2013

(Continua)

GENBANK	AMOSTRA	TIPO	ESTADO/PAÍS
U06093S1	Quebec BCQ.571	Entérico	Canadá
U06091	Quebec BCQ.9	Entérico	Canadá
AF239306	Quebec BCQ.7373	Entérico	Canadá
AB277116	Hokaido/18/05	Entérico	Japão
AF058944	OK– 514-3	Respiratório	EUA
AY935638	KWD2	Entérico	Coreia do Sul
AY935637	KWD1	Entérico	Coreia do Sul
AF058943	LSU–94LSS–051-2	Respiratório	EUA
AY255831	USP1	Entérico	MG – Brasil
AB277120	Ishikawa /1/ 99	Entérico	Japão
AY935639	KWD3	Entérico	Coreia do Sul
AY935646	KWD10	Entérico	Coreia do Sul
DQ479424	Kakegawa	Entérico	SP – Brasil
AY606205	LYVB	Entérico	SP – Brasil
AY606204	USP14	Entérico	SP – Brasil
AY606203	USP13	Entérico	SP – Brasil
AY606202	USP12	Entérico	SP – Brasil
AY606201	USP11	Entérico	SP – Brasil
AY606200	USP10	Entérico	SP – Brasil
AY606199	USP9	Entérico	SP – Brasil
AY606198	USP8	Entérico	SP – Brasil
AY606197	USP7	Entérico	SP – Brasil
AY606196	USP6	Entérico	SP – Brasil
AY606195	USP5	Entérico	MG – Brasil
AY606194	USP4	Entérico	MG – Brasil
AY606193	USP3	Entérico	MG – Brasil
AY606192	USP2	Entérico	MG – Brasil
AY353075	WDBR-01	Entérico	SP – Brasil
DQ811784	DB2	Entérico	EUA
AB277110	Hokkaido / 12 / 03	Não informada	Japão
AB277107	Hokkaido / 9 / 03	Respiratório	Japão
AF239308	Ontário BCO. 43277	Respiratório	Canadá
DQ389659	KWD18	Entérico	Coreia do Sul
AB277130	Tochigi / 2 / 01	Entérico	Japão
AB277122	Ishikawa / 3 / 01	Entérico	Japão
DQ389660	KWD19	Entérico	Coreia do Sul
DQ389655	KWD14	Entérico	Coreia do Sul
DQ389635	KCD4	Entérico	Coreia do Sul
DQ389640	KCD9	Entérico	Coreia do Sul
DQ479423	BR- UEL3	Entérico	MG – Brasil
DQ479422	BR- UEL2	Entérico	MG – Brasil
DQ479421	BR- UEL1	Entérico	MG – Brasil
FG899737	96	Entérico	SP – Brasil

(Conclusão)

GENBANK	AMOSTRA	TIPO	ESTADO/PAÍS
JF795416	299	Entérico	SP – Brasil
JF795413	587	Entérico	SP – Brasil
JF795407	841	Entérico	SP – Brasil
JF795409	850	Entérico	SP – Brasil
JF795412	868	Entérico	SP – Brasil
JF795415	887	Entérico	SP – Brasil
JF795408	923	Entérico	SP – Brasil
JF795417	933	Entérico	SP – Brasil
JF795414	934	Entérico	SP – Brasil
Sem Identificação	938	Entérico	SP – Brasil
JF795405	9146	Entérico	SP – Brasil
JF795410	9215	Entérico	SP – Brasil
JF795411	9224	Entérico	SP – Brasil
EU814648	438 / 06 – TN – 50	Respiratório	Itália
EF445634	339 / 06	Entérico	Itália
AF339836	Quebec BCQ.3994	Respiratório	Canadá
AF239309	Ontário BCI.44175	Respiratório	Canadá
AF058942	LY – 138	Entérico	EUA
EF424618	RAH65TC	Entérico	EUA
EF424616	EAH65TC	Respiratório	EUA
AJ575373	BREDAVIRUS B145	Entérico	Holanda

Os alinhamentos obtidos para cada gene foram utilizados para a geração das árvores, utilizou-se o critério de otimização de distância, com o algoritmo *Neighbor-joining* e modelo evolutivo *Maximum Composite Likelihood* para nucleotídeos, com 1000 repetições de *bootstrap* utilizando o programa MEGA 4 (TAMURA, et al., 2007).

As árvores foram enraizadas com uma sequência de vírus da influenza C (M17868) e bredavírus bovino (AJ575373) e como grupos externos para os genes *HE* e *S*, respectivamente.

As identidades entre as sequências de nucleotídeos para cada um dos grupos de alinhamentos foram calculadas com o programa Bioedit versão 7.0 9.0 (HALL, 1999) para todas as sequências incluídas no estudo, com o programa Microsoft® Office Excel 2003.

4 RESULTADOS

"Há duas coisas infinitas: o Universo e a tolice dos homens."

(Albert Einstein)

4 RESULTADOS

Os resultados baseados nas metodologias definidas para esse trabalho estão descritos nos itens a seguir.

4.1 NESTED RT-PCR PARA DETECÇÃO DO GENE RdRp DE *Betacoronavirus*

Todas as 27 amostras do presente estudo foram positivas para *Betacoronavírus*, resultando no fragmento esperado de 136 pb para o gene RdRp, bem como para amostra Kakegawa (controle positivo).

4.2 HEMI-NESTED RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA PROTEÍNA HEMAGLUTININA ESTERASE (HE) DO BCoV

A reação de hemi-*nested* RT-PCR dirigida ao gene codificador da proteína HE foi aplicada a todas as 27 amostras de vacas (14 secreções nasais e 13 amostras fecais), resultando em 14 amostras positivas do material de secreção nasal e 13 para o material fecal, de acordo com o aparecimento da banda de 441pb (Quadro 3), como para amostra Kakegawa (controle positivo).

Os controles negativos adicionados a cada três amostras na fase de hemi-*nested* não apresentaram quaisquer bandas, bem como os controles negativos inseridos a partir da extração de RNA (água DEPC).

4.3 NESTED RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA SUBUNIDADE S1 DA PROTEÍNA DE ESPÍCULA (S) DO BCoV

A reação de RT-PCR dirigida ao gene S foi aplicada as 27 amostras de vacas (14 secreções nasais e 13 amostras fecais), resultando todas positivas, uma vez que apresentaram a banda esperada de 488pb (Quadro 7), como obtido para o controle positivo (amostra Kakegawa).

As reações referentes aos controles negativos (água DEPC) e os controle negativos de nested não produziram quaisquer bandas.

Quadro 7 – Resultados da hemi-nested RT-PCR e nested RT-PCR para os genes HE e S de BCoV respectivamente, para amostras de secreções nasais e fecais utilizadas no presente estudo – São Paulo-2013

Identificação	Tipo	BCoV	Gene He	Gene S
31	R	P	P	P
	-	-	-	-
34	R	P	P	P
	E	P	P	P
37	R	P	P	P
	E	P	P	P
54	R	P	P	P
	E	P	P	P
58	R	P	P	P
	E	P	P	P
67	R	P	P	P
	E	P	P	P
573	R	P	P	P
	E	P	P	P
577	R	P	P	P
	E	P	P	P
715	R	P	P	P
	E	P	P	P
725	R	P	P	P
	E	P	P	P
729	R	P	P	P
	E	P	P	P
749	R	P	P	P
	E	P	P	P
766	R	P	P	P
	E	P	P	P
Leona	R	P	P	P
	E	P	P	P

R = Respiratório E = Entérico - = colheita não realizada

4.4 SEQUENCIAMENTO DE DNA

Para 24 das 27 amostras positivas para a hemi-nested RT-PCR do gene *HE* (31, 34, 37, 58, 67, 573, 577, 715, 725, 729, 749 e SN amostras de secreção nasal e 34, 37, 54, 58, 67, 573, 577, 715, 725, 729, 766, e SN amostras fecais) foram obtidas sequências com escore ≥ 21 , conforme aferido pelo aplicativo Phred, sendo

que, para as amostras 54 e 766 (amostras de secreção nasal) e 749 (amostra fecal) não foram obtidas sequências de tal qualidade.

Já para o gene S, 26 das 27 amostras positivas para a PCR deste gene resultaram em sequências com escore Phred ≥ 20 (31, 34, 37, 54, 58, 67, 573, 577, 715, 725, 729, 749, 766 e SN amostras de secreção nasal e 34, 37, 54, 58, 573, 577, 715, 725, 729, 749, 766, e SN amostras fecais), sendo que, para a amostra 67 (amostra fecal) não foi obtida sequência viável.

Para cada uma das sequências obtidas, a análise de BLAST/n confirmou a identidade das mesmas, não tendo esta análise, produzido resultados não homólogos aos respectivos genes estudados com escores significativos.

4.5 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Na árvore construída com o método de distância para o gene S (figura 1), as 26 amostras entéricas e respiratórias de BCoV do presente estudo formaram um cluster com valor de bootstrap de 82 que foi denominado Grupo 1, sendo que as demais sequências entéricas brasileiras retiradas do Genbank, formaram outros 3 clusters, sendo o primeiro com valor bootstrap de 68, formado por amostras São Paulo, descrito por Souza, 2008, o segundo com amostras de Minas Gerais, com 91 de bootstrap (TAKIUCHI et al. 2008) sendo o último formado por amostras de Minas Gerais e São Paulo com bootstrap de 69 foi formado por amostras (BRANDÃO et al., 2006), Grupos 2, 3 e 4, respectivamente.

Figura 1 - Árvore filogenética enraizada construída com o método distância com algoritmo *neighbor-joining*, modelo evolutivo *Maximum Composite Likelihood* para o gene codificador da proteína S do coronavírus bovino, destacando em vermelho as amostras do presente estudo, tendo como grupo externo *bredavírus* bovino (AJ575373). Os números próximos de cada nó representam os valores de 1000 repetições de bootstrap, tendo sido demonstrados apenas valores de bootstrap acima de 50% – São Paulo – 2013

Para a árvore construída com o método de distância para o gene HE (figura 2), foram formados apenas 2 grupos de amostras brasileiras, sendo que as 24 amostras entéricas e respiratórias de BCoV do presente estudo formaram um cluster juntamente com 2 amostras entéricas do Canadá (número de acesso Genbank: AF230524 e AF230523) e o outro grupo formado por amostras entéricas de São Paulo descrito por Souza, 2008, ambos com valor de bootstrap de 46, sendo mantidos os nomes de grupos 1 e 2 uma vez que fazem parte do mesmo conjunto de sequências obtidos para o gene S.

As outras sequências recuperadas do Genbank formaram 2 clusters, um com duas amostras dos EUA, com 64 de bootstrap e outro com amostras do Canadá, Coreia e Estados Unidos da América, com amostras entéricas e respiratórias.

Figura 2 - Árvore filogenética enraizada construída com método de distância com algoritmo *neighbor-joining*, modelo evolutivo *Maximum Composite Likelihood* para o gene codificador da proteína HE do coronavírus bovino, destacando em vermelho as amostras do presente estudo, tendo como grupo externo o vírus influenza C (M117868). Os números próximos de cada nó representam os valores de 1000 repetições de bootstrap, tendo sido demonstrados apenas valores de bootstrap acima de 50% – São Paulo – 2013

4.6 ANÁLISE DE DIVERSIDADE MOLECULAR

4.6.1 Gene *S*

Para as amostras do presente estudo (Grupo 1), a identidade de nucleotídeos para a região do gene *S* (nucleotídeos 1381 a 1712 do gene *S* em relação à amostra Mebus de número de acesso Genbank U00735) foi de 100%.

Ao se comparar o Grupo 1 com os grupos 2, 3 e 4 as identidades foram de 98,5%, 97,3% e 89%, respectivamente.

4.6.2 Gene *HE*

A identidade das amostras do presente estudo (Grupo 1), para o gene *HE* (nucleotídeos 158 a 527 do gene *HE* em relação à amostra Mebus de número de acesso Genbank U00735) também foi de 100%.

Ao se comparar o Grupo 1 com os grupos 2, a identidade foi de 99,6%, entretanto, os nós para estes grupos apresentaram valores de bootstrap inferiores a 50%.

5 DISCUSSÃO

“Tudo na vida é simples, se usarmos a chave de decisões: sim ou não.”

(Fernando Ferreira)

5 DISCUSSÃO

No presente estudo as amostras entéricas e respiratórias foram positivas quanto a presença de *Betacoronavírus 1*, utilizando-se uma reação dirigida ao gene *RdRp*. Estas também foram analisadas quanto sua diversidade dirigida aos genes HE e S, revelando 100% de identidade de nucleotídeos em ambos os genes sequenciados, o que revelou uma única linhagem viral presente em ambos os tratos respiratório e entérico, sendo esta envolvida no desencadeamento da doença.

Ainda que todas as 27 amostras tenham resultado nos amplicons esperados para os genes S e HE, quando estes foram submetidos ao sequenciamento de DNA, não se obtiveram sequências viáveis para todos, visto que para o gene S, 26 dos 27 fragmentos resultaram em sequências com escore Phred maior ou igual a 20 e os fragmentos amplificados para o gene HE, 24 dos 27 obtiveram esse escore.

Esses resultados podem ser explicados devido à baixa concentração de DNA nas PCRs desses fragmentos, na etapa de purificação possíveis perdas do produto amplificado ou falhas na precipitação, uma vez que o excesso de etanol inviabiliza a leitura no sequenciador.

Nas reações para pesquisa de diversidade molecular de BCoV, considerando as regiões de hibridação dos primers, todas as amostras foram positivas para ambos os genes, mostrando que essas regiões são bons alvos para estudos de variabilidade genética por conterem na região amplificada regiões variáveis como já descrito por Brandão et al., 2006 e Souza et al., 2010).

As análises filogenéticas obtidas com as sequências viáveis apresentadas na figura 1, revelam que para o gene S, todas as 26 amostras da presente pesquisa segregam em um cluster único (grupo 1), distinto dos 3 grupos brasileiros formados apenas por amostras de trato entérico de animais jovens e adultos, no Estado de São Paulo descritos por Souza (2008), de Minas Gerais relatados por Takiuchi et al. (2008) e de São Paulo e Minas Gerais encontrados por Brandão et al. (2006), respectivamente.

Inicialmente, estes resultados demonstram aqui uma mesma e única linhagem de BCoV estava envolvida tanto nos processos entéricos quanto respiratórios, disseminando-se de modo rápido entre a população estudada. A existência de uma única linhagem em surtos de doença entérica já foi relatada em surtos de disenteria

sazonal (PAVARINI, 2009; SOUZA et al., 2008a,b,c; SOUZA, 2009) e entre neonatos (TAKIUCHI et al., 2008), o que é coerente com uma rápida transmissão entre diferentes indivíduos antes mesmo que se acumulem mutações detectáveis.

Além disso, não houve diferenciação entre as amostras entéricas e respiratórias, o que é discordante de alguns relatos prévios. Por exemplo, a comparação de genomas completos de BCoV recuperados dos tratos respiratórios e entérico de um mesmo animal mostrou a presença de substituições sinônimas e não sinônimas na ORF1 e uma substituição não sinônima no gene S para a posição 179 de aminoácidos dentro da mesma região aqui estudada (CHOULJENKO et al., 2001). Entretanto, uma possível base para esta diferença pode ser devida ao fato de que as amostras do referido estudo foram previamente isoladas em células da linhagem HRT-18, o que pode ter levado a vieses em função de seleção artificial pela purificação em placa. Num estudo recente (FULTON et al., 2013), apresenta sugestão de diferenciação entre amostras entéricas e respiratórias, sem entretanto ter levado em consideração amostras entéricas dos mesmos animais.

De modo diferente, o isolamento em células previamente ao sequenciamento pode acabar demonstrando ausência de diferenciação entre amostras entéricas e respiratórias e levar a evolução convergente entre amostras diferentes (HASOKSUZ et al., 2002; BORUCKI et al., 2013). Da observação destes resultados discrepantes, pode-se especular que o resultado do prévio isolamento em células de fato exerce viés por pressão de seleção “artificial”, mas com resultados aleatórios.

Entretanto, em um estudo similar realizado na Suécia, não se encontrou diferenciação entre amostras entéricas e respiratórias de BCoV para uma mesma região geográfica, sugerindo, mas uma vez, que a região geográfica e não o processo patológico, tenha influência sobre a filogenia de BCoV (LIU et al., 2006).

Outra hipótese sobre a qual se pode especular ainda para a possível existência de linhagens respiratórias e entéricas em alguns dos relatos citados anteriormente é que, ainda que o receptor de membrana celular seja o mesmo, o habitat intracelular pode ser diferente entre enterócitos e células do epitélio respiratório em termos de interações entre proteínas celulares e virais e mesmo entre os mecanismos de tradução de proteínas, o que poderia levar a selecionar, a partir de uma mesma quasi-espécie original, diferentes subpopulações para os tratos respiratório e entérico considerando a possibilidade de uma infecção inicial respiratória que evolua para enterite como já sugerido (ZHANG et al., 2007).

Devido à ausência de sequências (SAIF, 2010) e de estudos planejados, grande parte dos artigos relata dados de amostras nem sempre relacionadas em termos geográficos e temporais. Por exemplo, em um dos primeiros estudos comparando respiratório e entérico (GÉLINAS et al., 2001), foram encontradas diferenças entre vírus destas diferentes origens nos genes HE e S, entretanto, as amostras de campo não foram obtidas de um mesmo animal ou rebanho, além da possível interferência do prévio isolamento em cultivo celular.

Análises realizadas na Coreia durante os anos de 2004 a 2005 (PARK et al., 2006), sugerem que o clima seja uma variável importante em diferenciação das linhagens de BCoV e os estudos filogenéticos demonstraram que sequências de vírus de animais com diarreia neonatal formaram cluster com amostras de bovinos adultos, com amostras virais encontradas na primavera ficando distante daquelas colhidas no inverno, não levando em conta, entretanto, a localização geográfica das colheitas, que pode ser a variável mais provável para explicar os padrões de segregação.

Entretanto, a ausência de diferenciação entre amostras entéricas e respiratórias de BCoV encontra explicação plausível quando se procura entender as relação da proteína de espícula e o seu receptor de membrana celular.

O receptor celular ao qual a porção S1 da proteína S se liga é o ácido N-acetil-9-O acetil-neuramínico, o qual é compartilhado por células epiteliais dos tratos respiratório e entérico de BCoV (POPOVA, ZHANG, 2002; SCHWEGMANN-WEßSEL, HERRLER, 2006), o que significa que não haveria necessidade de custos com mutações em S1 em função da estabilidade do receptor. Considerando a evolução sob o ponto de vista da parcimônia tendo como objetivo a economia de passos e uma vez que mutações levariam a menor ligação ao receptor sendo o receptor idêntico, uma vez que o fenômeno da emergência de complexidade em sistemas biológicos não ocorre necessariamente com o aumento de diversidade/quantidade de estruturas/ complexidade estrutural.

Pode-se fazer um paralelo com o coronavírus aviário IBV, o qual se apresenta sob a forma de diversos patotipos que têm diferentes graus de afinidade pelos tratos reprodutivos, respiratório, entérico e renal, mas utiliza com receptor o ácido siálico alfa 2,3 que é, similarmente ao receptor de BCoV, presente em todos os tipos de células epiteliais de galinhas (CAVANAGH, 2007; WINTER et al., 2008; ABD EL

RAHMAN et al., 2009), sendo que todos os patótipos de IBV podem apresentar proteínas S idênticas, como o descrito aqui para BCoV.

Baseado nos estudos acima citados, somando-se aos resultados obtidos pelo presente estudo, pode-se dizer que não há diferença entre idade de hospedeiros, nem em relação ao tipo de amostra estudada baseado nas regiões genômicas aqui estudadas.

Em relação ao estudo filogenético do gene HE, as amostras deste trabalho formaram um único grupo como o grupo da árvore construída para o gene S, bem como o conjunto de sequências descritas por Souza (2009), mostrando que não há recombinações entre essas amostras brasileiras, nas regiões gênicas estudadas uma vez a topologia de ambas não é discordante.

Comparando-se as topologias obtidas para os genes S e HE, nota-se que o mesmo padrão de não diferenciação entre amostras entéricas e respiratórias foi obtido; entretanto, a árvore para HE teve uma resolução menor, com maior frequência de politomias.

Primeiramente, um padrão similar de segregação entre as duas proteínas pode ser devido ao fato de tanto a proteína HE quanto S utilizarem os mesmos receptores e, portanto, estariam sujeitas a pressão de seleção similar (POPOVA, ZHANG; 2002).

Somado ao maior número de sequências depositadas no *Genbank* para o gene S, pode-se se ter a impressão de que histórias evolutivas reescritas a partir de S sejam mais informativas que de HE, mas pode-se especular que se o número de sequência para os genes S e HE fosse maior, bem como a região estudada, seria possível comparar de um modo mais amplo a evolução baseada em ambos os genes.

6 CONCLUSÕES

“A estética literária deve se curvar à clareza científica.”

(Leonardo José Richtzenhain)

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na presente pesquisa e embasados pela literatura consultada permitiram chegar-se às seguintes conclusões:

- Linhagens idênticas de BCoV podem ser encontradas tanto no trato entérico quanto no respiratório do bovinos estudados.
- Não há diferença em tropismo entre amostras entéricas e respiratórias de BCoV explicável a partir da análise dos gene HE e S.

CAPÍTULO 2 – Diversidade molecular de amostras brasileiras de BCoV baseadas em sequências completas do gene S

"It takes all the running you can do, to keep in the same place. If you want to get somewhere else, you must run at least twice as fast as that!"

(Lewis Carrol)

7 OBJETIVOS

“Mais caro que os reagentes é o tempo, que passou e não pode ser comprado.”

(Paulo Eduardo Brandão)

7 OBJETIVOS

Considerando a ausência de dados sobre a diversidade molecular de gene S completo, os objetivos deste trabalho foram:

- Padronizar reações de PCR para a região S2 do gene S de BCoV para, em associação com os primers já descritos em literatura para S1, obter sequências completas para o gene S.
- Estudar a filogenia de amostras brasileiras de BCoV com base em sequências completas do gene S em comparação com sequências disponíveis nos bancos de dados.

8 MATERIAIS E MÉTODOS

Souza, S. P.:

– Ao menos hoje a gente não morre queimado.

Brandão, P. E.:

– É, a gente se queima, mas não é queimado.

8 MATERIAIS E MÉTODOS

8.1 PRIMERS UTILIZADOS

Para o sequenciamento completo do gene S, foram utilizados os 5 pares de primers (Quadro 8) descritos por Hasoksuz et al. (2002) e 3 novos pares de primers desenhados para o presente trabalho (SOUZA et al., 2010a).

Para o desenho de primers (figura 3) foram recuperadas 61 sequências de gene S do Genbank, sendo U00735, EU401989, EU401987, EF401988, EF193075, D00662, M64668, M646667, M646667, AB354579, FJ938063, DQ811784, D00731, AF058943, AF058944, EU686689, EU401986, AY935637, AY935638, AY935639, AY935640, AY935641, AY935642, AY935643, AY935644, AY935645, AY935646, DQ389652, DQ389653, DQ389654, DQ389655, DQ389656, DQ389657, DQ389658, DQ389659, DQ389660, DQ389632, DQ389633, DQ389634, DQ389635, DQ389636, DQ389637, DQ389638, DQ389639, DQ389640, DQ389641, AF391541, FJ938066, EF424619, AF391542, EF424615, FJ938064, AF220295, AF058942, NC003045, EU814648, EU814647, EF445634, EF424620, EF424618, EF424617 e EF424620 foram alinhadas no programa *Bioedit* v. 5.0.9 (HALL, 1999), com o algoritmo CLUSTAL/W.

A partir do alinhamento foram pesquisadas regiões de baixo polimorfismo entre as sequências comparadas, obtendo-se manualmente três pares de primers com sobreposição de *amplicons*.

Em função do alto polimorfismo encontrado nas sequências decidiu-se não utilizar softwares para o desenho dos primers, evitando assim possíveis problemas como ausência de ampliações em decorrência de diversidades viral dos *Betacoronavírus*.

Os primers foram submetidos à análise de qualidade pelo aplicativo *Oligoanalyzer* disponível em <http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>, sendo analisadas a possibilidade da formação de homo e hetero dímero, *hairpins* e temperatura de *melting*.

Os primers foram submetidos ao BLAST/n para a verificação da ocorrência de identidades não relacionadas ao gene S de BCoV, o que poderia resultar em amplificações não-específicas.

Figura 3 - Esquema do Gene S de BCoV e regiões dos primers utilizados no presente estudo para o sequenciamento de gene completo – 2013

Quadro 8 – Primers utilizados no presente trabalho para o estudo de diversidade molecular do gene codificador da proteína de espícula S, segundo o nome dos primers, a sequência utilizada, a posição, o tamanho do fragmento esperado e a temperatura de hibridização - São Paulo, 2013

Primer	Sequência	Posição*	Fragmento esperado	Temperatura de hibridização
S1AF	5 - ATGTTTTTGATACTTTTAATT-3	23640-23661	655 pb	50 °C
S1AR	5 - AGTACCACCTTCTTGATAAA-3	24275-24294		
S1BF	5 -ATGGCATTGGGATACAG-3	24189-24205	490 pb	55 °C
S1BR	5 -TAATGGAGAGGGCACCGACTT-3	24658-24678		
S1CF	5 -GGGTTACACCTCTCACTTCT-3	24422-24441	769 pb	58°C
S1CR	5 -GCAGGACAAGTGCCTATACC-3	25171-25190		
S1DF	5 -GTCCGTGTAAATTGGATGGG-3	25100-25119	827 pb	55 °C
S1DR	5 -TGTAGAGTAATCCACACAGT-3	25907-25926		
S1EF	5 -TTACAAAAATCAAACACAGACAT-3	25495-25517	877 pb	55°C
S1ER	5 -AAACTTTATTACAATCGCTTCC-3	26350-26371		
S2FF**	5 -TCAATTTTCCCCTGTATTAGG-3	26321-26342	555 pb	55 °C
S2FR**	5-CMAGTCTRGATAGAAATTTCTTGTA-3	26851-26875		
S2GF**	5- GCTACCAATTCTGCTTTAGTTA-3	26740-26761	519 pb	55 °C
S2GR**	5-GTAGTAATAACCACTACCAGTG-3	27237-27258		
S2HF**	5-TTTAGCTATGTCCCTACTAAGTA-3	27115-27137	638 pb	55 °C
S2HR**	5-CCAATAAATCAAAGACGAAGCTTA-3	27730-27752		

* Posição em relação à amostra MEBUS Accession Number: U00735.

** Pares de Primers desenhados neste estudo.

8.2 AMOSTRAS

As amostras utilizadas no presente trabalho (quadro 9) são positivas para BCoV e provenientes do Banco de Amostras do *Coronavirus Reseach Group* (CRG), mantidas a -20 °C no Laboratório de Biologia Molecular e Aplicada à Sorologia (LABMAS) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) até o momento das análises.

Quadro 9 – Amostras utilizadas no presente capítulo para a pesquisa de diversidade do gene S segundo a sua identificação, localização e ano de colheita - São Paulo-2013

Identificação	Localização	Colheita (Ano)
299	Paranapanema/SP	2003
850	Paranapanema/SP	2003
978	Paranapanema/SP	2003
9146	Paranapanema/SP	2003
D-17	São Miguel Arcanjo/SP	2003
B-04	São Miguel Arcanjo/SP	2003
F-20	São Miguel Arcanjo/SP	2003
1-A	São Miguel Arcanjo/SP	2003
E-37	Vespasiano Corrêa/RS	2007
E-725	Vespasiano Corrêa/RS	2007
E-749	Vespasiano Corrêa/RS	2007
VM	Belo Horizonte/MG	2008
9	Ponta Grossa/PR	2010
11	Ponta Grossa/PR	2010

As amostras foram selecionadas tendo como critério de inclusão a região geográfica de origem segundo os filogrupos já detectados no Brasil (SOUZA et al., 2008a,c; SOUZA et al., 2010; BARROS, 2011). Os controles utilizados, o preparo das amostras, bem como a técnica de extração de RNA foram feitos segundo os itens 3.2, 3.3 e 3.4 do capítulo 1, respectivamente.

8.3 APLICAÇÃO DA PCR PARA O GENE S COMPLETO DO BCoV

A transcrição reversa foi realizada a 37°C por 60 min em um mix contendo 1 x First Strand Buffer (Invitrogen™), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 3µL de Random Primers a 50ng/µL (Invitrogen™) e 600U de M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™), com 30µL do RNA extraído, para um volume final de 60µL.

Após a obtenção do DNA complementar, foi realizada a reação de PCR pela adição de 10µL de cada c-DNA ao mix de PCR (1 x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 2,5 µM de cada primer para os respectivos pares, 2,5mM MgCl₂, 19µL água DEPC e 1,25U de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen™)

para um volume final de 50µL), submetidos desnaturação inicial de 94/ 3min e, a seguir, 45 ciclos de 94°C/45 segundos, temperatura de hibridação igual T_m média entre os dois primers de cada par menos 5 °C/2 min e 72°C/7 min e 72°C/10 min para a extensão final.

Cinquenta microlitros do produto da PCR foram analisados em gel de eletroforese com agarose a 1,5 %, corados com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL e observados sob luz ultra-violeta. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram a banda esperada para cada par de primer (Quadro 8) quando comparadas visualmente com 100bp Ladder (Invitrogen™).

Os fragmentos esperados foram purificados, sequenciados e analisados segundo os itens 3.7, 3.8 e 3.9 do capítulo 1 deste trabalho.

A purificação da reação de sequenciamento foi realizada por Sephadex™ G-50fine (GE Healthcare Biosciences), em placas com filtro multiscreen HV com 96 orifícios. Após a purificação, as sequências foram obtidas em sequenciador automático ABI-3130 (Applied Biosystems™).

8.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA E DE DIVERSIDADE MOLECULAR

As sequências finais do gene S para cada amostra foram alinhadas com sequências homólogas dos genes S de coronavírus bovino recuperadas do GenBank (números de acesso no quadro 10), com o algoritmo CLUSTAL/W implementado dentro do programa Bioedit versão 7.0 9.0 (HALL, 1999).

Para reconstruir a árvore filogenética foram recuperadas do Genbank 47 sequências do gene S completo de diferentes regiões do mundo, sendo utilizado o método de distância com o algoritmo *neighbor-joining*, modelo evolutivo *Maximum Composite Likelihood*, com 1000 repetições de bootstrap utilizando o Programa Mega 5.

As identidades entre as sequências de nucleotídeos para cada um dos grupos de alinhamentos foram calculadas com o programa Bioedit versão 7.0 9.0 (HALL, 1999) para todas as sequências incluídas no estudo, com o programa Microsoft® Office Excel 2003.

Para os cálculos de identidades de aminoácidos, foram excluídas sequências de nucleotídeos com 100% de identidade entre si, bem como aquelas com 100% de identidades de aminoácidos quando realizada a tradução com Bioedit v. 5.0.9 (HALL, 1999).

Quadro 10 – Sequências completas do gene S de coronavírus bovino recuperadas do GenBank utilizadas para a reconstrução da filogenia de coronavírus bovino, segundo o número de acesso do Genbank e o país de origem - São Paulo-2013

(Continua)

GenBank	País
AB354579	Japão
AF181469	EUA (não publicado)
AF220295	Canadá
AF391542	EUA
AY935637	Coreia do Sul
AY935638	Coreia do Sul
AY935639	Coreia do Sul
AY935640	Coreia do Sul
AY935641	Coreia do Sul
AY935642	Coreia do Sul
AY935643	Coreia do Sul
AY935644	Coreia do Sul
AY935645	Coreia do Sul
AY935646	Coreia do Sul
D00662	Coreia do Sul
D00731	Isolado em HRT-18
DQ811784	EUA
EF193075	Alemanha
EF424615	EUA
EF424616	EUA
EF424617	EUA
EF424618	EUA
EF424619	EUA
EF424620	EUA
EF445634	Itália
EU401986	Coreia do Sul
EU401988	Coreia do Sul
EU401989	Coreia do Sul
EU686689	Coreia do Sul
EU814647	Itália
EU814648	Itália
FJ938063	EUA
FJ938064	EUA
HE616738	Cuba
HE616739	Cuba

(Conclusão)

GenBank	País
HE616740	Cuba
HE616741	Cuba
AF391541	EUA
AF239317	Canadá
DQ389636	Coreia do Sul
DQ389637	Coreia do Sul
DQ389638	Coreia do Sul
DQ389639	Coreia do Sul
DQ389640	Coreia do Sul
DQ389641	Coreia do Sul

9 RESULTADOS

Em um sistema autopoético, quanto tempo é necessário para que os novos padrões sejam incorporados até notarmos a emergência de um fenômeno?
E quantas hipóteses são necessárias para que a teoria seja aceita?

(Sibele Pinheiro de Souza)

9 RESULTADOS

Os resultados desse capítulo estão descritos nos itens a seguir.

9.1 DESENHO DE PRIMERS

Após o Blast/n nenhum dos pares de primers desenhados neste estudo apresentou sequências não homólogas a *Betacoronavírus 1*.

Após análise *in silico* dos *primers*, não foram encontrados homo ou hetero dímeros com ΔG s significativos.

9.2 RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE S COMPLETO DO BCoV

Para as 13 das 14 amostras foram obtidos amplicons para as oito regiões alvo do presente estudo com resultado positivo para PCR do gene S (Quadro 11), sendo estes submetidas a reação de sequenciamento.

Quadro 11 – Resultados das PCRs dos pares de primers utilizados nas amostras do presente capítulo para o gene S completo de BCoV, segundo a intensidade da banda – São Paulo – 2013

Primer Amostras	Par A	Par B	Par C	Par D	Par E	Par F	Par G	Par H
299	P*	P*	P*	N	N	P	N	N
850	P	N	P**	N	P*	P*	P	P
978	P*	N	P*	N	N	P*	P*	N
9146	P**	P	P**	P*	P*	P**	P	P
D-17	P**	P	P**	P	P**	P**	P	P
B-04	P*	P**	P**	P**	P**	P*	P**	P*
F-20	P*	P*	P**	P*	P**	P**	P**	P**
1-A	P*	P*	P*	P*	P*	P**	P*	P**
E-37	P*	P*	N	N	N	N	N	N
E-725	P*	P	P*	P*	P*	P	P	P
E-749	P	P*	P*	N	N	P*	P	P
VM	P	N	N	N	N	P*	P*	P*
9	N	N	N	N	N	N	N	N
11	P	P**	P	P*	P*	P	P	N
Kakegawa	P	P	P	P	P	P	P	P
CN	P	P	P	P	P	P	P	P

N= negativo; P = positiva; P* = positiva fraca e P** = positiva forte CN= controle negativo

9.3 SEQUENCIAMENTO DE DNA E ANÁLISE FILOGENÉTICA

Das amostras apresentadas no quadro 12, apenas as de identificação 9146 e D-17 resultaram em fragmentos para os oito pares de primers, sendo, portanto apenas essas incluídas para o estudo filogenético. Apesar disso as oito demais amostras do presente estudo, ainda que não tenham tido seus genes S montados completamente resultaram em contigs completos para alguns fragmentos.

Quadro 12 – Resultados dos contigs gerados para as amostras do presente capítulo para o gene S de BCoV – São Paulo – 2013

Primer Amostras	Par A	Par B	Par C	Par D	Par E	Par F	Par G	Par H
299	P	P	P	N	N	P	P	N
850	P	P	P	N	P	P	P	P
978	P	N	P	N	N	P	P	N
9146	P	P	P	P	P	P	P	P
D-17	P	P	P	P	P	P	P	P
B-04	P	P	P	P	P	P	P	P
F-20	P	P	P	P	P	P	P	P
1-A	P	P	P	P	P	P	P	P
E-37	P	N	P	P	P	P	P	P
E-725	P	P	P	N	P	P	P	P
E-749	P	P	P	N	N	P	P	P
VM	P	N	N	N	N	P	P	P
9	N	N	N	N	N	N	N	N
11	P	P	P	P	P	P	P	N

N= negativo; P = positiva

Na árvore filogenética apresentada na figura 4, podem ser vistos 6 clusters distintos, enquanto que para o cluster 6 não há um padrão filogeográfico, os grupos de 1 a 5 contêm sequências que segregaram de acordo com sua origem geográfica, sendo que as amostras D-17 e 9146 do presente estudo encontram-se com sequências derivadas de BCoV de Cuba e a maioria das sequências derivadas dos EUA, resultando essas duas amostras brasileiras e um subcluster próprio.

Considerando-se todas as 49 sequências utilizadas para análise filogenética a identidade média de nucleotídeos foi 98,55% (desvio padrão de 0,64%) e identidades máximas e mínima de 100% e 97,1%.

Entre as duas amostras sequenciadas (D-17 e 9146), a identidade de nucleotídeos e aminoácidos foram de 99,6% e 99,4% respectivamente, sendo detectadas as seguintes mutações não-silenciosas quando comparadas com o conjunto de dados utilizados para a construção da árvore com essas duas amostras: CAA422CTA, (Q→L), AAT5159ACT, (N→T), ATC2680CTC, (I→L), GGT3536GCT, (G→A), GAT3823CAT, (D→H), sendo que as duas primeiras mutações se encontram em S1.

Figura 4 - Árvore filogenética construída com método de distância com algoritmo *neighbor-joining*, modelo evolutivo *Maximum Composite Likelihood* para o gene S completo do coronavírus bovino, destacando em vermelho as amostras do presente estudo. Os números próximos de cada nó representam os valores de 1000 repetições de bootstrap, tendo sido demonstrados apenas valores de bootstrap acima de 66% – São Paulo – 2013

10 DISCUSSÃO

Los hombres son animales con ropa.

(Sibele Pinheiro de Souza)

10 DISCUSSÃO

No presente trabalho, com a utilização de um conjunto de oito pares de primers foi possível sequenciar o gene de espícula completo para duas amostras brasileiras de BCoV, as quais, além de segregarem em conjunto na árvore filogenética, apresentaram substituições de aminoácidos tanto em S1 quanto em S2.

Como evidenciado pelas análises de Blast/n, há, teoricamente, a probabilidade de hibridação dos primers em genes S de outros vírus classificados como *Betacoronavírus 1*, como por exemplo HCoV OC43, CRCoV.

Entretanto, considerando-se que esses outros *Betacoronavírus* não foram relatados como infectando bovinos, reduz-se a probabilidade de amplificações não relacionadas ao BCoV.

Paralelamente, para todas as 14 amostras, ainda que em baixa concentração, foram obtidos amplicons para todos os oito segmentos com os tamanhos esperados. Considerando a diversidade de origem dessas amostras e o fato delas terem sido selecionadas a partir de grupos filogenéticos diferentes, isto demonstra que os primers propostos são aplicáveis para estudos de diversidade molecular para gene S completo de BCoV.

Uma das prováveis causas para as baixas concentrações para alguns dos amplicons, sobretudo para os fragmentos de 1 a 5, são as possíveis diferenças de carga viral nas amostras ou mesmo o longo tempo de conservação das mesmas, o que poderia levar a degradação do RNA viral, como por exemplo, as amostras que datam de 2003. Também foi observado a presença de bandas inespecíficas menores nos pares de primers S1CR/S1CR, S1DF/S1DR e S1EF/S1ER, o que poderia ocasionar uma competição entre as bandas pelos reagentes utilizados na PCR.

Para o aprimoramento dessas reações e maior eficiência na geração de amplicons e sequências de DNA, sugere-se que uma mais ampla titulação de cada um dos reagentes utilizados, compostos em diferentes *mix* de transcrição reversa e PCR, como sugerido por Asano et al.,2010 e a realização de um gradiente de temperatura de hibridização.

Outra possibilidade de aprimoramento para geração de sequências seria a clonagem dos amplicons obtidos, que permitiria maior concentração de DNA-alvo a ser sequenciado.

Entretanto o estudo do gene S completo permite, em uma análise mais detalhada, estudar variações nos domínios da proteína S, como por exemplo o domínio de ligação a receptor, peptídeo de fusão, predição de estruturas de proteínas e busca por eventos de recombinação.

Baseado nos resultados do presente trabalho, pode-se afirmar que as amostras brasileiras são filogeograficamente próximas das amostras da América do Norte, mostrando que essas análises podem apontar assinaturas regionais de BCoV em diferentes países (SOUZA et al., 2011).

Entretanto, deve-se levar em consideração a existência de um baixo número de sequências completas para o gene de espícula disponível no Genbank, o que poderia levar a interpretações superficiais sobre a reconstrução filogenética de BCoV.

Como apresentado na figura 4, as duas amostras brasileiras aqui estudadas segregaram em um cluster exclusivo. Observando esse resultado com a maioria dos outros clusters encontrados, a hipótese de assinaturas filogeográficas para BCoV, como já sugerido em outros estudos utilizando apenas o gene S parcial é sustentável (SOUZA et al., 2008a,c; TAKIUCHI et al., 2008), esse mesmo padrão filogeografico apoiado em gene S completo já foi descrito na Coreia e no Japão (PARK et al., 2006; KO et al., 2006; KANNO et al., 2008 2007) .

Sobre a concordância entre as topologias de árvores filogenéticas com sequências parciais e aquelas com sequências completas S, os resultados iniciais aqui apresentados permitem inferir que, para fins de epidemiologia molecular, há concordância entre as mesmas. Pode-se especular que a análise parcial do gene S, pode ser usada como triagem em surtos de BCoV, minimizando assim gastos com reagente, tempo na geração de dados, selecionando previamente as amostras para um análise completa do gene S.

Nota-se que esse cluster dessas duas amostras brasileiras encontra-se próximo ao cluster da maioria das amostras dos EUA e Cuba, uma explicação plausível para essa proximidade seria a troca de populações virais entre essas diversas regiões por meio de bovinos infectados com BCoV, como já sugerido para a

relação próxima existente entre as amostras de Cuba e EUA (MARTÍNEZ et al., 2012).

Entretanto, para o cluster 6, nota-se a existência de sequências derivadas de países tão distantes quanto Japão e Alemanha, ainda que a sugestão de troca de populações virais por intermédio de transito animal possa-se aplicar nesse caso, deve-se considerar também o fato de que a maioria das amostras contidas nesse cluster sofreu passagens sucessivas em cultivos celulares, o que já foi demonstrado como um viés importante para estudos filogenéticos para BCoV (BORUCKI, et al., 2013).

Observando-se as substituições de aminoácidos ocorridas entre as amostras do Genbank e as amostras D-17 e 9146, houve troca de classe de aminoácidos em três casos Q→L (polar-não-polar), G→A (polar-não-polar) e D→H (carga negativa-carga positiva). A troca entre classes de aminoácidos pode gerar alterações de hidrofobicidade em uma proteína o que pode causar alterações na relação-sistema imune, como no caso da alteração Q→L ocorrida em S1 ou de atividade fusogênica e de formação de sincícios, como aquelas ocorridas em S2, que são G→A e D→H. Ainda que não haja indícios no presente estudo acerca dos fenótipos relacionados a essas duas amostras, as implicações biológicas poderiam ser investigadas por meio de isolamento de cultivo celular seguido de testes de soroneutralização cruzada e de dinâmica de replicação viral.

Um grande passo para gerar dados em larga escala para estudos futuros seria a utilização de sequenciadores de próxima geração, o que permitiria uma visão mais aprofundada da genética de populações de coronavírus bovino, baseadas não apenas em gene S mais em genomas completos.

11 CONCLUSÕES

El viento es el cantante de una canción rara y al mismo tiempo bella.

(Sibele Pinheiro de Souza)

11 CONCLUSÕES

- Foi possível propor reações para a região S2 do gene S de BCoV que permitiram, em associação com os *primers* já descritos para S1, a geração de sequências completas do gene de espícula.
- Com base em sequências de 98,7% do gene S, manteve-se o padrão filogeográfico específico brasileiro, quando comparadas com estudos prévios baseados em sequências parciais para o mesmo gene.

12 REFERÊNCIAS

Los arboles estan rojos de vergüenza, luego estarán desnudos.

Bailan para la gran bienvenida... Del bello outono.

(Sibele Pinheiro de Souza)

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, S.; KIENZLE, T. E.; LAPPS, W.; BRIAN, D. A. Deduced sequence of the bovine coronavirus spike protein and identification of the internal proteolytic cleavage site. **Virology**, v. 176, p. 296-301, 1990.
- ADB, E. R. S.; EL-KENAWY, A. A.; NEUMANN, U.; HERRLER, G.; WINTER, C. Comparative analysis of the sialic acid binding activity and the tropism for the respiratory epithelium of four different strains of avian infectious bronchitis virus. **Avian Pathology**, v. 38, n. 11, p. 41-45, 2009.
- AKASHI, H.; INABA, Y.; MIURA, Y.; TOKUHISHA, S.; SATO, K.; SATODA, K. Properties of a coronavirus isolated from a cow with epizootic diarrhea. **Veterinary Microbiology**, v. 5, p. 265-276, 1980.
- ASANO, K. M.; SOUZA, S. P.; BARROS, I. N.; AYRES, G. R.; SILVA, S. O.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDÃO, P. E. Multiplex semi-nested RT-PCR with exogenous internal control for simultaneous detection of bovine coronavirus and group A rotavirus. **Journal of virological methods**, v. 169, p. 375-379, 2010.
- BARRERA, M. V.; RODRÍGUEZ, E. B.; BETANCOURT, A. M.; FRÍAS, M. T. L.; BRANDÃO, P. First report in Cuba of bovine coronavirus detection in a winter dysentery outbreak. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 4, p. 2006.
- BARROS, I. N. **Um enfoque multigênico para a genealogia comparada de *Betacoronavirus* em bovinos e equinos**. 2011. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- BRANDÃO, P. E.; BIRGEL JR., E. H.; GREGORI, F.; ROSALES, C. A. R.; RUIZ, V. L. A.; JEREZ J. A. Bovine coronavirus detection in adult cows in Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 2, p. 103-104, 2002.
- BRANDÃO, P. E.; GREGORI, F.; MONTELEONE, G. S.; SOARES, R. M.; ROSALES, C. A. R.; JEREZ, J. A. Nested PCR assay for detection of bovine coronavirus S1 gene. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 1, p. 1-3, 2003.
- BRANDÃO, P. E.; GREGORI, F.; RICHTZENHAIN, L. J.; ROSALES, C. A. R.; VILLARREAL, L. Y. B.; JEREZ, J. A. Molecular diversity of Brazilian strains of bovine coronavirus (BCoV) reveals a deletion within the hypervariable region of the S1 subunit of the spike glycoprotein also found in human coronavirus OC43. **Archives of Virology**, v. 151, n. 9, p. 1735-1748, 2006.
- CAMPBELL, S. G.; COOKINGHAM, C. A. The enigma of winter dysentery. **Cornell Veterinarian**, v. 68, p. 423-441, 1978.

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Veterinary Research** v.38, n. 2, p. 281-97, 2007.

CAVANAGH, D. The coronavirus surface glycoprotein. In: SIDDELL, S. G. **The coronaviridae**. New York: Plenum, 1995. p. 73-113.

CHOULJENKO, V. N.; LIN, X. Q.; STORZ, J.; KOUSOULAS, G.; GORBALENYA, A. E. Comparison of genomic and predicted amino acid sequences of respiratory and enteric bovine coronaviruses isolated from the same animal with fatal shipping pneumonia. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 2927-2933, 2001.

CHOULJENKO, V. N.; KOUSOULAS, K. G.; LIN, X. Q.; STORZ, J. Nucleotide and predicted amino acid sequences of all genes encoded by the 3' genomic portion (9.5 kb) of respiratory bovine coronaviruses and comparisons among respiratory and enteric coronaviruses. **Virus Genes**, v. 17, p. 33-42, 1998.

CLARK, M. A. Bovine coronavirus. **British Veterinary Journal**, v. 149, n. 1, p. 51-70, 1993.

COLLINS, A. R.; KNOBLER, R. L.; POWELL, H.; BUCHMEIER, M. J. Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for cell attachment and cell-cell fusion. **Virology**, v. 119, p. 358-371, 1982.

CYR-COATS, K. S. T.; STORZ, J. Bovine coronavirus-induced cytopathic expression and plaque formation: host cell and virus strain determine trypsin dependence. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 35, p. 48-56, 1988.

DURHAM, P. J.; HASSARD, L. E.; ARMSTRONG, K. R.; NAYLOR, J. M. Coronavirus-associated diarrhea (winter dysentery) in adult cattle. **Canadian Veterinary Journal**, v. 30, n. 10, p. 825-827, 1989.

FULTON, R. W.; RIDPATH, J. F.; BURGE, L. J. Bovine coronaviruses from the respiratory tract: Antigenic and genetic diversity. **Vaccine**, v. 31, p. 886-892, 2013.

FUKUTOMI, T.; TSUNEMITSU, H.; AKASHI, H. Detection of bovine coronaviruses from adult cows with epizootic diarrhea and their antigenic and biological diversities. **Archives of Virology**, v. 144, n. 5, p. 997-1006, 1999.

GÉLINAS, A. M.; BOUTIN, M.; SASSEVILLE, A. M.; DEA, S. Bovine coronaviruses associated with enteric and respiratory diseases in Canadian dairy cattle display different reactivities to anti-HE monoclonal antibodies and distinct amino acid changes in their HE, S and ns4.9 protein. **Virus Research**, v. 76, n. 1, p. 43-57, 2001.

HALL, T. A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HASOKSUZ, M.; SREEVATSAN, S.; CHO, K.O.; HOET, A. E.; SAIF, L.J. Molecular analysis of the S1 subunit of the spike glycoprotein of respiratory and enteric bovine coronavirus isolates. **Virus Research**, v. 84, p. 101–109, 2002.

HECKERT, R. A.; SAIF, L. J.; HOBLET, K. H.; AGNES, A. G. A longitudinal study of bovine coronavirus enteric and respiratory infections in dairy calves in two herds in Ohio. **Veterinary Microbiology**, v. 22, p. 187-201, 1990.

HOLMES, K. V.; LAI, M. M. C. Coronaviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Virology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p. 1075-1093.

HONDA, E.; TAKAHASHI, H.; OKAZAKI, K.; MINETOMA, T.; KUMAGAI, T. The multiplication of transmissible gastroenteritis viruses in several cell lines originated from porcine kidney and effects of trypsin on the growth of the viruses. **Japanese Journal of Veterinary Sciences**, v. 52, n. 2, p. 217-224, 1990.

HORNER, G. W.; HUNTER, R.; KIRKBRIDE, C. A. A coronavirus-like agent present in faeces of cows with diarrhoea. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 23, n. 5, p. 98, 1975.

ICTV Virus Taxonomy: 2009 Release. Disponível em:
<<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>> Acesso em: 17 jan. 2012.

JEONG, J. H.; KIM, G. Y.; YOON, S. S.; PARK, S. J.; KIM, Y. J.; SUNG, C. M.; SHIN, S. S.; LEE, B. J.; KANG, M. I.; PARK, N. Y.; KOH, H. B.; CHO, K. O. Molecular analysis of S gene of spike glycoprotein of winter dysentery bovine coronavirus circulated in Korea during 2002-2003. **Virus Research**, v. 108, n. 1-2, p. 207-212, 2005.

KANNO, T.; KAMIYOSHI, T.; ISHIRARA, R.; HATAMA, S.; UCHIDA, I. Phylogenetic studies of bovine coronavirus isolated in Japan. **Virology**, v. 71, p. 83-86, 2008.

KANNO, T.; HATAMA, S.; ISHIRARA, R.; UCHIDA, I. Molecular analysis of bovine coronaviruses isolated in Japan from 1999 to 2006. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 1218-1224, 2007.

KING, B.; POTTS, B. J.; BRIAN, D. A. Bovine coronavirus hemagglutinin protein. **Virus Research**, v. 2, p. 53-59, 1985.

KLAUSEGGER, A.; STROBL, B.; REGL, G.; KASER, A.; LUYTJES, W.; VLASAK, R. Identification of a coronavirus hemagglutinin-esterase with a substrate specificity different from those of influenza C virus and bovine coronavirus. **Journal of Virology**, v. 73, n. 5, p. 3737-3743, 1999.

KO, C. K.; KANG, M. I.; LIM, G. K.; KIM, G. Y.; YOON, S. S.; PARK, J. T.; JEONG, C.; PARK, S. H.; PARK, S. J.; KIM, Y. J.; JEONG, J. H.; KIM, S. K.; PARK, S. I.; KIM, H. H.; KIM, K. Y.; CHO, K. O. Molecular characterization of HE, M, and E genes of winter dysentery bovine coronavirus circulated in Korea during 2002-2003. **Virus Genes**, v. 32, p. 129-136, 2006.

KOURTESIS, A. B.; GÉLINAS, A. M.; DEA, S. Genomic and antigenic variations of the HE glycoprotein of bovine coronaviruses associated with neonatal calf diarrhea and winter dysentery. **Archives of Virology**, v. 146, n. 6, p. 1219-1230, 2001.

KUBO, H.; YAMADA, Y. K.; TAGUCHI, F. Localization of neutralizing epitopes and the receptor-binding site within the amino-terminal 330 amino acids of the murine coronavirus spike protein. **Journal of Virology**, v. 68, p. 5403-5410, 1994.

LAI, M. C. M.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 48, p. 1-100, 1997.

LIU, L.; HÄGGLUND, S.; HAKHVERDYAN, M.; ALENIUS, S.; LARSEN, L. E.; BELÁK, S. Molecular epidemiology of bovine coronavirus on the basis of comparative analyses of the S gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 957-960, 2006.

LUO, Z.; WEISS, S. R. Roles in cell-to-cell fusion of two conserved hydrophobic regions in the murine coronavirus spike protein. **Virology**, v. 244, p. 483-494, 1998.

LUYTJES, W.; BREDENBEEK, P. J.; NOTEN, A. F. H.; HORZINEK, M. C.; SPAAN, W. J. M. Sequence of mouse hepatitis virus A59 mRNA 2: indications for RNA-recombination between coronavirus and influenza C virus. **Virology**, v. 166, p. 415-422, 1988.

MARTÍNEZ, N.; BRANDÃO, P. E.; SOUZA, S. P.; BARRERA, M.; SANTANA, N.; ARCE, H. D.; PÉREZ, L. J. Molecular and phylogenetic analysis of bovine coronavirus based on the spike glycoprotein gene. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 1870-1878, 2011.

MASTERS, P. S. The molecular biology of coronaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 66, p. 193-292, 2006.

MCNULTY, M. S.; BRYSON, D. G.; ALAN, G. M.; LOGAN, E. F. Coronavirus infection of the bovine respiratory tract. **Veterinary Microbiology**, v. 9, p. 425-434, 1984.

MONTELEONE, G. S.; BIRGEL J. R, E. H.; BRANDÃO, P. E.; GREGORI, F.; ROSALES, C. A. R.; RUIZ, V. L. A.; SOARES, R. M.; JEREZ, J. A. Bovine Coronavirus detection in adult cows. **Virus Reviews and Research**, v. 7, p. 191, 2002. Trabalho apresentado no XIII Encontro Nacional de Virologia, 2002, Águas de Lindóia. São Paulo.

PARK, S. J.; JEONG, C.; YOON, S. S.; CHOY, H. E.; SAIF, L. J.; PARK, S. H.; KIM, Y. J.; JEONG, J. H.; PARK, S. I.; KIM, H. H.; LEE, B. J.; CHO, H. S.; KIM, S. K.; KANG, M. I.; CHO, K. O. Detection and characterization of Bovine Coronaviruses in fecal specimens of adult cattle diarrhea during the warmer seasons. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3178-3188, 2006.

PAVARINI, S. P. **Achados clínico patológicos em casos naturais e experimentais de disenteria de inverno em bovinos adultos**. 2009. 56 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

PENSAERT, M.; CALLEBAUT, P.; COX, E. Enteric coronaviruses of animals. In: KAPIKIAN, A. Z. **Viral infections of the gastrointestinal tract**. 2. ed. New York: Marcel-Dekker, 1994. p. 627-696.

POPOVA, R.; ZHANG, X. The spike but not the hemagglutinin/esterase protein of bovine coronavirus is necessary and sufficient for viral infection. **Virology**, v. 294, p. 222–236, 2002.

SAEKI, K.; OHTSUKA, N.; TAGUCHI, F. Identification of the spike protein residues of murine coronavirus responsible for receptor-binding activity by use of soluble receptor-resistant mutants. **Journal of Virology**, v. 71, n. 12, p. 9024-9031, 1997.

SAIF, L. J. Bovine respiratory coronavirus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, n. 2, p. 349-364, 2010.

SCHEWEGMANN-WEßSEL, C.; HERRLER, G. Sialic acids as receptor determinants for coronavirus. **Journal of Glycoconjugates**, v. 23, p. 51–58, 2006.

SCHULTZE, B.; GROSS, H. J.; BROSSMER, R.; HERRLER, G. The S protein of bovine coronavirus is a hemagglutinin recognizing 9-O-acetylated sialic acid as a receptor determinant. **Journal of Virology**, v. 65, p. 6232-6237, 1991.

BORUCKI, M. K.; ALLEN, J. E.; CHEN-HARRIS, H.; ZEMLA, A.; VANIER, G.; MABERY, S.; TORRES, C.; HULLINGER, P.; SLEZAC, T. The Role of Viral Population Diversity in Adaptation of Bovine Coronavirus to New Host Environments. **PLOS | ONE**, v. 8, p. , 2013.

SOUZA, S. P.; ASANO, K. M.; BARROS, I. N.; AYRES, G. R.; PAVARINI, S. P.; DRIEMEIER, D.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDÃO, P. E. Genealogical studies of respiratory and enteric bovine coronavirus of brazilian strains based on the partial analysis of the S and HE genes. **Virus Reviews and Research**, v. 14, p. 193, 2009. Trabalho apresentado no XIII Encontro Nacional de Virologia, Brasília-DF.

SOUZA, S. P.; ASANO, K. M.; OLIVEIRA, R. N.; HORA, A. S.; NOGUEIRA, J. S.; BARROS, I. N.; AYRES, G. R.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDAO, P. E. Study of the Full Spike Gene of Brazilian Bovine Coronavirus (BCoV) Brazilian Strains. **Virus Reviews and Research**, v. 13, p. 70, 2011. Trabalho apresentado no XIII Encontro Nacional de Virologia em Atibaia, SP. 2011.

SOUZA, S. P.; ASANO, K. M.; OLIVEIRA, R. N.; HORA, A. S.; NOGUEIRA, J. S.; BARROS, I. N.; AYRES, G. R.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDAO, P. E. Both the S1 and S2 coding-regions of the spike glycoprotein gene of bovine coronavirus reveals a marked phylogeographic pattern for the distribution of the virus. **Virus Reviews and Research**, v. 13, p. 158, 2010a. Trabalho apresentado no XII Encontro Nacional de Virologia em Gramado, RS.

SOUZA, S. P.; ASANO, K. M.; PAVARINI, S. P.; DRIEMEIER, D.; CASTRO, A. M. M. G.; SILVA, S. O. S.; MARTINS, J.; RICHTZENNHAIN, L. J.; BRANDÃO, P. E. On the occurrence of bovine coronavirus as a respiratory pathogen of cattle. **Virus Reviews and Research**, v. 13, p. 122, 2008b. Trabalho apresentado no XIII Encontro Nacional de Virologia, Caxambu-MG

SOUZA, S. P.; ASANO, K. M.; SILVA, S. O. S.; RICHTZENNHAIN, L. J.; BRANDÃO, P. E. Analysis of Spike and Hemagglutinin-esterase genes of Brazilian strains of Bovine Coronavirus (BCoV) evidence multiple and previously not described lineages. **Virus Reviews and Research**, v. 13, p. 120, 2008c. Trabalho apresentado no XIII Encontro Nacional de Virologia, Caxambu-MG

SOUZA, S. P. **Epidemiologia molecular em um surto de disenteria de inverno em bovinos leiteiros adultos no Estado de São Paulo e descrição de genótipos para o Coronavírus bovino (BCoV)**. 2008. 72 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008a.

SOUZA, S. P.; ASANO, K. M.; VILLARREAL, L. Y. B.; SILVA, S. O. S.; RICHTZENNHAIN, L. J.; BRANDÃO, P. E. A semi-nested assay targeted to Coronavirus Bovine hemagglutinin-esterase gene as a basis for molecular epidemiology. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.47, n. 4, p. 323-328, 2010b.

TAGUCHI, F. The S2 subunit of the murine coronavirus spike protein is not involved in receptor binding. **Journal of Virology**, v. 69, n. 11, p. 7260-7263, 1995.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Molecular analysis of the ovine coronavirus S1 gene by direct sequencing of diarrheic fecal specimens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 4, p. 277-282, 2008.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TEGTMEIER, C.; UTTENTHALL, A. A. ; FRIIS, N. S.; JENSEN, N. E.; JENSEN, H. E. Pathological and microbiological studies on pneumonic lungs from Danish calves. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 46, p. 693-700, 1999.

TOTH, T. E. Trypsin-enhanced replication of neonatal calf diarrhea coronavirus in bovine embryonic lung cells. **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, n. 6, p. 967-972, 1982.

TSUNEMITSU, H.; YONEMICHI, H.; HIRAI, T.; KUDO, T.; ONOE, S.; MORI, K.; SHIMIZU, M. Isolation of bovine coronavirus from feces and nasal swabs of calves with diarrhea. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 53, n. 3, p. 433-437, 1991.

WINTER, C.; HERRLER, G.; NEUMANN, U. Infection of the tracheal epithelium by infectious bronchitis virus is sialic acid dependent. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 4, p. 367-373, 2008.

YAMADA, Y. K.; TAKIMOTO, K.; YABE, M.; TAGUCHI, F. Acquired fusion activity of a murine coronavirus MHV-2 variant with mutations in the proteolytic cleavage site and the signal sequence of the S protein. **Virology**, v. 227, p. 215-219, 1997.

ZHANG, X.; HASOKSUZ, M.; SPIRO, D. Quasispecies of bovine enteric and respiratory coronaviruses based on complete genome sequences and genetic changes after tissue culture adaptation. **Virology**, v. 363, p. 1–10, 2007.

ZHANG, X.; HERBST, W.; KOUSOULAS, K. G. Comparison of the S genes and the biological properties of respiratory and enteropathogenic bovine coronaviruses. **Archives of Virology**, v.134, p. 421–426, 1994.