UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

WILLIAM MARCIEL DE SOUZA

Caracterização genômica e evolutiva de vírus zoonóticos nas Américas

Ribeirão Preto

2017

WILLIAM MARCIEL DE SOUZA

Caracterização genômica e evolutiva de vírus zoonóticos das Américas

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Imunologia Básica e
Aplicada,
Orientador: Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes
Figueiredo.

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Souza, William Marciel de
Caracterização genômica e evolutiva de vírus zoonóticos nas Américas.
Ribeirão Preto, 2017.

107 p. : il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Figueiredo, Luiz Tadeu Moraes.

1. Zoonoses virais. 2. Metagenômica viral. 3. Genômica. 4. Evolução. 5. *Bunyavirales*. 6. *Vesiculovirus* 7. *Arbovirus* 8. *Parvovirus* 9. *Hepeviridae*

Nome: William Marciel de Souza

Título: Caracterização genômica e evolutiva de vírus zoonóticos nas Américas

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Imunologia Básica e
Aplicada

Aprovado em __ de Novembro de 2017,

Banca Examinadora

Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo

Instituição: Universidade de São Paulo Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai (*in memoriam*), à minha irmã Amanda, e ao meu “irmão” Eduardo. E a todos os meus professores, pelo estímulo e conhecimento transmitido.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo pelas oportunidades, orientação, paciência, simplicidade e estímulo que foram essenciais para meu desenvolvimento científico.

Ao Prof. Dr. Edison Luiz Durigon e Dr. Jansen de Araújo pela contribuição em diversas etapas deste estudo, e por terem gentilmente cedido as amostras aqui utilizadas, após longo período de coletas.

Ao Prof. Dr. Pablo Murcia e Dr. Robert Gifford pelos ensinamentos, generosidade, confiança e constante disponibilidade em ajudar durante todo o meu estágio na *MRC-University of Glasgow Centre for Virus Research*.

Ao Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes e Prof. Dr. Gustavo Olszanski Acrani pelas oportunidades, ensinamentos, convívio e a amizade durante estes últimos anos, foram momentos inspiradores e de grande aprendizado.

Ao Dr. Robert Tesh, Dr^a. Patrícia Aguillar e Dr^a. Daniele Barbosa de Almeida Medeiros pela disponibilidade e colaboração nos estudos sobre os vírus da ordem *Bunyavirales*.

À Marília Farignoli Romeiro, Marcílio Jorge Fumagalli e Luiz Carlos Vieira, meus amigos e pesquisadores extremamente dedicados com quem tive o imensurável prazer de contar durante todo o desenvolvimento deste estudo. Palavras não traduzem o carinho e a imensa gratidão que tenho por toda a ajuda de vocês.

À Soraya Jabur Badra pela grande amizade, carinho e pelos ótimos momentos que convivemos, bem como o suporte dado ao longo deste percurso.

Aos amigos de laboratório, Aline, Felipe Carvalho, Danilo, Angélica, Leonardo e Gilberto pela ajuda, carinho e paciência durante todo este período.

Aos Profs. Dr. Eurico Arruda, Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca e às suas respectivas equipes sempre solícitos durante todo este período, e que direta ou indiretamente auxiliaram no planejamento e/ou execução deste trabalho.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa em Virologia da FMRP-USP: Adriana,

Danillo e Maria Lúcia (Piti) pela amizade, além de constante e simpática presença durante este período. Também ao meu amigo, Antônio Carlos da Silva, pelas boas e divertidas conversas durante o desenvolvimento deste estudo. Além de todos os funcionários que possibilitam o pleno funcionamento do prédio.

Aos funcionários do Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD) na Universidade de Campinas, especialmente à Sandra Krauchenco e Osvaldo Reis, por gentilmente terem me recebido e conduzido os procedimentos de sequenciamento com a plataforma Illumina.

Aos amigos Jedson Cardoso e Dr. Sandro Patroca da Silva pelos conhecimentos transmitidos e pela assiduidade na colaboração tanto durante meu período no Instituto Evandro Chagas, quanto no desenvolvimento deste estudo.

Aos professores do Programa de Imunologia Básica Aplicada da FMRP-USP. À Ana Cristina, secretária do Programa de Imunologia Básica Aplicada pela solicitude e gentileza com que atendeu todas as minhas dúvidas durante este período.

Aos colegas da Pós-Graduação pelas experiências compartilhadas e prazerosos momentos de descontração. Especialmente aos amigos Tiago Medina (Pará) que foi essencial na preparação da seleção do doutorado, e Leonardo Lima pelos excelentes e divertidos momentos compartilhados durante toda esta jornada.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão das bolsas (Processo No. 12/24150-9 e 15/05778-5) e pelo apoio financeiro que contribuíram diretamente para o desenvolvimento deste estudo, bem como para a participação em eventos científicos, que foram de grande importância para minha formação acadêmica, científica e profissional.

A todos os colaboradores anônimos, presentes e ausentes, que de alguma forma nos auxiliaram na execução deste projeto.

Este trabalho contou com os seguintes apoios financeiros:

- **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (Processos No. 12/24150-9; 15/05778-5; 13/14929-1; 14/02438-6).
- **Pró-Reitoria de Pós-Graduação** da Universidade de São Paulo.

Este trabalho resultou nas seguintes publicações:

1. **Souza WM**, Acrani GO, Romeiro MF, Reis O Jr, Tolardo AL, da Silva SP, de Almeida Medeiros DB, Varela M, Nunes MR, Figueiredo LTM. Molecular characterization of Capim and Enseada orthobunyaviruses. **Infect Genet Evol.** 2016 Jun;40:47-53.
2. **Souza WM**, Acrani GO, Romeiro MF, Júnior OR, Tolardo AL, de Andrade AA, da Silva Gonçalves Vianez Júnior JL, de Almeida Medeiros DB, Nunes MR, Figueiredo LTM. Complete genome sequence of Piry vesiculovirus. **Arch Virol.** 2016 Aug;161(8):2325-8.
3. **Souza WM**, Romeiro MF, Fumagalli MJ, Modha S, de Araujo J, Queiroz LH, Durigon EL, Figueiredo LT, Murcia PR, Gifford R. Chapparvoviruses occur in at least three vertebrate classes and have a broad biogeographic distribution. **J Gen Virol.** 2017. 98 (2), 225-229.
4. Nunes Neto JP*, **Souza WM***, Acrani GO, Romeiro MF, Fumagalli MJ, Vieira CL, Medeiros DB, de Lima JA, de Lima CP, Cardoso JF, Rodrigues SG, Figueiredo LTM, da Silva SP, Tesh R, Nunes MR, Vasconcelos PF. Characterization of the Bujaru, Frijoles and Tapara antigenic complexes into the Sandfly Fever group and two unclassified phleboviruses from Brazil. **J Gen Virol.** 2017 Apr;98(4):585-594. *Contribuíram igualmente para este trabalho.
5. Melo Junior AB*, **Souza WM***, Acrani GO, Carvalho VC, Romeiro MF, Tolardo AL, Silva SP, Cardoso JF, Chiang JO, Vianez Júnior JL, Figueiredo LTM, Vasconcelos PFC, Nunes MRT, Medeiros DBA. Genomic characterization and evolution of Tacaiuma orthobunyavirus (*Peribunyaviridae* family, *Bunyavirales* order) isolated in Brazil. **Infect Genet Evol.** 2017. *Contribuíram igualmente para este trabalho. Aceito.
6. **Souza WM**, Fumagalli MJ, Araujo J, Sabino-Santos Jr G, Motta Maia GF, Romeiro MF, Modha S, Queiroz LH, Nunes MRT, Durigon EL, Murcia PR and Figueiredo LTM. Discovery of novel anelloviruses species in wild small mammals expands the host diversity and proposes two new genera into *Anelloviridae* family. **Virology.** 2017. Em avaliação.

7. Chiang JO*, **Souza WM***, Nunes MRT, Acrani GO, Travassos da Rosa APA, Freitas NM, Silva SP, Silva PHD, Sousa AW, Rodrigues SG, Quaresma JAS, Dutary B, Guzmán H, Vasilakis N, Tesh RB, Vasconcelos PFC. Characterization of the Gamboa virus serogroup (Orthobunyavirus genus: *Peribunyaviridae* family). **Am J Trop Med Hyg.** 2017.

*Contribuíram igualmente para este trabalho. Submetido.

8. Nunes MRT*, **Souza WM***, Acrani GO, Silva SP, Vasconcelos PFC. Revalidation and genetic characterization of novel members of Group C (*Orthobunyavirus*, *Peribunyaviridae*) isolated in the Americas. **PlosOne.** 2017. *Contribuíram igualmente para este trabalho. Submetido.

9. **Souza WM**, Romeiro MF, Sabino-Santos Jr G, Motta Maia FG, Fumagalli MJ, Modha S, Nunes MRT, Murcia PR and Figueiredo LTM. A novel Hepatitis E virus in wild rodents. **Emerging Infectious Diseases.** 2017. Submetido.

10. Dennis TPW*, **Souza WM***, Wilson SJ, Gifford RJ. Host associations of novel Circoviruses and Parvoviruses identified via metagenomic sequencing - insights from phylogenetic analysis of endogenous viral elements. **Journal of Virology.** 2017. *Contribuíram igualmente para este trabalho. Submetido.

11. Aguilar PV, **Souza WM**, Nunes MRT. Characterization of the Patois serogroup reveals a novel reassortment within Orthobunyaviruses. 2017. Em preparação.

12. Aguilar PV, Fumagalli MJ, **Souza WM**, Nunes MRT. Genomic characterization of Estero real nairovirus from Cuba. 2017. Em preparação.

RESUMO

SOUZA WM. Caracterização genômica e evolutiva de vírus zoonóticos nas Américas (Tese). Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2017.

O sequenciamento de alto desempenho, pela redução dos custos nos últimos anos, vem sendo cada vez mais utilizado para prospectar e identificar vírus. Estes métodos são extremamente mais sensíveis que outros métodos moleculares, e capazes de sequenciar genomas virais sem conhecimento prévio, clonagem ou isolamento. Neste estudo, utilizamos o sequenciamento de alto desempenho para conhecer, e caracterizar genomas completos de arbovírus isolados nas Américas, incluindo a prospecção de vírus em amostras de pequenos mamíferos do estado de São Paulo, Brasil. Assim, sequenciamos e caracterizamos 44 *Bunyavirales*, 35 no gênero *Orthobunyavirus*, família *Peribunyaviridae*, oito no gênero *Phlebovirus*, família *Phenuiviridae*, e um orthonairovírus, família *Nairoviridae*. Entre os *Bunyavirales* identificamos uma provável nova estratégia de codificação da proteína não estrutural do segmento pequeno, e ainda identificados sete vírus que são *reassortants* naturais. Caracterizamos o genoma completo do vesiculovírus Piry, determinando sua relação filogenética com arbovírus pertencentes ao gênero *Vesiculovirus*, família *Rhabdoviridae*. Prospectamos novos vírus, os quais incluímos em três famílias, *Parvoviridae*, *Anelloviridae* e *Hepeviridae*. Na família *Parvoviridae*, identificamos 20 chapparvovírus endógenos e exógenos, oriundos de grande diversidade de hospedeiros vertebrados e invertebrados, e que representam uma nova subfamília, a *Chapparvovirinae*. Também, descrevemos onze novas espécies de *Anelloviridae* em roedores silvestres e marsupiais, fornecendo importantes informações sobre a diversidade, a taxonomia, e ainda ampliamos a gama de hospedeiros de anellovírus conhecidos. Por fim, identificamos e caracterizamos uma nova espécie de *Orthohepevirus* de roedores *Sigmodontinae*, nomeada "Orthohepevirus E". Acreditamos que estamos a fornecer relevantes informações sobre genômica, epidemiologia molecular, evolução e taxonomia de 45 arbovírus americanos, bem como sobre 13 novas espécies virais encontradas em pequenos mamíferos. Tais informações deverão dar subsídios para múltiplos futuros estudos visando compreender a importância destes novos vírus e a desenvolver métodos diagnósticos.

Palavras-chave: Zoonoses virais, metagenômica viral, genômica, evolução, *Bunyavirales*, *Vesiculovirus* e Arbovírus.

ABSTRACT

SOUZA WM. Genomic and evolutionary characterization of zoonotic viruses in the Americas (Thesis). Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2017.

In last years, high-throughput sequencing (HTS) has been cost-effective and increasingly used for prospection and identification of viruses. These methods are extremely more sensitive than other molecular methods and are capable of sequencing viral genomes without prior knowledge, cloning or isolation. In this study, we used HTS approach to identify and characterize complete genomes of arbovirus isolated in the Americas, as well as viral prospection in samples of small mammals from São Paulo State, Brazil. Thus, we sequenced and characterized 44 viruses from *Bunyavirales* order, including 35 in *Orthobunyavirus* genus, family *Peribunyaviridae*, eight in *Phlebovirus* genus, family *Phenuiviridae*, and one in *Orthonairovirus* genus, family *Nairoviridae*. Among the *Bunyavirales* we identified a novel putative strategy for encoding the non-structural protein of the small segment, as well as we identified seven viruses that are natural reassortants. Also, we characterized the complete genome of the Pirý vesiculovirus, determining its phylogenetic relationship with arboviruses belonging to the *Vesiculovirus* genus, family *Rhabdoviridae*. On the other hand, we have prospected novel viruses, which included in three families, *Parvoviridae*, *Anelloviridae*, and *Hepeviridae*. In the *Parvoviridae* family, we identified 20 endogenous and exogenous chapparvoviruses from a broad diversity of vertebrate and invertebrate hosts, representing a new subfamily, the *Chapparvovirinae*. Also, we have described eleven new species of *Anelloviridae* in wild rodents and marsupials, providing important information on diversity, taxonomy and even broadening the range of known anelloviruses hosts. Finally, we identified and characterized a novel species of orthohepevirus in *Sigmodontinae* rodent, named "Orthohepevirus E". We believe that we are providing relevant information on genomics, molecular epidemiology, evolution and taxonomy of 45 American arboviruses, as well as on 13 new viral species found in small mammals. Thus, these informations should provide support for multiple future studies to understand the importance of these new viruses, as well as to develop diagnostic methods.

Keywords: Zoonotic viruses, viral metagenomic, genomic, evolution, *Bunyavirales*, *Vesiculovirus* and *Arbovirus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fatores envolvidos para o surgimento de zoonoses virais.	21
Figura 2. Linha do tempo da emergência de algumas zoonoses virais e seus impactos na humanidade.....	22
Figura 3. Etapas para a quebra da barreira da espécie de hospedeiro pelo vírus “ <i>viral spillover</i> ”	23
Figure 4. Exemplos de ciclos mantenedores de arbovírus.....	25
Figure 5. Distribuição dos mosquitos <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> no mundo.....	27
Figure 6. Laboratório de Virologia de Belém.....	29
Figure 7. Métodos para identificação de vírus.....	30
Figure 8. Comparação entre o sequenciamento de pelo método Sanger e o sequenciamento de alto desempenho	32
Figure 9. Linha do tempo com o desenvolvimento de métodos de sequenciamento de alto desempenho, e suas capacidades de sequenciamento.....	33
Figure 10. Critérios para classificação viral propostos pelo ICTV	36
Figure 11. Pontos de coleta ou captura de animais silvestres no estado de São Paulo.	40
Figura 12. MetaVIC, uma nova <i>pipeline</i>	47
Figura 13. Gráfico interativo para a visualização de resultados gerados pelo programa Krona	47
Figura 14. Fluxo de etapas com a ferramenta DIGS.	50
Figura 15. Genomas representativos dos 35 orthobunyavírus sequenciados.	52
Figura 16. Árvore de máxima verossimilhança do gênero <i>Orthobunyavirus</i>	53
Figura 17. Distância evolutiva em aminoácidos entre os grupos do gênero <i>Orthobunyavirus</i>	54
Figura 18. Eventos de <i>reassortments</i> naturais no gênero <i>Orthobunyavirus</i>	55
Figura 19. Genomas dos phlebovírus sequenciados.....	56
Figura 20. Árvore de máxima verossimilhança do gênero <i>Phlebovirus</i>	58
Figura 21. Distância evolutiva em aminoácidos entre os grupos do gênero <i>Phlebovirus</i>	58
Figura 22. Evento de <i>reassortment</i> natural encontrado no gênero <i>Phlebovirus</i>	59
Figura 23. Organização genômica do orthonairovírus Estero Real.....	60
Figura 24. Árvore de máxima verossimilhança do gênero <i>Orthonairovirus</i>	60
Figura 25. Organização genômica do vesiculovírus Piry.....	61
Figura 26. Árvore de máxima verossimilhança baseado nas sequências completas dos genomas completos dos <i>Vesiculovirus</i>	62
Figura 27. Organização genômica dos chapparvovírus identificados neste estudo.	64
Figura 28. Árvore de máxima verossimilhança mostrando relacionamento dos chapparvovírus com a família <i>Parvoviridae</i>	65
Figure 29. Organização genômica dos anellovírus identificados neste estudo.	67
Figure 30. Árvore de máxima verossimilhança mostrando o relacionamento dos anellovírus descritos na família <i>Anelloviridae</i>	69
Figure 31. Análise de <i>p-distance</i> dos membros da família <i>Anelloviridae</i>	70
Figure 32. Frequência e diversidade dos anellovírus identificados neste estudo.	72
Figure 34. Análise de <i>p-distance</i> dos orthohepevírus descritos entre a família <i>Hepeviridae</i> ..	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais métodos de HTS.....	34
Tabela 2. Vírus utilizados neste estudo.	38
Tabela 3. Amostras de roedores e marsupiais coletadas no estado de São Paulo.	41
Tabela 4. Amostras de morcegos coletadas no estado de São Paulo.....	42
Tabela 5. Chapparvovírus identificados neste estudo.....	63
Tabela 6. Anellovírus identificados neste estudo.	66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. VÍRUS ZOONÓTICOS	21
1.2. ARBOVÍRUS	24
1.3. A ERA CLÁSSICA E MOLECULAR DA IDENTIFICAÇÃO DOS VÍRUS	29
1.4. REVOLUÇÃO GENÔMICA: DO DNA AOS MÉTODOS DE SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO	31
1.5. SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO APLICADO À VIROLOGIA	35
2. OBJETIVOS	37
2.1. OBJETIVO GERAL	37
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1. VÍRUS ISOLADOS	38
3.1.1. Propagação dos vírus em células C6/36	39
3.1.2. Propagação dos vírus em células Vero	40
3.2. AMOSTRAS BIOLÓGICAS PROVENIENTES DE ANIMAIS SILVESTRES	40
3.2.1. Roedores e marsupiais capturados no estado de São Paulo	41
Legenda: “N” número de animais por lote.	42
3.2.2. Morcegos capturados no estado de São Paulo	42
3.3. PROCESSAMENTOS DAS AMOSTRAS	43
3.3.1. Preparação dos lotes	43
3.3.2. Ultracentrifugação	43
3.3.3. Tratamento enzimático	43
3.3.4. Extração dos ácidos nucleicos e quantificação do material genético	43
3.4. SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO	44
3.4.1. Reação de transcriptase reversa e preparação das amostras	44
3.4.2. Preparo das bibliotecas para sequenciamento na plataforma <i>Ion Torrent</i>	44
3.4.3. Sequenciamento nucleotídico de alto desempenho com a plataforma <i>Ion Personal Genome Machine</i>	44
3.4.4. Preparo das bibliotecas para o sequenciamento na plataforma <i>Illumina</i>	45
3.4.5. Sequenciamento nucleotídico de alto desempenho com a plataforma <i>Illumina</i>	45
3.5. ANÁLISES POR BIOINFORMÁTICA	46
3.5.1. Montagens dos genomas sequenciados com a plataforma <i>Ion Torrent</i>	46
3.5.2. MetaVIC: <i>Pipeline</i> para metagenômica viral em amostras de hospedeiros desconhecidos	46
3.5.3. Anotação gênica	48
3.5.4. Análises filogenéticas	48
3.5.5. Database-integrated genome-screening (DIGS)	49
3.6. RT-PCR PARA DETECÇÃO ESPECÍFICA DO VÍRUS DA HEPATITE E	50
4. RESULTADOS	51

4.1.GENOMAS DE VÍRUS ISOLADOS NAS AMÉRICAS.....	51
4.1.1. Gênero <i>Orthobunyavirus</i> (família <i>Peribunyaviridae</i>)	51
4.1.2. Gênero <i>Phlebovirus</i> (família <i>Phenuiviridae</i>).....	55
4.1.3. <i>Orthonairovirus</i> Estero Real (família <i>Nairoviridae</i>).....	59
4.1.4. <i>Vesiculovirus</i> Piry (família <i>Rhabdoviridae</i>).....	61
4.2.PROSPECÇÃO DE NOVOS VÍRUS NO BRASIL	62
4.2.1. <i>Chapparvovirus</i> (família <i>Parvoviridae</i>)	62
4.2.2. Família <i>Anelloviridae</i>	66
4.2.3. Família <i>Hepeviridae</i>	72
5. DISCUSSÃO	74
5.1.GENOMAS DE VÍRUS ISOLADOS NAS AMÉRICAS.....	74
5.1.1. Gênero <i>Orthobunyavirus</i> (família <i>Peribunyaviridae</i>)	74
5.1.2. Gênero <i>Phlebovirus</i> (família <i>Phenuiviridae</i>).....	78
5.1.3. Gênero <i>Orthonairovirus</i> (família <i>Nairoviridae</i>)	79
5.1.4. <i>Vesiculovirus</i> Piry (família <i>Rhabdoviridae</i>).....	80
5.2. PROSPECÇÃO DE NOVOS VÍRUS NO BRASIL	81
5.2.1. <i>Chapparvovirus</i> (família <i>Parvoviridae</i>)	81
5.2.2. Família <i>Anelloviridae</i>	82
5.2.3. Família <i>Hepeviridae</i>	85
6. CONCLUSÕES.....	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

1. INTRODUÇÃO

1.1 VÍRUS ZOONÓTICOS

As zoonoses, doenças transmitidas entre animais e os seres humanos, têm grande importância na saúde pública mundial, sendo responsáveis por 75% das doenças infecciosas emergentes no mundo (1, 2). Dentre as zoonoses, destacam-se as infecções de etiologia viral que acompanham a humanidade há longo tempo, como a raiva (vírus da família *Rhabdoviridae*) (2), cujos primeiros relatos datam de 2200 a.C., em Eshnunna na antiga Mesopotâmia, atualmente parte do Iraque (3). As zoonoses virais surgem por uma série de processos envolvendo desde dinâmicas ecológicas, até fatores microbiológicos, como exemplificado a seguir (**Figura 1**).

Figura 1. Fatores envolvidos para o surgimento de zoonoses virais. (4)

As zoonoses virais possuem complexos ciclos de transmissão baseados em três principais mecanismos. A zoonose direta, como o próprio nome diz, é transmitida diretamente de animais vertebrados para humanos através de mordidas, como é o caso do vírus da raiva, ou através do ar, como ocorre com os vírus Influenza (família *Orthomyxoviridae*) (4). Outra forma, são os vírus transmitidos aos seres humanos e a outros mamíferos pela picada de uma espécie animal intermediária, referida como vetor (esta transmissão será detalhada na secção 1.2. Arbovírus) (5). Por último, vírus humanos poderiam infectar outros animais, o que

conceitualmente denomina-se zoonose reversa. Este é o caso do vírus Torque Teno de suínos da família *Anelloviridae* (6).

Ao longo do século passado, a humanidade testemunhou o surgimento de muitas zoonoses virais que resultaram em epidemias e pandemias com milhões de mortes. Os vírus Influenza, que são originários de aves, tiveram sua primeira grande epidemia registrada de 1918 a 1919, e ficou conhecida como a pandêmica “Gripe espanhola”, que infectou cerca de um terço da população mundial, e teria causado de 50 a 100 milhões de óbitos (7). No último meio século, novos vírus zoonóticos têm emergido, como os hantavírus (família *Hantaviridae*) na Ásia e Américas, os vírus Ebola (família *Filoviridae*) e HIV (vírus da imunodeficiência humana, da família *Retroviridae*) na África, bem como vários outros subtipos do vírus Influenza e os vírus da família *Coronaviridae*, causadores de síndromes respiratórias como a SARS (Síndrome Respiratória Aguda Grave) e o MERS (Síndrome Respiratória do Oriente Médio) (4, 8). Estes exemplos ressaltam a importância de compreendermos os fatores que influenciam a emergência e disseminação destes vírus, especialmente pelo grande impacto na mortalidade mundial (**Figura 2**). Outras zoonoses virais negligenciadas têm causado grande impacto na saúde pública em diversos países, como as causadas pelo vírus da Hepatite E (família *Hepeviridae*), causa mais comum de hepatite aguda esporádica e insuficiência hepática fulminante em seres humanos no mundo, com letalidade de 0,5 a 3% em adultos, e elevadas taxas (15 a 25%) entre gestantes (9, 10).

Figura 2. Linha do tempo da emergência de algumas zoonoses virais e seus impactos na humanidade. (8)

As zoonoses virais causam pouco ou nenhum sinal de doença em seus hospedeiros naturais, como aves selvagens, roedores, morcegos, primatas entre outros. Porém, quando ocorre o “*viral spillover*”, ou seja, a quebra de barreira da espécie hospedeira do vírus, outros hospedeiros podem apresentar manifestações clínicas que caracterizem doenças graves. Este fenômeno é constituído por complexas etapas que incluem a distribuição e densidade do hospedeiro viral em uma determinada região geográfica, a prevalência e intensidade da infecção no hospedeiro primário, assim como a capacidade do hospedeiro primário transmitir o patógeno aos hospedeiros secundários de modo eficiente até que a exposição do patógeno chegue aos humanos, geralmente o hospedeiro final. Na infecção humana, para um efetivo “*viral spillover*”, o patógeno precisa ser infectivo e capaz de superar as defesas imunológicas humanas, resultando em sua efetiva replicação e disseminação (**Figura 3**). Exemplo deste fato, ocorreu com porcos infectados com o vírus da Influenza aviária, e com cavalos infectados pelo vírus Hendra da família *Paramyxoviridae* (11, 12). Seres humanos ao se infectarem com estes vírus zoonóticos, podem apresentar doença grave com altas taxas de mortalidade, como nas infecções pelos vírus Influenza H5N1 e H7N9, vírus Hendra, e os coronavírus da SARS e MERS (8, 11, 13, 14).

Figura 3. Etapas para a quebra da barreira da espécie de hospedeiro pelo vírus “*viral spillover*”. (4)

É importante ressaltar que zoonoses virais ainda desconhecidas, com potencial de transmissão eficiente entre humanos, podem surgir a qualquer momento, inclusive como ameaça de uma pandemia global. Surgiram desta forma, por exemplo, a SARS que ocorreu em 2003 e 2004, envolvendo transmissão do vírus de morcegos para civetas (*Paradoxurus hermaphroditus*), e posteriormente para humanos (15). Este vírus ceifou mais de 800 vidas humanas e custou à economia global mais de US\$ 80 bilhões (16). Do mesmo modo, outro membro da família *Coronaviridae* originário de morcegos, emergiu no Oriente Médio em 2012 causando a MERS em cerca de 2.000 indivíduos, com letalidade de 35%. Existe uma grande preocupação de que este vírus possa vir a causar uma pandemia mundial (14). Também, novos subtipos do vírus Influenza têm emergido nos últimos anos, entre eles o H5N1 que é altamente patogênico, responsável por dizimar a produção de aves na Ásia, e causar a morte de mais de 350 seres humanos desde 2003. Este vírus continua a ocorrer em surtos regulares na Ásia (8, 13).

Em 2014, o mundo foi surpreendido pela reemergência do vírus Ebola (família *Filoviridae*) em diversos países da costa da África ocidental (Serra Leoa, Libéria, Senegal, Gâmbia, Mali, Guiné e Nigéria), causando o maior surto já registrado, com mais de 28 mil casos suspeitos, sendo 15.261 confirmados, com 11.325 mortes (17). Em resposta, para controlar o surto, foram investidos cerca de US\$ 3,6 bilhões até dezembro de 2015. Apesar disso, o surto de Ebola resultou na perda de US\$ 2,2 bilhões nos três principais países atingidos: Serra Leoa, Libéria e Guiné (18), além de menos investimento e uma perda substancial no crescimento do setor privado destes países, diminuindo a produção agrícola, o que levou a preocupações com a segurança alimentar, e uma diminuição no comércio transfronteiriço, uma vez que as restrições de transporte, bens e serviços aumentaram durante a epidemia (18).

Considerando-se a grande importância das zoonoses virais, a criação de fundos e recursos com o objetivo de caracterizar, monitorar e desenvolver novos métodos diagnósticos, além de antivirais e vacinas, é essencial para prevenção e controle de prováveis vírus zoonóticos emergentes e reemergentes.

1.2. ARBOVÍRUS

Dentre os vírus zoonóticos emergentes, reemergentes ou negligenciados com grande preocupação na saúde pública mundial, destacam-se os transmitidos por artrópodes, conhecidos como arbovírus (*arthropod borne virus*) (1, 19, 20). Os arbovírus são causadores de importantes doenças infecciosas, principalmente em regiões tropicais e subtropicais do

mundo (5, 21), e são classificados nas famílias *Asfarviridae*, *Arenaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Flaviviridae*, *Nairoviridae*, *Peribunyaviridae* e *Phenuiviridae* (22). São transmitidos por artrópodes hematófagos, essencialmente mosquitos, moscas e carrapatos classificados em cinco ordens: *Anoplura*, *Diptera*, *Ixodida*, *Hemiptera*, e *Siphonaptera*, que têm em comum o fato de se alimentarem do sangue de vertebrados. A manutenção na natureza destes vírus pode ocorrer em complexos ciclos (**Figura 4**), mas sempre se deve considerar três componentes principais: vírus, vetores e vertebrados, como aves, répteis e mamíferos, incluindo humanos (23).

Figure 4. Exemplos de ciclos mantenedores de arbovírus. (24)

A emergência dos arbovírus está associada a fatores como mudanças ecológicas, ambientais, climáticas, ou aumento populacional de vetores, que propiciam o deslocamento geográfico destes vírus (19, 25). Também vale destacar o impacto da migração ou a invasão pelo homem de nichos ecológicos onde determinadas zoonoses são mantidas na natureza, propiciando que estes vírus se tornem patógenos humanos (19). Este é o exemplo dos vírus do dengue, que atualmente dispensam o ciclo silvestre, mantidos por mosquitos antropofílicos no ambiente urbano (**Figura 4**) (21).

A importância das infecções por arbovírus fica evidente com o crescente aumento no número de casos diagnosticados e o consequente impacto na saúde pública global. Muitos

arbovírus são emergentes, como o novo phlebovírus (família *Phenuviridae*) identificado na China em 2011, responsável por causar a SFTS (Síndrome grave de febre com trombocitopenia). Esta doença humana com taxas de mortalidade de 12 a 30%, tem como provável vetor, carrapatos da espécie *Haemaphysalis longicornis* (26). Em 2012, foi descrito no estado do Missouri, nos EUA, outro vírus transmitido por carrapatos da espécie *Amblyomma americanum*, que também causa uma doença humana grave, semelhante à SFTS (27). Ressaltamos aqui a ampla distribuição de carrapatos pelo mundo, com cerca de 40 espécies virais associadas a graves doenças humanas, que podem ser transmitidas por estes vetores. Destacam-se dentre elas, as causadoras de encefalites e doenças febris agudas em humanos, como o Tick-Borne Encephalitis (família *Flaviviridae*) e o Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (família *Nairoviridae*) na Ásia, África e Europa. Muitos destes vírus transmitidos por carrapatos são responsáveis também por importantes doenças veterinárias, como o African Swine Fever (família *Reoviridae*) e a Nairobi infectious diseases (família *Nairoviridae*), ambos no continente africano (22). Embora estes vírus resultem em doenças graves e importantes para a saúde pública e veterinária, para muitos deles não estão disponíveis testes diagnósticos comerciais específicos, tratamentos, ou vacinas que minimizem a gravidade das manifestações clínicas ou previnam eficientemente as infecções.

A distribuição geográfica dos arbovírus com possibilidades reais de transmissão aos seres humanos é bastante ampla, uma vez que os mosquitos vetores, principalmente dos gêneros *Culex*, *Aedes* e *Anopheles*, ocupam praticamente todos os ecossistemas terrestres, exceto as regiões árticas e antárticas (**Figura 5**).

O primeiro vírus identificado como causador de doença humana foi o da febre amarela (família *Flaviviridae*), identificado em 1900 pelo médico do exército dos EUA Walter Reed, em Cuba, que seria transmitido por mosquitos, como sugeria o cubano Carlos Finlay desde 1881 (28, 29). Descrevia-se assim, o primeiro arbovírus. Apesar do pioneirismo de Max Theiler e colaboradores em 1930 nos estudos com o vírus da febre amarela, que incluiu o desenvolvimento de uma vacina segura e eficiente (vacina 17D) a partir da atenuação do vírus após múltiplas passagens em ovo embrionário de galinha (30), este vírus continua causando milhares de mortes anualmente. Só em 2013 cerca de 127 mil casos e 45 mil óbitos foram descritos, sendo sua quase totalidade (90%) na África (31), devido principalmente a programas de vacinação irregulares, que fazem com que este vírus ainda seja um grave problema de saúde pública neste continente. No Brasil, apesar da gratuidade da vacina, entre dezembro de 2016 a abril de 2017 foram registrados mais de 2.200 casos suspeitos de febre amarela e 202 mortes, o maior número de casos em mais de 40 anos (32).

Os últimos 25 anos do século XX foram marcados por uma dramática expansão de outros *Flaviviridae* como os vírus do Dengue, que tiveram suas primeiras grandes epidemias descritas no sudeste asiático com casos graves e fatais da doença (33). Acredita-se que este vírus tenha se disseminado por praticamente todas as regiões tropicais e subtropicais devido à urbanização não planejada em países em desenvolvimento, transporte moderno, falta de controle eficaz dos mosquitos, globalização, introdução e adaptação dos principais vetores (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*) em novas áreas geográficas (**Figura 5**) (34). Neste século, os vírus do Dengue tornaram-se os causadores de doenças infecciosas com o maior número de casos em regiões tropicais e subtropicais. Todos os anos, estima-se que ocorra de 50 a 100 milhões de infecções, e aproximadamente de 20 a 25 mil mortes (35). Considerando-se o grande impacto do Dengue na saúde pública global, esforços para produzir uma vacina eficiente, começam a tornar-se realidade. Ressaltamos a Dengvaxia desenvolvida pela companhia farmacêutica Safoni, já em uso no Brasil e a “vacina TV003”, oriunda da colaboração entre *U.S. National Institute of Allergy and Infectious Diseases* e o Instituto Butantan (São Paulo, Brasil), que esta sendo testada em vários países endêmicos (36, 37).

Figure 5. Distribuição dos mosquitos *Aedes aegypti* (A) e *Aedes albopictus* (B) no mundo. (38)

Outro flavivírus que se tornou pandêmico recentemente é o vírus Zika. Este vírus foi isolado pela primeira vez em abril de 1947 do sangue de macacos *Rhesus macaque*, colocados como sentinelas na floresta Zika, em Uganda (39). No entanto, apenas em 1954 que o vírus Zika foi associado a uma doença humana, e após cinco décadas sem descrição de novos casos, foram confirmados 13 infecções humanas na África e sudeste asiático (40). Em abril de 2007, o vírus Zika iniciou sua dispersão para novas regiões geográficas, sendo descritos 49 casos de doença febril aguda na ilha de Yap, na Micronésia (41). De 2013 a início de 2014, o vírus Zika já infectou 11% da população na Polinésia Francesa, e 1.385 pessoas na Nova Caledônia, Ilha de Páscoa e Ilhas Cook. Além da doença febril aguda alguns pacientes apresentaram a síndrome de Guillain-Barré (42). No começo de 2015, o vírus Zika foi identificado no Brasil, provavelmente introduzido durante a Copa das Confederações em 2013, causando uma grande epidemia no país (43). Além de causar doença febril aguda e síndrome de Guillain-Barré, o vírus Zika também foi associado a doenças neurológicas em fetos de grávidas infectadas (44). Até abril de 2017, o Brasil registrou mais de 180 mil casos de febre do Zika e cerca de 13 mil casos suspeitos de microcefalia. O vírus Zika continua sua dispersão pelo mundo, já tendo sido descrito em mais de 40 países nas Américas (45-47). Em março de 2017, uma vacina de DNA contra Zika foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (EUA) para ensaios clínicos (48).

O vírus Chikungunya da família *Togaviridae*, também de origem africana, foi isolado em 1952 na Tanzânia e responsável por surtos na África e Ásia na década de sessenta (49, 50). Após um período de relativa inatividade, reemergiu nestes continentes em 2005 como grande preocupação para a saúde pública mundial, causando grandes surtos, e disseminando-se pelo sul da Europa, Caribe e América do Sul. Em 2014 foram notificados no Brasil 41 casos importados e 27 infecções autóctones, confirmando a introdução deste arbovírus no país (51). Como os vírus do Dengue e Zika, o vírus Chikungunya causa doença febril aguda, mas que se distingue por causar artralgias, que podem persistir como artrites crônicas por toda a vida do paciente, produzindo grande morbidade, perda da qualidade de vida e também, grandes perdas econômicas (52).

O Brasil possui requisitos essenciais para a introdução e adaptação de diversas arboviroses, como as já mencionadas Dengue, Febre Amarela, Zika e Chikungunya, originárias do sudeste asiático ou continente africano, e transmitidas por mosquitos do gênero *Aedes* (**Figura 5**). O vasto território nacional com um terço coberto por florestas tropicais e outros ecossistemas naturais extremamente diversificados, a grande diversidade de fauna, a degradação ambiental promovida pela pecuária e agricultura, e o crescimento populacional

nas últimas décadas, propiciam contato de artrópodes hematófagos com os seres humanos (53). Provavelmente, estes fatores contribuíram para o surgimento das arboviroses: febres do vírus Oropouche (*Peribunyaviridae*) e do vírus Mayaro (*Togaviridae*), ambas de grande importância na região Amazônica (54-56).

Um marco importante na história da arbovirologia brasileira foi a criação do Laboratório de Virologia no Instituto Evandro Chagas, estado do Pará, pela Fundação Rockefeller, em 1954 (**Figura 6**). Os estudos ali realizados têm sido de grande importância na descoberta de uma ampla variedade de arbovírus. O Instituto dispõe de uma extraordinária coleção composta por mais de 10 mil cepas virais classificadas em mais de 200 espécies virais, todas identificadas por métodos de virologia clássica (57). Apesar do contínuo esforço para estudar a patogênese, ultraestrutura, biologia molecular e a evolução destes vírus, uma parte desta coleção viral permanece pouco estudada.

Figure 6. Laboratório de Virologia de Bélem. Primeiros diretores: Dr. Ottis Causey e Dr.ª Calixta Causey (esquerda). Dr.ª Amélia Paes de Andrade Travassos da Rosa e Dr. Robert Shope, realizando um teste de fixação de complemento no Laboratório de Virologia de Bélem em 1959 (direita). (57)

1.3. A ERA CLÁSSICA E MOLECULAR DA IDENTIFICAÇÃO DOS VÍRUS

A história da virologia como ciência é muito recente, no entanto, os vírus como patógenos humanos são descritos em muitas páginas da história humana. Lembramos aqui, por exemplo, o clássico desenho egípcio mostrando homem com membro atrofico sugerindo sequela de poliomielite. A virologia começa em 1886, quando Adolf Eduard Mayer demonstrou que a “doença do mosaico” do tabaco (família *Virgaviridae*) poderia ser transmitida de uma planta infectada para outra planta saudável, esfregando seu extrato líquido filtrado através de papel. Tratava-se, portanto de um patógeno filtrável (58, 59). O desenvolvimento do filtro para bactérias de Chamberland-Pasteur em 1884 (**Figura 7a**), um sistema simples, foi essencial para os estudos de Dmitri Ivanovski (1892) e posteriormente,

Martinus Beijerinck (1898), que detectou os ultramicrobios filtráveis, posteriormente denominados de vírus (59, 60).

A primeira doença animal causada por “agentes filtráveis” foi descrita em 1898 por Friedrich Loeffler como sendo a febre aftosa (família *Picornaviridae*), conhecida desde o século XVI como não causada por bactérias ou toxinas, e sim por “substâncias ultravisíveis e ultrafiltráveis” (61). Um grande avanço na virologia, foi a propagação do vírus do Sarcoma de Rous (família *Retroviridae*) em ovos embrionados de galinha descrito em 1911, permitindo pela primeira vez a replicação viral fora de um hospedeiro natural (62). Três décadas depois, foi descrito o primeiro cultivo viral em cultura de células, os vírus da caxumba (família *Paramyxoviridae*) e Influenza foram mantidos em cultura de células derivadas de embrião de galinha (63).

Figure 7. Métodos para identificação de vírus. Filtro Chamberland-Pasteur (a), immuno-cromatográfico (b), PCR em tempo real (c).

Os primeiros métodos diagnósticos virais datam de 1929, com a realização de testes de fixação do complemento (64). Outros dois importantes métodos diagnósticos também foram aplicados em virologia: a imunofluorescência, na década de cinquenta e a microscopia eletrônica, na década de trinta (65, 66). Grande parte do conhecimento sobre diagnóstico laboratorial e identificação viral que temos atualmente, baseia-se nas interações antígeno-anticorpo. O diagnóstico viral baseado nestas interações teve grande progresso a partir de 1975, quando Kohler e Milstein descreveram a produção de anticorpos monoclonais (67). Nos últimos anos, estes métodos diagnósticos evoluíram muito, desde os primeiros ELISAs (*enzyme-linked immunosorbent assay*) em meados da década de setenta, que se aprimoraram e

tornaram-se substancialmente baratos e fáceis de serem executados (**Figura 7b**), até os atuais “kits” de diagnóstico rápido, que estão disponíveis comercialmente para muitos vírus, e são amplamente utilizados na medicina humana e veterinária (68). Outro importante avanço na detecção e caracterização de vírus ocorreu com o desenvolvimento da eletroforese (69, 70), permitindo diagnosticar infecções crônicas virais, como a causada pelo HIV (família *Retroviridae*) (71).

Com o surgimento dos métodos moleculares, em meados da década de setenta, houve uma revolução na virologia com mudanças substanciais na investigação virológica, uma vez que o material genético de um vírus passou a ser acessível e identificável. Tal avanço permitiu atingir especificidade e sensibilidade que ultrapassaram a até então obtida para a maioria dos testes clássicos, fornecendo informações relevantes como espécie, genótipo e subtipo dos vírus. Embora as técnicas de transferência de *Southern* e *Northern blotting* permitissem marcar sequências específicas de DNA viral (72, 73), elas eram lentas, caras e laboriosas. Suas vantagens em relação aos métodos clássicos, não foram suficientes para compensar suas desvantagens e por isso, não foram técnicas amplamente adotadas por laboratórios de diagnóstico clínico. Já a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), desenvolvida por Kary Mullis em 1983 (74), foi rapidamente difundida nas pesquisas em virologia, tendo sido primeiramente usada no diagnóstico do vírus do papiloma humano (*Papillomaviridae*) (75). A primeira PCR precedida de transcriptase reversa (RT) foi utilizada na detecção do HIV tipo 1 (76). Em 1999, surge a PCR em tempo real (**Figura 7c**) diagnosticando os vírus SV40 (*Polyomaviridae*) e da hepatite B (*Hepadnaviridae*) (77, 78).

1.4. REVOLUÇÃO GENÔMICA: DO DNA AOS MÉTODOS DE SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO

O DNA (ácido desoxirribonucleico) foi identificado e isolado por Friedrich Miescher em 1869 (79), mas permaneceu esquecido até 1944, quando Oswald Avery, Colin MacLeod e Maclyn McCarty demonstraram que o DNA purificado de uma bactéria era capaz de modificar o DNA de outra bactéria (80). Um passo fundamental para a genômica foi dado em 1953 por James Watson e Francis Crick, ao descobrirem o modelo de dupla hélice do DNA, propondo que o mesmo seria composto de duas cadeias de nucleotídeos complementares, orientadas em direções opostas (compostas por adenina “A”, citosina “C”, guanina “G” e timina “T”), enroladas em torno de si e ligadas por pontes de hidrogênio (81).

Em 1977, Frederick Sanger e colaboradores descreveram uma metodologia para determinação de sequências de DNA, posteriormente denominado método Sanger ou dideoxi (Figura 8a) (82, 83).

Figure 8. Comparação entre o sequenciamento de pelo método Sanger (a) e o sequenciamento de alto desempenho (b). (84)

Nos primeiros sequenciamentos genômicos com o uso desta tecnologia, faziam-se extenuantes procedimentos que consumiam de semanas a meses de trabalho, os fragmentos sequenciados eram em número pequeno e continham até mil nucleotídeos, com erro variando de 0,5 a 15%. O primeiro sequenciamento nucleotídico de um vírus de RNA já havia sido realizado em 1976 por Walter Fiers e colaboradores. Foram sequenciados os 3.569 nucleotídeos do bacteriófago MS2 da família *Leviviridae* (85). No mesmo ano, Sanger e sua equipe descreveram o primeiro genoma completo do fago Φ -X174 (família *Microviridae*), um vírus de DNA com 5.386 nucleotídeos (86). Em 1984 o genoma completo do primeiro vírus patogênico humano foi sequenciado, o vírus do Epstein-Barr (*Herpesviridae*) (87). No ano seguinte, foi a vez do sequenciamento completo do HIV, na época denominado HTLV-III

(*human T-cell leukaemia type III*) (88). O método Sanger foi praticamente o único método de sequenciamento nucleotídico utilizado até o início dos anos 2000, sendo que grande parte dos genomas virais que conhecemos hoje, resultam deste método (89-91). Além disso, o método Sanger propiciou enorme progresso nos estudos de biologia e medicina, incluindo o sequenciamento dos principais organismos modelos de estudos como *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* e o próprio genoma humano (92-95). Entretanto, métodos de sequenciamento com menores custos, maior rapidez e maior eficiência ainda estariam por vir. Novas estratégias para o sequenciamento do DNA foram desenvolvidas no início dos anos 2000, e seus resultados proporcionaram uma revolução na biologia e medicina, pela magnitude de dados gerados a um custo muito inferior aos obtidos pelo método Sanger (96, 97).

Se a virologia teve sua origem na botânica, o sequenciamento de alto desempenho (HTS, *High throughput sequencing*) originou-se na engenharia elétrica e na química. O primeiro notório método de HTS foi o pirosequenciamento, desenvolvido em meados de 2005 (97). O sistema consistia na paralelização do processamento de sequenciamento, utilizando a nanotecnologia e a metodologia de pirosequenciamento. As principais vantagens do uso desta tecnologia foram a rapidez e a facilidade técnica, por não necessitar da clonagem de fragmentos de DNA (**Figura 8b**), e por permitir a obtenção de grande volume de sequências (cerca de 100 MB) em poucas horas de trabalho (98, 99). Nos anos seguintes, diversos métodos de sequenciamento foram desenvolvidos aumentando ainda mais a capacidade de geração de sequências, e um proporcional barateamento do custo (**Figura 9 e Tabela 1**).

Figure 9. Linha do tempo com o desenvolvimento de métodos de sequenciamento de alto desempenho, e suas capacidades de sequenciamento. (99)

Tabela 1. Principais métodos de HTS. (98)

Plataforma	Tamanho da sequência (bp)	Capacidade	Dados	Tempo de corrida	Taxa de erros	Custo do equipamento (US\$)	Custo por Gb (~US\$)
Sequenciamento por ligação							
SOLiD 5500 xl	50 (SE)	160 Gb	~1.4 B	10 dias	≤0.1%, AT viés;	\$251.000	\$70
	75 (SE)	120 Gb					
	50 (SE)*	320 Gb*					
Sequenciamento por síntese: CRT							
Illumina MiSeq v2	36 (SE) 540–610 Mb		12–15 M (SE)	4h	0.1%, substituição	\$99.000	~\$1,000
	25 (PE) 750–850 Mb			5.5 h			\$996
	150 (PE) 4.5–5.1 Gb		24–30 M (PE)	24h			\$212
	250 (PE) 7.5–8.5 Gb			39 h			\$142
Illumina HiSeq2500 v4	36 (SE) 64–72 Gb		2B(SE)	29h	0.1%, substituição	\$690.000	\$150
	50 (PE) 180–200 Gb			2,5 dias			\$58
	100 (PE) 360–400 Gb		4 B (PE)	5 dias			\$45
	125 (PE) 450–500 Gb			6 dias			\$30
Illumina HiSeq3000/4000	50 (SE) 105–125 Gb		2.5 B (SE)	1–3.5 dias	0.1%, substituição	\$740,000 - \$900.000	\$50
	75 (PE) 325–375 Gb						\$31
	150 (PE) 650–750 Gb						\$22
Sequenciamento por síntese: SNA							
Ion PGM 314	200 (SE)	30–50	400,000–550,000	23h	1%, <i>indel</i>	\$49.000	\$25–3,500
	400 (SE)	60–100 Mb		3.7 h			
Ion PGM 316	200 (SE)	300–500 Mb	2–3 M	3h	1%, <i>indel</i>	\$49.000	\$700–1,000
	400 (SE)	600 Mb–1 Gb		4.9 h			
Ion PGM 318	200 (SE)	600 Mb–1 Gb	4–5.5 M	4 h	1%, <i>indel</i>	\$49.000	\$450–800
	400 (SE)	1–2 Gb		7.3 h			

Ion Proton	200 (SE)	Upto10Gb	60–80 M	2–4 h	1%, <i>indel</i>	\$224.000	\$80
<i>Sequenciamento de uma única molécula longa em tempo real</i>							
Oxford Nanopore MinION	200 Kb	Até 1.5Tb	>100.000	Até 48 horas	~12%, <i>indel</i>	\$1.000	\$750

1.5. SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO APLICADO À VIROLOGIA

Tradicionalmente, a identificação de novos vírus é dependente da capacidade de cultivá-los em sistemas de cultura de células, permitindo assim seu isolamento ou propagação, e a caracterização de suas propriedades biológicas. Entretanto, muitos vírus não são cultiváveis em sistemas celulares, como é o caso do vírus da Hepatite C (família *Flaviviridae*), que desde sua identificação em 1989, tem na propagação em cultura de células um grande desafio (100). Como os vírus não possuem o RNA ribossomal 16s ou citocromo C oxidase, que poderiam ser utilizados para avaliar diversidade, a aplicação de recentes métodos de sequenciamento tem fornecido informações importantes sobre a diversidade viral em ampla gama de amostras, permitindo assim, caracterizá-los sem propagá-los em cultura de células (101-103). Esta abordagem, denominada “Metagenômica viral”, é baseada na investigação do genoma viral em mistura de populações microbianas (104-106) e tem permitido o conhecimento de uma extraordinária e inimaginável diversidade viral, com centenas de novos vírus descritos anualmente (103, 107-110).

Muitas questões fundamentais na virologia têm sido respondidas com a metagenômica, especialmente sobre genômica, estratégias de codificação, evolução, diversidade, entre outras. Com este rápido progresso nos métodos de sequenciamento e com o grande volume de dados gerados, a bioinformática emergiu como área essencial para a realização de experimentos, análises e interpretação de dados (111). Têm sido identificados genomas de vírus completamente desconhecidos, inclusive associados às infecções humanas e veterinárias (25, 110, 112, 113). Deste modo, o sequenciamento nucleotídico de alto desempenho tem permitido uma inversão histórica no conhecimento das doenças virais, possibilitando a identificação dos vírus antes mesmo de serem observadas as doenças que estes patógenos possam vir a ocasionar (114). Além disso, o sequenciamento de alto desempenho vem sendo aplicado na identificação de vírus zoonóticos, caracterizando novos vírus que podem oferecer risco à saúde humana, mas que ainda não emergiram (19, 25, 110). Permite também a detecção de vírus que não estão sendo diagnosticados por métodos convencionais e moleculares dependentes de sequências previamente conhecidas, como, por

exemplo, a PCR. Assim foi identificado um novo pegivírus humano (família *Flaviviridae*) que coinfectava um paciente com vírus da Hepatite C (*Flaviviridae*), que morreu de sepse de origem desconhecida (115).

Na arbovirologia, a metagenômica tem provado ser uma poderosa abordagem. Em dois recentes trabalhos foram descritos mais de 2.000 vírus em invertebrados, muitos deles hematófagos, demonstrando uma diversidade e abundância viral sem precedentes (108, 116). Além de identificar vírus patogênicos, os estudos de metagenômica ajudaram a compreender uma abundância da ordem de 125 mil novos vírus, os quais são espetacularmente diversos na natureza, atuando como antagonísticos, comensais ou mutualistas (117, 118). Entretanto, a maioria destes foram descritos em ambientes aquáticos e poucos possuem a caracterização experimental como aqueles vírus que causam doenças humanas ou influenciam a economia global (118). Apenas para conceituar o grande número de vírus existentes, a biomassa de todos os vírus conhecidos foi estimada em 75 milhões de baleias azuis (aproximadamente 200 milhões de toneladas), e se colocados de ponta a ponta, o comprimento coletivo destes vírus abrangeria 65 galáxias (118, 119).

Considerando-se a grande importância dos estudos de metagenômica viral e visando uma melhor compreensão da ecologia, história evolutiva e o impacto dos vírus no mundo, o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) ratificaram a inclusão dos vírus identificados por estes novos métodos de sequenciamento na classificação taxonômica, como mostrado na **Figura 10** (118). Portanto, apesar de recentes, os novos métodos de sequenciamento provaram notória capacidade de gerar informações que enriquecem e ajudam a compreender o papel dos vírus no mundo.

Figure 10. Critérios para classificação viral propostos pelo ICTV. (118)

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Descrever e caracterizar genomas de vírus previamente isolados nas Américas, bem como prospectar vírus em amostras de morcegos (ordem *Chiroptera*), gambás (ordem *Didelphimorphia*) e roedores (ordem *Rodentia*) capturados ou coletados no Brasil.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar genomas virais e estudar a evolução de vírus pertencentes aos gêneros *Orthobunyavirus* (família *Peribunyaviridae*), *Phlebovirus* (família *Phenuiviridae*) e *Orthonairovirus* (família *Nairoviridae*) isolados nas Américas;
- ✓ Caracterizar o genoma do vesiculovírus Piry (família *Rhabdoviridae*) e estudar sua evolução;
- ✓ Prospectar e caracterizar genomas virais, e estudar a evolução dos vírus em amostras de morcegos (ordem *Chiroptera*), gambás (ordem *Didelphimorphia*) e roedores (ordem *Rodentia*) capturados no estado de São Paulo;
- ✓ Estudar a epidemiologia molecular de vírus com possível importância médica ou veterinária.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. VÍRUS ISOLADOS

Analizamos neste trabalho as sequências virais obtidas a partir de vírus isolados entre os anos de 1954 e 2012 no Brasil e em outros países da América Latina, que estão armazenados no Banco de Arbovírus do Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CPV-FMRP-USP). Além de sequências virais oriundas dos vírus fornecidos pelas equipes do Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes e da Dra. Daniele Barbosa de Almeida Medeiros (Instituto Evandro Chagas, em Ananindeua, estado do Pará), e pelas equipes do Dr. Robert Tesh e da Dr^a Patrícia Aguilar (Departamento de Patologia da Universidade do Texas, em Galveston, Estados Unidos da América)(**Tabela 2**).

Tabela 2. Vírus utilizados neste estudo.

Gênero	Vírus e cepa	Hospedeiro	Localização	Data
<i>Orthobunyavirus</i>	Enseada 76V- 25880 ¹	<i>C. epanastasis</i>	São Paulo, Brasil	1976
	Capim BeAn 8582 ¹	<i>C. philander</i>	Pará, Brasil	1958
	Gamboa BeAn 448848 ²	<i>Geotrygon montana</i>	Pará, Brasil	1985
	Gamboa AN395446 ²	<i>Columbidae (pássaro)</i>	Pará, Brasil	1986
	Gamboa BeAr 502380 ²	<i>Aedeomyia squamipennis</i>	Pará, Brasil	1986
	Gamboa BeAr 503385 ²	<i>Aedeomyia squamipennis</i>	Pará, Brasil	N/A
	Gamboa MARU10962 ³	<i>Aedeomyia squamipennis</i>	Gamboa, Panamá	1962
	Gamboa GAM131 ³	<i>Aedeomyia squamipennis</i>	Gamboa, Panamá	2012
	Alajuela 438524 ²	<i>Aedeomyia squamipennis</i>	Colon, Panamá	1987
	Alajuela 382716 ²	<i>Aedeomyia squamipennis</i>	Juan Mina, Panamá	1985
	Alajuela MARU11079 ³	<i>Aedeomyia squamipennis</i>	Gamboa, Panamá	1963
	Alajuela GAM122 ³	<i>Aedeomyia squamipennis</i>	Gamboa, Panamá	2012
	Soberania GAM130 ³	<i>Aedeomyia squamipennis</i>	Gamboa, Panamá	2012
	Soberania GAM118 ³	<i>Aedeomyia squamipennis</i>	Gamboa, Panamá	2012
	Soberania GML903023 ³	<i>Aedeomyia squamipennis</i>	Bayano, Panamá	1977
	Soberania GML435718 ³	<i>Aedeomyia squamipennis</i>	Juan Mina, Panamá	1986
	Gamboa TRVL 61469 ²	<i>Aedes</i> sp.	Paramaribo, Suriname	1964
	Pueblo Viejo 75V-2621 ²	<i>Aedeomyia squamipennis</i>	Vines, Equador	1975
	Calchaqui AG 83-1347 ²	<i>Aedeomyia squamipennis</i>	Santa Fe, Argentina	1982
	Abras 75V1183 ³	<i>Culex paracrybda</i> .	Naranjal, Equador	1974
	Babahoyo 75V2858 ³	<i>Culex ocosa</i>	Babahoyo, Equador	1975
	Patois 63A49 ³	<i>Sigmodon hispidus</i>	Almirante, Panamá	1961

	Patois-like MP1078 ³	N/A	N/A	N/A
	Shark River 64U80 ³	<i>Culex sp.</i>	Everglades National Park, EUA	1964
	Zegla BT5012 ³	<i>Sigmodon hispidus</i>	Almirante, Panamá	1961
	Apeu BeAn848 ²	<i>Cebus apella</i>	Pará, Brasil	1955
	Itaqui BeAn12797 ²	Roedor sentinela	Pará, Brasil	1959
	Nepuyo BeAn10709	Roedor sentinela	Pará, Brasil	1959
	Caraparu BeAn3994 ²	<i>Cebus apella</i>	Pará, Brasil	1956
	Madrid BT4075 ²	<i>Homo sapiens</i>	Almirante, Panamá	1961
	Murucutu BeAn974 ²	<i>Cebus apella</i>	Pará, Brasil	1955
	Oriboca BeAn17 ²	<i>Cebus apella</i>	Pará, Brasil	1954
	Marituba BeAn15 ²	<i>Cebus apella</i>	Pará, Brasil	1954
	Tacaiuma BeAn73 ¹	<i>Cebus apella</i>	Pará, Brasil	1955
	Tacaiuma BeAr617554 ²	<i>Haemagogus janthinomys</i>	Pará, Brasil	1999
<i>Phlebovirus</i>	Ambe BeAr407981 ²	<i>Phlebotominae sp.</i>	Pará, Brasil	1982
	Anhanga BeAn46852 ²	<i>Choloepus brasiliensis</i>	Pará, Brasil	1962
	Bujaru BeAn47693 ¹	<i>Proechimys guyannensis oris</i>	Pará, Brasil	1962
	Joa BeAr371637 ²	<i>Lutzomyia species</i>	Pará, Brasil	1979
	Munguba BeAr389707 ²	<i>Lutzomyia umbratilis</i>	Pará, Brasil	1980
	Tapara BeAn413570 ²	<i>Phlebotominae sp.</i>	Pará, Brasil	1983
	Uriurana BeAr479776 ²	<i>Phlebotominae sp.</i>	Pará, Brasil	1985
	Urucuri BeAn100049 ²	<i>Proechimys guyannensis</i>	Pará, Brasil	1966
<i>Orthonairovirus</i>	Estero Real ³	<i>Ornithodoros tadaridae</i>	Cuba	1980
<i>Vesiculovirus</i>	Piry BeAn 24232 ¹	<i>Philander opossum</i>	Pará, Brasil	1960

Local de armazenamento dos vírus sequenciados: ¹Centro de Pesquisa em Virologia da FMRP-USP, ²Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Pará ³Universidade do Texas, Galveston, Texas, Estados Unidos da América. N/A: sem informação disponível.

3.1.1. Propagação dos vírus em células C6/36

Os vírus armazenados no CPV-FMRP-USP foram propagados em células de *Aedes albopictus* clone C6/36, em frascos de 75 cm² (Corning Incorporated, EUA) (120). As células foram infectadas com 100 µL dos vírus citados na **Tabela 2**, e mantidas em estufa a 28°C por 1 hora para a adsorção viral. Em seguida, adicionou-se à monocamada celular meio Leibovitz-15 (L-15) (Vitrocell) contendo 2% de Soro Fetal Bovino (SFB), armazenando-a a 28°C até a observação, em microscópio, do efeito citopático (CPE), ou seja, dos danos causados à célula pela infecção viral que resultam em suas mudanças morfológicas. Em seguida, coletou-se o sobrenadante e a monocamada de células, submetendo-os a centrifugação de 1.000xg a 4°C, por 20 minutos. O sobrenadante após a centrifugação foi coletado, aliqotado em tubo de 25 mL e armazenado a -70°C.

3.1.2. Propagação dos vírus em células Vero

Os vírus oriundos do Instituto Evandro Chagas e da Universidade do Texas foram propagados em células Vero, de origem de epitélio renal de macaco da espécie *Cercopithecus aethiops* em frascos de 75 cm³ (Corning Incorporated, EUA) (121). As células foram infectadas com 200 µL de cada um dos vírus citados na **Tabela 2**, e incubadas por 1 hora, a 37°C, para promover adsorção dos vírus à monocamada celular. Em seguida foram adicionados 20 mL de meio E-MEM (Eagle - *Minimum Essential Medium*), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, e as células foram incubadas a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂, até a formação de CPE. Em seguida, o sobrenadante e monocamada de células foram submetidos a centrifugação de 1000xg, a 4°C, por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado, aliquotado em tubo de 25 mL, e armazenado a -70°C.

3.2. AMOSTRAS BIOLÓGICAS PROVENIENTES DE ANIMAIS SILVESTRES

As amostras incluídas neste estudo foram coletadas de animais silvestres capturados pela equipe do Prof. Dr. Edison Luiz Durigon, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) entre outubro de 2006 e outubro de 2010. Os roedores foram capturados na região de Ribeirão Preto, estado de São Paulo, pela equipe de campo do CPV-FMRP-USP liderada pelo Dr. Gilberto Sabino-Santos Júnior, entre 2008 e 2013 (**Figura 11**).

Figura 11. Pontos de coleta ou captura de animais silvestres no estado de São Paulo.

Todas as amostras foram coletadas seguindo as resoluções da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, e com autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade-ICMBio. As mesmas foram agrupadas em lotes constituídos do mesmo material biológico, mesma espécie animal, mesma região ou locais próximos, no mesmo período de captura ou coleta (mês ou ano), conforme descrito nas seções 3.2.1 e 3.2.2.

3.2.1. Roedores e marsupiais capturados no estado de São Paulo

Roedores e marsupiais foram coletados na área rural de quatro municípios paulistas: (i) Nazaré Paulista, entre 18 e 19 de maio de 2009; (ii) Jacupiranga, entre 28 de maio de 2007 e 29 de abril de 2008; (iii) Teodoro Sampaio, entre 15 e 19 de maio de 2008; (iv) Ribeirão Preto, entre 2008 e 2013. Resumidamente, as capturas foram feitas utilizando armadilhas dos tipos *Sherman* e *Tomahawk*, intercaladas em espaçamentos de 4 metros e organizadas em 2 linhas de 40 unidades. Como isca, utilizou-se mistura de pasta de amendoim, essência de baunilha e aveia em flocos. As armadilhas foram distribuídas no final da tarde e verificadas ao amanhecer do seguinte. Os animais capturados foram transferidos para sacos plásticos e submetidos aos procedimentos de identificação, biometria, coleta de sangue e/ou órgãos (122). As amostras de órgãos e sanguíneas foram estocadas em nitrogênio líquido sendo posteriormente transferidas e armazenadas a -70°C no Laboratório de Virologia, do Departamento de Microbiologia do ICB-USP ou no CPV-FMRP-USP. Foram incluídos neste estudo 847 amostras de roedores e marsupiais, distribuídas em 32 lotes, como apresentado na **Tabela 3**.

Tabela 3. Amostras de roedores e marsupiais coletadas no estado de São Paulo.

Lote	Animal	Espécie	Amostra	N	Local	Data
Lote 16	Marsupial	<i>Didelphis albiventris</i>	Soro	14	Teodoro Sampaio	2009
Lote 23	Roedor	<i>Akodon cursor</i>	Pulmão	4	Nazaré Paulista	19/05/09
Lote 26	Marsupial	<i>Didelphis albiventris</i>	Soro	14	Teodoro Sampaio	2009
Lote 27	Marsupial	<i>Didelphis albiventris</i>	Soro	16	Teodoro Sampaio	2009
Lote 28	Marsupial	<i>Didelphis albiventris</i>	Soro	17	Teodoro Sampaio	2009
Lote 29	Marsupial	<i>Didelphis albiventris</i>	Soro	17	Teodoro Sampaio	2009
Lote 30	Marsupial	<i>Didelphis albiventris</i>	Soro	14	Teodoro Sampaio	2009
Lote 31	Roedor	<i>Akodon cursor</i>	Soro	8	Nazaré Paulista	18/05/09
Lote 32	Roedor	<i>Akodon cursor</i>	Soro	8	Nazaré Paulista	18/05/09
Lote 33	Roedor	<i>Akodon cursor</i>	Pulmão	4	Nazaré Paulista	18/05/09
Lote 34	Roedor	<i>Akodon cursor</i>	Soro	4	Nazaré Paulista	18/05/09
Lote 35	Roedor	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Fígado	10	Vale do Ribeira	2007/2008
Lote 36	Roedor	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Soro	5	Jacupiranga	2008
Lote 37	Roedor	<i>Akodon sp</i>	Fígado	12	Teodoro Sampaio	May-08

Lote 38	Roedor	<i>Akodon sp</i>	Soro	12	Nazaré Paulista	May-08
Lote 39	Marsupial	<i>Didelphis albiventris</i>	Soro	9	Teodoro Sampaio	May-08
Lote 1B	Roedor	<i>Akodon montensis</i>	Sangue	55	Riberião Preto	2008
Lote 2B	Roedor	<i>Akodon montensis</i>	Sangue	55	Riberião Preto	2008
Lote 3B	Roedor	<i>Akodon montensis</i>	Sangue	41	Riberião Preto	2009
Lote 4B	Roedor	<i>Akodon montensis</i>	Sangue	48	Riberião Preto	2012-2013
Lote 5B	Roedor	<i>Calomys tener</i>	Sangue	38	Riberião Preto	2008
Lote 6B	Roedor	<i>Calomys tener</i>	Sangue	37	Riberião Preto	2008
Lote 7B	Roedor	<i>Calomys tener</i>	Sangue	34	Riberião Preto	2009, 2012-2013
Lote 8B	Roedor	<i>Necomys lasiurus</i>	Sangue	59	Riberião Preto	2008
Lote 9B	Roedor	<i>Necomys lasiurus</i>	Sangue	59	Riberião Preto	2008
Lote 10B	Roedor	<i>Necomys lasiurus</i>	Sangue	58	Riberião Preto	2008
Lote 11B	Roedor	<i>Necomys lasiurus</i>	Sangue	52	Riberião Preto	2009
Lote 12B	Roedor	<i>Necomys lasiurus</i>	Sangue	24	Riberião Preto	2012-2013
Lote 13B	Roedor	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Sangue	43	Riberião Preto	2008-2009
Lote 14B	Roedor	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Sangue	20	Riberião Preto	2012-2013
Lote 15B	Marsupial	<i>Didelphis albiventris</i>	Sangue	32	Riberião Preto	2012-2013
Lote 16B	Roedor	<i>Mus musculus</i>	Sangue	24	Riberião Preto	2008-2009

Legenda: “N” número de animais por lote.

3.2.2. Morcegos capturados no estado de São Paulo

Morcegos foram coletados no dia 23 de junho de 2010 em área rural do município de Araçatuba, estado de São Paulo. As capturas foram realizadas com redes de neblina com 12 metros de comprimento por 4 metros de altura, abertas ao final da tarde e recolhidas 6 horas depois. Os animais capturados foram transferidos para sacos plásticos e procedeu-se à identificação por critérios morfológicos (123), biometria, eutanásia e coleta de órgãos. Os órgãos foram armazenadas em nitrogênio líquido no campo e posteriormente, a -70°C, no Laboratório de Virologia, do Departamento de Microbiologia do ICB-USP. Neste estudo foram incluídos 72 amostras de órgãos, distribuídas em 8 lotes, como apresentado na **Tabela 4**.

Tabela 4. Amostras de morcegos coletadas em Araçatuba, no estado de São Paulo.

Lote	Espécie	Amostra	N	Local	Data
Lote 17	<i>Artibeus lituratus</i>	Fígado	6	Araçatuba	23/06/10
Lote 18	<i>Carollia perspicillata</i>	Fígado	18	Araçatuba	23/06/10
Lote 19	<i>Carollia perspicillata</i>	Rim	18	Araçatuba	23/06/10
Lote 20	<i>Glossophaga soricina</i>	Fígado	3	Araçatuba	23/06/10
Lote 21	<i>Glossophaga soricina</i>	Rim	3	Araçatuba	23/06/10
Lote 22	<i>Molossus rufus</i>	Fígado	8	Araçatuba	23/06/10
Lote 24	<i>Desmodus rotundus</i>	Fígado	8	Araçatuba	23/06/10
Lote 25	<i>Desmodus rotundus</i>	Rim	8	Araçatuba	23/06/10

Legenda: “N” número de animais por lote.

3.3. PROCESSAMENTOS DAS AMOSTRAS

3.3.1. Preparação dos lotes

As amostras de órgãos (Rim, Fígado e Pulmão) foram pesadas e homogeneizadas individualmente com 2 mL de solução de Hanks (Gibco, EUA) no TissueLyser II (Qiagen, Alemanha). Os homogeneizados foram centrifugados a 15.000xg, por 15 minutos, a 4°C e em seguida, os sobrenadantes dos homogeneizados, bem como outras amostras líquidas (sangue e soro), foram agrupados em lotes, respeitando os critérios apresentados na seção 3.1. Ao final, todos os lotes foram filtrados em membranas de 0,22 µm (Millipore, EUA) para remoção de células eucarióticas e bactérias, transferidos para novos tubos, e armazenados a -70°C.

3.3.2. Ultracentrifugação

Todas as amostras, soluções virais e lotes provenientes de animais silvestres, foram submetidas a ultracentrifugação para concentração do material genético. Os estoques virais no CPV-FMRP-USP foram precipitados com polietilenoglicol (PEG) 8000 (Sigma-Aldrich, EUA). Para isso, uma mistura contendo 8,57 mL de uma solução de PEG 8000 a 40% e 2,59 mL de solução NaCl a 30%, adicionada a 20 mL da solução contendo células infectadas, foi mantida sob agitação, *overnight*, a 4°C. Em seguida, esta mistura foi centrifugada a 14.000xg por 1 hora, a 4°C; o sobrenadante foi descartado e os precipitados foram ressuspensos em 1 mL de solução de Hanks (GIBCO, EUA). As soluções virais e os lotes de amostras de animais silvestres foram aplicados sobre um *cushion* de sacarose a 30%, e ultracentrifugados a 180.000xg, por 3 horas, a 4°C. Finalmente, o precipitado foi eluído em 600 µL de solução de Hanks e aliquoteado em triplicatas de 200 µL.

3.3.3. Tratamento enzimático

Para a remoção do DNA e/ou RNA não encapsidado, 200 µL das amostras ultracentrifugadas foram tratados com 20 U de DNase Turbo (Ambion, EUA), 0,1 mg/mL de RNase A (Invitrogen, EUA) e 25 U de Benzonase (Sigma-Aldrich, EUA), e incubados a 37°C, por 2 horas. Posteriormente, a DNase foi inativada com 10 µL de *DNA Inactivation* (Ambion, EUA) e as misturas foram transferidas para um novo tubo, conforme descrito pelo fabricante.

3.3.4. Extração dos ácidos nucleicos e quantificação do material genético

O RNA amostral foi extraído com *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. O extrato de RNA foi eluído em 60 µL de solução

tampão de eluição livre de RNase. Todas as amostras foram quantificadas pelo *Qubit® Fluorometric Quantitation* (Invitrogen, EUA) no *Agilent 2100 Bioanalyzer*.

3.4. SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO

O sequenciamento genômico dos extratos de RNA oriundos de isolados virais do CPV-FMRP, bem como das amostras de animais, foi realizado no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), na Universidade de Campinas (UNICAMP). As amostras do Instituto Evandro Chagas e da Universidade do Texas, foram sequenciadas nestes respectivos locais.

3.4.1. Reação de transcriptase reversa e preparação das amostras

Os extratos de RNA foram submetidos à transcrição reversa com *primers* randômicos e a enzima *SuperScript II* (Invitrogen, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Os produtos da reação foram purificados com esferas magnéticas *Agencourt AMPure XP Reagent* (Beckman Coulter, EUA), para a remoção dos reagentes utilizados na reação de síntese e obtenção das fitas de cDNA exclusivamente; e eluídos em Tris-HCl (pH 7,5).

3.4.2. Preparo das bibliotecas para sequenciamento na plataforma *Ion Torrent*

As bibliotecas para sequenciamento na plataforma *Ion Torrent* foram preparadas no *AB Library Builder™ System*. O tamanho da biblioteca foi selecionado em gel de agarose a 1%, para a remoção dos fragmentos menores que 100 nucleotídeos, utilizando o *kit E-gel size selection* (Invitrogen, EUA) segundo especificações do fabricante. Para a amplificação das bibliotecas de RNAs, a PCR em emulsão no *Ion One Touch™ 2 System™* (Life Technologies, EUA) foi realizada com o *kit Ion PGM™ Template OT2 200* (Life Technologies, EUA). Na fase aquosa o equipamento forma uma emulsão em óleo, onde realiza a termociclagens seguindo os princípios de uma PCR, ocorrendo assim a amplificação clonal dos fragmentos. Em seguida, as amostras foram enriquecidas em esferas de captura com estreptavidina e separadas magneticamente pelo equipamento *One Touch ES™*.

3.4.3. Sequenciamento nucleotídico de alto desempenho com a plataforma *Ion Personal Genome Machine*

O sequenciamento na plataforma *Ion Personal Genome Machine® (PGM™) System* (Life Technologies, EUA) utilizou o princípio de sequenciamento por detecção eletroquímica de síntese, que ocorre em um *chip* contendo arranjo de sensores CMOS (*Complementary*

metal-oxide semiconductor). Foram utilizados o *chip* de 318 e o *Ion PGM™ Sequencing 200 Kit v2* (Life Technologies, EUA) para otimizar os resultados, gerando fragmentos de 200 e 400 nucleotídeos, com acurácia média 99,5%, o que permitiu o sequenciamento de cerca de 1,6 GB.

3.4.4. Preparo das bibliotecas para o sequenciamento na plataforma Illumina

Para o sequenciamento na plataforma Illumina, as bibliotecas foram construídas utilizando o *kit Nextera® XT DNA Sample Preparation* (Illumina, EUA), que tem transposons modificados para fragmentar o DNA amostral e inserir em suas extremidades adaptadores únicos, chamados de sequências *index*, numa reação de PCR de 12 ciclos. A partir destas sequências *index* as bibliotecas foram sequenciadas e posteriormente quantificadas com o *kit KAPA Library Quantification* (Illumina, EUA) seguindo as especificações do produto. Para cada reação de qPCR foram utilizados 4 µL das bibliotecas diluídas 1:4.000, 12 µL do *KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix* contendo o *Primer Premix* e 4 µL de água para o volume final de 20 µL. As condições de reação foram: 95°C de denaturação por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 95°C para o anelamento dos *primers* e 30 segundos a 60°C para extensão da polimerase. Todas as qPCRs foram realizadas em duplicata, no equipamento *Applied Biosystems ViiA™ 7Dx Real-Time PCR* (Thermo Fisher, EUA).

3.4.5. Sequenciamento nucleotídico de alto desempenho com a plataforma Illumina

Após quantificação, as bibliotecas foram submetidas ao sequenciamento no equipamento HiSeq 2500 (Illumina, EUA) utilizando o *TruSeq DNA Sample Preparation*. As amostras foram depositadas com o uso do instrumento robótico *cBot* (Illumina, EUA), em uma lâmina (*flowcell*) de 8 canaletas (*lanes*) contendo em sua superfície, oligonucleotídeos complementares aos adaptadores das bibliotecas. Posteriormente, esta *flowcell* foi inserida no equipamento HiSeq2500 para a incorporação de nucleotídeos marcados por fluorescência, contendo terminadores *dideoxi* nos fragmentos ligados aos adaptadores. A cada ciclo, os nucleotídeos incorporados têm sua fluorescência excitada por uma série de *lasers*, e a consequente emissão é captada e interpretada por câmeras. Após a captura da imagem, os terminadores são clivados e o próximo ciclo de incorporação ocorre, até um total de 100 ciclos por direção de sequência. Os sequenciamentos foram feitos por leitura “*paired-end*” com sequências de 2 x 150 bp, gerando aproximadamente 300 milhões de sequências por canaleta. Os dados gerados foram analisados como descrito abaixo.

3.5. ANÁLISES POR BIOINFORMÁTICA

3.5.1. Montagens dos genomas sequenciados com a plataforma *Ion Torrent*

As sequências geradas pela plataforma *Ion Torrent* foram montadas utilizando o método *De novo* com o programa Mira v.4.0.2 (124). Após remoção das sequências de baixa qualidade (média inferior a % bases ≥ 20), os genomas foram montados com base na sobreposição das sequências geradas, obtendo confiabilidade dos resultados. Estas montagens genômicas foram comparadas com BlastX v.2.4.0+ utilizando uma base de dados de proteínas não redundantes disponíveis no NCBI (125).

3.5.2. MetaVIC: *Pipeline* para metagenômica viral em amostras de hospedeiros desconhecidos

Os dados gerados pelo sequenciamento na plataforma Illumina produzem grande volume de sequências incluindo além dos genomas virais, os genomas dos hospedeiros, de bactérias, entre outros. Considerando-se que não havia *pipeline* específica para a remoção de sequências idênticas ou similares às de hospedeiros desconhecidos, bem como aquelas desinteressantes para nosso estudo, como as de bactérias, bacteriófagos, plantas, invertebrados, e vertebrado, uma nova *pipeline*, a MetaVIC, foi desenvolvida. Deste modo, a nova *pipeline* MetaVIC, constituída de duas etapas: pré-processamento e montagem dos genomas, foi desenvolvida e utilizada neste trabalho para os estudos de metagenômica viral de amostras de animais silvestres (**Figura 12**).

3.5.2.1. MetaVIC: Pré-processamento dos reads

No pré-processamento para a montagem dos genomas, diferentes algoritmos foram utilizados para remover sequências não virais. Dentre eles (i) Trim_galore, para remover adaptadores e sequências curtas (126), (ii) PrinSeq, para remover sequências duplicadas e de baixa qualidade (126), (iii) Ribopicker, para remover sequências de RNA ribossomal (127), (iv) Trim_galore, novamente, para remover sequências curtas e normalizar os arquivos, (v) Diamond (BLAST-like), para alinhar os *reads* com todas as sequências de proteínas não redundantes disponíveis no NCBI (128), (vi) Filter_fastq, para remover *reads* alinhados com outras sequências desinteressantes ao estudo, como descrito acima, (vii) Trim_galore, para remover sequências curtas e normalizar os arquivos (**Figura 12A**). Ao final, utilizaram-se os *reads* filtrados na montagem dos genomas virais.

Figura 12. MetaVIC, uma nova *pipeline*. A) Etapa de pré-processamento. B) Etapa de montagem dos genomas virais.

3.5.2.2. MetaVIC: Montagem dos genomas virais

Resumidamente, nesta etapa da *pipeline* MetaVIC as sequências pré-processadas foram submetidas ao método *De novo* com dois algoritmos de montagem, o IBDA_UB e o Spades (129, 130), selecionados com base no melhor desempenho em testes prévios. Posteriormente, os *contigs* gerados foram combinados em *contigs* maiores com o programa GARM (131), e alinhados com o programa *Diamond* (*BLAST-like*) (**Figura 12B**). Os resultados foram visualizados em gráfico interativo gerado pelo programa Krona (132) (**Figura 13**). Posteriormente, os *contigs* foram separados manualmente a partir dos arquivos de saída dos montadores, para as análises posteriores.

Por ser uma ferramenta útil em metagenômica, especialmente para amostras de hospedeiros sem genoma completo disponível em base de dados, esta *pipeline* foi disponibilizada ao público gratuitamente em <https://github.com/sejmodha/metaViC>.

3.5.3. Anotação gênica

As sequências genômicas virais foram verificadas manualmente e analisadas com o programa Geneious 9.1.2 (Biomatters, New Zealand). Os domínios das proteínas foram preditos com os programas *InterProScan* e *Conserved Domain Database* (133), as regiões transmembrana e peptídeos sinal foram identificados com o TOPCONS webserver (134) e os sítios de glicosilação com o NetNglyc 1.0 Server. As massas moleculares de cada uma das proteínas virais foram identificadas com a ferramenta *Protein Molecular Weight Calculator* (<http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>).

3.5.4. Análises filogenéticas

3.5.4.1. Conjunto de dados, alinhamento e determinação do melhor modelo estatístico

As diferentes espécies virais identificadas foram analisadas separadamente e alinhadas a conjuntos de sequências de genomas virais das mesmas famílias virais disponibilizadas no Genbank. Cada conjunto de sequências foi submetido ao programa DAMBE 5.2.6 para a exclusão de sequências idênticas (135). Os alinhamentos foram feitos com os programas MAFFT, Muscle ou RevTrans (136-138) e editados manualmente para a remoção das regiões com sinal filogenético pobre. Posteriormente, para identificar os melhores modelos de substituição de nucleotídeos e de aminoácidos, visando as análises filogenéticas, os alinhamentos nucleotídicos e de aminoácidos foram individualmente submetidos aos programas jModelTest (139) e ProTest (140), respectivamente. Três critérios estatísticos foram implementados nestes programas para definir o melhor modelo para o conjunto de dados, incluindo o hLRT (*hierarchical likelihood ratio tests*), o AIC (*Akaike Information Criterion*) e o critério BIC (*Bayesian Information Criterion*).

3.5.4.2. Árvores filogenéticas

Para inferir a classificação taxonômica dos vírus, bem como seu processo evolutivo entre os grupos virais descritos, as árvores filogenéticas foram construídas usando o método probabilístico de Máxima Verossimilhança (do inglês *Maximum likelihood - ML*), com três algoritmos: PhyML, RaxML e IQ-TREE (141-144). Todas as análises filogenéticas foram realizadas com o melhor modelo estatístico previamente definido e os suportes estatísticos foram calculados utilizando *bootstrap* com 1000 réplicas. As árvores filogenéticas foram visualizadas e editadas com o Figtree v.1.4.2.

3.5.4.3. Análise de distância genética e predição de motifs

Para determinar a divergência genética entre os vírus identificados e seus grupos virais foi utilizado o método de *p-distance*, incluindo o modelo de substituição de “d: Transitions + Transversions” e um *bootstrap* de 1000 réplicas, no programa MEGA v.6 (145), e também com o *Sequence Demarcation Tool* (SDT) (146). *Motifs* característicos foram identificados no programa Geneious 9.1.2 com base no alinhamento aminoacídico, como previamente descrito.

3.5.4.4. Análise de reassortments

Para identificar potenciais eventos de recombinação ou *reassortments* foram observadas as topologias das árvores filogenéticas em conjunto, pelos métodos Bootscan, Geneconv, Chimerax, MaxChi e RDP no programa RDP4 (147). Para tanto, regiões codificantes completas, ou de todos os genes dos vírus segmentados, por exemplo, os membros da ordem *Bunyavirales*, foram alinhadas. Para a avaliação dos resultados considerou-se um valor de “*p*” superior a 0,05 com correção de Bonferroni para múltiplas comparações. Todas as configurações específicas do programa foram mantidas em seus valores padrões.

3.5.5. Database-integrated genome-screening (DIGS)

Para explorar genomas virais (endógenos e exógenos) depositados em base de dados públicos como o Genbank, utilizou-se a *Database-integrated genome-screening version 1.0* (DIGS), disponível em <https://github.com/giffordlabcvr/DIGS-tool> (148). Resumidamente, as sequências de vírus de interesse foram adicionadas no DIGS e em seguida, foram realizadas exaustivas comparações com o BLAST, buscando por sequências virais homólogas em genomas e transcriptomas de dados previamente publicados (**Figura 14**). Em seguida, os genomas encontrados foram refinados e classificados como previamente descrito.

Figura 14. Fluxo de etapas com a ferramenta DIGS.

3.6. RT-PCR PARA DETECÇÃO ESPECÍFICA DO VÍRUS DA HEPATITE E

Foi desenvolvido um RT-PCR para determinar a frequência de uma nova espécie de vírus da Hepatite E. Deste modo, cada amostra individual incluída nos lotes para sequenciamento (descrito na secção 3.2.1), teve seu RNA extraído e submetido à síntese de cDNA como descrito anteriormente. A reação de PCR foi realizada com 5 µL de cDNA (5-50 ng), 2,5 µL do *primers forward* GAGGGCCGGGCCTC(T/C)TTTGTT e *reverse* CAGTGGGTTTAACGAGGCGGCATA (ambos a 10 pmol/µL), 25 µL do MasterMix, e 10 µL da enzima SuperFi, totalizando 50 µL de mistura reacional. Esta reação foi submetida a uma termociclagem de 98°C por 30 segundos, e 35 ciclos de 98°C por 10 segundos, 70°C por 10 segundos e 72°C por 30 segundos, e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% e aqueles com o tamanho esperado de ~800 pb foram preparados com ExoSAP-IT® (USB, EUA) e submetidos ao sequenciamento pelo método Sanger, no equipamento *ABI 3130 Aviant automated sequencer* (Applied Biosystems, EUA). Os resultados foram visualizados e analisados com o programa Geneious 9.1.2 (Biomatters, New Zealand), e para confirmar o sequenciamento na região de interesse, as sequências foram submetidas ao BLAST e alinhadas com sequências de referências.

4. RESULTADOS

4.1. GENOMAS DE VÍRUS ISOLADOS NAS AMÉRICAS

4.1.1. Gênero *Orthobunyavirus* (família *Peribunyaviridae*)

4.1.1.1. Caracterização genômica dos *orthobunyavírus*

Os 35 *orthobunyavírus* sequenciados neste trabalho possuem genomas de RNA trisegmentado com polaridade negativa. Os segmentos L destes vírus codificam a proteína RNA polimerase dependente de RNA (RdRP), com tamanho entre 2.240 e 2.273 aminoácidos. As RdRPs possuem domínios altamente conservados, nomeados *Pre-Motif A* e *Motifs A* a *E* em posições aminoacídicas entre 951 a 1.252 (**Figura 15**). Os segmentos M codificam precursores das glicoproteínas (GPC) com 1.425 a 1.593 aminoácidos, e possuem um peptídeo sinal na região N terminal. As GPCs são clivadas nas proteínas estruturais Gn e Gc, e na proteína não estrutural NSm. A topologia das GPCs contém quatro domínios transmembrânicos (TMD) com exceção das GPCs dos vírus do grupo Gamboa (vírus Gamboa, Alajuela, Calchaqui, Pueblo Viejo e Soberania) que apresentam 7 TMDs, além de uma proteína NSm maior que as previamente descritas para o gênero *Orthobunyavirus* (**Figura 15**). Os locais de asparagina preditos para N-glicosilação nas GPCs dos *orthobunyavirus* sequenciados, variaram em número de sítios ou posições, enquanto que os segmentos S codificam uma nucleoproteína de 235 a 245 aminoácidos e alguns deles possuem uma ORF de mesma orientação, mas diferente *frame*, que codifica uma proteína não estrutural no segmento S (NSs). Interessantemente, identificamos uma potencial nova estratégia de codificação da proteína NSs nos vírus Enseada e nos membros dos grupos Patois e C, que apresentam uma potencial ORF codificadora para a proteína NSs antes da proteína N (**Figura 15**).

Figura 15. Genomas representativos dos 35 orthobunyavírus sequenciados.

4.1.1.2. Relação filogenética dos orthobunyavírus sequenciados no gênero *Orthobunyavirus*

As árvores de ML construídas com sequências completas em nucleotídeos e aminoácidos produziram o mesmo padrão de grupos, mas em diferentes topologias, indicando que os sítios de saturação não afetam adversamente as inferências filogenéticas. As ORFs dos 139 orthobunyavírus com sequências completas, permitem agrupá-los em 16 clados monofiléticos com alto suporte estatístico (**Figura 16**). Entre estes, 11 clados correspondem aos grupos previamente estabelecidos no gênero *Orthobunyavirus*, que incluem Bunyamwera, Wyeomyia, Guaroa, California Encephalitis, Bwamba, Nyando, Guama, Group C, Mapputta, Tete e Simbu. Os orthobunyavírus sequenciados neste estudo foram incluídos em cinco novos grupos, Gamboa, Patois, Capim, Enseada e Tacáuma (Anophles A) e novos vírus do Grupo C.

Figura 16. Árvore de máxima verossimilhança do gênero *Orthobunyavirus* baseadas no segmento S (esquerda), segmento M (meio) e segmento L (direita). A barra de escala indica distância evolutiva em números de substituições nucleotídicas por sítio, e os valores de *bootstrap* são indicados nos principais ramos. As árvores foram inferidas com o modelo de substituições nucleotídicas GTR+I+G4 para todos os segmentos. Os vírus e grupos caracterizados neste estudo são destacados na cor vermelha.

As análises de distâncias evolutivas das proteínas N, GPC e RdRP neste gênero viral revelam que os orthobunyavírus sequenciados possuem padrão de distância genética aminoacídica similar ao dos previamente descritos, sendo a proteína RdRP, a mais conservada no gênero *Orthobunyavirus* (Figura 17).

Figura 17. Distância evolutiva em aminoácidos entre os grupos do gênero *Orthobunyavirus*. Os vírus e grupos caracterizados neste estudo são destacados na cor vermelha.

4.1.1.3. Análise de potenciais reassortments no gênero *Orthobunyavirus*.

Combinando as inconsistências entre os ramos observados nas árvores filogenéticas com as análises obtidas a partir do programa RDP4, identificamos no gênero *Orthobunyavirus* dois novos vírus são *reassortants* naturais, um no grupo Gamboa, e outro no grupo Patois. Também foram redefinidos três eventos de *reassortment* no Grupo C (**Figura 18**).

Figura 18. Eventos de *reassortments* naturais no gênero *Orthobunyavirus*. Hipóteses dos eventos de *reassortments* (a-e), e parâmetros estatísticos destes eventos determinados pelo programa RDP4 (f).

4.1.2. Gênero *Phlebovirus* (família *Phenuiviridae*)

4.1.2.1. Caracterização genômica dos *phlebovirus*

Os oito *phlebovirus* sequenciados neste trabalho possuem genomas de RNA trisegmentado com polaridade negativa. Os segmentos L codificam uma proteína RdRP de 2.020 a 2.096 aminoácidos, com domínios altamente conservados: *Pre-Motif A*, e *Motifs A* a *E*, em posições aminoácidas entre 915 a 1.189 (**Figura 19**). Os segmentos M codificam uma GPC de 1.302 a 1.429 aminoácidos, que contém um peptídeo sinal na região N terminal. Também, as GPCs são clivadas em três proteínas: Gn e Gc (estruturais), e a NSm (não estrutural). Todos os *phlebovirus* sequenciados possuem uma NSm com sequência *upstream* da proteína Gn, sugerindo uma organização típica para alguns *phlebovirus* (família *Phenuiviridae*). A topologia das GPCs incluiu três TMDs, a primeira na região C-terminal da proteína Gn e as outras duas, nas regiões N e C-terminal da proteína Gc (**Figura 19**). Os

locais de asparagina preditos para N glicosilação da GPC variaram em número de sítios ou posições (**Figura 19**). Interessantemente, os sítios de N-glicosilação das GPCs localizaram-se na porção da poliproteína voltada para o lúmen do retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi, indicando que poderiam ser glicosilados durante a replicação viral. Por fim, todos os segmentos S dos phlebovírus são *ambisense*, ou seja, possuem duas ORFs que codificam em sentidos opostos, sendo a proteína N codificada no sentido negativo, e a proteína NSs no sentido positivo. O tamanho destas proteínas foi de 244 a 250 aminoácidos para a proteína N, e 249 a 289 aminoácidos para a NSs (**Figura 19**).

Figura 19. Genomas dos phlebovírus sequenciados.

4.1.2.2. Relação filogenética dos phlebovírus sequenciados no gênero *Phlebovirus*

As árvores de ML com sequências completas dos genes em nucleotídeos e aminoácidos produziram o mesmo padrão de grupo em diferentes topologias. As ORFs das sequências completas dos quatro genes de 85 phlebovírus, mostram-nos agrupados em 18 grupos monofiléticos com alto suporte estatístico. Entre estes, onze clados bem suportados correspondem às espécies virais já estabelecidas pelo ICTV, que incluem Bujaru, Chagres, Candiru, Frijoles, Icoaraci, Punta Toro, Rift Valley, Salehabad, Sandfly fever Naples, SFTS e

Uukuniemi. Em adição, também encontraram-se outros grupos ainda não reconhecidos pelo ICTV, como o Bhanja, Sandfly Sicilian Turkey e Karimabad (149). As análises filogenéticas revelaram que os phlebovírus sequenciados formam três grupos. Os vírus Bujaru e Munguba compõem o grupo Bujaru. Os vírus Uriurana e Taparã formam um clado único e bem estabelecido nos quatro genes, com alto suporte estatístico, constituindo o grupo Taparã. E o vírus Joá é membro do grupo Frijoles, porém, o protótipo deste grupo ainda não dispõe de genoma completo. Interessantemente, os vírus Anhangá e Urucuri apresentam distintas topologias nas árvores filogenéticas e não são agrupados (**Figura 20**).

Figura 20. Árvore de máxima verossimilhança do gênero *Phlebovirus* baseadas nas sequências aminoacídicas da proteína N (A), proteína NSs (B) proteína GPC (C) e proteína RdRP (D). A barra de escala indica distância evolutiva em números de substituições aminoacídicas por sítio, e os valores de *bootstrap* são indicados nos principais ramos. As árvores foram inferidas com o modelo de substituições aminoacídicas de LG para as proteínas GPC e RdRp, e o modelo de JTT para as proteínas N e NSs. Os vírus e grupos caracterizados neste estudo são destacados na cor vermelha.

Análises de distâncias evolutivas das proteínas N, NSs, GPC e RdRP do gênero *Phlebovirus* revelaram que os vírus transmitidos por carrapatos possuem maior divergência aminoacídica que os transmitidos por moscas e mosquitos, exceto no caso dos vírus do grupo Rift Valley fever e Sandfly Sicilian Turkey que exibem distância de proteínas NSs semelhante a dos phlebovírus transmitidos por carrapatos (**Figura 21**). No entanto, os novos phlebovírus sequenciados neste trabalho apresentam divergência aminoacídica semelhante aos phlebovírus transmitidos por moscas e mosquitos (**Figura 21**). Interessantemente, os resultados observados nas árvores de ML são similares aos observados na análise da distância evolutiva, especialmente quando os phlebovírus são comparados com base em seus vetores (**Figura 20**).

Figura 21. Distância evolutiva em aminoácidos entre os grupos do gênero *Phlebovirus*.

4.1.2.3. Análises de potenciais reassortments no gênero *Phlebovirus*.

Combinando as inconsistências entre os ramos observados nas árvores filogenéticas com as análises com RDP4, não foi observado *reassortments* nos phlebovírus sequenciados em nosso estudo. No entanto, o vírus *Medjerda Valley* foi identificado como um potencial evento uma vez que as análises sugerem que possui segmentos S e L do vírus Arbia, e o

segmento M de um vírus com origem evolutiva desconhecida, provavelmente única (**Figura 22**).

Figura 22. Evento de *reassortment* natural encontrado no gênero *Phlebovirus*. Hipóteses do evento de *reassortments* (a), e parâmetros estatísticos do evento determinados pelo programa RDP4 (b).

4.1.3. Orthonairovirus Estero Real (família *Nairoviridae*)

4.1.3.1. Caracterização genômica do orthonairovírus Estero Real

O genoma do vírus Estero Real (ERV) possui RNA trisegmentado com polaridade negativa. O segmento L, com 11.816 nucleotídeos, codifica uma proteína RdRp de 3.925 aminoácidos com domínios conservados de polimerase, nomeados *Pre-Motif A* e *Motifs A* a *E*, na posição aminoacídica 2.265 a 2.573. Também, identificou-se na proteína RdRp um *motif* catalítico, conhecido como OUT-like (*Ovarian Tumor family*) (**Figura 23**). O segmento M do ERV codifica uma GPC de 1.402 aminoácidos e um peptídeo sinal na região N-terminal. Além disso, três TMDs foram identificadas na GPC, quatro locais de N-glicosilação e onze locais de O-Glicosilação. *Motifs* de clivagem da GPC foram identificados entre a posição aminoacídica 389 e 392 (RKLL). O segmento S codifica proteína N de 505 aminoácidos, mas nenhuma ORF que poderia codificar a proteína NSs foi identificada (**Figura 23**).

Figura 23. Organização genômica do orthonairovrus Estero Real (a). Modelo das glicoprotenas do orthonairovrus Estero Real

4.1.3.2. Relaco filogentica do orthonairovrus Estero Real no gnero Orthonairovirus

rvores de ML construdas com seqncias aminoacdicas de ERV e 40 genomas completos de orthonairovrus, mostraram 15 clados monofilticos com alto suporte estatstico, mas com topologias diferentes em cada segmento. Quatorze dos clados bem suportados correspondem a espcies de orthonairovrus estabelecidas (150). Observou-se que o ERV forma clado monofiltico nico relacionado aos vrus da espcie Hughes em todos os segmentos, sugerindo que esses vrus tenham mesma origem evolutiva (**Figura 24**). Alm disso, combinando as topologias filogenticas com o RDP4, no observou *reassortment* no ERV.

Figura 24. rvore de mxima verossimilhana do gnero *Orthonairovirus* baseadas nas seqncias aminoacdicas Protena N (A), Protena GPC (B) e Protena RdRP (C). A barra de escala indica distncia

evolutiva em números de substituições aminoacídicas por sítio, e os valores de *bootstrap* são indicados nos principais ramos. As árvores foram inferidas com o modelo de substituições aminoacídicas de LG+I+G4 para todas as proteínas. O vírus caracterizados neste estudo é destacado na cor vermelha.

4.1.4. Vesiculovírus Piry (família *Rhabdoviridae*)

4.1.4.1. Caracterização genômica do Vesiculovírus Piry

O vesiculovírus Piry (PIRV) possui organização típica dos vírus do gênero *Vesiculovirus*, apresenta regiões não codificantes terminais 3' e 5' com respectivamente 103 e 70 nucleotídeos e cinco regiões codificadoras intercaladas por sequências reguladoras de transcrição, dispostas na seguinte ordem: nucleoproteína, fosfoproteína, glicoproteína, proteína de matriz e polimerase (**Figura 25**). A nucleoproteína possui 427 aminoácidos e a fosfoproteína 329 aminoácidos, incluindo mais 21 aminoácidos que todas as outras fosfoproteínas descritas no gênero *Vesiculovirus*. Esta porção extra encontra-se na “*hinge region*” da fosfoproteína, entre os domínios I e II (posição aminoacídica 188 a 208) (**Figura 25**). A proteína de matriz possui 229 aminoácidos e a glicoproteína é composta por 529 aminoácidos incluindo um peptídeo sinal de 18 aminoácidos na região N-terminal. Também, a glicoproteína apresenta dois resíduos de asparagina, locais de putativas N-glicosilações, na posição aminoacídica 181 e 340. A polimerase possui 2.095 aminoácidos altamente conservados no gênero, com *motifs* característicos da ordem *Mononegavirales*: os domínios I a VI e os *motifs* Pré-A, A-D do Domínio III (**Figura 25**).

Figura 25. Organização genômica do vesiculovírus Piry.

4.1.4.2. Relação filogenética do vírus Piry no gênero *Vesiculovirus*

A árvore filogenética baseada no genoma de 33 vesiculovírus revelou que estes são divididos em dois principais clados. Um dos clados inclui os causadores de estomatites vesiculares como Indiana, Alagoas, New Jersey, além dos vírus Cocal, Morreton, Marabá e Carajás. O outro clado é composto pelos vesiculovírus Jurona, Malpais Spring, Isfahan, Chandipura e o PIRV. Portanto, este segundo clado é constituído de prováveis arbovírus filogeneticamente relacionados ao vesiculovírus Perinet (**Figura 26**).

Figura 26. Árvore de máxima verossimilhança baseado nas sequências completas dos genomas completos dos *Vesiculovirus*. A barra de escala indica distância evolutiva em números de substituições nucleotídicas por sítio, e os valores de *bootstrap* são indicados nos principais ramos. As árvores foram inferidas com o modelo de substituições nucleotídicas GTR. O vírus caracterizados neste estudo é destacado na cor vermelha.

4.2. PROSPEÇÃO DE NOVOS VÍRUS NO BRASIL

4.2.1. Chapparvovírus (família *Parvoviridae*)

Uma nova espécie de chapparvovírus foi identificada em morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus* coletados em Araçatuba, São Paulo. Este vírus foi denominado *Desmodus rotundus parvovirus*, com genoma de 4.284 nucleotídeos, que codifica dois genes: uma proteína não estrutural (NS), também conhecida como replicase, com 668 aminoácidos; e o gene da proteína do capsídeo, conhecida como VP, com 484 aminoácidos.

Utilizando o programa DIGS v.1.0 para triagem *in silico* foram encontrados 19 genomas parciais de novos chapparvovírus em 350 genomas de invertebrados e vertebrados, analisados. Dois chapparvovírus foram encontrados nos genomas de aves das espécies *Mesitornis unicolor* e *Serinus canaria*; outro no genoma do réptil *Protobothrops mucrosquamatus*, um no do primata *Cebus imitator* e o outro no de morcego da espécie *Myotis davidii*. Também, foram encontrados cinco novos chapparvovírus nos genomas de espécies marinhas incluindo dois em peixes, *Syngnathus scovelli* e *Hippocampus comes* e outros três em invertebrados marinhos, incluindo polvo da espécie *Octopus bimaculoides*, estrela-do-mar da espécie *Patiria miniata*, e centopeia da espécie *Strigamia maritima* (Tabela

5). Além disso, foram identificados genomas parciais de chapparvovírus em invertebrados terrestres, incluindo três espécies de aranhas, *Latrodectus hesperus*, *Parasteatoda tepidariorum* e *Loxosceles reclusa*; e em outros invertebrados terrestres, *Catajapyx aquilonaris* (inseto), *Saccoglossus kowalevskii* (inseto), *Eisenia fetida* (minhoca), *Onthophagus taurus* (besouro), *Agrilus planipennis* (grilo) e *Mesobuthus martensii* (escorpião) (**Tabela 5**). Interessantemente, estes vírus possuem ampla distribuição geográfica e infectam grande variedade de hospedeiros.

Tabela 5. Chapparvovírus identificados neste estudo.

Vírus	Animal	Amostra	Localização	Ambiente	No. GenBank
Desmodus rotundus parvovirus	<i>Desmodus rotundus</i>	Rim	Araçatuba, São Paulo, Brazil	Nativo	KX907333
Cebus capucinus imitator	<i>Cebus capucinus imitator</i>	-	Costa Rica	-	LVWQ01135885
Mesitornis unicolor	<i>Mesitornis unicolor</i>	-	Madagascar	-	JJRI01094129
Protobothrops mucrosquamatus	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	-	Okinawa, Japão	-	BCNE02131058
Myotis davidii	<i>Myotis davidii</i>	Baço, rim e intestino delgado	Caverna de Taiyi, Xianning, China	Nativo	ALWT01091740
Serinus canaria	<i>Serinus canaria</i>	-	-	-	CAVT010188449
Saccoglossus kowalevskii	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	-	EUA	Nativo	ACQM01061598
Octopus bimaculoides	<i>Octopus bimaculoides</i>	Gônadas	Oceano Pacífico, USA	Nativo	LGKD01682827
Patiria miniata	<i>Patiria miniata</i>	Esperma	Oceano Pacífico, EUA	Nativo	AKZP01065322
Eisenia fetida	<i>Eisenia fetida</i>	-	-	-	CYRZ010396261
Syngnathus scovelli	<i>Syngnathus scovelli</i>	Animal completo	EUA	Cativeiro	https://creskolab.uoregon.edu/pipefish/
Onthophagus taurus	<i>Onthophagus taurus</i>	Animal completo	EUA	Nativo	JHOM01022742
Strigami maritima	<i>Strigami maritima</i>	-	-	-	AFFK01023528
Agrilus planipennis	<i>Agrilus planipennis</i>	Animal completo	EUA	Urbano	JENH01067900
Hippocampus comes	<i>Hippocampus comes</i>	Músculo	-	-	LVHJ01006034
Latrodectus hesperus	<i>Latrodectus hesperus</i>	Animal completo	EUA	Nativo	JJRX01097408
Catajapyx aquilonaris	<i>Catajapyx aquilonaris</i>	Animal completo	Austria	Nativo	JYFJ01046956
Parasteatoda tepidariorum	<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	Animal completo	-	-	AOMJ02182105
Mesobuthus martensii	<i>Mesobuthus martensii</i>	Animal completo	China	-	AYEL01046460
Loxosceles reclusa	<i>Loxosceles reclusa</i>	Animal completo	-	-	JJRW011214679

Também identificamos os *motifs* “HXH” e “GPXNTGKS”, característicos da proteína NS de todos os membros da família *Parvoviridae*. Interessantemente, os chapparvovírus

encontrados sobrepõem 8 a 11 nucleotídeos nos dois genes. Além disso, observamos *stop codon* no gene NS em três novos chapparvovírus, identificados em centopeia da espécie *Strigamia maritima*, aranha da espécie *Parasteatoda tepidariorum* e escorpião da espécie *Mesobuthus martensii* (**Figura 27**).

Figura 27. Organização genômica dos chapparvovírus identificados neste estudo.

As árvores de ML construídas com sequências completas dos genes NS e VP produziram o mesmo padrão de grupos, mas com diferentes topologias. As regiões conservadas em sequências de ambos os genes, mostram que os parvovírus formam três grupos monofiléticos com alto suporte estatístico. Entre estes grupos, observam-se dois clados bem suportados correspondentes às subfamílias *Densovirinae* e *Parvovirinae* já estabelecidas pelo ICTV. O terceiro clado é constituído por chapparparvovírus cuja subfamília é nomeada “*Chapparparvovirinae*”, uma potencial subfamília dos *Parvoviridae*. Análise filogenética com a proteína NS revelou que os chapparparvovírus identificados em invertebrados formam um grupo monofilético basal em relação aos chapparparvovírus encontrados em vertebrados (**Figura 28**). A análise filogenética com a proteína VP apresenta a mesma topologia da árvore ML da proteína NS, mas não mostrou agrupamento de chapparparvovírus basalmente para *Chapparparvovirinae*.

Figura 28. Árvore de máxima verossimilhança mostrando relacionamento dos chapparparvovírus com a família *Parvoviridae*. (A) Proteína não estrutural (B) Proteína do capsídeo. A barra de escala indica distância evolutiva em números de substituições aminoacídicas por sítio, e os valores de *bootstrap* (> 75) são indicados nos principais ramos com círculos pretos. As árvores foram inferidas com o modelo de substituições aminoacídicas rtREV+F+G4 para proteína não estrutural e Blosum62+F+G4 para proteína do capsídeo. Os vírus identificados neste estudo são destacados com a silhueta dos seus hospedeiros e nomes em cores, animais terrestres (laranja) e marinhos (azul).

4.2.2. Família *Anelloviridae*

4.2.2.1. Caracterização genômica de novos *anellovirus*

Foram identificados 26 *anellovirus* classificados em 11 novas espécies. Os vírus, identificados em amostras de roedores, morcegos e gambás, incluem 17 genomas completos e 10 genomas parciais (**Tabela 6**).

Tabela 6. *Anellovirus* identificados neste estudo.

Gênero	Espécie	Cepa	ORF1	NT	Hospedeiro	Espécie	Amostra	N	Local	Data
Deltatorquevirus	Torque teno Calomys tener virus (TTCtV)	138	Parcial	1,865	Roedor	<i>Calomys tener</i>	Sangue	38	Ribeirao Preto	2008
Sigmatorquevirus	Torque teno Carollia perspicillata virus (TTCpV)	2	Parcial	1,728	Morcego	<i>Carollia perspicillata</i>	Fígado	18	Araçatuba	2010
Sigmatorquevirus	Torque teno Desmodus rotundus virus (TTDrV)	182	Completo	2,529	Morcego	<i>Desmodus rotundus</i>	Fígado	8	Araçatuba	2010
Sigmatorquevirus	Torque teno Didelphis albiventris (TTDaV)	3470	Completo	2,605	Gambá	<i>Didelphis albiventris</i>	Soro	14	Teodoro Sampaio	2009
Omegatorquevirus	Rodent Torque teno virus 3 (RoTTV-3)	250	Completo	2,538	Roedor	<i>Necomys lasiurus</i>	Sangue	58	Ribeirao Preto	2008
Omegatorquevirus	Rodent Torque teno virus 4 (RoTTV-4)	188	Completo	2,561	Roedor	<i>Calomys tener</i>	Sangue	37	Ribeirao Preto	2008
Omegatorquevirus	Rodent Torque teno virus 4 (RoTTV-4)	117	Completo	2,577	Roedor	<i>Mus musculus</i>	Sangue	24	Ribeirao Preto	2008 - 2009
Omegatorquevirus	Rodent Torque teno virus 4 (RoTTV-4)	332	Completo	2,684	Roedor	<i>Necomys lasiurus</i>	Sangue	58	Ribeirao Preto	2008
Omegatorquevirus	Rodent Torque teno virus 4 (RoTTV-4)	4269	Completo	2,594	Roedor	<i>Necomys lasiurus</i>	Sangue	52	Ribeirao Preto	2009
Omegatorquevirus	Rodent Torque teno virus 4 (RoTTV-4)	1259	Completo	2,588	Roedor	<i>Necomys lasiurus</i>	Sangue	59	Ribeirao Preto	2008
Omegatorquevirus	Rodent Torque teno virus 4 (RoTTV-4)	108	Completo	2,577	Roedor	<i>Necomys lasiurus</i>	Sangue	59	Ribeirao Preto	2008
Omegatorquevirus	Rodent Torque teno virus 4 (RoTTV-4)	319	Completo	2,536	Roedor	<i>Necomys lasiurus</i>	Sangue	24	Ribeirao Preto	2012 - 2013
Omegatorquevirus	Rodent Torque teno virus 4 (RoTTV-4)	67	Parcial	1,340	Roedor	<i>Akodon montensis</i>	Sangue	55	Ribeirao Preto	2008
Omegatorquevirus	Rodent Torque teno virus 4 (RoTTV-4)	152	Parcial	1,099	Roedor	<i>Calomys tener</i>	Sangue	37	Ribeirao Preto	2008
Omegatorquevirus	Rodent Torque teno virus 4 (RoTTV-4)	2216	Parcial	1,047	Roedor	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Sangue	43	Ribeirao Preto	2008 - 2009
Omegatorquevirus	Rodent Torque teno virus 4 (RoTTV-4)	1458	Parcial	1,087	Roedor	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Fígado	10	Vale do Ribeira	2007 - 2008
Omegatorquevirus	Rodent Torque teno virus 5 (RoTTV-5)	2	Completo	3,433	Roedor	<i>Akodon montensis</i>	Sangue	48	Ribeirao Preto	2012 - 2013
Omegatorquevirus	Rodent Torque teno virus 5 (RoTTV-5)	22	Completo	2,617	Roedor	<i>Akodon montensis</i>	Sangue	48	Ribeirao Preto	2012 - 2013
Omegatorquevirus	Rodent Torque teno virus 5 (RoTTV-5)	2192	Completo	2,689	Roedor	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Fígado	10	Vale do Ribeira	2007 - 2008
Omegatorquevirus	Rodent Torque teno virus 5 (RoTTV-5)	49	Parcial	1,830	Roedor	<i>Akodon cursor</i>	Pulmão	4	Nazare Paulista	2009
Omegatorquevirus	Rodent Torque teno virus 5 (RoTTV-5)	1012	Parcial	1,111	Roedor	<i>Akodon cursor</i>	Soro	8	Nazaré Paulista	2009
Omegatorquevirus	Rodent Torque teno virus 5 (RoTTV-5)	1594	Parcial	1,406	Roedor	<i>Necomys lasiurus</i>	Sangue	52	Ribeirao Preto	2009
Omegatorquevirus	Rodent Torque teno virus 6 (RoTTV-6)	2404	Completo	2,505	Roedor	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Sangue	43	Ribeirao Preto	2008 - 2009
Omegatorquevirus	Rodent Torque teno virus 7 (RoTTV-7)	15	Completo	2,379	Roedor	<i>Akodon montensis</i>	Sangue	48	Ribeirao Preto	2012 - 2013
Omegatorquevirus	Rodent Torque teno virus 8 (RoTTV-8)	2252	Completo	2,325	Roedor	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Fígado	10	Vale do Ribeira	2007 - 2008
Alphatorquevirus	Opossum torque teno virus (OTTV)	13255	Completo	2,220	Gambá	<i>Didelphis albiventris</i>	Serum	17	Teodoro Sampaio	2009

Os *anellovirus* possuem genoma de DNA fita simples (ssDNA) com 2,3 a 2,7 kb. A maioria de suas sequências apresentam região não traduzida (UTR) rica em GC (>60%), além de uma putativa região *TATA-box* e um sinal de cauda de poliadenilação (**Figura 29**). Todos os *anellovirus* apresentam uma ORF que codifica uma putativa proteína ORF1 de 541 a 580 aminoácidos. A única exceção é o Torque teno calomys tener virus (TTCtV) que possui a proteína ORF1 com 337 aminoácidos. Além disso, identificamos a ORF2 que codifica uma

putativa proteína de 103 a 168 aminoácidos nos Opossum torque teno vírus (OTTV) e Torque Teno didelphis albiventris vírus (TTDaV) (**Figura 29**). A ORF3 codifica uma proteína putativa de 127 a 154 aminoácidos nos TTCtV, TTDaV, Torque teno desmodus rotundus vírus (TTDrV) e Torque teno carollia perspicillata vírus (TTCpV). Além disso, foram identificadas putativas ORFs anteriormente não caracterizadas, que foram denominadas “ORF-?”, podendo codificar proteínas de 109 a 152 aminoácidos nos RoTTTV-3 a RoTTTV-8, TTDrV e TTCtV (**Figura 31**). As “ORF-?” não apresentaram homologia com proteínas de anellovírus ou de outras famílias virais.

Figure 29. Organização genômica dos anellovírus identificados neste estudo.

4.2.2.2. A análise filogenética revela dois novos gêneros na família *Anelloviridae*

Para estudar relações filogenéticas entre novos anellovírus na família *Anelloviridae*, construiu-se uma árvore filogenética com 123 sequências completas de nucleotídeos da ORF1. Todos os anellovírus conhecidos foram divididos em dois grandes grupos, anellovírus de primatas e não primatas, e distribuídos em 14 clados monofiléticos com alto suporte estatístico. Doze dos clados bem suportados corresponderam a gêneros já estabelecidos dentro da família *Anelloviridae*: *Alphatorquevirus*, *Betatorquevirus*, *Deltatorquevirus*, *Epsilontorquevirus*, *Etatorquevirus*, *Gammatorquevirus*, *Gyrovirus*, *Iotatorquevirus*, *Kappatorquevirus*, *Lambdatorquevirus*, *Thetatorquevirus* e *Zetatorquevirus*, incluindo as 68 espécies de anellovírus reconhecidos pela ICTV. Por outro lado, dois destes clados identificados foram distintos destes gêneros acima referidos (**Figura 30**).

Para determinar se os vírus identificados nestes dois clados distintos pertenciam a gêneros anteriormente não caracterizados, o *p-distance* da ORF1 de todos os representantes da família *Anelloviridae* foi calculado (**Figura 31**). Utilizando critérios de classificação taxonômica do ICTV, com valores de corte para a distância em nucleotídeos em isolados ou cepas de até 20%, e em espécies de 20 a 55%, foi confirmado que onze dos 26 vírus identificados neste estudo, constituem novas espécies de anellovírus distribuídas em quatro gêneros. Também os dois clados divergentes descritos anteriormente representam dois novos gêneros na família *Anelloviridae*, que foram denominados *Omegatorquevirus* e *Sigmatorquevirus* (**Figura 30 e 31**).

Figure 30. Árvore de máxima verossimilhança mostrando o relacionamento dos anellovírus descritos na família *Anelloviridae*. A barra de escala indica distância evolutiva em números de substituições nucleotídicas por sítio, e os valores de *bootstrap* (> 75) são indicados nos principais ramos com círculos pretos. As árvores foram inferidas com o modelo de substituições nucleotídicas GTR+I+G4. Os vírus identificados neste estudo são destacados com a silhuetas dos seus hospedeiros e nomes dos vírus na cor verde, e os gêneros propostos na cor rosa.

Figure 31. Análise de p -distance dos membros da família *Anelloviridae*. Os vírus descritos são destacados em negro.

O gênero *Omegatorquevirus* é constituído pelos vírus RoTTV 3 a RoTTV 8 identificados neste estudo, além de quatro anellovírus previamente descritos: *Rodent Torque teno virus RN*, AS 1014, bem como o Mosquito VEM Anellovirus SDRB A e B (151, 152) (**Figura 30**). O gênero *Sigmatorquevirus* é composto por quatro vírus que representam três novas espécies de anellovírus: TTDaV, TTCpV, e TTDrV que está relacionado ao vírus *Torque teno tadarida brasiliensis* (TTTbV) (153). Apesar dos TTDrV e TTTbV terem sido encontrados em diferentes hospedeiros, eles exibem 91% de identidade nucleotídica, portanto, são a mesma espécie viral. Foram encontradas também duas novas espécies de anellovírus, TTCtV e OTTV, classificadas nos gêneros *Deltatorquevirus* e *Alphatorquevirus*, respectivamente (**Figura 30**).

4.2.2.3. Frequência e diversidade dos anellovírus

Um total de 45% (18/40) dos lotes de pequenos mamíferos coletados no estado de São Paulo foram positivos para anellovírus. Isto significa que os anellovírus foram encontrados em 9 das 13 espécies de animais testadas. Observou-se uma alta frequência de anellovírus em sete espécies de pequenos mamíferos, com frequência superior a 40% (**Figura 32a**). *Necomys lasiurus* e *Mus musculus* com uma frequência de detecção de 100% e *Calomys tener* com 70% de frequência. Todos os anellovírus foram detectados nas amostras de sangue (**Figura 32a**). Por outro lado, a maior diversidade de espécies de anellovírus foi observada em *Oligoryzomys nigripes* e *Akodon montensis*, com 36% e 27% das 11 novas espécies de anellovírus, respectivamente. Curiosamente, a diversidade de anellovírus em *Oligoryzomys nigripes* foi observada nas amostras de sangue, fígado ou em ambas (**Figura 32b**).

Figure 32. Frequência (a) e diversidade (b) dos anellovírus identificados neste estudo.

4.2.3. Família *Hepeviridae*

Uma nova espécie de orthohepevírus foi identificada nos *Necromys lasiurus* e *Calomys tener* capturados na região de Ribeirão Preto, estado de São Paulo. Os dois vírus encontrados, representantes desta nova espécie, foram denominados *Necromys orthohepevírus* (NeHEV) e *Calomys orthohepevírus* (CaHEV), com base nas espécies de roedores nas quais foram identificados. Para o NeHEV encontramos um genoma quase completo com 6.819 nt, enquanto para o CaHEV encontramos dois genomas parciais, com 752 e 1.500 nt. O NeHEV apresenta organização genômica típica dos membros do gênero *Orthohepevirus* possuindo duas ORFs, uma codificando a poliproteína e outra, a proteína do capsídeo (**Figura 33a**).

Para avaliar a filogenia e a taxonomia do NeHEV, a árvore filogenética foi construída com a ORF1 (poliproteína não estrutural). A análise revelou cinco clados distintos e bem suportados (>95% de *bootstrap*), representando as espécies de orthohepevírus A à D. Surpreendentemente, o quinto clado incluiu NeHEV, CaHEV e o kestrel HEV (**Figura 33b**).

Figure 33. Organização genômica dos orthohepevírus identificados (a). Árvore de máxima verossimilhança mostrando o relacionamento dos orthohepevírus descritos entre a família *Hepeviridae* (b). A barra de escala indica distância evolutiva em números de substituições aminoacídicas por sítio, e os valores de bootstrap (> 75) são indicados nos principais ramos com círculos pretos. A árvore foi inferida com o modelo de substituições aminoacídicas LG+F+G4. Os vírus identificados neste estudo são destacados com a silhuetas dos seus hospedeiros e nomes dos vírus na cor laranja.

Além disso, o NeHEV e o CaHEV compartilhavam apenas 62 a 64% de identidade aminoacídica com kestrel HEV, e menos de 60% com outros membros representativos do orthohepevírus tanto na poliproteína não estrutural, quanto no cápsideo (**Figuras 34**). Baseado nos critérios de demarcação de espécies do ICTV para a família *Hepeviridae* e nos resultados obtidos neste estudo, propomos que NeHEV, CaHEV e o Kestrel HEV constituam uma nova espécie HEV do gênero *Orthohepevirus*, que denominamos provisoriamente de "Orthohepevirus E". Para determinar a frequência de "Orthohepevirus E" nas amostras de

roedores incluídas neste estudo, foi realizado uma RT-PCR específica, cujo resultado apontou a presença de genoma viral em 1,08% das amostras (7/647), incluindo três de *Necromys lasiurus* e quatro de *Calomys tener*.

Figure 34. Análise de *p-distance* dos orthobunyavírus descritos entre a família *Hepeviridae*.

5. DISCUSSÃO

5.1. GENOMAS DE VÍRUS ISOLADOS NAS AMÉRICAS

5.1.1. Gênero *Orthobunyavirus* (família *Peribunyaviridae*)

Caracterizamos a genômica e a filogenia de 35 vírus do gênero *Orthobunyavirus*, família *Peribunyaviridae*. As análises filogenéticas destes vírus confirmaram que os mesmos representam cinco novos grupos dentro do gênero.

Em linhas gerais, observamos que a proteína RdRP destes vírus contém os *motifs* altamente conservados das polimerases de vírus de RNA com polaridade negativa (*Pre-Motif A* e *Motifs A* a *E*) (154). Dentre os orthobunyavírus caracterizados, os do grupo Gamboa apresentam uma característica única, possuem proteína NSm de 317 aminoácidos, quase o dobro do tamanho das NSm típicas deste gênero, que têm de 102 a 186 aminoácidos. Embora a proteína NSm atue como um precursor da poliproteína, que é cotranslacionalmente clivada nas proteínas Gc e Gn, seu papel na replicação e virulência é pouco conhecido (155). Na infecção pelo vírus Bunyamwera, demonstrou-se que NSm é crítica para a montagem e morfogênese viral (156). Por outro lado, estudos com o vírus Maguari sugerem que NSm não

é essencial para o crescimento deste vírus em cultura de células (157). Um estudo recente sugere que a deleção de NSm no vírus Schmalemborg reduz a virulência em quadros de infecção experimental (158). Porém, o resgate de um clone infeccioso do vírus Oropouche, com deleção completa da proteína NSm, não afetou a replicação viral em cultura de células (159). Portanto, futuros estudos usando genética reversa são necessários para elucidar a importância biológica de NSm, particularmente desta NSm de tamanho peculiar encontrada nos vírus do grupo Gamboa.

Todos os orthobunyavírus possuem uma nucleoproteína, codificada pelo segmento S, que está envolvida na síntese e replicação do RNA viral (155, 160). Em sua ORF, o segmento S também pode codificar uma proteína NSs na mesma direção da N, porém em diferente *frame*. NSs é antagonista da resposta de interferon em diversos orthobunyavírus que infectam vertebrados (161), e nos vírus do grupo Gamboa ela está presente na sua forma típica, com cerca de 130 aminoácidos. No entanto, identificamos uma potencial nova estratégia de codificação da proteína NSs no vírus Enseada e nos vírus dos grupos Patois e Grupo C. Nestes vírus, seu *start codon* localiza-se antes do *start codon* de N. Estudos prévios mostraram que os vírus do Grupo C (Marituba, Oriboca, Caraparu, Madri e Itaya) codificam uma proteína NSs contendo de 83 a 101 aminoácidos, e também uma NSs truncada ou não funcional, com 62 aminoácidos (162, 163). Porém, sugerimos que o genoma dos vírus do Grupo C usado nestes estudos estava incompleto, visto que identificamos uma nova estratégia de codificação da proteína NSs onde todos os vírus do Grupo C apresentam uma ORF que codifica NSs do tamanho similar ao observado para outros orthobunyavírus. Corrobora nosso achado para o gênero *Orthobunyavirus*, o vírus Brazoran, que também apresenta a ORF para a proteína NSs antes do *start codon* da nucleoproteína (164). Considerando-se que a proteína NSs desempenha um papel crucial na virulência e patogênese de vários orthobunyavírus previamente caracterizados, estudos adicionais usando genética reversa poderiam elucidar sua importância biológica nos vírus Enseada e nos membros dos grupos Patois e C (158, 161, 165).

Os vírus do Grupo C representariam o primeiro novo grupo identificado neste estudo. A filogenia do segmento M dos vírus deste grupo revela quatro grupos filogenéticos com alto suporte estatístico. Estes grupos coincidem com as classificações antigas baseadas nos testes de fixação do complemento, neutralização e inibição da hemaglutinação (166-169), que foram previamente nomeados como complexos de Marituba, Caraparu, Madrid e Oriboca (170). O complexo de Caraparu inclui os vírus Caraparu, Apeu e Bruconha; o complexo Madrid inclui os vírus Madrid e Itaya; o complexo Marituba inclui os vírus Martituba, Murucuri, Restan,

Nepuyo e Gumbo limbo, e o complexo Oriboca, os vírus Oriboca e Itaqui (162, 163, 170). Infelizmente, não existem sequências completas para vírus Vínco e Ossa, mas provavelmente, esses vírus serão agrupados no complexo Caraparu, como mostraram ensaios sorológicos (167). A concordância entre filogenia do segmento M e classificação sorológica ocorre porque o segmento M codifica as glicoproteínas, principais determinantes antigênicos reconhecidos pelos testes de neutralização e inibição da hemaglutinação (171).

Os vírus do Grupo C são descritos em uma ampla área geográfica, que inclui áreas tropicais e subtropicais das Américas como Estados Unidos, México, Panamá, Honduras, Guatemala, Trinidad e Tobago, Brasil, Peru, Equador, Venezuela e Guiné Francesa (169, 170, 172). Clinicamente, as infecções humanas por vírus do Grupo C são assintomáticas ou produzem doença febril inespecífica (170). Pouco se sabe sobre a epidemiologia destes vírus, especialmente pela ausência de métodos diagnósticos, de modo que a caracterização genômica destes vírus poderá subsidiar o desenvolvimento de testes moleculares e sorológicos para sua detecção.

O vírus Enseada foi isolado de mosquitos da espécie *Culex epanastasis* no estado de São Paulo em 1976, no entanto, permaneceu como um orthobunyavírus não classificado (167). Observamos que este vírus compartilha o mesmo ancestral comum que os vírus do Grupo C, mas permanece em clado único e provavelmente, é protótipo de um novo grupo no gênero *Orthobunyavirus*. Embora, o vírus Enseada não tenha sido associado com infecções humanas, sua estreita relação filogenética com os membros dos grupos Capim, Guama e Patois sugere que a associação deste vírus com doença humana ou veterinária não pode ser excluída.

O segundo novo grupo identificado neste estudo é representado pelo vírus Capim, o protótipo do sorogrupo Capim. Posteriormente, outros vírus deste grupo foram sequenciados (173). Estes vírus parecem estar restritos a infecções em mosquitos e aparentemente, não são associados a doenças humanas ou veterinárias.

Gamboia foi outro grupo caracterizado neste estudo, geneticamente relacionado ao grupo Koongol. O grupo Koongol é composto pelos vírus Koongol e Wongal, ambos atribuídos pelo ICTV como uma única espécie, porém, apenas o vírus Koongol tem seu genoma completo sequenciado (173). Estes vírus foram originalmente isolados de mosquitos do gênero *Culex* coletados em 1960 em Queensland, Austrália (174). Estudos soropidemiológicos sugerem que o vírus Koongol infecta vários mamíferos incluindo marsupiais, e também pássaros, podendo ser encontrado por toda a Austrália (175, 176). Assim, acreditamos que a relação do grupo Koongol com pássaros poderia explicar o

relacionamento filogenético com vírus do grupo Gamboa, também descrito em aves. Além disso, a classificação genômica do grupo Gamboa coincide com a classificação baseada em testes sorológicos utilizando fixação do complemento, hemaglutinação e neutralização (177, 178). Até o momento não há evidências de infecção humana por vírus deste grupo, isolados apenas de aves e mosquitos na América Latina.

Os genomas dos vírus do grupo Patois são inéditos. Estes são filogeneticamente relacionados aos vírus Enseada, Brazoran, bem como aos membros dos grupos Guama, Capim e C. Apesar dos vírus do grupo Patois não serem associados a doenças humanas ou veterinárias, a estrita relação filogenética com vírus causadores de doenças humanas e o achado de anticorpos neutralizantes em humanos, sugerem que estes vírus possam causar infecção humana e suas consequências clínicas precisariam ser elucidadas em estudos futuros (179-181).

O último grupo do gênero *Orthobunyavirus* caracterizado neste estudo foi o do vírus Tacaiúma, sorologicamente classificado no grupo de Anopheles A (182). O vírus Tacaiúma causa doença humana caracterizada por febre, dor de cabeça, calafrios, mialgia, artralgia e fraqueza (183). O Tacaiúma é a única exceção no gênero, um vírus que infecta vertebrados e não possui ORF codificadora da proteína NSs. Interessantemente, apesar da falta de NSs, Tacaiúma suprime a resposta imune inata do hospedeiro, atuando especificamente no bloqueio de IFN- β (182). No entanto, o mecanismo ou produto viral responsável pelo bloqueio do sistema de defesa inata ainda não foi elucidado.

O chamado *reassortment* é um mecanismo evolutivo importante em vírus de RNA segmentado. Este fenômeno, ocorre com a coinfeção de múltiplos vírus segmentados do mesmo grupo em uma célula hospedeira, podendo resultar na mistura de segmentos genômicos destes vírus (184). Tal ocorrência está envolvida na emergência de vírus como o Schmallerberg e variações do vírus Oropouche (54, 185-187). Combinando as discrepâncias nas árvores filogenéticas e as análises RDP4, identificamos seis *reassortants* com diferentes organizações no gênero *Orthobunyavirus*. Em membros do Grupo C, identificamos *reassortments* nos vírus Apeu, Itaqui e Oriboca, que já eram indicados como potenciais *reassortants* em estudos baseados em fixação do complemento e análises de genoma parcial, mesmo quando os genomas completos dos vírus Apeu e Itaqui ainda não haviam sido sequenciados (188). Observamos que o vírus Itaya identificado na Amazônia peruana em 1999, também é *reassortant* (189). Por outro lado, não encontramos nenhuma evidência neste sentido em relação aos vírus Murucuri e Restan, como previamente descrito (170).

Recentemente, foram caracterizados *reassortants* em quatro isolados virais do grupo Gamboa em mosquitos da espécie *Aedeomyia squamipennis* coletados no Panamá (190). Em nosso estudo, identificamos *reassortment* em outro membro deste grupo, o vírus Soberania cepa 118 e também identificamos que vírus Zegla do grupo Patois é um *reassortment* natural. O fato dos vírus Zegla e o Patois (vírus parental) terem sido isolados de roedores da espécie *Sigmodon hispidus* capturados perto da cidade de Almirante no Panamá em junho de 1961 (179, 180), reforça a hipótese de *reassortment* natural. Futuros estudos precisam ser direcionados para elucidar as implicações deste fenômeno nos grupos Gamboa, Patois e Grupo C.

5.1.2. Gênero *Phlebovirus* (família *Phenuiviridae*)

O gênero *Phlebovirus* é bastante abundante e diversificado, o que, juntamente com fato de alguns phlebovírus não causarem doença em camundongos recém-nascidos, ou efeito citopático visível em cultura de células, dificulta a classificação das espécies que o compõe (191). Embora os phlebovírus tenham sido classificados principalmente por estudos sorológicos, esta diversidade torna a tarefa de testar phlebovírus recém-isolados por sorologia bastante laboriosa (191, 192). Na última década, portanto, as novas ferramentas moleculares disponíveis, incluindo o sequenciamento de alto desempenho, tem fornecido opção eficiente para caracterizar e classificar estes vírus (118).

No presente estudo, sequenciamos os genomas de oito phlebovírus para determinar suas relações taxonômicas e evolutivas. Classificamos os vírus Bujaru, Munguba, Ambé, Anhangá, Joá, Uriurana, Urucuri e Tapará em três grupos no gênero *Phlebovirus*: Bujaru, Tapará e Frijoles. O grupo Bujaru inclui os vírus Bujaru e Munguba, corroborando a classificação baseada em testes sorológicos, que inclusive, foi utilizada pela ICTV para classificar esses vírus em uma espécie viral única, Bujaru. Curiosamente, o vírus Anhangá, que compartilha o mesmo ancestral comum com o phlebovírus Bujaru nos segmentos M e L, não produz reações cruzadas em testes sorológicos. Por isso, sugere-se que o vírus Anhangá não seja membro do grupo Bujaru. Os vírus do grupo Bujaru e o vírus Anhangá não são associados a doenças humanas ou veterinária tendo sido isolados de flebotomíneos como *Lutzomyia umbratilis* e mamíferos, como *Proechimys guyannensis oris* e *Choloepus brasiliensis* no Brasil. Não se pode afastar que estes vírus causem infecções humanas ou veterinárias (193).

Os vírus Uriurana e o Tapará, phlebovírus não classificados em grupos antigênicos, no presente estudo mostraram-se em um grupo denominado Tapará, coincidindo com

classificação sorológica por fixação do complemento. Também, a relação filogenética entre o complexo Tapará e o vírus Chagres, sugere que os vírus Uriurana e Tapará possam estar envolvidos em infecções humanas (194, 195). Os vírus Ambé e Urucuri foram isolados no Brasil, mas não são associados a infecções humanas ou veterinárias. O vírus Ambé foi isolado em *Phlebotominae sp.* coletados em Altamira em 1982, estado do Pará, e o vírus Urucuri isolado de *Proechimys guyannensis* em 1966, na floresta de Utinga, estado do Pará. Neste estudo, observamos que estes vírus apresentam diferenças topológicas em todos os segmentos, portanto, assim como observado em testes sorológicos, permaneceram como phlebovírus desagrupados.

Em suma, caracterizamos o genoma e a evolução de três grupos de phlebovírus: o Bujaru, o Tapará e o Frijoles. Os phlebovírus Ambé e Urucuri permaneceram desagrupados. Não observamos evidência de *reassortment* entre os phlebovírus sequenciados em nosso estudo, porém, identificamos um *reassortment* no vírus Medjerda Valley, que possui os segmentos S e L idênticos ao do vírus Arbia e provavelmente, um segmento M único. Além disso, ambos os vírus circulam na mesma região geográfica, reforçando a hipótese de *reassortment* natural (196). Acreditamos que nosso estudo forneça informações importantes sobre diversidade genética, classificação e evolução no gênero *Phlebovirus*.

5.1.3. Gênero *Orthonairovirus* (família *Nairoviridae*)

O gênero *Orthonairovirus* (família *Nairoviridae*) inclui 38 vírus predominantemente transmitidos por carrapatos, e sete espécies reconhecidas pelo ICTV (197). O primeiro orthonairovírus identificado, foi o *Nairobi sheep disease virus*, isolado de ovinos com gastroenterite hemorrágica em 1910. Este vírus mata até 75% dos animais infectados na África e Índia (198). No entanto, o vírus melhor caracterizado neste gênero, é o da febre hemorrágica da Crimeia-Congo (CCHFV), causador de febre hemorrágica humana com letalidade de 5 a 30% na África, Ásia e Europa (199). Estudos recentes por sequenciamento de alto desempenho permitiram conhecer e classificar diversos orthonairovírus (150, 200, 201). No presente estudo, sequenciamos e caracterizamos o vírus Estero Real (ERV), determinando suas relações filogenéticas dentro da família *Nairoviridae*.

Observamos que ERV compartilha o mesmo clado monofilético dos vírus da espécie Hughes em todos os segmentos, sugerindo uma mesma origem evolutiva. Os vírus da espécie Hughes foram originalmente isolados de carrapatos do gênero *Ornithodoros*, um ectoparasita comum das aves marinhas de várias ilhas oceânicas. Também já foram isolados de aves marinhas da espécie *Sterna fuscata* (202). Os vírus da espécie Hughes têm ampla distribuição

mundial. Entretanto, apenas os vírus Soldado e Zirqa são associados a doença humana que leva a prurido persistente e grave em pacientes com doença febril nas Ilhas Seychelles e nos Emirados Árabes Unidos. Além disso, estudo experimental mostrou que pintainhos infestados com carrapatos infectados experimentalmente com vírus Soldado morriam (203, 204).

Considerando que ERV, assim como os vírus da espécie Hughes, possuem GPC com topologia similar, bem como a mesma origem evolutiva, é possível que ele cause infecções humanas ou veterinárias. Não observamos *reassortment* em ERV. A caracterização genômica e evolutiva de ERV na família *Nairoviridae* permite entender a evolução e a diversidade destes vírus e deverá ser útil no desenvolvimento de métodos de diagnóstico e sistemas de genética reversa para este vírus.

5.1.4. Vesiculovírus Piry (família *Rhabdoviridae*)

O gênero *Vesiculovirus* (família *Rhabdoviridae*) inclui nove espécies de vírus isolados em artrópodes e mamíferos, com importância para saúde humana e veterinária (205). O vesiculovírus Piry (PIRYV) foi originalmente isolado dos tecidos do baço e fígado de um gambá da espécie *Philander opossum*, capturado em 1960, em Belém, estado do Pará. Estudos sorológicos descrevem uma alta prevalência (4 a 17,7%) de anticorpos neutralizantes específicos para PIRYV em populações de diferentes regiões do Brasil (206-208). A doença humana causada por este vírus foi descrita somente em cinco casos, todos relacionados a acidentes laboratoriais. Os pacientes apresentaram febre alta, dor de cabeça, prostração, mialgia e artralgia (206, 208). A infecção experimental com PIRYV em bovinos, ovinos, caprinos e suínos sugere que ele não esteja associado à estomatite vesicular clássica descrita para outros membros deste gênero (209). Recentemente, observou-se que PIRYV causa dano neuropatológico e alterações comportamentais em camundongos *swiss* (210).

Para melhor caracterizar o vesiculovírus Piry, previamente analisado com sequências genômicas parciais (211, 212), analisamos seu genoma completo e sua relação filogenética no gênero *Vesiculovirus*. A árvore filogenética com 33 vesiculovírus indicou que PIRYV esteja possivelmente mais relacionado ao vírus Perinet, isolado de um lote de mosquitos *Culex antennatus* em Madagascar, em 1978 (213). Também, no mesmo clado, estão os vírus Jurona, Malpais Spring, Isfahan e Chandipura, isolados ou associados à transmissão por mosquitos, sugerindo que PIRYV, também possa ser um arbovírus (214-218). Além disso, PIRYV compartilha o mesmo ancestral comum com os vírus Isfahan e Chandipura, ambos causadores de doença febril aguda e encefalites humanas (214, 215, 217), sugerindo que as infecções pelo PIRYV possam causar encefalite.

A caracterização genômica e filogenética do PIRYV poderá ser útil no desenvolvimento do sistema de genética reversa para estudar aspectos da replicação viral *in vivo* e *in vitro*. Permitirá estudar o neurotropismo em camundongos, bem como seu uso como vetor de expressão, o que já ocorre com outros vesiculovírus (219). Também, poderá ser útil no desenvolvimento de testes diagnósticos e para estudar a epidemiologia do PIRYV.

5.2. PROSPECÇÃO DE NOVOS VÍRUS NO BRASIL

5.2.1. Chapparvovírus (família *Parvoviridae*)

Os parvovírus são vírus pequenos, lineares, não envelopados, que possuem genoma de fita simples de DNA com 5 a 6 kb de comprimento (220). Os parvovírus possuem pelo menos dois genes, um que codifica proteína não estrutural (NS) e outro que codifica uma proteína do capsídeo (VP) (220). A família *Parvoviridae* divide-se em duas subfamílias, *Parvovirinae* e *Densovirinae*, restritas respectivamente a vertebrados e invertebrados (220). O primeiro chapparvovírus foi descrito em morcegos, em Gana, e depois em amostras fecais de aves, suínos e roedores. Tem sido proposto que os chapparvovírus são uma nova linhagem nos *Parvovirinae* (109, 221).

Combinando abordagem de metagenômica viral e busca *in silico* por sequências homólogas de chapparvovírus em genomas de animais, identificamos 20 genomas de chapparvovírus. Estes vírus apresentam a típica organização genômica dos parvovírus, com dois genes e possuem *motifs* conservados como os “HVVH” e “GPXNTGKS”, homólogos a *motif* de endonuclease “HHH” e de helicase “GPASTGKS”, próprios da família *Parvovirinae* (222, 223).

Surpreendentemente, novas espécies de chapparvovírus de vertebrados, e de uma ampla gama de invertebrados marinhos, terrestres e em genomas de peixes, constituem um grupo monofilético estatisticamente bem suportado em relação aos chapparvovírus de vertebrados, sugerindo que os chapparvovírus teriam sua origem em animais invertebrados. Atualmente, todos os parvovírus descritos em invertebrados são classificados na subfamília *Densovirinae* (220) e muitos são descritos em invertebrados terrestres, incluindo mosquitos *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* e *Haemagogus*, baratas dos gêneros *Periplaneta* e *Blattella*, grilos do gênero *Acheta*, borboletas do gênero *Papilio* e várias espécies de mariposas (*Diatraea*, *Galleria*, *Helicoverpa*, *Junonia*, *Mythimna*, *Pseudoplusia*, *Bombyx*, *Dendrolimus* e *Helicoverpa*) (220). Também, densovírus são descritos em invertebrados marinhos, causando perdas econômicas em fazendas de camarões e associados a implicações ecológicas por

produzirem extensos surtos de doença em estrelas marinhas na costa nordeste do Pacífico (224-226).

Os resultados descritos neste estudo apresentam uma nova subfamília na família *Parvoviridae*, os *Chapparvoviridae*, com ampla gama de hospedeiros, incluindo novos invertebrados terrestres e marinhos, como diferentes espécies de aranhas, vermes, besouros, escorpião, estrela-do-mar, moluscos e centopeia, bem como peixes marinhos.

Parvovírus são conhecidos por serem endogenizados em células de ampla gama de animais. Os vírus resultantes deste processo são chamados elementos virais endógenos (EVE) (227-229). Este fenômeno de integração ao genoma do hospedeiro, ocorre após infecções crônicas por estes vírus, como foi demonstrado para os vírus dos gêneros *Dependoparvovirus* e *Protoparvovirus* (228-230). Em alguns casos, a integração e persistência dos parvovírus pode ser benéfica para seus hospedeiros, protegendo contra infecções virais (231, 232). Apesar de muitos chapparvovírus identificados no presente estudo serem potenciais EVEs, somente os vírus identificados nos genomas de *Patiria miniata*, *Strigamia maritima*, *Hippocampus comes*, *Catajapyx aquilonaris* foram identificados em grandes *contigs*. Identificamos *stop codons* na sequência de chapparvovírus oriundos de *Strigamia maritima*, sugerindo que esses vírus sejam EVEs integrados na linha germinal destas espécies. Utilizando busca *in silico* identificamos vírus em sequências curtas de genomas completos (*Whole genome sequencing*). Por não identificarmos regiões gênicas conhecidas no hospedeiro, não foi possível determinar, se tais vírus são EVEs ou genomas de DNA viral exógeno presentes na amostra de DNA sequenciada.

Em suma, nossos resultados mostram que os chapparvovírus representam uma nova subfamília dos *Parvoviridae*, com origem evolutiva própria, ampla distribuição geográfica e grande diversidade de hospedeiros. Estes vírus ainda não são associados a doença humana ou veterinária. Porém, estudos futuros devem ser direcionados para avaliar o impacto da infecção por estes vírus em hospedeiros animais e humanos, bem como seus aspectos biológicos.

5.2.2. Família *Anelloviridae*

A família *Anelloviridae* possui 12 gêneros que incluem 68 espécies de vírus de DNA fita simples (ssDNA) com genomas de 2,1 a 3,9 kb (233). Estes vírus estão associados a infecção crônica sem doença aparente, com prevalência de 5% a 90% em seres humanos (234). No entanto, estudos associam anellovírus a um amplo espectro de doenças, incluindo hepatite, esclerose múltipla, carcinomas hepatocelulares, infecções respiratórias, distúrbios

sanguíneos e doenças autoimunes, embora não sejam comprovadamente a causa destas doenças, podendo ser inclusive, constituintes naturais do viroma humano (234-238).

Anellovírus têm sido detectados em sangue de um amplo espectro de mamíferos, incluindo primatas, porcos, cavalos, gatos, cachorros, roedores e morcegos (151, 153, 239-241). No presente estudo, identificamos onze novas espécies de anellovírus em hospedeiros previamente não reconhecidos, bem como identificamos dois novos gêneros, ressaltando assim a diversidade desta família viral.

O genoma dos anellovírus pode variar segundo o hospedeiro (242). O tamanho dos genomas identificados neste estudo foi consistente com relatos anteriores, com exceção do OTTV, identificado em gambás da espécie *Didelphis albiventris*. Este genoma foi maior que os descritos anteriormente para anellovírus infectando animais não primatas, mostrando-se semelhante aos do gênero *Alphatorquevirus* descritos em primatas. As UTRs dos vírus identificados neste estudo mostraram-se conservadas e semelhantes às de anellovírus previamente caracterizados. Isto corrobora a ideia de que as UTRs devem desempenhar papéis regulatórios importantes durante a replicação viral (234). Na maioria dos anellovírus identificados neste estudo, foi possível identificar a região *TATA-box* e o sinal de poliadenilação, importantes reguladores na transcrição de genes virais (243). No entanto, futuros estudos *in vitro* são necessários para elucidar a função desses reguladores.

Todas as novas espécies de anellovírus descritas neste estudo possuem ORF1 que, provavelmente, codifica uma proteína de capsídeo, mas com papel pouco conhecido na infecção viral (241, 244). A putativa proteína ORF2 foi identificada nos OTTV e TTDaV, identificados em gambás da espécie *Didelphis albiventris*. Estudo anterior sugere que ORF2 codifique uma proteína não estrutural envolvida na supressão da via canônica e não canônica de NF- κ B, indicando que esta proteína esteja envolvida na regulação de respostas imunes inatas e adaptativas do hospedeiro (245). A ORF3 foi identificado nos TTCtV, TTCpV, TTDrV e TTDaV, encontrados em roedores, morcegos e gambás. Acredita-se que a ORF3 codifique duas formas de uma proteína em diferentes estados de fosforilação, com características semelhantes às da proteína NS5A (proteína não estrutural 5-A) do vírus da hepatite C (246). Portanto, a proteína codificada pela ORF3 estaria envolvida no ciclo replicativo viral e na regulação de proteínas do hospedeiro, desempenhando papel importante nas infecções persistentes pelos anellovírus. Também, encontramos outras ORFs putativas, mas que não mostraram-se homólogas a genes ou proteínas de anellovírus previamente descritos, bem como às de outros de qualquer família viral. Futuros estudos são necessários para elucidar a função dessas proteínas e seus papéis na infecção por anellovírus.

Combinando análises filogenéticas e de *p-distance*, e usando os critérios de classificação do ICTV para anellovírus, classificamos os anellovírus encontrados neste estudo, em onze novas espécies. Além disso, identificamos dois novos gêneros na família *Anelloviridae*, que denominamos *Omegatorquevirus* e *Sigmatorquevirus*. Esses dois gêneros formam clados divergentes e bem suportados, com distância de nucleotídeos superior a 50%, para com os outros doze gêneros previamente classificados. Também, ao identificarmos dois novos gêneros na família *Anelloviridae*, aumentamos a diversidade dos anellovírus. Além disso, apesar da árvore filogenética indicar como origem dos anellovírus hospedeiros não primatas, não observamos evidências para julgar se resultaram de coevolução com o hospedeiro a milhões de anos ou se tiveram a origem e obtiveram diversidade em escala de tempo muito menor que seus hospedeiros. Esta é uma questão interessante que deve ser respondida em estudos futuros (247).

Os vírus do gênero *Omegatorquevirus* foram os mais frequentes neste estudo. As espécies mais comuns foram RoTTV-4 (onze cepas) e RoTTV-5 (seis cepas), detectadas em *Akodon montesis*, *Akodon cursor*, *Calomys tener*, *Necromys lasiurus*, *Mus musculus* e *Oligoryzomys nigripes*. Quase todos estes anellovírus foram identificados em roedores americanos *Sigmodontinae* (família *Cricetidae*), predominantes na América do Sul (248). Interessantemente, o gênero *Omegatorquevirus* forma um clado monofilético com outros vírus identificados em roedores *Cricetidae* (151). São exceções os vírus Mos VEM SDRB A e B descritos em mosquitos nos EUA, mas que provavelmente são oriundos da alimentação destes artrópodes (249), e a cepa 117 do RoTTV-4, identificada em *Mus musculus* (família *Muridae*) que possui ampla distribuição mundial e comportamento antropofílico (250).

Morcegos (ordem *Chiroptera*) são reconhecidos como importantes fontes de vírus causadores de doenças humana e veterinária (251). No entanto, anellovírus descritos em morcegos mostraram-se restritos a uma única espécie do sul do Brasil, *Tadarida brasiliensis* (153). No presente estudo, identificamos duas novas espécies de anellovírus em *Carollia perspicillata* e *Desmodus rotundus*. Estes vírus formam um clado monofilético único que propomos como gênero *Sigmatorquevirus*. Outro vírus pertencente ao gênero *Sigmatorquevirus* é o TTDaV, encontrado em gambá. Curiosamente, OTTV, classificado como *Alphatorquevirus*, também foi obtido de gambá, diferentemente de todos os membros do gênero, identificados em primatas (234). Este vírus poderia ser resultante de antropozoonose, como a proposta para os *Torque teno vírus de humanos e suínos* (6). Também, identificamos uma nova espécie de anellovírus do gênero *Deltatorquevirus* em roedor *Calomys tener*, este vírus agrupa-se a outros anellovírus de roedores, musaranhos e

mosquitos (151, 247, 249). Em suma, este é o primeiro estudo sobre epidemiologia molecular de anellovírus em pequenos mamíferos nas Américas e adiciona informações que incrementam a diversidade e a gama de hospedeiros de anellovírus na natureza.

5.2.3. Família *Hepeviridae*

A hepatite E é uma zoonose viral que envolve ampla gama de espécies animais (9). Na última década, o número de hospedeiros infectados por *Hepeviridae* expandiu dramaticamente, bem como a diversidade de variantes destes vírus (252). Os *Hepeviridae* dividem-se em dois gêneros, o *Piscihepevirus* que inclui uma espécie única, a *Piscihepevirus*, infectando salmões (253). O gênero o *Orthohepevirus* com quatro espécies: *Orthohepevirus* A, incluindo todos os vírus conhecidos por infectarem humanos, suínos, camelos, javali, coelhos, suídates e algumas cepas que infectam ratos; *Orthohepevirus* B incluindo os vírus de aves; *Orthohepevirus* C com a maioria dos vírus infectantes de ratos e furões; *Orthohepevirus* D contendo vírus de morcegos (253). Apesar dos orthohepevírus terem ampla gama de hospedeiros incluindo roedores, os estudos têm sido limitados a roedores *Muridae* (252, 254-256). No presente estudo, investigamos orthohepevírus em roedores *Cricetidae* brasileiros, e encontramos duas variantes de um novo orthohepevírus em *Necromys lasiurus* e *Calomys tener*.

Combinando análises filogenéticas com análises de *p-distance* e usando os critérios de classificação do ICTV para a família *Hepeviridae*, observamos que os vírus encontrados representam uma nova espécie no gênero *Orthohepevirus*, que denominamos *Orthohepevirus* E. Interessantemente, o orthohepevírus mais relacionado ao NeHEV foi um vírus identificado em falcões das espécies *Falco tinnunculus* e *Falco vespertinus*, ambos capturados na Hungria (257). Além disso, estudo anterior detectou orthohepevírus relacionado a mamíferos na ave de rapina *Gyps himalayensis*, no Zoológico de Pequim, China, este não relacionado aos orthohepevírus aviários (258). Além disso, a carga viral elevada de orthohepevírus foi mensurada na amostra fecal do *Falco tinnunculus*, indicadora de possível eliminação viral (257). No entanto, é provável que os orthohepevírus de *Falco tinnunculus* e *Falco vespertinus* sejam oriundos da dieta destas aves carnívoras e que incluem em sua dieta musaranhos e roedores. Os resultados do presente estudo mostram que os orthohepevírus estão presentes no sangue dos roedores, sugerindo replicação viral e um papel destes animais como reservatórios. Por outro lado, a infecção em aves com dieta carnívora pode participar na disseminação deste vírus em meio ambiente, o que precisa ser melhor elucidado. Ainda, observamos alta frequência orthohepevírus, 1.19% em *Necromys lasiurus* e 3.66% em

Calomys tener. Nossos resultados são distintos daqueles mostrados em trabalho anterior relatando tais vírus em 18% (2/11) e 14% (1/7) em amostras fecais de *Falco tinnunculus* e *Falco vespertinus*, respectivamente (257), acreditamos que possa estar relacionado ao discrepante número de amostras analisadas.

Portanto, no presente estudo, identificamos uma nova espécie de *Orthohepevirus* em 1.08% de roedores oriundos de área rural em Ribeirão Preto, estado de São Paulo. As análises genômicas e filogenéticas demonstraram que NeHEV e CaHEV representam variações de uma nova espécie de orthohepevírus, tentativamente designada como "Orthohepevirus E". Também, expandimos a diversidade ecológica dos hospedeiros roedores de orthohepevírus incluindo os *Cricetidae*. No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar o papel deste vírus como patógenos humanos ou veterinários, especialmente porque roedores é uma importante conexão entre ambiente silvestre e urbano, expondo os seres humanos e animais domésticos a importantes doenças transmitidas por estes animais, como os orthohantavírus e os arenavírus.

6. CONCLUSÕES

- ✓ Identificamos cinco grupos geneticamente inéditos (Enseada, Capim, Tacaúma, Patois, Gamboa) no gênero *Orthobunyavirus*, que incluem os 35 vírus estudados;
- ✓ Os orthobunyavírus Enseada, e os grupos Patois e C provavelmente, utilizam uma nova estratégia de codificação da proteína não estrutural no segmento pequeno de RNA;
- ✓ Os vírus Apeu, Itaqui, Oriboca, Zegla e Soberania são prováveis *reassortants* naturais;
- ✓ Bujaru, Tapará e Frijoles são três grupos geneticamente novos no gênero *Phlebovirus*, família *Phenuiviridae*;
- ✓ O vírus Estero Real representa uma nova espécie na família *Nairoviridae*;
- ✓ O vesiculovírus Piry é provavelmente um arbovírus com base em seu relacionamento filogenético;
- ✓ Os *Chapparovirinae* descritos são representantes de uma provável nova subfamília dos *Parvoviridae*;
- ✓ Os anellovírus estudados ampliam a diversidade e gama de hospedeiros da família *Anelloviridae*;
- ✓ Orthohepevirus E, associado a roedores *Sigmodontinae* é uma provável nova espécie na família *Hepeviridae*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Blancou J, Chomel BB, Belotto A, Meslin FX. Emerging or re-emerging bacterial zoonoses: factors of emergence, surveillance and control. *Veterinary research*. 2005;36(3):507-22.
2. Hubalek Z. Emerging human infectious diseases: anthroponoses, zoonoses, and sapronoses. *Emerging infectious diseases*. 2003;9(3):403-4.
3. Adamson PB. The spread of rabies into Europe and the probable origin of this disease in antiquity. *Journal of the Royal Asiatic Society of Great Britain & Ireland Royal Asiatic Society of Great Britain and Ireland*. 1977;2:140-4.
4. Plowright RK, Parrish CR, McCallum H, Hudson PJ, Ko AI, Graham AL, et al. Pathways to zoonotic spillover. *Nature reviews Microbiology*. 2017.
5. Meltzer E. Arboviruses and viral hemorrhagic fevers (VHF). *Infectious disease clinics of North America*. 2012;26(2):479-96.
6. Ssemadaali MA, Effertz K, Singh P, Kolyvushko O, Ramamoorthy S. Identification of heterologous Torque Teno Viruses in humans and swine. *Scientific reports*. 2016;6:26655.
7. Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerging infectious diseases*. 2006;12(1):15-22.
8. Bean AG, Baker ML, Stewart CR, Cowled C, Deffrasnes C, Wang LF, et al. Studying immunity to zoonotic diseases in the natural host - keeping it real. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(12):851-61.
9. Kamar N, Dalton HR, Abravanel F, Izopet J. Hepatitis E virus infection. *Clinical microbiology reviews*. 2014;27(1):116-38.
10. Kourtis AP, Read JS, Jamieson DJ. Pregnancy and infection. *The New England journal of medicine*. 2014;370(23):2211-8.
11. Field HE. Hendra virus ecology and transmission. *Current opinion in virology*. 2016;16:120-5.
12. Herfst S, Bohringer M, Karo B, Lawrence P, Lewis NS, Mina MJ, et al. Drivers of airborne human-to-human pathogen transmission. *Current opinion in virology*. 2017;22:22-9.
13. Christou L. The global burden of bacterial and viral zoonotic infections. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2011;17(3):326-30.
14. Okba NM, Raj VS, Haagmans BL. Middle East respiratory syndrome coronavirus vaccines: current status and novel approaches. *Current opinion in virology*. 2017;23:49-58.

15. Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, Epstein JH, et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science*. 2005;310(5748):676-9.
16. Yu H. Universal health insurance coverage for 1.3 billion people: What accounts for China's success? *Health policy*. 2015;119(9):1145-52.
17. Trad MA, Naughton W, Yeung A, Mazlin L, O'Sullivan M, Gilroy N, et al. Ebola virus disease: An update on current prevention and management strategies. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2017;86:5-13.
18. Centers-for-Disease-Control-and-Prevention. Cost of the Ebola Epidemic - 2014-2016 West Africa Outbreak. <https://http://www.cdc.gov/vhf/ebola/outbreaks/2014-west-africa/cost-of-ebola.html2017>.
19. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 2008;451(7181):990-3.
20. Meslin FX. Global aspects of emerging and potential zoonoses: a WHO perspective. *Emerging infectious diseases*. 1997;3(2):223-8.
21. Gould EA, Higgs S. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009;103(2):109-21.
22. Brackney DE, Armstrong PM. Transmission and evolution of tick-borne viruses. *Current opinion in virology*. 2016;21:67-74.
23. Kuno G, Chang GJ. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clinical microbiology reviews*. 2005;18(4):608-37.
24. Martina BE, Barzon L, Pijlman GP, de la Fuente J, Rizzoli A, Wammes LJ, et al. Human to human transmission of arthropod-borne pathogens. *Current opinion in virology*. 2017;22:13-21.
25. Haagmans BL, Andeweg AC, Osterhaus AD. The application of genomics to emerging zoonotic viral diseases. *PLoS pathogens*. 2009;5(10):e1000557.
26. Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, Liu Y, Li JD, Sun YL, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *The New England journal of medicine*. 2011;364(16):1523-32.
27. McMullan LK, Folk SM, Kelly AJ, MacNeil A, Goldsmith CS, Metcalfe MG, et al. A new phlebovirus associated with severe febrile illness in Missouri. *The New England journal of medicine*. 2012;367(9):834-41.

28. Chaves-Carballo E. Clara Maass, yellow fever and human experimentation. *Mil Med.* 2013;178(5):557-62.
29. Chastel C. [Centenary of the discovery of yellow fever virus and its transmission by a mosquito (Cuba 1900-1901)]. *Bull Soc Pathol Exot.* 2003;96(3):250-6.
30. Staples JE, Monath TP. Yellow fever: 100 years of discovery. *Jama.* 2008;300(8):960-2.
31. Monath TP, Vasconcelos PF. Yellow fever. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology.* 2015;64:160-73.
32. Ortiz-Martinez Y, Patino-Barbosa AM, Rodriguez-Morales AJ. Yellow fever in the Americas: the growing concern about new epidemics. *F1000Research.* 2017;6:398.
33. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical microbiology reviews.* 1998;11(3):480-96.
34. Gubler DJ. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Foundation symposium.* 2006;277:3-16; discussion -22, 71-3, 251-3.
35. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013;496(7446):504-7.
36. Villar L, Dayan GH, Arredondo-Garcia JL, Rivera DM, Cunha R, Deseda C, et al. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. *The New England journal of medicine.* 2015;372(2):113-23.
37. Scott LJ. Tetravalent Dengue Vaccine: A Review in the Prevention of Dengue Disease. *Drugs.* 2016;76(13):1301-12.
38. Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQ, Shearer FM, Barker CM, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *eLife.* 2015;4:e08347.
39. Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 1952;46(5):509-20.
40. Wikan N, Smith DR. Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. *The Lancet Infectious diseases.* 2016;16(7):e119-26.
41. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *The New England journal of medicine.* 2009;360(24):2536-43.
42. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clinical microbiology reviews.* 2016;29(3):487-524.

43. Faria NR, Azevedo Rdo S, Kraemer MU, Souza R, Cunha MS, Hill SC, et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science*. 2016;352(6283):345-9.
44. Calvet G, Aguiar RS, Melo AS, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious diseases*. 2016;16(6):653-60.
45. Metsky HC, Matranga CB, Wohl S, Schaffner SF, Freije CA, Winnicki SM, et al. Zika virus evolution and spread in the Americas. *Nature*. 2017;546(7658):411-5.
46. Faria NR, Quick J, Claro IM, Theze J, de Jesus JG, Giovanetti M, et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. *Nature*. 2017;546(7658):406-10.
47. Liu Y, Liu J, Du S, Shan C, Nie K, Zhang R, et al. Evolutionary enhancement of Zika virus infectivity in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Nature*. 2017;545(7655):482-6.
48. McArthur MA. Zika Virus: Recent Advances towards the Development of Vaccines and Therapeutics. *Viruses*. 2017;9(6).
49. Lo Presti A, Cella E, Angeletti S, Ciccozzi M. Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of Chikungunya virus: An updating review. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2016;41:270-8.
50. Rougeron V, Sam IC, Caron M, Nkoghe D, Leroy E, Roques P. Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2015;64:144-52.
51. Nunes MR, Faria NR, de Vasconcelos JM, Golding N, Kraemer MU, de Oliveira LF, et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC medicine*. 2015;13:102.
52. Abdelnabi R, Neyts J, Delang L. Chikungunya virus infections: time to act, time to treat. *Current opinion in virology*. 2017;24:25-30.
53. Vasconcelos PF, Travassos da Rosa AP, Rodrigues SG, Travassos da Rosa ES, Degallier N, Travassos da Rosa JF. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. *Cadernos de saude publica*. 2001;17 Suppl:155-64.
54. Travassos da Rosa JF, de Souza WM, Pinheiro FP, Figueiredo ML, Cardoso JF, Acrani GO, et al. Oropouche Virus: Clinical, Epidemiological, and Molecular Aspects of a

Neglected Orthobunyavirus. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2017;96(5):1019-30.

55. Rodriguez-Morales AJ, Paniz-Mondolfi AE, Villamil-Gomez WE, Navarro JC. Mayaro, Oropouche and Venezuelan Equine Encephalitis viruses: Following in the footsteps of Zika? *Travel medicine and infectious disease*. 2017;15:72-3.

56. Mourao MP, Bastos Mde S, de Figueiredo RP, Gimaque JB, Galusso Edos S, Kramer VM, et al. Mayaro fever in the city of Manaus, Brazil, 2007-2008. *Vector borne and zoonotic diseases*. 2012;12(1):42-6.

57. Rosa APdATd. The history of Arbovirology at Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, Brazil, from 1954 to 1998. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. 2016;7:61-70.

58. van Kammen A. Beijerinck's contribution to the virus concept--an introduction. *Arch Virol Suppl*. 1999;15:1-8.

59. Bos L. Beijerinck's work on tobacco mosaic virus: historical context and legacy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1999;354(1383):675-85.

60. Lustig A, Levine AJ. One hundred years of virology. *Journal of virology*. 1992;66(8):4629-31.

61. Rott R, Siddell S. One hundred years of animal virology. *The Journal of general virology*. 1998;79 (Pt 11):2871-4.

62. Rous P. A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. *The Journal of experimental medicine*. 1911;13(4):397-411.

63. Weller TH, Enders JF. Production of hemagglutinin by mumps and influenza A viruses in suspended cell tissue cultures. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine*. 1948;69(1):124-8.

64. Bedson SaB, J. Complement-fixation with filterable viruses and their antisera. *British Journal of Experimental Pathology*. 1929;10:11.

65. Liu C. Rapid diagnosis of human influenza infection from nasal smears by means of fluorescein-labeled antibody. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine*. 1956;92(4):883-7.

66. Brenner S, Horne RW. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim Biophys Acta*. 1959;34:103-10.

67. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256(5517):495-7.

68. Josko D. Updates in immunoassays: virology. *Clin Lab Sci*. 2012;25(3):179-84.

69. Davis BJ. Disc Electrophoresis. Ii. Method and Application to Human Serum Proteins. *Ann N Y Acad Sci.* 1964;121:404-27.
70. Ornstein L. Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Ann N Y Acad Sci.* 1964;121:321-49.
71. Burke DS, Brandt BL, Redfield RR, Lee TH, Thorn RM, Beltz GA, et al. Diagnosis of human immunodeficiency virus infection by immunoassay using a molecularly cloned and expressed virus envelope polypeptide. Comparison to Western blot on 2707 consecutive serum samples. *Ann Intern Med.* 1987;106(5):671-6.
72. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology.* 1975;98(3):503-17.
73. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1977;74(12):5350-4.
74. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American.* 1990;262(4):56-61, 4-5.
75. Shibata DK, Arnheim N, Martin WJ. Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *The Journal of experimental medicine.* 1988;167(1):225-30.
76. Hart C, Schochetman G, Spira T, Lifson A, Moore J, Galphin J, et al. Direct detection of HIV RNA expression in seropositive subjects. *Lancet.* 1988;2(8611):596-9.
77. Abe A, Inoue K, Tanaka T, Kato J, Kajiyama N, Kawaguchi R, et al. Quantitation of hepatitis B virus genomic DNA by real-time detection PCR. *Journal of clinical microbiology.* 1999;37(9):2899-903.
78. Shi L, Ho J, Norling LA, Roy M, Xu Y. A real time quantitative PCR-based method for the detection and quantification of simian virus 40. *Biologicals.* 1999;27(3):241-52.
79. Dahm R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Dev Biol.* 2005;278(2):274-88.
80. Avery OT, Macleod CM, McCarty M. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from *Pneumococcus* Type Iii. *The Journal of experimental medicine.* 1944;79(2):137-58.
81. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 1953;171(4356):737-8.

82. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(12):5463-7.
83. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*. 1975;94(3):441-8.
84. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology*. 2008;26(10):1135-45.
85. Fiers W, Contreras R, Duerinck F, Haegeman G, Iserentant D, Merregaert J, et al. Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene. *Nature*. 1976;260(5551):500-7.
86. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*. 1977;265(5596):687-95.
87. Baer R, Bankier AT, Biggin MD, Deininger PL, Farrell PJ, Gibson TJ, et al. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*. 1984;310(5974):207-11.
88. Ratner L, Haseltine W, Patarca R, Livak KJ, Starcich B, Josephs SF, et al. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature*. 1985;313(6000):277-84.
89. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*. 1986;321(6071):674-9.
90. Pareek CS, Smoczynski R, Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genet*. 2011;52(4):413-35.
91. Hutchison CA, 3rd. DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic acids research*. 2007;35(18):6227-37.
92. Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 2000;287(5461):2185-95.
93. Consortium CeS. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*. 1998;282(5396):2012-8.
94. Church DM, Goodstadt L, Hillier LW, Zody MC, Goldstein S, She X, et al. Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. *PLoS Biol*. 2009;7(5):e1000112.
95. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291(5507):1304-51.
96. Sims D, Sudbery I, Illott NE, Heger A, Ponting CP. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nature reviews Genetics*. 2014;15(2):121-32.

97. Rothberg JM, Leamon JH. The development and impact of 454 sequencing. *Nature biotechnology*. 2008;26(10):1117-24.
98. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature reviews Genetics*. 2016;17(6):333-51.
99. Reuter JA, Spacek DV, Snyder MP. High-throughput sequencing technologies. *Molecular cell*. 2015;58(4):586-97.
100. Catanese MT, Dorner M. Advances in experimental systems to study hepatitis C virus in vitro and in vivo. *Virology*. 2015;479-480:221-33.
101. Bench SR, Hanson TE, Williamson KE, Ghosh D, Radosovich M, Wang K, et al. Metagenomic characterization of Chesapeake Bay viroplankton. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(23):7629-41.
102. Thurber RV, Haynes M, Breitbart M, Wegley L, Rohwer F. Laboratory procedures to generate viral metagenomes. *Nature protocols*. 2009;4(4):470-83.
103. Zhang T, Breitbart M, Lee WH, Run JQ, Wei CL, Soh SW, et al. RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biol*. 2006;4(1):e3.
104. Edwards RA, Rohwer F. Viral metagenomics. *Nature reviews Microbiology*. 2005;3(6):504-10.
105. Delwart EL. Viral metagenomics. *Reviews in medical virology*. 2007;17(2):115-31.
106. Bibby K. Metagenomic identification of viral pathogens. *Trends in biotechnology*. 2013;31(5):275-9.
107. Qin XC, Shi M, Tian JH, Lin XD, Gao DY, He JR, et al. A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(18):6744-9.
108. Shi M, Lin XD, Tian JH, Chen LJ, Chen X, Li CX, et al. Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature*. 2016.
109. Baker KS, Leggett RM, Bexfield NH, Alston M, Daly G, Todd S, et al. Metagenomic study of the viruses of African straw-coloured fruit bats: detection of a chiropteran poxvirus and isolation of a novel adenovirus. *Virology*. 2013;441(2):95-106.
110. Smits SL, Osterhaus AD. Virus discovery: one step beyond. *Current opinion in virology*. 2013.
111. Marz M, Beerenwinkel N, Drosten C, Fricke M, Frishman D, Hofacker IL, et al. Challenges in RNA virus bioinformatics. *Bioinformatics*. 2014;30(13):1793-9.
112. Chiu CY. Viral pathogen discovery. *Current opinion in microbiology*. 2013.

113. Bexfield N, Kellam P. Metagenomics and the molecular identification of novel viruses. *Veterinary journal*. 2011;190(2):191-8.
114. Mokili JL, Rohwer F, Dutilh BE. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Current opinion in virology*. 2012;2(1):63-77.
115. Berg MG, Lee D, Collier K, Frankel M, Aronsohn A, Cheng K, et al. Discovery of a Novel Human Pegivirus in Blood Associated with Hepatitis C Virus Co-Infection. *PLoS pathogens*. 2015;11(12):e1005325.
116. Li CX, Shi M, Tian JH, Lin XD, Kang YJ, Chen LJ, et al. Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. *eLife*. 2015;4.
117. Roossinck MJ. Move over, bacteria! Viruses make their mark as mutualistic microbial symbionts. *Journal of virology*. 2015;89(13):6532-5.
118. Simmonds P, Adams MJ, Benko M, Breitbart M, Brister JR, Carstens EB, et al. Consensus statement: Virus taxonomy in the age of metagenomics. *Nature reviews Microbiology*. 2017;15(3):161-8.
119. Suttle CA. Viruses: unlocking the greatest biodiversity on Earth. *Genome*. 2013;56(10):542-4.
120. Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *The Journal of general virology*. 1978;40(3):531-44.
121. Ammerman NC, Beier-Sexton M, Azad AF. Growth and maintenance of Vero cell lines. *Current protocols in microbiology*. 2008;Appendix 4:Appendix 4E.
122. Bonvicino CR, Oliveira JA, D'Andrea PS. Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. 1st ed. Rio de Janeiro, Brazil: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa-Pan-American Health Organization//World Health Organization; 2008. 120 p.
123. Sikes RS, Gannon WL. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy* 2011;92(1).
124. Chevreux B, Pfisterer T, Drescher B, Driesel AJ, Muller WE, Wetter T, et al. Using the miraEST assembler for reliable and automated mRNA transcript assembly and SNP detection in sequenced ESTs. *Genome research*. 2004;14(6):1147-59.
125. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*. 1990;215(3):403-10.
126. Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*. 2011;27(6):863-4.

127. Schmieder R, Lim YW, Edwards R. Identification and removal of ribosomal RNA sequences from metatranscriptomes. *Bioinformatics*. 2012;28(3):433-5.
128. Buchfink B, Xie C, Huson DH. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature methods*. 2015;12(1):59-60.
129. Peng Y, Leung HC, Yiu SM, Chin FY. IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics*. 2012;28(11):1420-8.
130. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology*. 2012;19(5):455-77.
131. Soto-Jimenez LM, Estrada K, Sanchez-Flores A. GARM: genome assembly, reconciliation and merging pipeline. *Current topics in medicinal chemistry*. 2014;14(3):418-24.
132. Ondov BD, Bergman NH, Phillippy AM. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC bioinformatics*. 2011;12:385.
133. Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, et al. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic acids research*. 2015;43(Database issue):D222-6.
134. Tsirigos KD, Peters C, Shu N, Kall L, Elofsson A. The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. *Nucleic acids research*. 2015;43(W1):W401-7.
135. Xia X, Xie Z. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *The Journal of heredity*. 2001;92(4):371-3.
136. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*. 2013;30(4):772-80.
137. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*. 2004;32(5):1792-7.
138. Wernersson R, Pedersen AG. RevTrans: Multiple alignment of coding DNA from aligned amino acid sequences. *Nucleic acids research*. 2003;31(13):3537-9.
139. Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular biology and evolution*. 2008;25(7):1253-6.

140. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*. 2011;27(8):1164-5.
141. Anisimova M, Gascuel O. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Systematic biology*. 2006;55(4):539-52.
142. Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular biology and evolution*. 2015;32(1):268-74.
143. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology*. 2010;59(3):307-21.
144. Stamatakis A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*. 2006;22(21):2688-90.
145. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*. 2013;30(12):2725-9.
146. Muhire BM, Varsani A, Martin DP. SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PloS one*. 2014;9(9):e108277.
147. Martin DP, Murrell B, Golden M, Khoosal A, Muhire B. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution*. 2015;1:5.
148. Gifford RJ, Blanco-Melo D, Zhu H, Dennis T, Singer J, Hughes J, et al. The DIGS Tool: Genomic beachcombing using BLAST and a relational database. <http://giffordlabcvr.github.io/DIGS-tool/2016> [cited 2016 26 Sep 2016].
149. Matsuno K, Weisend C, Travassos da Rosa AP, Anzick SL, Dahlstrom E, Porcella SF, et al. Characterization of the Bhanja serogroup viruses (Bunyaviridae): a novel species of the genus Phlebovirus and its relationship with other emerging tick-borne phleboviruses. *Journal of virology*. 2013;87(7):3719-28.
150. Kuhn JH, Wiley MR, Rodriguez SE, Bao Y, Prieto K, Travassos da Rosa AP, et al. Genomic Characterization of the Genus Nairovirus (Family Bunyaviridae). *Viruses*. 2016;8(6).
151. Nishiyama S, Dutia BM, Stewart JP, Meredith AL, Shaw DJ, Simmonds P, et al. Identification of novel anelloviruses with broad diversity in UK rodents. *The Journal of general virology*. 2014;95(Pt 7):1544-53.
152. Shi C, Liu Y, Hu X, Xiong J, Zhang B, Yuan Z. A metagenomic survey of viral abundance and diversity in mosquitoes from Hubei province. *PloS one*. 2015;10(6):e0129845.

153. Cibulski SP, Teixeira TF, de Sales Lima FE, do Santos HF, Franco AC, Roehe PM. A Novel Anelloviridae Species Detected in *Tadarida brasiliensis* Bats: First Sequence of a Chiropteran Anellovirus. *Genome announcements*. 2014;2(5).
154. Reguera J, Weber F, Cusack S. Bunyaviridae RNA polymerases (L-protein) have an N-terminal, influenza-like endonuclease domain, essential for viral cap-dependent transcription. *PLoS pathogens*. 2010;6(9):e1001101.
155. Elliott RM. Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights. *Nature reviews Microbiology*. 2014;12(10):673-85.
156. Shi X, Kohl A, Leonard VH, Li P, McLees A, Elliott RM. Requirement of the N-terminal region of orthobunyavirus nonstructural protein NSm for virus assembly and morphogenesis. *Journal of virology*. 2006;80(16):8089-99.
157. Pollitt E, Zhao J, Muscat P, Elliott RM. Characterization of Maguari orthobunyavirus mutants suggests the nonstructural protein NSm is not essential for growth in tissue culture. *Virology*. 2006;348(1):224-32.
158. Kraatz F, Wernike K, Hechinger S, König P, Granzow H, Reimann I, et al. Deletion mutants of Schmallenberg virus are avirulent and protect from virus challenge. *Journal of virology*. 2015;89(3):1825-37.
159. Tilston-Lunel NL, Acrani GO, Randall RE, Elliott RM. Generation of Recombinant Oropouche Viruses Lacking the Nonstructural Protein NSm or NSs. *Journal of virology*. 2015;90(5):2616-27.
160. Dong H, Li P, Elliott RM, Dong C. Structure of Schmallenberg orthobunyavirus nucleoprotein suggests a novel mechanism of genome encapsidation. *Journal of virology*. 2013;87(10):5593-601.
161. Leonard VH, Kohl A, Hart TJ, Elliott RM. Interaction of Bunyamwera Orthobunyavirus NSs protein with mediator protein MED8: a mechanism for inhibiting the interferon response. *Journal of virology*. 2006;80(19):9667-75.
162. Forshey BM, Castillo RM, Hang J. Group C orthobunyavirus genomic sequences require validation. *Journal of virology*. 2014;88(5):3052-3.
163. Hang J, Forshey BM, Yang Y, Solorzano VF, Kuschner RA, Halsey ES, et al. Genomic characterization of group C Orthobunyavirus reference strains and recent South American clinical isolates. *PloS one*. 2014;9(3):e92114.
164. Lanciotti RS, Kosoy OI, Bosco-Lauth AM, Pohl J, Stuchlik O, Reed M, et al. Isolation of a novel orthobunyavirus (Brazoran virus) with a 1.7 kb S segment that encodes a unique

nucleocapsid protein possessing two putative functional domains. *Virology*. 2013;444(1-2):55-63.

165. Gouzil J, Fablet A, Lara E, Caignard G, Cochet M, Kundlacz C, et al. The nonstructural protein NSs of Schmallenberg virus is targeted to the nucleolus and induces nucleolar disorganization. *Journal of virology*. 2016.

166. Causey OR, Causey CE, Maroja OM, Macedo DG. The isolation of arthropod-borne viruses, including members of two hitherto undescribed serological groups, in the Amazon region of Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1961;10:227-49.

167. Calisher CH, Coimbra TL, Lopez Ode S, Muth DJ, Sacchetta Lde A, Francy DB, et al. Identification of new Guama and Group C serogroup bunyaviruses and an ungrouped virus from Southern Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1983;32(2):424-31.

168. Calisher CH, Gutierrez E, Francy DB, Alava A, Muth DJ, Laznick JS. Identification of hitherto unrecognized arboviruses from Ecuador: members of serogroups B, C, Bunyamwera, Patois, and Minatitlan. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1983;32(4):877-85.

169. Casals J, Whitman L. Group C, a new serological group of hitherto undescribed arthropod-borne viruses. *Immunological studies*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1961;10:250-8.

170. Nunes MR, Travassos da Rosa AP, Weaver SC, Tesh RB, Vasconcelos PF. Molecular epidemiology of group C viruses (Bunyaviridae, Orthobunyavirus) isolated in the Americas. *Journal of virology*. 2005;79(16):10561-70.

171. Palacios G, Tesh R, Travassos da Rosa A, Savji N, Sze W, Jain K, et al. Characterization of the Candiru antigenic complex (Bunyaviridae: Phlebovirus), a highly diverse and reassorting group of viruses affecting humans in tropical America. *Journal of virology*. 2011;85(8):3811-20.

172. Scherer WF, Madalenoitia J, Flores W, Acosta M. The first isolations of eastern encephalitis, group C, and Guama group arboviruses from the Peruvian Amazon region of western South America. *Bulletin of the Pan American Health Organization*. 1975;9(1):19-26.

173. Shchetinin AM, Lvov DK, Deriabin PG, Botikov AG, Gitelman AK, Kuhn JH, et al. Genetic and Phylogenetic Characterization of Tataguine and Witwatersrand Viruses and Other Orthobunyaviruses of the Anopheles A, Capim, Guama, Koongol, Mapputta, Tete, and Turlock Serogroups. *Viruses*. 2015;7(11):5987-6008.

174. Doherty RL, Carley JG, Mackerras MJ, Marks EN. Studies of arthropod-borne virus infections in Queensland. III. Isolation and characterization of virus strains from wild-caught mosquitoes in North Queensland. *The Australian journal of experimental biology and medical science*. 1963;41:17-39.
175. Doherty RL, Wetters EJ, Gorman BM, Whitehead RH. Arbovirus infection in Western Queensland: serological studies, 1963-1969. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1970;64(5):740-7.
176. Sanderson CJ. A serologic survey of Queensland cattle for evidence of arbovirus infections. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1969;18(3):433-9.
177. Beaty BJ, Bishop DH. Bunyavirus-vector interactions. *Virus research*. 1988;10(4):289-301.
178. Calisher CH. History, Classification, and Taxonomy of viruses in the Family Bunyaviridae. In: Elliott RM, editor. *The Bunyaviridae*. New York: Plenum Press; 1996. p. 1-18.
179. Scherer WF, Anderson K, Dickerman RW, Ordonez JV. Studies of Patois group arboviruses in Mexico, Guatemala, Honduras, and British Honduras. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1972;21(2):194-200.
180. Srihongse S, Shope RE. The Patois group of arboviruses. *Acta virologica*. 1968;12(5):453-6.
181. Zarate ML, Geiger RH, Shope RE, Scherer WF. Intergroup antigenic relationships among Arboviruses manifested by a Mexican strain of Patois virus and viruses of the Bunyamwera, C, California, Capim and Guama groups. *American journal of epidemiology*. 1968;88(2):273-86.
182. Mohamed M, McLees A, Elliott RM. Viruses in the Anopheles A, Anopheles B, and Tete serogroups in the Orthobunyavirus genus (family Bunyaviridae) do not encode an NSs protein. *Journal of virology*. 2009;83(15):7612-8.
183. Vasconcelos PFC, Travassos Da Rosa APA, DeGallier N, Travassos Da Rosa JFS, Pinheiro FP. Clinical and epidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazonia. *Ciência e Cultura*. 1992;44(2):117-24.
184. Briese T, Calisher CH, Higgs S. Viruses of the family Bunyaviridae: are all available isolates reassortants? *Virology*. 2013;446(1-2):207-16.
185. Goller KV, Hoper D, Schirrmeyer H, Mettenleiter TC, Beer M. Schmollenberg virus as possible ancestor of Shamonda virus. *Emerging infectious diseases*. 2012;18(10):1644-6.

186. Yanase T, Kato T, Aizawa M, Shuto Y, Shirafuji H, Yamakawa M, et al. Genetic reassortment between Sathuperi and Shamonda viruses of the genus Orthobunyavirus in nature: implications for their genetic relationship to Schmallerberg virus. *Archives of virology*. 2012;157(8):1611-6.
187. Aguilar PV, Barrett AD, Saeed MF, Watts DM, Russell K, Guevara C, et al. Iquitos virus: a novel reassortant Orthobunyavirus associated with human illness in Peru. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5(9):e1315.
188. de Brito Magalhaes CL, Drumond BP, Novaes RF, Quinan BR, de Magalhaes JC, dos Santos JR, et al. Identification of a phylogenetically distinct orthobunyavirus from group C. *Archives of virology*. 2011;156(7):1173-84.
189. Hontz RD, Guevara C, Halsey ES, Silvas J, Santiago FW, Widen SG, et al. Itaya virus, a Novel Orthobunyavirus Associated with Human Febrile Illness, Peru. *Emerging infectious diseases*. 2015;21(5):781-8.
190. Eastwood G, Loaiza JR, Pongsiri MJ, Sanjur OI, Pecor JE, Auguste AJ, et al. Enzootic Arbovirus Surveillance in Forest Habitat and Phylogenetic Characterization of Novel Isolates of Gamboa Virus in Panama. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2016;94(4):786-93.
191. Palacios G, Savji N, Travassos da Rosa A, Guzman H, Yu X, Desai A, et al. Characterization of the Uukuniemi virus group (Phlebovirus: Bunyaviridae): evidence for seven distinct species. *Journal of virology*. 2013;87(6):3187-95.
192. Palacios G, da Rosa AT, Savji N, Sze W, Wick I, Guzman H, et al. Aguacate virus, a new antigenic complex of the genus Phlebovirus (family Bunyaviridae). *The Journal of general virology*. 2011;92(Pt 6):1445-53.
193. Tesh RB. The genus Phlebovirus and its vectors. *Annual review of entomology*. 1988;33:169-81.
194. Srihongse S, Johnson CM. Human infections with Chagres virus in Panama. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1974;23(4):690-3.
195. Peralta PH, Shelokov A, Brody JA. Chagres Virus: A New Human Isolate from Panama. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1965;14:146-51.
196. Bichaud L, Dachraoui K, Alwassouf S, Alkan C, Mensi M, Piorkowski G, et al. Isolation, full genomic characterization and neutralization-based human seroprevalence of Medjerda Valley virus, a novel sandfly-borne phlebovirus belonging to the Salehabad virus complex in northern Tunisia. *The Journal of general virology*. 2016;97(3):602-10.

197. Briele T, Alkhovsky S, Beer M, Calisher CH, Charrel R, Ebihara H, et al. Implementation of non-Latinized binomial species names in the family Bunyaviridae. International Committee on Taxonomy of Viruses 2015 Contract No.: 2015.003aM.
198. Honig JE, Osborne JC, Nichol ST. The high genetic variation of viruses of the genus Nairovirus reflects the diversity of their predominant tick hosts. *Virology*. 2004;318(1):10-6.
199. Bente DA, Forrester NL, Watts DM, McAuley AJ, Whitehouse CA, Bray M. Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral research*. 2013;100(1):159-89.
200. Walker PJ, Widen SG, Firth C, Blasdel KR, Wood TG, Travassos da Rosa AP, et al. Genomic Characterization of Yogue, Kasokero, Issyk-Kul, Keterah, Gossas, and Thiafora Viruses: Nairoviruses Naturally Infecting Bats, Shrews, and Ticks. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2015;93(5):1041-51.
201. Walker PJ, Widen SG, Wood TG, Guzman H, Tesh RB, Vasilakis N. A Global Genomic Characterization of Nairoviruses Identifies Nine Discrete Genogroups with Distinctive Structural Characteristics and Host-Vector Associations. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2016;94(5):1107-22.
202. Kohls GM, Sonenshine DE, Clifford CM. The systematics of the subfamily Ornithodorinae (Acarina: Argasidae). II. Identification of the larvae of the Western Hemisphere and descriptions of three new species. *Annals of the Entomological Society of America*. 1965;58(3):331-64.
203. Converse JD, Hoogstraal H, Moussa MI, Feare CJ, Kaiser MN. Soldado virus (Hughes group) from *Ornithodoros (Alectorobius) capensis* (Ixodoidea: Argasidae) infesting Sooty Tern colonies in the Seychelles, Indian Ocean. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1975;24(6 Pt 1):1010-8.
204. Varma MG, Bowen ET, Simpson DI, Casals J. Zirga virus, a new arbovirus isolated from bird-infesting ticks. *Nature*. 1973;244(5416):452.
205. Lichty BD, Power AT, Stojdl DF, Bell JC. Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *Trends in molecular medicine*. 2004;10(5):210-6.
206. Figueiredo LT, da Rosa AP, Fiorillo AM. [Prevalence of neutralizing antibodies to Pirý arbovirus in subjects of the region of Ribeirão Preto, State of São Paulo]. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1985;27(3):157-61.
207. Tavares-Neto J, Travassos da Rosa AP, Ataíde M, Morais-Souza H, Vasconcelos P, Travassos da Rosa J. [Frequency of neutralizing antibodies to the vesiculovirus Pirý, in blood

- donors of Uberaba, Minas Gerais, Brazil]. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1990;32(3):211-4.
208. Pinheiro FP, Bensabath G, Andrade AH, Lins ZC, Fraiha H, Tang AT, et al. Infectious diseases along Brazil's trans-amazon highway: surveillance and research. *Bulletin of the Pan American Health Organization*. 1974;8(2):111-22.
 209. Wilks CR, House JA. Susceptibility of various animals to the vesiculovirus Piry. *The Journal of hygiene*. 1984;93(1):147-55.
 210. de Sousa AA, Reis R, Bento-Torres J, Trevia N, Lins NA, Passos A, et al. Influence of enriched environment on viral encephalitis outcomes: behavioral and neuropathological changes in albino Swiss mice. *PloS one*. 2011;6(1):e15597.
 211. Brun G, Bao X, Prevec L. The relationship of Piry virus to other vesiculoviruses: a re-evaluation based on the glycoprotein gene sequence. *Intervirology*. 1995;38(5):274-82.
 212. Nichol ST, Holland JJ. Genome RNA terminus conservation and diversity among vesiculoviruses. *J Virol*. 1987;61(1):200-5.
 213. Clerc Y, Rodhain F, Digoutte JP, Tesh R, Heme G, Coulanges P. [The Perinet virus, rhabdoviridae, of the vesiculovirus type isolated in Madagascar from Culicidae]. *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar*. 1982;49(1):119-29.
 214. Marriott AC. Complete genome sequences of Chandipura and Isfahan vesiculoviruses. *Archives of virology*. 2005;150(4):671-80.
 215. Cherian SS, Gunjekar RS, Banerjee A, Kumar S, Arankalle VA. Whole genomes of Chandipura virus isolates and comparative analysis with other rhabdoviruses. *PloS one*. 2012;7(1):e30315.
 216. Vasilakis N, Widen S, Travassos da Rosa AP, Wood TG, Walker PJ, Holmes EC, et al. Malpais spring virus is a new species in the genus vesiculovirus. *Virology journal*. 2013;10:69.
 217. Tesh R, Saidi S, Javadian E, Loh P, Nadim A. Isfahan virus, a new vesiculovirus infecting humans, gerbils, and sandflies in Iran. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1977;26(2):299-306.
 218. Walker PJ, Firth C, Widen SG, Blasdel KR, Guzman H, Wood TG, et al. Evolution of genome size and complexity in the rhabdoviridae. *PLoS pathogens*. 2015;11(2):e1004664.
 219. Liniger M, Zuniga A, Naim HY. Use of viral vectors for the development of vaccines. *Expert review of vaccines*. 2007;6(2):255-66.
 220. Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Chiorini JA, Mukha DV, Pintel DJ, Qiu J, et al. The family Parvoviridae. *Archives of virology*. 2014;159(5):1239-47.

221. Yang S, Liu Z, Wang Y, Li W, Fu X, Lin Y, et al. A novel rodent Chapparravirus in feces of wild rats. *Virology journal*. 2016;13:133.
222. Kivovich V, Gilbert L, Vuento M, Naides SJ. The putative metal coordination motif in the endonuclease domain of human Parvovirus B19 NS1 is critical for NS1 induced S phase arrest and DNA damage. *International journal of biological sciences*. 2012;8(1):79-92.
223. Walker SL, Wonderling RS, Owens RA. Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 Rep68 protein helicase motifs. *Journal of virology*. 1997;71(9):6996-7004.
224. Bonami JR, Mari J, Poulos BT, Lightner DV. Characterization of hepatopancreatic parvo-like virus, a second unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps. *The Journal of general virology*. 1995;76 (Pt 4):813-7.
225. Hewson I, Button JB, Gudenkauf BM, Miner B, Newton AL, Gaydos JK, et al. Densovirus associated with sea-star wasting disease and mass mortality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(48):17278-83.
226. La Fauce KA, Elliman J, Owens L. Molecular characterisation of hepatopancreatic parvovirus (PmergDNV) from Australian *Penaeus merguensis*. *Virology*. 2007;362(2):397-403.
227. Arriagada G, Gifford RJ. Parvovirus-derived endogenous viral elements in two South American rodent genomes. *Journal of virology*. 2014;88(20):12158-62.
228. Katzourakis A, Gifford RJ. Endogenous viral elements in animal genomes. *PLoS genetics*. 2010;6(11):e1001191.
229. Liu H, Fu Y, Xie J, Cheng J, Ghabrial SA, Li G, et al. Widespread endogenization of densoviruses and parvoviruses in animal and human genomes. *Journal of virology*. 2011;85(19):9863-76.
230. Kailasan S, Agbandje-McKenna M, Parrish CR. Parvovirus Family Conundrum: What Makes a Killer? *Annual review of virology*. 2015;2(1):425-50.
231. Flegel TW. Hypothesis for heritable, anti-viral immunity in crustaceans and insects. *Biology direct*. 2009;4:32.
232. Clavijo G, van Munster M, Monsion B, Bochet N, Brault V. Transcription of densovirus endogenous sequences in the *Myzus persicae* genome. *The Journal of general virology*. 2016;97(4):1000-9.
233. Biagini P, Study-Group A-C. Anelloviridae family: International Committee on Taxonomy of Viruses; 2017 [cited 2017 20 Apr 2017].

234. Spandole S, Cimponeriu D, Berca LM, Mihaescu G. Human anelloviruses: an update of molecular, epidemiological and clinical aspects. *Archives of virology*. 2015;160(4):893-908.
235. Garcia-Alvarez M, Berenguer J, Alvarez E, Guzman-Fulgencio M, Cosin J, Miralles P, et al. Association of torque teno virus (TTV) and torque teno mini virus (TTMV) with liver disease among patients coinfecting with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2013;32(2):289-97.
236. Mancuso R, Saresella M, Hernis A, Agostini S, Piancone F, Caputo D, et al. Torque teno virus (TTV) in multiple sclerosis patients with different patterns of disease. *Journal of medical virology*. 2013;85(12):2176-83.
237. Masouridi-Levrat S, Pradier A, Simonetta F, Kaiser L, Chalandon Y, Roosnek E. Torque teno virus in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Bone marrow transplantation*. 2016;51(3):440-2.
238. Tyschik EA, Shcherbakova SM, Ibragimov RR, Rebrikov DV. Transplacental transmission of torque teno virus. *Virology journal*. 2017;14(1):92.
239. Hrazdilova K, Slaninkova E, Brozova K, Modry D, Vodicka R, Celer V. New species of Torque Teno miniviruses infecting gorillas and chimpanzees. *Virology*. 2016;487:207-14.
240. Okamoto H. TT viruses in animals. *Current topics in microbiology and immunology*. 2009;331:35-52.
241. Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Tawara A, Fukai K, Muramatsu U, et al. Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia. *The Journal of general virology*. 2002;83(Pt 6):1291-7.
242. Manzin A, Mallus F, Macera L, Maggi F, Blois S. Global impact of Torque teno virus infection in wild and domesticated animals. *Journal of infection in developing countries*. 2015;9(6):562-70.
243. Paran N, Ori A, Haviv I, Shaul Y. A composite polyadenylation signal with TATA box function. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(3):834-41.
244. Martinez-Guino L, Ballester M, Segales J, Kekarainen T. Expression profile and subcellular localization of Torque teno sus virus proteins. *The Journal of general virology*. 2011;92(Pt 10):2446-57.

245. Zheng H, Ye L, Fang X, Li B, Wang Y, Xiang X, et al. Torque teno virus (SANBAN isolate) ORF2 protein suppresses NF-kappaB pathways via interaction with IkappaB kinases. *Journal of virology*. 2007;81(21):11917-24.
246. Asabe S, Nishizawa T, Iwanari H, Okamoto H. Phosphorylation of serine-rich protein encoded by open reading frame 3 of the TT virus genome. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;286(2):298-304.
247. Okamoto H, Nishizawa T, Takahashi M, Tawara A, Peng Y, Kishimoto J, et al. Genomic and evolutionary characterization of TT virus (TTV) in tupaia and comparison with species-specific TTVs in humans and non-human primates. *The Journal of general virology*. 2001;82(Pt 9):2041-50.
248. Parada A, D'Elia G, Palma RE. The influence of ecological and geographical context in the radiation of Neotropical sigmodontine rodents. *BMC evolutionary biology*. 2015;15:172.
249. Ng TF, Wheeler E, Greig D, Waltzek TB, Gulland F, Breitbart M. Metagenomic identification of a novel anellovirus in Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsii*) lung samples and its detection in samples from multiple years. *The Journal of general virology*. 2011;92(Pt 6):1318-23.
250. Pocock MJO, Searle JB, White PCL. Adaptations of animals to commensal habitats: population dynamics of house mice *Mus musculus domesticus* on farms. *Journal of Animal Ecology*. 2004;73:878-88.
251. Brook CE, Dobson AP. Bats as 'special' reservoirs for emerging zoonotic pathogens. *Trends in microbiology*. 2015;23(3):172-80.
252. Doceul V, Bagdassarian E, Demange A, Pavio N. Zoonotic Hepatitis E Virus: Classification, Animal Reservoirs and Transmission Routes. *Viruses*. 2016;8(10).
253. Smith DB, Simmonds P, International Committee on Taxonomy of Viruses Hepeviridae Study G, Jameel S, Emerson SU, Harrison TJ, et al. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *The Journal of general virology*. 2014;95(Pt 10):2223-32.
254. Lack JB, Volk K, Van Den Bussche RA. Hepatitis E virus genotype 3 in wild rats, United States. *Emerging infectious diseases*. 2012;18(8):1268-73.
255. Li TC, Ami Y, Suzaki Y, Yasuda SP, Yoshimatsu K, Arikawa J, et al. Characterization of full genome of rat hepatitis E virus strain from Vietnam. *Emerging infectious diseases*. 2013;19(1):115-8.

256. Purcell RH, Engle RE, Rood MP, Kabrane-Lazizi Y, Nguyen HT, Govindarajan S, et al. Hepatitis E virus in rats, Los Angeles, California, USA. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(12):2216-22.
257. Reuter G, Boros A, Matics R, Kapusinszky B, Delwart E, Pankovics P. Divergent hepatitis E virus in birds of prey, common kestrel (*Falco tinnunculus*) and red-footed falcon (*F. vespertinus*), Hungary. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2016;43:343-6.
258. Li H, Zhu R, She R, Zhang C, Shi R, Li W, et al. Case Report Associated with Aspergillosis and Hepatitis E Virus Coinfection in Himalayan Griffons. *BioMed research international*. 2015;2015:287315.