CARLA MENEGUIN BARBOSA

**CORONAVÍRUS EM AVES SILVESTRES E DOMÉSTICAS
PROVENIENTES DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
Graduação Interunidades em Biotecnologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo para obtenção do Título de Mestre
em Biotecnologia

São Paulo
2015

CARLA MENEGUIN BARBOSA

**CORONAVÍRUS EM AVES SILVESTRES E DOMÉSTICAS
PROVENIENTES DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
Graduação Interunidades em Biotecnologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo para obtenção do Título de Mestre
em Biotecnologia.

Área de concentração: Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Edison Luiz Durigon.

Versão original.

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Barbosa, Carla Meneguim.

Coronavírus em aves silvestres e domésticas provenientes de diferentes regiões do Brasil / Carla Meneguim Barbosa. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Edison Luiz Durigon.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Vírus emergentes em animais silvestres.

Versão do título para o inglês: Coronavirus in wild and domestic birds from different regions of Brazil.

1. Coronavírus 2. Aves silvestres 3. Aves domésticas 4. Aves migratórias 5. Biologia molecular 6. Brasil I. Durigon, Prof. Dr. Edison Luiz II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0125/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Carla Meneguim Barbosa.

Título da Dissertação: Coronavírus em aves silvestres e domésticas provenientes de diferentes regiões do Brasil.

Orientador(a): Prof. Dr. Edison Luiz Durigon.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
---	--

Decl. CEUA.119/2013.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 105/09/CEUA, datado de 13.08.09, prorrogado a validade até 13.08.15 e por solicitação do Prof. Dr. **Edison Luiz Durigon**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Carla Meneguim Barbosa** ao Projeto de Pesquisa "*Monitoramento de aves silvestres e eqüinos do vírus da febre do oeste no Nilo no Brasil pela técnica de real-time PCR*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 31 de outubro de 2013.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

Coordenador da CEUA

ICB/USP

Dedico este trabalho...

... Aos meus pais e ao meu irmão, pela paciência e suporte.

...Ao meu avô Gildo, que mesmo sem jamais ter frequentado uma universidade, foi o melhor mestre que alguém poderia ser.

... À minha avó Izabel, por me fornecer um porto seguro nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Obrigada aos meus pais pelo suporte em todos esses anos, desejo ser merecedora do esforço dedicado por vocês em todos os aspectos, especialmente quanto à minha formação.

Agradeço ao meu irmão Daniel e ao Vitor pelo companheirismo, compreensão e colaboração especialmente nessa fase tão importante. Amo vocês!

Agradeço ao meu avô Gildo por me ensinar o valor do trabalho e do estudo. O senhor me incentivou e inspirou a entrar nessa jornada, foi uma honra conviver contigo, General! Onde quer que esteja, sei que está muito orgulhoso agora.

À minha avó Izabel, agradeço pelas palavras de incentivo e por me transmitir calma e confiança quando mais precisei.

Obrigada ao meu querido orientador Edison Durigon, responsável por este trabalho, serei eternamente grata pela paciência e pela oportunidade de convívio e aprendizado. Desejo um dia poder contribuir à ciência com a mesma integridade, humildade e entusiasmo que o senhor demonstra. Muito obrigada!!!

Obrigada aos meus colegas de laboratório Jansen e Tati que tiveram a árdua tarefa de treinar esta inexperiente e distraída veterinária para um trabalho de tanta responsabilidade e ainda o fizeram com tamanho carinho e paciência. Luciano, Dani Bruna, Dani Araújo, Angélica, Gustavo, Vivi, Silvana, Thais, Flávio, Andressa e Mariana, obrigada pela ajuda e suporte de vocês. Enfim obrigada por tudo pessoal, sem vocês nada disso seria possível.

Ao professor Fábio Gregori, obrigada pela indicação que foi o início de tudo e pela atenção nas correções feitas na qualificação, espero ter correspondido às suas expectativas!

Agradeço ainda ao professor Paulo Brandão que abriu as portas de seu laboratório para que uma parte desta pesquisa fosse realizada e que gentilmente nos cedeu os controles positivos.

Ao CEMAVE e ao DEPAVE por auxiliar na aquisição na obtenção das amostras.

À CAPES pelo suporte financeiro.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é
senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor
se lhe faltasse uma gota”.*

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

BARBOSA, C. M. **Coronavírus em aves silvestres e domésticas provenientes de diferentes regiões do Brasil**. 2015 f.62 Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Devido ao seu mecanismo único de replicação, os CoVs têm uma tendência a sofrer recombinações e mutações, o que permite que se adaptem constantemente a novos hospedeiros e nichos ecológicos (WOO et al., 2012), podendo inclusive passar a acometer o homem, a exemplo do ocorrido com os Coronavírus causadores da Síndrome Respiratória Aguda Severa (SARS) e da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS) (CHAN et al., 2013). Apesar de ainda não terem sido relatados Coronavírus aviários com potencial zoonótico, espécies de aves silvestres e domésticas podem portar CoVs de grande importância econômica como o Vírus da Bronquite Infecciosa (IBV) que causa lesões em trato gastrointestinal, respiratório, urinário e reprodutor, levando a taxas de mortalidade de cerca de 30% e quedas bruscas na produção de ovos (CAVANNAGH, 2007). Além disso, nos últimos anos, diversos novos CoVs geneticamente distintos do IBV vêm sendo identificados em diferentes famílias de aves e mamíferos silvestres e domésticos. O Brasil contém 18% do total da diversidade de espécies de aves no mundo (CBRO 2011; <http://www.cbro.org.br>) e o maior número de espécies ameaçadas de extinção (DEVELEY; GOERCK, 2009), no entanto, estudos sobre a presença de Coronavírus em aves silvestres ainda são bastante escassos. O presente estudo tem por objetivo realizar análise retrospectiva da presença de Coronavírus em swabs traqueais e cloacais de aves silvestres e domésticas provenientes de diferentes regiões brasileiras, coletadas entre os anos de 2004 e 2013; realizar a caracterização molecular dos vírus encontrados, através do sequenciamento parcial do gene da RNA polimerase RNA dependente (RpRd) nas amostras positivas e análise filogenética afim de correlacionar a epidemiologia dos vírus encontrados às rotas de migrações de aves e à proximidade das regiões urbanas e de granjas avícolas, verificando a possibilidade de transmissão. Para isso, as amostras foram submetidas a extração de RNA total seguida das reações de Transcrição Reversa (RT), Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Nested-PCR, com primers que têm como alvo o gene da RpRd, e os resultados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose. As amostras positivas foram purificadas e sequenciadas. Uma vez que o gene da proteína S dos Coronavírus é bastante variável entre os diferentes grupos, somente as amostras que apresentaram *Gammacoronavírus* foram submetidas a protocolos similares com primers que têm como alvo regiões gene da proteína S do IBV. Do total de 746 amostras testadas, 25 apresentaram resultados positivos para

os Coronavírus na PCR e Nested-PCR com primers para o gene da RpRd e foram sequenciadas. Obtivemos sucesso no sequenciamento de 7 dessas amostras, sendo 4 positivas para *Gammacoronavírus* e 3 positivas para *Deltacoronavírus*. Na tentativa de sequenciamento da proteína S dos 4 *Gammacoronavírus* encontrados, obtivemos sucesso na amostra proveniente de uma galinha (*Gallus gallus*), coletada na Ilha de Marajó-PA. Essa amostra mostrou sequência sendo identificada como uma cepa de IBV próxima a cepas detectadas anteriormente no Brasil. Este trabalho é inédito no Brasil, pois demonstra a presença de *Gamma* e *Deltacoronavírus* aviários circulando em diversas regiões do país, próximo a regiões urbanas e de indústrias avícolas, mostrando evidências de que aves silvestres podem carrear estes Coronavírus entre diferentes sítios migratórios no Brasil.

Palavras-chave: Coronavírus. Aves silvestres. Aves domésticas. Aves migratórias. Biologia molecular. Brasil.

ABSTRACT

BARBOSA, C. M. **Coronavirus in wild and domestic birds from different regions of Brazil**. 2015 p. 62 Masters thesis (Biotechnology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Because of its unique replication mechanism, Coronaviruses (CoVs) tend to suffer recombinations and mutations, allowing them to constantly adapt to new hosts and ecological niches (Woo et al., 2012), and may even come to affect humans, like the Coronavirus causing Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) and the Middle East Respiratory Syndrome (MERS) (Chan et al., 2013). Regardless it has never been reported any avian Coronavirus with zoonotic potential, species of both wild and domestic birds can carry CoVs of great economic importance as the Infectious Bronchitis Virus (IBV) that causes lesions in the gastrointestinal, respiratory, urinary and reproductive systems, leading to mortality rates of around 30% and sudden drops in egg production (CAVANNAGH, 2007). Furthermore, recently, many new CoVs, genetically distinct from IBV have been identified in different families of wild and domestic birds and mammals. Even though Brazil contains 18% of the bird species diversity in the world (CBRO 2011; <http://www.cbro.org.br>) and the largest number of endangered species (DEVELEY; Goerck, 2009), studies about the presence of Coronaviruses in wild birds are still quite scarce. This study aims to perform a retrospective analysis of the presence of Coronaviruses in tracheal and cloacal swabs of wild and domestic birds from different regions of Brazil, collected between 2004 and 2013; characterize the viruses found, by partial sequencing of the gene of the RNA-dependent RNA polymerase (RpRd) in positive samples and accomplish the molecular characterization of found viruses, by partial sequencing of the gene RpRd in positive samples and phylogenetic analysis, in order to correlate the epidemiology of the virus found the bird migration routes and the proximity of urban and poultry regions, verifying the possibility transmission to humans and animals. Thereunto, the samples were subjected to total RNA extraction followed by Reverse Transcription (RT), Polymerase Chain Reaction (PCR) and Nested-PCR reactions with primers that target the RpRd gene and the results were visualized by agarose gel electrophoresis. Positive samples were purified and sequenced. Once Coronaviruses S protein gene are too much variable between different groups, only positive samples for the *Gammacoronavirus* group were also subjected to similar protocols with primers that target two regions of the IBV's S protein gene. Of the amount of 746 samples tested, 25 were positive for Coronavirus in PCR and nested PCR tests with primers for RpRd gene and were sequenced. We have succeeded in sequencing 7 of these samples which 4 were

positive for *Gammacoronavirus* and 3 for *Deltacoronavirus*. In attempt of sequencing the S protein gene, of the 4 *Gammacoronavirus* found, we have succeeded in a chicken sample (*Gallus gallus*) collected in Ilha de Marajó-PA. This sample showed sequence being identified as a strain of IBV, closely related to strains previously detected in Brazil. This work is unprecedented in Brazil, as demonstrates the presence of *Gamma* and *Deltacoronavirus* in birds circulating in different regions of the country, close to urban areas and poultry industries, showing evidence that wild birds may carry these Coronavirus between different migratory sites in Brazil.

Keywords: Coronavirus. Wild birds. Domestic birds. Migratory birds. Molecular biology. Brazil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática da nucleoproteína N e sua ligação ao RNA (A), da proteína de envelope E e da proteína de membrana M (B).....	24
Figura 2 - Representação esquemática da Proteína <i>Spike</i>	25
Figura 3 - Representação de um Coronavírus e suas proteínas estruturais.....	26
Figura 4 - Síntese e processamento das poliproteínas pp1a e pp1ab produzidas a partir do ORF1.....	27
Figura 5 - Estrutura do genoma dos Coronavírus.....	27
Figura 6 -Representação do ciclo de vida dos Coronavírus.....	29
Figura 7 - Modelo de evolução dos Coronavírus onde os morcegos seriam a fonte de genes do Alphacoronavírus e Betacoronavírus e as aves a fonte de genes dos Gammacoronavírus e Deltacoronavírus.....	29
Figura 8 - Exemplos de transmissão de Coronavírus entre hospedeiros não relacionados....	31
Figura 9 - Oito maiores rotas migratórias de aves aquáticas.....	34
Figura 10 - Quatro principais rotas migratórias de aves pelo Brasil.....	36
Figura 11 - Principais estados produtores de frangos de corte no Brasil.....	38
Figura 12 -Principais estados produtores de ovos de galinha no Brasil.....	39
Figura 13 - Sequência dos primers utilizados para as reações de PCR e Nested-PCR, que têm como alvo o gene da RpRd.....	43
Figura 14 - Árvore filogenética das sequências parciais do gene codificador da RpRd de amostras provenientes do Parque Nacional da Lagoa do Peixe, no Rio Grande do Sul, Parque do Ibirapuera, em São Paulo e Ilha de Marajó, no Pará.....	49
Figura 15 - Árvore filogenética construída com o método de “neighbor-joining” da primeira sequência parcial da região S1 do gene da proteína S obtida da amostra 1812 proveniente da Ilha de Marajó-PA.....	50

Figura 16 - Árvore filogenética construída com o método de “neighbor-joining” da segunda sequência parcial da região S1 do gene da proteína S obtida da amostra 1812 proveniente da Ilha de Marajó-PA.....	51
Figura 17 - Criação de animais de onde foram coletadas amostras na Ilha de Marajó.....	53
Figura 18 - Ganso Chinês (<i>Anser cygnoides</i>).....	54
Figura 19 - Maçarico-de-sobre-branco (<i>Calidris fuscicollis</i>).....	56
Figura 20 - Maçarico Branco (<i>Calidris alba</i>).....	56
Figura 21 - Talha-mar (<i>Rynchops niger</i>).....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de amostras analisadas por localidade.....	41
Tabela 2 - Sequências dos primers utilizados para as reações de Nested PCR	46
Tabela 3 - Localidades e número de amostras analisadas e resultados das análise de Nested-PCR e sequenciamento.....	47
Tabela 4 - Identificação, espécie da ave, local de captura e grupo de Coronavírus encontrado.....	48

ABREVIATURAS E SIGLAS

BCoV - CoV bovino

CBRO- Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos

CCoV - Coronavírus canino

cDNA- DNA complementar

CoV- Coronavírus

CTD - Domínio de dimerização C - terminal

DEPC - Dietil-pirocarbonato

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

dNTP - Deoxinucleosídeo - trifosfato

et al. - E colaboradores

FCoV - Coronavírus felino

g - gramas

IBV- Vírus da Bronquite Infecciosa

ICTV- *International Committee on Taxonomy of Viruses*

kb - Kilobase

Km - Quilômetros

M - Molar

MERS - Síndrome Respiratória do Oriente Médio

MHV - Vírus da Hepatite Murina

mL - Mililitro

mM - Milimolar

NCBI- National Center for Biotechnology Information

nMol - Nanomoles

NTD - Domínio de ligação ao RNA N - terminal

ORF - *open reading frame*

pb - Pares de bases

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PhCoV - *Pheasants Coronavirus*

RBD - Domínios de ligação ao receptor

RNA - Ácido Ribonucleico

rpm - Rotações por minuto

RpRd - RNA-polimerase RNA dependente

RT- Transcrição reversa

SARS - Síndrome Aguda Respiratória Severa

sgRNA - mRNA subgenômico

SPF- *Specific Pathogens Free*

ssRNA- RNA de fita simples

TCoV - *Turkey Coronavirus*

TGEV - Coronavírus suíno da Gastroenterite Transmissível

TRS - *Transcriptional Regulatory Sequence*

U - Unidade internacional

USP- Universidade de São Paulo

SÍMBOLOS

% - Percentual

°C- Graus Celsius

μg - Microgramas

μL - Microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Os Coronavírus	21
2.1.1 Estrutura.....	21
2.1.2 Genoma.....	25
2.1.3 Ciclo dos Coronavírus.....	27
2.1.4 Classificação e Principais Hospedeiros.....	28
2.1.5 Transmissão Interspecífica (Cross-species)	29
2.2 Coronavírus em Aves	31
2.2.1 Rotas Migratórias e Espécies Brasileiras	33
2.2.2 Avicultura no Brasil	38
3 OBJETIVOS.....	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
5 RESULTADOS	47
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXO	61
A - Tabela de amostras positivas para o Nested-PCR, nome popular, nome científico, local e data de coleta.....	61

1 INTRODUÇÃO

Os Coronavírus (CoVs) são uma grande família de vírus envelopados com RNA de fita simples (ssRNA) e senso positivo, conhecidos desde meados de 1960, capazes de infectar uma grande quantidade de hospedeiros e causar diferentes doenças respiratórias, entéricas, hepáticas e de sistema nervoso. Devido ao seu mecanismo único de replicação, os CoVs têm uma tendência a sofrer recombinações e mutações, o que permite que se adaptem constantemente a novos hospedeiros e nichos ecológicos (WOO et al., 2012).

Até 2003 pouco se sabia a respeito desses vírus e somente 10 CoVs eram conhecidos, foi quando ocorreu a emergência da Síndrome Aguda Respiratória Severa (SARS), que se disseminou rapidamente para mais de doze países na América do Norte, América do Sul, Europa e Ásia, provocando a morte de 800 pessoas até 2004. A emergência dessa nova doença levou à descoberta de diversos novos CoVs (WOO et al., 2010).

A princípio, a divisão dos CoVs foi feita de acordo com suas características genótípicas e sorológicas, a princípio, esses vírus foram divididos em 3 grupos chamados de 1, 2 e 3. De acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), hoje esses grupos foram renomeados para os gêneros *Alphacoronavirus* (grupo 1), *Betacoronavirus* (grupo 2), *Gammacoronavirus* (grupo 3) e *Deltacoronavirus*, recentemente proposto (WOO et al., 2012).

Tendo em vista que as aves são reservatório para a maioria dos vírus emergentes devido ao habito de andar em bandos e sua habilidade para voar por longas distâncias, as aves possuem potencial para disseminar vírus emergentes entre si, para outros animais e humanos. A diversidade de rotas migratórias e espécies de aves no Brasil pode trazer diversos patógenos ao país, incluindo os CoVs (LI et al., 2004).

O estudo dos CoVs em aves no Brasil é, portanto, de grande importância econômica, pois algumas espécies tais como a causadora da Bronquite Infecciosa, que acomete trato respiratório, gastrointestinal e reprodutor, levando a taxa de mortalidade de 30% (CAVANAGH, 2007) e ainda quedas nas taxas de postura e eclodibilidade dos ovos (FENG et al., 2012), podem acometer criações acarretando grandes perdas, quanto epidemiológica, uma vez que no país há uma enorme biodiversidade, com um grande número aves domésticas e silvestres, residentes e

migratórias provenientes de diversas localidades, o que facilita a dispersão de doenças e o aparecimento de novos vírus. Deve-se considerar também um papel em saúde pública, pois há possibilidade do encontro de CoVs com potencial zoonótico ou ainda que possam contribuir para os estudos da origem desses vírus, tais como dos agentes causadores da SARS e da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Os Coronavírus

2.1.1 Estrutura

Dentro do vírion, o genoma ssRNA fica complexado, envolto em um nucleocapsídeo helicoidal composto de muitas cópias da nucleoproteína (N). Essa fosfoproteína estrutural possui entre 50 e 60 KDa e sua estrutura contem 2 domínios de ligação a RNA de estrutura conhecida: um domínio de ligação RNA N-terminal (NTD) e um domínio de dimerização C-terminal (CTD) 20 (figura 1A) (GROSSOEHME et al., 2009).

O principal papel da proteína N é o empacotamento do genoma viral em uma ribonucleoproteína helicoidal, longa e flexível formando os complexos chamados nucleocapsídeos que protegem o genoma e auxiliam na regulação da replicação. A interação entre a proteína N e o RNA é mediada por sinais de ligação contidos nas sequências *leader*. Durante o ciclo viral, diversas cópias da proteína N interagem com o RNA genômico e RNAs subgenômicos, indicando que há um papel dessa proteína na transcrição e tradução (MCBRIDE; VAN ZYL; FIELDING, 2014).

Outro papel importante é sua participação na montagem do vírion que depende da não somente da dimerização das proteínas N e sua associação com o RNA mas também das interações com proteínas do envelope. Os CoVs adquirem seu envelope lipídico no brotamento do nucleocapsídeo através das membranas do retículo endoplasmático. Acredita-se que é essa associação do nucleocapsídeo com as proteínas de envelope, em especial com a proteína M, que leva à incorporação do nucleocapsídeo em vírus envelopados (NARAYANAN et al., 2000).

Diversos estudos demonstraram ainda que a proteína N é necessária para uma replicação eficiente do CoV, localizando-se junto aos componentes da replicase nos estágios iniciais da infecção e estimulando a síntese de RNA genômico (HURST et al., 2010). Sabe-se que, nos CoVs, essa proteína possui atividade de chaperona, reduzindo a barreira de energia necessária para dissociar a cadeia de RNA de sentido negativo do template de RNA genômico, o que facilita a hibridização com a Sequência Regulatória da Transcrição (TRS) da sequência líder na transcrição descontínua (ZÚÑIGA et al., 2010).

Outra atividade da proteína N é a modulação da resposta celular. Foi demonstrado que, no Coronavírus causador da SARS (SARS-CoV), a proteína N pode controlar o ciclo celular da célula hospedeira mantendo-a em fase S através da regulação da atividade da CDK-ciclina e

ainda suprimir a transcrição de fatores celulares de resposta ao estresse, além de ter atividade antagonista aos interferons β (LU et al., 2011). Os CoVs podem também interferir na transdução de sinais celulares através da fosforilação da proteína N em um estágio tardio da infecção, o que pode contribuir no mecanismo de evasão do sistema imunológico do hospedeiro (KOPECKY-BROMBERG et al., 2007).

A bicamada lipídica da membrana, por sua vez, é composta por ao menos 3 proteínas: a proteína de membrana (M), a proteína de envelope (E) e a glicoproteína *Spike* (S) (SATIJA; LAL, 2007).

Com 25 a 30 KDa, a proteína M é a glicoproteína mais abundante na partícula viral e na célula infectada. Suas interações mediam a formação do envelope viral, desempenhando papel chave na montagem do vírion. Quando expressa em combinação com a proteína E, forma partículas semelhantes aos vírions em tamanho e formato, demonstrando que as proteínas M e E são requisitos mínimos para a formação do envelope (NARAYANAN et al., 2000). Essas glicoproteínas interagem ainda com as fosfoproteínas N, participando do processo de empacotamento do RNA, e forma um complexo com as proteínas S e HE, podendo estar associada a determinação do sítio intracelular de ligação do vírus ao complexo de Golgi (SATIJA; LAL, 2007). Possuem 3 domínios: Um ectodomínio curto N-terminal, um domínio transmembrana que a atravessa 3 vezes, e um endodomínio C-terminal (figura 1B) (HAGEMEIJER; ROTTIER; DE HAAN, 2012).

A proteína de envelope (E) é a menor proteína do envelope viral, com 9 a 12 KDa, apresentando duas funções importantes: Forma o envelope viral conjuntamente com as glicoproteínas M, tendo funções no início da formação da partícula viral e influenciando sua morfologia, e é capaz induzir apoptose em células infectadas com o vírus da hepatite murina (MHV). Trata-se de uma proteína de natureza hidrofóbica, com uma região C-terminal que se estende ao interior do vírion e uma região N-terminal hidrofóbica que permanece transmembrânica capaz de alterar a permeabilidade da membrana (figura 1B) (MAEDA et al., 2001).

Figura 1 - Representação esquemática da nucleoproteína N e sua ligação ao RNA (A), da proteína de envelope E e da proteína de membrana M (B) (Fonte: GÓES, 2012).

A proteína S (figura 2) é uma grande proteína transmembrana, com tamanho entre 180 e 200 KDa, altamente glicosilada com 21 a 35 sítios de N-glicosilação que se arranja em trímeros na superfície do vírion conferindo a forma de coroa característica que pode ser visualizada ao microscópio eletrônico (GRAHAM; BARIC, 2010). Conforme mostrado na figura 2, o setodomínio das proteínas S de todos os CoVs apresenta a mesma conformação: um domínio N-terminal denominado S1, responsável pela ligação ao receptor, e um domínio C-terminal S2, responsável pela fusão. A subunidade S2 é a mais conservada da proteína, enquanto a sequência da subunidade S1 diverge até mesmo entre espécies diferentes do mesmo Coronavírus. A subunidade S1 contém 2 subdomínios, HR1 e HR2, ambos funcionam como domínios de ligação ao receptor (RBDs) e se ligam a uma grande variedade de proteínas e açúcares (BELOUZARD et al., 2012).

O pareamento da proteína S pelo receptor na superfície celular é o que determina o tropismo do vírus pela célula. Para infectar novas espécies hospedeiras, os CoVs devem se adaptar ao receptor do novo hospedeiro através de mutação ou recombinação com outro Coronavírus que já seja capaz de infectar essa nova espécie (WU et al., 2012).

Outra importante função da proteína S está relacionada à fusão do envelope viral à membrana da célula hospedeira. Vírus envelopados podem entrar diretamente na célula após a ligação ao receptor ou através de endocitose, onde a fusão se dá com a membrana endossomal. Nos dois casos essa fusão se dá através de grandes mudanças conformacionais da proteína S causadas por diferentes e complexos mecanismos como acidificação do pH e ativação proteolítica (BELOUZARD; MADU; WHITTAKER, 2010).

Figura 2 - Representação esquemática da Proteína *Spike* (Fonte: GÓES, 2012).

Alguns *Betacoronavírus* apresentam ainda a Hemaglutinina Esterase (HE) em seus envelopes. Apesar de aparentemente não essencial, essa proteína pode atuar na adsorção, inserção e liberação dos vírus aumentando a virulência (SATIJA; LAL, 2007). A representação da disposição das proteínas estruturais dos Coronavírus encontra-se na figura 3.

Figura 3: Representação de um Coronavírus e suas proteínas estruturais (Fonte: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/30.html. Modificado).

2.1.2 Genoma

O genoma dos CoVs é o maior de RNA conhecido, com fita simples, senso positivo e tamanho entre 27 e 32kb. Todos os CoVs possuem quatro proteínas dentro dos vírions mas essas proteínas têm menos de 40% de identidade de aminoácidos entre espécies de grupos diferentes (HAGEMEIJER; ROTTIER; DE HAAN, 2012).

Apesar de todos os CoVs carregarem diversos genes acessórios, a organização do genoma global se mantém, no formato de *open reading frames* (ORFs) que apresentam estruturas *cap* seguidas da sequência "leader" na porção 5'e são poliadeniladas na porção 3' sendo que as duas partes finais do genoma contêm regiões não-traduzidas (URTs). Assim como os demais membros da ordem nos *Nidovirales* (do latim, Nido = ninho ou *nest*, em inglês), possuem diversos mRNAs subgenômicos (sgRNAs) que formam um arranjo emaranhado, no sentido 3'-*nested*. Esses sgRNAs são policistrônicos e contêm todos os ORFs seguintes ao gene a ser expresso, porém somente o primeiro ORF, localizado após a sequência "leader" é traduzido (BELOUZARD et al., 2012).

A porção 5' do genoma viral contém o gene da replicase, que codifica diversas atividades enzimáticas. Esse gene é codificado em dois grandes ORFs, ORF 1a e 1b, que são traduzidos em dois grandes peptídeos, pp1a e pp1ab, através de um mecanismo de *frameshifting* que envolve um pseudo-nó formado no RNA genômico (figura 4) (SAWICKI; SAWICKI; SIDDELL, 2007).

Esse mecanismo de *frameshifting* é importante pois permite a criação de diversas proteínas de um genoma relativamente pequeno. Enquanto o ribossomo traduz o mRNA ele pode deslocar para frente ou para trás. Uma vez que cada códon é criado por 3 aminoácidos consecutivos, esse deslocamento leva a um novo *frame* de leitura com sequências de aminoácidos diferentes e, portanto, uma proteína diferente (ZIEBUHR, 2004).

Figura 4 - Síntese e processamento das poliproteínas pp1a e pp1ab produzidas a partir do ORF1 (Fonte: MCDONALD; PATTON, 2009).

Conforme mostrado na figura 5, após a ORF1, há uma série de ORFs que variam de acordo com o vírus. A montante de cada ORF encontra-se sempre uma pequena sequência repetitiva chamada *Transcriptional Regulatory Sequence* (TRS) (MCDONALD; PATTON, 2009).

Figura 5 - Estrutura do genoma dos Coronavírus (Fonte: MCDONALD; PATTON, 2009).

As proteínas estruturais ficam codificadas no terceiro terço do genoma, na ordem S-E-M-N em todos os Coronavírus (nos Coronavírus que expressam a proteína HE, ela permanece codificada na posição 5' à proteína S). Cada grupo de Coronavírus codifica ainda um grupo de pequenas proteínas acessórias não-essenciais únicas e específicas (BELOUZARD et al., 2012).

2.1.3 Ciclo dos Coronavírus

O vírus se liga ao receptor da célula hospedeira através da interação da glicoproteína S. A entrada do vírus na célula hospedeira pode ocorrer através de fusão com a superfície da célula hospedeira, com a subsequente libertação do RNA genômico para o citoplasma ou através da formação de vesículas de endocitose com o genoma liberado para dentro do citoplasma na sequência de fusão com a membrana da vesícula, dependendo do Coronavírus (BERGMANN; LANE; STOHLMAN, 2006).

A princípio, o genoma viral atua como mRNA e as regiões ORF 1a e 1b são diretamente traduzidas pelos ribossomos gerando as poliproteínas pp1a e pp1ab. Essas poliproteínas são então lisadas por proteinases virais levando à formação de 15 proteínas não-estruturais no Vírus da Bronquite Infecciosa (IBV) (CAVANAGH, 2007) e 16 nos demais coronavírus, todas necessárias à replicação e transcrição, que se arranjam em vesículas de membrana dupla, dentro das quais a síntese de RNA genômico e subgenômico ocorre (DE GROOT et al., 2013).

A síntese de RNA nos coronavírus ocorre de duas formas: a replicação do genoma completo e a transcrição do RNA subgenômico. Na replicação do genoma, o RNA de senso positivo é transcrito em um *template* de RNA completo com senso negativo, a partir do qual diversos RNAs de senso positivo são gerados. Já na transcrição de RNA subgenômico, ocorre um modelo de transcrição descontínua onde a RNA polimerase RNA dependente (RpRd) inicia a transcrição na porção 3' do RNA genômico de senso positivo até alcançar a sequência TRS. Nesse momento, a RpRd pode prosseguir a polimerização ou parar a transcrição se realocando na sequência TRS inicial, logo após a sequência "leader", onde o complexo todo é incorporado devido à complementariedade das sequências TRS. Os *templates* de RNA de senso negativo gerados a partir desses processos são utilizados para gerar RNAs de polaridade positiva para a tradução de proteínas virais estruturais e acessórias. (SAWICKI; SAWICKI; SIDDELL, 2007).

A montagem do vírion ocorre então no interior de vesículas, que se fundem a membrana plasmática, liberando novos vírus. Diferentemente de outros vírus de RNA, a replicação dos CoVs ocorre quase inteiramente no citoplasma da célula infectada (figura 6) (BERGMANN et al., 2006).

Figura 6 -Representação do ciclo de vida dos Coronavírus (Fonte:BERGMANN; LANE; STOHLMAN, 2006).

2.1.4 Classificação e Principais Hospedeiros

O primeiro Coronavírus descoberto foi o IBV, isolado de embriões de galinha em 1937, seguido do Vírus da Hepatite Murina (MHV) e outros Coronavírus de mamíferos em 1940 e dos Coronavírus humanos HCoV-229E e HCoV-OC43 em 1960. Até 2002, somente 10 Coronavírus tinham seus genomas completos disponíveis, distribuídos em 3 grupos: 1 e 2 compostos de nove Coronavírus de mamíferos e 3 com o Coronavírus aviário. Somente em 2002, após a epidemia de SARS mais 16 CoVs foram completamente sequenciados e foram incluídos subgrupos nos grupos 2 (2c e 2d) e 3 (3b e 3c) (WOO et al., 2010).

A princípio, essa subdivisão foi baseada em relacionamentos antigênicos e posteriormente confirmada pelo sequenciamento genético, posteriormente, a classificação dos Coronavírus passou a ser dividida nos grupos *Alfa*, *Beta* e *Gamma* e acreditava-se que os grupos *Alpha* e *Betacoronavírus* eram encontrados apenas em mamíferos enquanto o grupo dos *Gammacoronavírus* seria restrito às aves (WOO et al., 2012). No entanto, pesquisas recentes indicam a presença de *Gammacoronavírus* em mamíferos e um novo grupo, os *Deltacoronavírus*, comum a aves e mamíferos (WERTHEIM et al., 2013). Atualmente o ICTV divide a família dos Coronavírus em 4 gêneros: *Alphacoronavírus*, *Betacoronavírus*, *Gammacoronavírus* e *Deltacoronavírus* (figura 7).

Figura 7 - Modelo de evolução dos Coronavírus onde os morcegos seriam a fonte de genes dos Alphacoronavírus e Betacoronavírus e as aves a fonte de genes dos Gammacoronavírus e Deltacoronavírus (**Fonte:** CHAN, 2013).

2.1.5 Transmissão Interspecífica (Cross-species)

A busca por Coronavírus em animais silvestres levou à descoberta de uma enorme diversidade de CoVs em aves e morcegos, sugerindo que esses animais são seus reservatórios naturais. Corroborando com essa descoberta, estudos filogenéticos de CoVs aviários e de morcegos sugerem uma relação antiga, com possível codivergência e coevolução com seus hospedeiros. Muitos CoVs encontrados em morcegos e outros mamíferos divergiram próximo às pontas da filogenia dos Coronavírus, sugerindo que foram resultado de um evento de transmissão *cross-species* recente (GRAHAM; BARIC, 2010).

A diversidade de Coronavírus se deve a 3 razões principais: a inespecificidade da RpRd dos CoVs, sua mudança aleatória de *template* seu grande genoma. A inespecificidade da RpRd dos CoVs causa taxas de mutação da ordem de 1 para 1000 a 10000 nucleotídeos replicados, tornando-os bastante maleáveis. A mudança aleatória de *templated* durante a replicação do RNA dos CoVs é única e leva a uma frequência de recombinação homóloga bastante alta e, como possuem o maior genoma entre todos os vírus de RNA conhecidos, os CoVs possuem uma plasticidade extra para acomodar e modificar genes. Esses fatores geram não somente uma grande variedade de cepas e genótipos de uma única espécie de Coronavírus, como também novas espécies, que podem ser capazes de se adaptar a novos hospedeiros e nichos ecológicos, inclusive podendo passar a acometer o homem (CHAN et al., 2013)

Um exemplo disso foi a emergência da SARS, em 2002 (figura 8a), um *Betacoronavírus* que infectou 8096 pessoas em 29 países, levando 774 pessoas à óbito. A princípio, colocava-se que as Civetas (*Paradoxurus hermaphroditus*) fossem o reservatório que levou ao aparecimento da doença em humanos, entretanto, evidências nas mudanças adaptativas de vírus isolados de animais infectados sugerem que o reservatório primário é o morcego nariz de ferradura (*Rhinolophus ferrumequinum*) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

Outro exemplo é o Coronavírus causador da MERS. Sabe-se que este CoV, provavelmente também surgiu a partir de Coronavírus de morcegos *Taphozous perforatus* passando a camelos e dromedários e chegando ao homem (MILNE-PRICE; MIAZGOWICZ; MUNSTER, 2014). Até Julho de 2015 a MERS somou 1368 casos confirmados em 26 países, com especial atenção para as epidemias na Arábia Saudita (1037 casos) e na Coreia do Sul (185 casos) somando 487 mortes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Além da SARS e da MERS, há outros exemplos de transmissão de Coronavírus entre espécies não relacionadas. O CoV bovino (BCoV) e o Coronavírus humano HCoV-OC43 são bastante similares, com 99% de identidade, e podem ter passado de bovinos para humanos há aproximadamente 100 anos atrás). O BCoV também apresenta 99,5% de similaridade com um Coronavírus isolado de uma Alpaca com enterite e com ruminantes silvestres (figura 8b). Além disso, o Coronavírus canino (CCoV), o Coronavírus felino (FCoV) e o Coronavírus suíno da Gastroenterite Transmissível (TGEV) mostram evidências de recombinação entre si, indicando que, em algum momento, estiveram presentes no mesmo hospedeiro. Recombinações entre o CCoV e o FCoV com um terceiro Coronavírus desconhecido geraram os Coronavírus CCoVII e FCoVII. O CCoVII, por sua vez passou a infectar suínos, transformando-se no TGEV (figura 8c) (PERLMAN; NETLAND, 2009).

Nature Reviews | Microbiology

Figura 8 - Exemplos de transmissão de coronavírus entre hospedeiros não relacionados. **a)** O Coronavírus de morcego (BtCoV), semelhante à SARS, se adaptou à transmissão entre animais silvestres como a Civeta e, posteriormente, passou a replicar-se eficientemente no homem, podendo ser transmitido pessoa para pessoa. **b)** O Coronavírus humano OC43 e o Coronavírus bovino BCoV se originaram em uma mesma espécie. O BCoV também cruzou a barreira entre espécies e passou a infectar diversos outros animais, como a alpaca e outros ruminantes silvestres. **c)** O Coronavírus Felino I (FCoV-I) e o Coronavírus Canino I (CCoV-I) provavelmente possuem um ancestral comum. CCoV-I se recombina com um Coronavírus desconhecido gerando o Coronavírus Canino II (CCoV-II) que, por sua vez, recombina-se com FCoV-I gerando o Coronavírus Felino II (FCoV-II) e ainda passou a infectar suínos, resultando no Vírus da Gastroenterite Transmissível (TGEV) (**Fonte:**PERLMAN; NETLAND, 2009).

2.2 Coronavírus em Aves

Antes da emergência da SARS, em 2002, o conhecimento sobre Coronavírus em aves se limitava basicamente a três espécies: galinhas domésticas (IBV), perus (*Turkey Coronavirus* - TCoV) e faisões (*Pheasants Coronavirus* - PhCoV). Esses Coronavírus são bastante próximos em termos de sequência genética e antígenicamente. Coronavírus de outras aves galiformes (galinha d'angola, perdiz, pavão), foram descobertos posteriormente, mas também são muito similares ao IBV (WOO et al., 2010)

O IBV inicialmente infecta o trato respiratório, onde se restringe às células ciliares e produtoras de muco. As concentrações de vírus são máximas no nariz e traqueia entre 2 e 5 dias pós-infecção. Concentrações similares de vírus são encontradas nos pulmões e sacos aéreos e,

com a perda dos cílios do epitélio ciliado, é comum o aparecimento de infecções bacterianas secundárias. O IBV pode se desenvolver ainda em outras células epiteliais como os rins (causando nefrite grave), oviduto, testis e trato gastrointestinal- esôfago, proventrículo, duodeno, jejuno, Bursa de Fabrícus, tonsilas cecais, reto e cloaca (CAVANAGH, 2007).

Estima-se que a mortalidade da bronquite infecciosa seja de 30%, além da queda no número de posturas e das taxas de eclodibilidade dos ovos, causando enorme prejuízo econômico à indústria avícola (FENG et al., 2012). O controle da doença é baseado principalmente na vacinação, mas o vírus sofre mudanças antigênicas constantes que, por vezes, pode resultar em uma proteção incompleta (CAVANAGH, 2005). Embora as galinhas sejam os hospedeiros naturais primários da IBV, recentemente vírus similares ao IBV foram relatados em espécies de aves silvestres *galliformes* e *não-galliformes* (HUGHES, 2009).

Em 2014, um novo *Gammacoronavírus* similar ao TCoV foi detectado como causador de uma doença fulminante em galinha d'angola (*Numida meleagris*) na França. Essa doença, também chamada doença X, é relatada há décadas no país e é caracterizada por enterite aguda, prostração intensa e uma taxa de mortalidade bastante alta, chegando a dizimar criações inteiras (LIAIS et al., 2014).

Com a detecção de Coronavírus em aves não-*galliformes* vieram à tona ainda novas espécies de Coronavírus. Esses novos CoVs, geneticamente distintos de IBV, foram identificados em diferentes famílias de aves (WOO et al., 2012) e em belugas (MIHINDUKULASURIYA et al., 2008) e ainda, a presença de *Gammacoronavírus* em patos selvagens (*Anas platyrhynchos*), indicando que os patos selvagens podem disseminar CoVs (MURADRASOLI, 2009). GOUGH et al. (2006) identificaram um Coronavírus de papagaio que é geneticamente diferente dos *Alfa*, *Beta*, e *Gammacoronavírus*. A partir deste, novos Coronavírus geneticamente semelhantes ao Coronavírus de papagaio foram subsequentemente detectados em mamíferos e aves terrestres e classificados como *Deltacoronavirus*.

Outros estudos também sugerem que há uma diversidade de Coronavírus que circulam em aves silvestres, como no estudo realizado por CHU et al. (2011) em Hong Kong entre novembro de 2009 e janeiro de 2010, que coletou e analisou 658 amostras de fezes frescas de aves dos pântanos de Mai Po. Noventa e nove (15,0%) destas amostras foram positivas por RT-PCR para Coronavírus. No Camboja, swabs cloacais foram coletados de 263 aves silvestres e resultados positivos pela mesma técnica foram obtidos em 13,0% dos animais testados (CHEUNG et al., 2009). Em 2010, MURADRASOLI et al. detectaram a presença de

Gammacoronavírus em 64 aves silvestres na região da Beríngia (entre a Sibéria e o Alasca), e em 2014, um *Gammacoronavirus* foi identificado em um vira-pedras (*Arenaria interpres*), na Baía de Delaware, EUA. Em todos os estudos feitos, todos os Coronavírus identificados pertenciam aos grupos *Gamma* e *Deltacoronavírus*. Esses novos dados mostram que os Coronavírus aviários possuem uma distribuição mais ampla e maior número de hospedeiros do que se pensava anteriormente, podendo levar a implicações na saúde animal e humana.

No Brasil, estudos sobre a presença de CoVs em aves silvestres ainda são bastante escassos. Em um dos poucos estudos realizados, foram coletadas amostras de 25 diferentes espécies de aves no zoológico de Bauru das quais 8 amostras foram positivas para *Gammacoronavirus* sendo duas pertencentes a *Galliformes*, duas a *Ciconiiformes*, uma *Gruiforme* e uma *Sphenisciforme* (CARDOSO et al., 2011).

2.2.1 Rotas Migratórias e Espécies Brasileiras

As aves são os únicos vertebrados terrestres que dividem com os humanos a peculiaridade de viajar através das barreiras nacionais e internacionais. A migração pode ser definida como um evento natural sazonal ou periódico, realizado em períodos reprodutivos ou de invernada (fora do período reprodutivo) dos animais. Devido às mudanças sazonais, milhões de indivíduos se redistribuem ao longo da superfície terrestre duas vezes ao ano. Regiões de alta latitude recebem animais principalmente na estação de reprodução enquanto locais de latitudes mais baixas provêm suporte às aves durante o período de invernada (LANE et al., 2011).

Todos os anos, milhões de aves viajam entre os continentes duas vezes ao ano em apenas algumas semanas. Durante essas migrações, as aves têm o potencial de dispersar patógenos que podem ser perigosos para a saúde animal e humana. As distâncias percorridas variam de acordo com cada espécie, podendo ser curtas ou longas (envolvendo milhares de quilômetros), sendo que podem ocorrer variações no comportamento migratório. Algumas aves como a *Sterna paradisaea* conseguem percorrer cerca de 20.000 Km entre a Antártica e o Norte da Escandinávia. Às vezes indivíduos da mesma população agem diferentes em relação ao deslocamento, como é o caso de algumas aves, por exemplo, os pardais canoros (*Melospiza*

melodia) e os pardais-de-coroa-branca (*Zonotrichia leucophrys*) norte-americanos, os quais as populações do norte são migratórias enquanto as do sul são sedentárias (PINTO, 2002).

Para facilitar os esforços internacionais de manejo e conservação, as rotas migratórias de diferentes espécies aviárias foram agrupadas na convenção de Ramsar (1999) nas denominadas “flyways”, que são “a completa extensão na qual uma espécie de ave (ou grupos de espécies relacionadas, ou populações distintas de uma mesma espécie) através da qual se locomovem anualmente das áreas de reprodução às áreas de invernada, incluindo locais intermediários de paradas para descanso e alimentação bem como as áreas pelas quais a ave migra”(BOERE; STROUD, 2006). As principais rotas migratórias são mostradas na figura 9.

Figura 9 - Oito maiores rotas migratórias de aves aquáticas. Rota do Pacífico das Américas, Rota do Mississippi Américas, Rota do Atlântico das Américas, Rota do Atlântico Leste, Rota do Mar Negro/Mediterrâneo, Rota do Oeste Asiático- Leste Africano, Rota da Ásia Central, Rota do Leste Asiático (**Fonte:** BOERE; STROUD, 2006).

Em um trabalho sobre as rotas migratórias de aves na América do Sul, SICK (1987) divide os movimentos que ocorrem neste continente da seguinte forma: migrações neárticas (aves provenientes do hemisfério norte); migrações austrais (aves que se deslocam para o norte a partir do hemisfério sul, havendo dentro do continente diversas migrações a partir da parte meridional em direção ao norte); deslocamentos em resposta à sazonalidade de recursos hídricos e tróficos (tais como florações e frutificações), que incluem movimentos regionais, locais ou parciais; deslocamentos nos Andes e nas cadeias de montanhas do sudeste do Brasil, produzindo migrações altitudinais importantes.

As aves migratórias neárticas que migram para a América do Sul utilizam as áreas de baixa elevação do leste americano até atingirem o Golfo do México, cruzando as Ilhas do Mar das Antilhas, alcançando o continente Sul-Americano pela costa da Colômbia, Venezuela e

Guianas e, a partir daí, podem utilizar-se das diversas rotas que incluem o Brasil. Algumas espécies da ordem *Charadriiformes* têm rotas migratórias melhor estudadas, passando pela região costeira do país. Grande parte das aves migratórias brasileiras tem suas áreas de reprodução no ártico e, a cada ano, com a proximidade do outono boreal, cerca de trinta espécies migram para a América do Sul, chegando à costa brasileira. Essas aves concentram-se em um pequeno número de locais, destacando-se, ao Norte do Brasil, a costa do Amapá, o salgado paraense e reentrâncias maranhenses. Na Região Nordeste, destacam-se a costa de Icapuí, CE, a região de Galinhos e Areia Branca, RN, a Ilha Coroa do Avião, PE, a região da Área de Proteção Ambiental de Piaçabuçu, AL, e as regiões de Mangue Seco e Cacha-Prego, Bahia. No Sul do país se evidencia o Parque Nacional da Lagoa do Peixe. As espécies permanecem no Brasil, em geral, de setembro a maio e dependem de habitats importantes para descanso, mudas de penas e alimentação, inclusive para repor as energias gastas na migração (ICMBIO, 2014).

Segundo o CEMAVE (Centro de Estudos de Migrações de Aves), as aves realizam no Brasil quatro rotas principais (figura 10): a Rota Atlântica, do Amapá ao Rio Grande do Sul, que é realizada, por exemplo, pelo Batuiruçu-de-axila-preta (*Pluvialis squatarola*); a rota Brasil Central (ou rota dos rios Xingu e Tocantins), divisão da rota Atlântica na altura da foz do rio Amazonas, pela qual as aves utilizam os vales dos rios Tocantins, Araguaia e Xingu, realizada pelo Batuiruçu (*Pluvia lisdominica*); a Rota do Rio Negro e Pantanal, de Manaus em direção ao Mato Grosso, buscando os estados do sul, a exemplo do Falcão peregrino (*Falco peregrinus*); a Rota Cis-Andina, que adentra o Brasil pela Amazônia ocidental, e se dirige para o pantanal de Mato Grosso, como a realizada pela Triste-pia (*Dolichonyx oryzivorus*) (PINTO, 2002).

Figura 10 - Quatro principais rotas migratórias de aves pelo Brasil: Rota Atlântica, a rota Brasil Central (ou dos rios Xingu e Tocantins), a Rota do Rio Negro e Pantanal e a Rota Cis-Andina (**Fonte:** PINTO, 2002).

Todo ano, durante o verão, diversas aves chegam ao litoral Sul do país provenientes da América do Norte, como os maçaricos e batuíras, e retornam para os Estados Unidos e Canadá quando o inverno chega, onde se reproduzem. O Rio Grande do Sul também contém vários “locais de parada”, onde várias espécies de aves param em locais específicos por alguns dias ou semanas durante a longa viagem migratória (VALENTE et al., 2011).

De acordo com a Lista de Aves no Brasil do Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (2011), atualmente constam 1832 espécies de aves registradas, representando 31 ordens e 97 famílias (CBRO 2011; <http://www.cbro.org.br>). Esse número de espécies corresponde a aproximadamente 18% de toda a diversidade de aves do mundo. Isso coloca o país, juntamente com a Colômbia e o Peru, entre os três países do mundo com a maior riqueza de aves, porém é o primeiro em número de espécies globalmente ameaçadas de extinção com um total de 122 espécies, sendo 23 criticamente ameaçadas, 30 em perigo, 66 vulneráveis, e 93 quase-ameaçadas (DEVELEY; GOERCK, 2009).

Uma das razões desta enorme diversidade de aves no país é a variedade de ambientes existentes. O Brasil tem uma grande parte das regiões de floresta tropical da América do Sul (Amazônia e Mata Atlântica), a maior região de savana (Cerrado), uma grande planície alagável (Pantanal), regiões de florestas secas (Caatinga), os maiores e mais preservados mangues das Américas e um ambiente marinho muito diversificado, com ilhas oceânicas e recifes de corais (ICMCBIO, 2014).

Diversos aspectos das migrações a longa distância contribuem com a aquisição de patógenos pelos pássaros migratórios. As florestas tropicais da América do Sul e Central, por exemplo, possuem as maiores biodiversidades no planeta. Pássaros que passam a invernada nesses locais têm como vantagem mais fontes de comida e locais para abrigo, no entanto, isso representa um risco de exposição à diversos reservatórios e vetores de patógenos, abundantes nessas regiões. Deve-se considerar ainda, o estresse associado às migrações, um conhecido fator de risco por causar imunossupressão e portanto aumentar a susceptibilidade às doenças infecciosas (REED, 2003).

Outro fator que pode ainda aumentar os riscos de disseminação de doenças infecciosas entre aves é o desmatamento e as mudanças de ambiente causadas pelo homem, que causam drásticas mudanças aos padrões de migração. A contínua perda e fragmentação do habitat nos locais de parada ao longo dos corredores das grandes rotas migratórias criam gargalos, resultando em superpopulação e aglomerados de espécies. Representamentos artificiais de água podem ainda alterar esses corredores de migração criando novos pontos de parada para aves aquáticas (MURPHY, 1998).

2.2.2 Avicultura no Brasil

A avicultura brasileira teve seu desenvolvimento a partir do final da década de 1950, nos estados da região Sudeste, principalmente em São Paulo. Esse período foi marcado pelo sistema de produção artesanal em que o frango caipira era vendido vivo ou já abatido nas feiras livres ou avícolas e a venda era regionalizada. Mais tarde, a avicultura começou a ganhar escalas industriais com o surgimento dos primeiros abatedouros com maior capacidade. Na década de 1970, houve uma reorganização da produção de carnes no Brasil, tendo a atividade se deslocado para as regiões Sudeste (VOILÀ; TRICHES, 2013). No primeiro trimestre de 2015 a Região Sul respondeu por 59,2% do abate nacional de frangos no 1º trimestre de 2015, seguida pelas Regiões Sudeste (20,5%), Centro-Oeste (15,1%), Nordeste (3,7%) e Norte (1,5%) (figura 13) (BELCHIOR; TAI; HELD, 2014).

A partir de então, a produção brasileira de carne de frango teve um rápido desenvolvimento e elevou a posição do Brasil, que ocupa a posição de 3º maior produtor desde o ano de 1992. Hoje, setor avícola representa o quinto maior produto de exportação do agronegócio brasileiro, atividade que coloca o Brasil na liderança das exportações com qualidade sendo o produto de maior contribuição na balança comercial do país (OSVALDO et al., 2014).

Figura 11 -Principais estados produtores de frangos de corte no Brasil (Fonte: BELCHIOR; TAI; HELD, 2014)

Quanto à produção de ovos, o Brasil é hoje o 7º maior produtor mundial e no primeiro trimestre de 2015 o estado de São foi o líder no ranking da produção de ovos por estado, detendo sozinho 32,1% da produção nacional (BELCHIOR; TAI; HELD, 2014).

Figura 12 -Principais estados produtores de ovos de galinha no Brasil (Fonte: BELCHIOR; TAI; HELD, 2014).

O mercado de produtos agrícolas tem como uma de suas características principais a grande interferência de fatos exógenos sobre seu funcionamento sendo que os fenômenos climáticos ou naturais, pragas ou problemas sanitários podem ser considerados os principais agentes exógenos a influenciarem este mercado. Problemas desta natureza têm causado grandes perdas ao setor, já que, com o surgimento de uma epidemia ou praga, países ao redor do mundo fecham seus mercados para a compra do produto supostamente infectado além, de parte dos consumidores deixarem de consumi-lo por medo de contaminação (SILVA et al., 2011). É importante, portanto, que doenças aviárias como as causadas por Coronavírus sejam estudadas uma vez que podem causar grandes perdas neste setor de fundamental importância econômica para o país.

3 OBJETIVOS

A) Realizar estudo retrospectivo analisando a presença de Coronavírus por RT-PCR em amostras de swab traqueal e swab cloacal provenientes de aves migratórias e residentes de diferentes regiões brasileiras.

B) Caracterização molecular (genotipagem) dos vírus encontrados, através do sequenciamento parcial do gene da RpRd do material genético das amostras positivas e análise filogenética.

C) Analisar a epidemiologia dos vírus encontrados, correlacionando-os às rotas de migrações de aves e à proximidade das regiões urbanas e de granjas avícolas, verificando a possibilidade de transmissão a humanos e animais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado a partir de 746 amostras de aves capturadas entre os anos de 2004 a 2013 pela equipe de campo do laboratório de virologia clínica e molecular, em diferentes expedições às regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sul do Brasil (tabela 1).

Tabela 1 - Número de amostras analisadas por localidade.

Região	Local	Número de amostras testadas
Norte	Pará (Ilha de Marajó)	93
Norte	Pará (Ilha de Canelas)	178
Nordeste	Bahia, Maranhão e Pernambuco (Caatinga)	151
Centro-Oeste	Mato Grosso do Sul (Pantanal)	51
Sudeste	São Paulo (Parque do Ibirapuera)	81
Sul	Rio Grande do Sul (Parque Nacional da Lagoa do Peixe)	192
Total		746

Parte das amostras analisadas foram utilizadas do banco de amostras do Laboratório de Virologia Biossegurança nível 3+, acondicionados em criotubo contendo 500 µL de meio VTM (2.000 U de penicilina G, 2,5 µg de estreptomicina, 6 µg de Gentamicina, 25 µg de Anfotericina B, 1,0% de albumina bovina e 20% de glicerina) mantidos em ultra-freezer (- 80 °C).

4.1 Extração do material genético

A extração de material genético total das amostras selecionadas foi realizada no Laboratório de Biossegurança nível 3+ "Prof. Dr. Klaus Eberhard Stewien" do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP), utilizando o equipamento de extração de RNA total automatizado "MagMAX™ Express" (Applied Biosystems®) usando o "MagMAX™ - 96 Total RNA Isolation Kit".

A cada poço da placa de extração, foram adicionados 100 µL de amostras, 10 µL de RNA Binding Beads, 10µL de RNA Lysis/Binding Enhancer e 130 µL de Lysis/Binding Solution, com posterior homogeneização. Em seguida, foram realizadas duas lavagens, sob agitação (900 g por 2 minutos, à temperatura ambiente), utilizando 150 µL do reagente Wash Solution 1 em cada poço. Em todas as etapas de lavagem, o robô utiliza uma placa magnética sob a microplaca por 1 minuto, para que as esferas metálicas (*beads*) ligadas ao RNA, não sejam removidas durante as lavagens. Outras duas lavagens sob agitação (900 g por 2 minutos, à temperatura ambiente) foram efetuadas, com 150 µL do reagente Wash Solution 2 em cada poço. Em seguida, 75 µL do tampão de eluição (Elution Buffer) foi adicionado em cada poço e novamente agitado a 900 g por 3 minutos, visando separar o RNA que estaria aderido às *beads* metálicas. O material extraído foi transferido para microtubos nuclease-free e armazenados em freezer (-80 °C) até seu processamento.

4.2 Reação de Transcrição Reversa (RT)

Uma vez extraído, o RNA obtido foi submetido à reação de Transcrição Reversa, a fim de se obter o DNA complementar (cDNA). Para cada reação, 10 µL do RNA extraído de cada amostra foi utilizado. Foram adicionados de 2 µL de RT Buffer 10X, 2 µL de Random Primers (50 ng/µL), 4,2 µL de água DEPC e 50 U de enzima MultiScribe™ Reverse Transcriptase. Essa reação foi então colocada no termociclador a 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 120 minutos, 85 °C por 5 minutos e resfriadas a 4 °C até serem retiradas.

4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Nested-PCR para o gene RpRd

Utilizando o protocolo de detecção de Coronavírus aviários desenvolvido por POON et al. (2009), que utiliza como alvo o gene da RpRd presente no ORF 1 do genoma viral, foi realizada uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida de uma Nested-PCR originando um fragmento de 440 pares bases (pb). As bandas foram submetidas a corrida eletroforética em gel de agarose, corado com brometo de etídeo e visualizadas sob luz ultravioleta.

PCR Primers

Forward Primer: 5'-GGKTGGGAYTAYCCKAARTG-3'

Reverse Primer: 5'-TGYTGTSWRCARAAYTCRTG-3'

Nested PCR Primers

Forward Primer: 5'-GGTTGGGACTATCCTAAGTGTGA-3',

Reverse Primer: 5'-CCATCATCAGATAGAATCATCAT-3'

Figura 13 - Sequência dos primers utilizados para as reações de PCR e Nested-PCR, que têm como alvo o gene da RpRd (**Fonte:** POON et al., 2009).

Para realizar o PCR, foram transferidos 3,0 µL do cDNA de cada amostra aos poços de uma nova placa de PCR (96 orifícios), 2,5 µL de Buffer 10X, 1,25 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µL de dNTP (10 µM), 2,5 µL de PCR Primer Forward (10 pMol/µL), 2,5 µL de PCR Primer Reverse (10 pMol/µL), 0,125 µL da enzima Taq™ DNA Polymerasee 12,625 µL de água DEPC. A reação foi então colocada no termociclador a 94 °C por 2 minutos e 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 48 °C por 30 segundos, 72 °C por 40 segundos, 72 °C por 7 minutos e mantido a 4 °C após o final dos ciclos.

Já para a Nested PCR, em uma nova placa, foram colocados 2,0 µL do produto de PCR, 2,5 µL de Buffer 10X, 1,25 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µL de dNTP (10 mM), 1,25 µL de Nested PCR Primer Forward (10 pMol/µL), 1,25 µL de Nested PCR Primer Reverse (10 pMol/µL), 0,125 µL da enzima Taq™ DNA Polymerasee 16,125 µL de água DEPC, submetidos às mesmas condições de tempo e temperatura descritas para a reação de PCR.

4.4 Eletroforese em Gel de Agarose

Foram confeccionados géis de agarose na concentração 2%, adicionados de 2,5 µL de Brometo de Etídio. No primeiro poço de cada linha do gel, foram aplicados 2 µL de marcador de peso molecular (DNA ladder, 0,25 µg/µL) e, nos demais poços, 15 µL de amostra com 3 µL de Blue Juice 10X. Como controle positivo, foi utilizado o Coronavírus aviário cepa vacinal MA5, cedido gentilmente pelo Prof. Paulo Brandão.

Os géis foram então submetidos à eletroforese a 100 mA por 50 minutos. As amostras que apresentaram bandas de 520 pb relativas à reação de PCR e bandas de 440 pb esperadas na reação de Nested, foram consideradas positivas.

4.5 Purificação dos fragmentos amplificados

Para a purificação dos produtos da PCR e Nested nas amostras que não apresentaram bandas inespecíficas foi utilizado protocolo do Kit ExoSap-IT® (Affymetrix), de acordo com as instruções do fabricante.

No caso de amostras que apresentaram bandas inespecíficas na eletroforese em gel de agarose, utilizamos o GeneJET™ Gel Extraction Kit (ThermoScientific), de acordo com as instruções dos fabricantes.

4.6 Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencing Kit (AppliedBiosystems)e colocadas no termociclador GeneAmp PCR System 9700, de acordo com as instruções do fabricante.

Em seguida, as amostras foram purificadas usando o BigDye X Terminator® Purification kit (Applied Biosystems)e aplicadas no sequenciador automatizado ABI PRISM 3130XL DNA Sequencer (Applied Biosystems).

4.7 Análise das sequências

Os cromatogramas gerados contendo as sequências nucleotídicas foram visualizados através do programa Bioedit v.7.2.5 e aquelas em sentido antisenso foram transformadas para seu reverso complementar. Foi verificada a similaridade com sequências existentes através do serviço Blast-n do GenBank da página do NCBI (National Center for Biotechnology

Information) no endereço eletrônico: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> de onde também foram importadas diversas sequências já descritas da região alvo amplificada que foram editadas e alinhadas através do software Clustaw W2.1.

As árvores filogenéticas foram geradas a partir das sequências nucleotídicas a partir do método de “neighbor-joining” para realização da inferência filogenética foram importadas sequências do GenBank dos diversos grupos de Coronavírus.

4.8 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Nested-PCR para o gene da proteína S

Visando genotipar os *Gammacoronavírus* encontrados, foram realizados protocolos que têm como alvo sequências diferentes e não contíguas da região S1 do gene da proteína S do IBV.

No primeiro deles, o cDNA das amostras positivas para *Gammacoronavírus* foram submetidas a uma PCR, com protocolo semelhante ao utilizado para o gene da RpRd, gerando amplicons de 490 pb e a amostra que gerou banda foi sequenciada.

A amostra positiva no primeiro protocolo foi então submetida a uma Nested PCR, gerando amplicons de 393 pb e sequenciada utilizando os primers mostrados na tabela 2.

Tabela 2 - Sequências dos primers utilizados para as reações de Nested PCR (**Fonte:** WORTHINGTON; CURRIE; JONES, 2008. Modificado).

Primer	Sequência
Primer PCR Senso	CACCTAGAGGTTTG T/C T A/T GCAT
Primer PCR Anti-senso	TCCACCTCTATAAACACC
Primer Nested-PCR Senso	TAATACTGG C/T AATTTTTCAGA
Primer Nested-PCR Anti-senso	AATACAGATTGCTTACAACCACC

4.9 Isolamento em ovos embrionados

Para o isolamento, ovos embrionados de galinha SPF (*Specific Pathogens Free*), foram visualizados ao ovoscópio para avaliação da viabilidade de embriões e integridade da casca, bem como para a delimitação da câmara de ar e identificação com o número da amostra correspondente.

Para esta tentativa, foi escolhida a amostra DEP5, positiva para *Deltacoronavírus*. A amostra foi centrifugada a 12000 rpm durante 5 min, adicionada de 10% de Estreptomicina e 5% de Griseofulvina e incubada por 1 hora em geladeira.

Após antissepsia e perfuração de um orifício na casca, o volume de 100 µL de amostra tratada foi inoculado na cavidade amniótica e alantóide. Os ovos ficaram incubados em estufa 72 horas a 37,5 °C e, em seguida foram refrigerados a 4 °C por 12 horas.

Foi então coletado 1 ml do fluído alantóico, do qual 100 µL foram utilizados para a segunda inoculação (segunda passagem) em ovo embrionado repetindo-se o procedimento por um total de 3 passagens. Para confirmar se houve crescimento do vírus, foram realizadas novas reações PCR e Nested-PCR com primers para RpRd e sequenciamento.

5 RESULTADOS

Foram analisadas o montante de 746 amostras dos locais listados na Tabela 2.

Tabela 3 - Localidades e número de amostras analisadas e resultados das análise de Nested-PCR e sequenciamento.

Local	Número de amostras testadas	Positivas por Nested-PCR	Sequenciamento
Pará (Ilha de Marajó)	93	3	1
Pará (Ilha de Canelas)	178	3	0
São Paulo (Parque do Ibirapuera)	81	8	3
Mato Grosso do Sul (Pantanal)	51	0	0
Bahia, Maranhão e Pernambuco (Caatinga)	151	0	0
Rio Grande do Sul (Parque Nacional da Lagoa do Peixe)	192	11	3
Total	746	25	7

Do total analisado, 25 apresentaram resultados positivos para PCR e Nested-PCR com primers para o gene da RpRd (tabela em anexo) para os Coronavírus e foram purificadas para serem submetidas a reação de sequenciamento.

Obtivemos sucesso no sequenciamento em 7 amostras estudadas, conforme mostrado na tabela 1. As sequências obtidas foram comparadas com outras disponíveis no GenBank. As amostras que obtiveram sequência, o local de onde foram obtidas, a espécie da ave e os resultados obtidos a partir da análise da sequência, encontram-se na tabela 2. As sequências obtidas foram alinhadas utilizando o programa BioEdit e as análises filogenéticas foram realizadas pelo programa software Clustaw W2.1. (Figuras 14 e 15), porém não foi confirmado o isolamento do *Deltacoronavírus* detectado na amostra DEP5.

Tabela 4 - Identificação, espécie da ave, local de captura e grupo de Coronavírus encontrado.

ID da Amostra	Espécie da Ave	Local	Grupo
Amostra 1812	<i>Gallus gallus</i>	Pará (Ilha de Marajó)	<i>Gammacoronavírus</i>
Amostra DEP5	<i>Anser cygnoides</i>	São Paulo (Parque do Ibirapuera)	<i>Deltacoronavírus</i>
Amostra DEP10	<i>Anser cygnoides</i>	São Paulo (Parque do Ibirapuera)	<i>Deltacoronavírus</i>
Amostra DEP16	<i>Anser cygnoides</i>	São Paulo (Parque do Ibirapuera)	<i>Gammacoronavírus</i>
Amostra PNL100	<i>Calidris alba</i>	Rio Grande do Sul (Parque Nacional da Lagoa do Peixe)	<i>Gammacoronavírus</i>
Amostra PNL115	<i>Rynchops niger</i>	Rio Grande do Sul (Parque Nacional da Lagoa do Peixe)	<i>Deltacoronavírus</i>
Amostra PNL159	<i>Calidris fuscicollis</i>	Rio Grande do Sul (Parque Nacional da Lagoa do Peixe)	<i>Gammacoronavírus</i>

Figura 14 - Árvore filogenética construída com o método de “neighbor - joining” das sequências parciais da região do gene codificador da RpRp. Em verde, sequências dos Coronavírus presentes em amostras provenientes do Parque Nacional da Lagoa do Peixe, no Rio Grande do Sul. Em vermelho, sequências dos Coronavírus presentes em amostras provenientes do Parque do Ibirapuera, em São Paulo. Em roxo, sequências do Coronavírus presente em amostra proveniente da Ilha de Marajó, no Pará.

Figura 15 - Árvore filogenética construída com o método de “neighbor-joining” da primeira sequência parcial da região S1 do gene da proteína S. 65 sequências disponíveis no GenBank foram adicionadas para construção da árvore para comparação com a amostra 1812 proveniente da Ilha de Marajó-PA. As sequências de referências para construção da árvore foram retiradas de VILLARREAL et al. (2010).

Figura 16 - Árvore filogenética construída com o método de “neighbor-joining” da segunda sequência parcial da região S1 do gene da proteína S obtida. 36 sequências disponíveis no GenBank foram adicionadas para construção da árvore para comparação com a amostra 1812 proveniente da Ilha de Marajó-PA.

6 DISCUSSÃO

O protocolo utilizado para triagem foi escolhido visando uma maior sensibilidade, utilizando, a princípio, primers degenerados que têm como alvo o gene da RpRd que é bastante conservado entre os coronavírus mas permite a diferenciação entre os grupos *Alpha*, *Beta*, *Gamma* e *Deltacoronavírus* uma vez que as proteínas dos têm menos de 40% de identidade de aminoácidos entre espécies de grupos diferentes (HAGEMEIJER; ROTTIER; DE HAAN, 2012). Para a diferenciação entre espécies do mesmo grupo, entretanto, é necessário o sequenciamento da proteína S que, por ser determinante no tropismo do vírus pela célula, é o gene com maiores taxas de mutação e recombinação (WU et al., 2012).

Neste estudo foram analisadas 746 amostras de diferentes regiões do país, através da detecção molecular por RT-PCR das quais 25 amostras apresentaram resultado positivo. Destas, 7 amostras provenientes de três regiões diferentes foram confirmadas por sequenciamento de DNA. Com base nos resultados obtidos, foi possível detectar a presença tanto de *Gammacoronavírus* quanto *Deltacoronavírus* nas aves. Ambos os grupos são conhecidos por infectar as aves, no entanto seu estudo no território brasileiro ainda é muito escasso.

A região Amazônica representa grande parte da avifauna brasileira, sendo o maior portal de entrada para as rotas migratórias de aves silvestres, desempenhando um papel importante como ponto de invernada. Constantemente estas aves silvestres entram em contato com outras aves domésticas.

Entre as amostras provenientes desta região, foram detectadas 3 amostras positivas para PCR e Nested-PCR com primers para a região da RpRd, sendo 1 confirmada por sequenciamento. Esta amostra confirmada pertence a uma galinha (*Gallus gallus*) proveniente de uma propriedade em que animais de diversas espécies eram mantidos juntos (Figura 17).

Na região amazônica animais domésticos estão constantemente em contato com aves selvagens, que pode transportar estes vírus. Além disso, outros animais estão eventualmente em contato com estas aves, favorecendo a disseminação destes vírus para outras regiões. O contato direto destes animais com outras espécies pode levar a transmissão interespecífica e recombinações que levam ao surgimento de novos vírus emergentes (PERLMAN, 2009).

Figura 17 - Criação de animais de onde foram coletadas amostras na Ilha de Marajó (Fonte: Equipe de Campo 2006).

Quando realizada a análise filogenética, a amostra 1812 formou um clado separado dentro do grupo *Gammacoronavírus*, relacionado principalmente a aves domésticas, tais como galinhas e perus, ficando próximo à uma cepa vacinal de TCoV (Figura 14).

Obtivemos sucesso também no sequenciamento de duas regiões da região S1 do gene da proteína S deste vírus. Na análise filogenética da primeira sequência da proteína S obtida (figura 15) a sequência se mostrou bastante próxima da cepa USP-47 de IBV, encontrada por CHACON et al. (2011) em uma amostra de galinha do ano de 2004 na região Sudeste do Brasil. Já na análise da segunda sequência obtida, foi mais próxima das cepas USP-27 USP-29 e USP-30, todas detectadas por VILLARREAL et al. (2010) em galinhas de postura e frangos de corte no período de 2007 a 2008 nas regiões Sul e Sudeste do país.

A diferença entre a análise filogenética da sequência do gene da RpRd e das sequências do gene da proteína S ocorre por serem sequenciamentos parciais e os Coronavírus frequentemente sofrem recombinações.

Nas amostras provenientes do parque do Ibirapuera em São Paulo, na região sudeste. Detectamos a presença também de Coronavírus em 3 gansos chineses (*Anser cygnoides*) (figura 18).

Figura 18 - Ganso Chinês (*Anser cygnoides*) (Fonte: <http://bicharada.net/animais/pop.pix.php?f=5062>).

Em um desses gansos, obteve-se sequência que, apesar de segregar para o grupo dos *Gammacoronavírus*, formou um cluster divergente dos demais no qual estão relacionadas apenas aves migratórias. As outras duas amostras formaram um cluster pertencente ao grupo *Deltacoronavírus*. Apesar destas sequências demonstrarem estar estritamente relacionadas com Coronavírus de aves silvestres, este grupo inclui também, Coronavírus de ferrets, suínos e leopardos.

Esses dados são importantes, uma vez que as aves correspondem a uma grande parcela dos animais que habitam os parques municipais da cidade de São Paulo. Praticamente metade delas é residente ou visitante, coabita com a população e busca condições para completar seu ciclo de vida (PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO, 2007). Dentre as espécies de aves, os anatídeos ornamentais constituem uma parte considerável de animais que habitam os parques municipais, sendo frequente o contato entre o ser humano, aves domésticas e aves silvestres residentes e migratórias. Deve-se ressaltar que as 3 amostras foram coletadas no mesmo dia em gansos que vivem no mesmo ambiente, convivem com diversas aves selvagens que utilizam o parque como ponto de parada e podem entrar em contato com o grande número de pessoas que visitam o parque. Outro fator importante é que o estado de São Paulo é atualmente o maior produtor de ovos o 4º maior produtor de carne de frango do país (BELCHIOR; TAI; HELD, 2014).

A maioria dos coronavírus aviários do gênero *Gammacoronavirus*, se replica bem em ovos embrionados de galinha de 10 a 12 dias de idade, especialmente IBV, TCoV e PhCoV, provocando lesões como nanismo, enrolamento do embrião com os pés deformados e comprimidos contra a cabeça e taxas progressivas de mortalidade a medida em que as passagens são realizadas (FABIAN; NARANJO, 2011). No entanto, há poucos trabalhos a sobre

crescimento de *Deltacoronavírus* em ovos embrionados. Assim como no estudo de MIHINDUKULASURIYA (2008), não obtivemos sucesso na tentativa de isolamento do Coronavírus encontrado na amostra DEP5, porém não descartamos esta metodologia e novas tentativas deverão ser realizadas futuramente.

Com relação às amostras do Parque Nacional da Lagoa do Peixe, no Rio Grande do Sul, na região Sul do país obtivemos provenientes de aves migratórias que foram capturadas em áreas de invernada.

Assim como na região Sudeste, a o achado de Coronavírus aviários na região Sul do país tem uma grande importância econômica, pois a região é a maior produtora de carne de frango do país, sendo o Rio Grande do Sul o terceiro estado com maior produção (BELCHIOR; TAI; HELD, 2014). Sabe-se que um dos Coronavírus aviários melhor estudados até o momento, o IBV, em populações suscetíveis, tem morbidade de 100% com mortalidade de até 30%, além de um maior número de carcaças condenadas e menor produção de ovos (IGNJATOVIĆ; SAPATS, 2000).

Pela análise de sequências, também foi observada uma diferença nos vírus encontrados nas três amostras. As amostras PNLP 115 e PNLP 159 foram coletadas no mesmo dia, enquanto a amostra PNLP 100 foi coletada no dia anterior, no mesmo local. Ainda assim, os Coronavírus observados foram bastante diferentes entre si. As amostras PNLP100 e PNLP159 pertencente a *Calidris alba* (figura 19) e *Calidris fuscicollis* (figura 20) respectivamente apresentaram *Gammacoronavírus* semelhantes aos encontrados em maçaricos, formando um grupo restrito a estas espécies. Esses animais são importantes migrantes boreais, que nascem na América do Norte e migram para o Sul no período de inverno. Essas rotas têm um papel importante na dispersão dos vírus como demonstrado por MURADRASOLI no Estreito de Bering em 2010, identificando *Gammacoronavírus* em espécies de aves silvestres.

Por outro lado, na mesma expedição de captura e coleta de material biológico foi capturado um *Rynchops niger* (figura 21) portando *Deltacoronavírus*, que na breve análise filogenética apresentou segregação para o clado próximo aos vírus encontrados no Parque do Ibirapuera.

Figura 20 - Maçarico Branco (*Calidris alba*) (Fonte: <http://www.avescatarinenses.com.br/>).

Figura 21 - Maçarico-de-sobre-branco (*Calidris fuscicollis*) (Fonte: <http://www.avescatarinenses.com.br/>).

Figura 19 - Talha-mar (*Rynchops niger*) (Fonte: <https://commons.wikimedia.org>).

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho apresentamos um estudo retrospectivo detectando a presença de Coronavírus em aves migratórias e residentes de diferentes regiões do Brasil.

Na caracterização molecular, foram demonstrados Coronavírus do grupo *Gammacoronavírus* em uma galinha (*Gallus gallus*) proveniente da região Norte, um cisne chinês (*Anser cygnoides*) da região Sudeste e duas espécies de maçaricos (*Calidris alba* e *Calidris fuscicollis*) na região Sul enquanto Coronavírus do grupo *Deltacoronavírus* foram encontrados em dois cisnes chineses (*Anser cygnoides*) da região Sudeste e em um vira-pedras (*Rynchops niger*) da região Sul. A detecção de *Deltacoronavírus* circulando em aves é inédita no país. No sequenciamento de regiões de S1 do gene da proteína S do *Gammacoronavírus* na amostra de galinha, foi obtida sequência semelhante a cepas de IBV encontradas no Brasil.

A proximidade entre os vírus encontrados em diferentes regiões do país mostra evidências de que aves silvestres podem carrear estes Coronavírus entre diferentes sítios migratórios no Brasil.

A presença de *Delta* e *Gammacoronavírus* em um grande parque dentro da cidade de São Paulo, na região Sudeste, demonstra a circulação desses vírus em áreas urbanas e a proximidade das granjas avícolas presentes nesta região.

REFERÊNCIAS*

- BELOUZARD, S. et al. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. **Viruses**, v. 4, n. 6, p. 1011–1033, 2012.
- BELOUZARD, S.; MADU, I.; WHITTAKER, G. R. Elastase-mediated activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein at discrete sites within the S2 domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 30, p. 22758–22763, 2010.
- BERGMANN, C. C.; LANE, T. E.; STOHLMAN, S. A. Coronavirus infection of the central nervous system: host-virus stand-off. **Nature reviews. Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 121–132, 2006.
- BOERE, G.; STROUD, D. The flyway concept: what it is and what it isn't. In: _____ (eds) **Waterbirds around the world. A global overview of the conservation, management and research of the world's waterbird flyways**. Edinburgh: The Stationary Office, 2006. p. 40–47.
- CARDOSO, T. C. et al. Genetically diverse coronaviruses in captive bird populations in a Brazilian zoological park. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 11, n. 2, p. 165–168, 2011.
- CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Veterinary Research**, v. 38, p. 281–297, 2007.
- CHACON, J. L. et al. Epidemiological survey and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in Brazil between 2003 and 2009. **Avian pathology : journal of the W.V.P.A.**, v. 40, n. 2, p. 153–162, 2011.
- CHAN, J. F. W. et al. Interspecies transmission and emergence of novel viruses: Lessons from bats and birds. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 10, p. 544–555, 2013.
- CHEUNG, P. P. et al. Identifying the species-origin of faecal droppings used for avian influenza virus surveillance in wild-birds. **Journal of Clinical Virology**, v. 46, n. 1, p. 90–93, 2009.
- CHU, D. K. W. et al. Avian Coronavirus in Wild Aquatic Birds. **Journal of Virology**, v. 85, n. 23, p. 12815–12820, 2011.
- DE GROOT, R. J. et al. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV); Announcement of the Coronavirus Study Group. **Journal of virology**, v. 5, n. May, p. 13–15, 2013.
- DEVELEY, P. F.; GOERCK, J. M. Áreas Importantes para a Conservação das Aves nas Américas- Brasil. **Important Bird Areas Americas - Priority sites for biodiversity conservation**, p. 15, 2009.
- FABIAN, L.; NARANJO, N. Isolamento e propagação de Astrovírus , Adenovírus , Coronavírus , Parvovírus , Rotavírus e Reovírus de aves comerciais com problemas entéricos em ovos embrionados Isolamento e propagação de Astrovírus , Adenovírus , Coronavírus , Parvovírus , Rotavírus e. 2011.
- FENG, J. et al. Virulent Avian Infectious Bronchitis Virus, People's Republic of China. v. 18, n. 12, 2012.
- GÓES, L. G. B. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE. 2012.
- GOUGH, R. E. et al. Isolation of a coronavirus from a green-cheeked Amazon parrot (*Amazona viridigenalis* Cassin). **Avian pathology : journal of the W.V.P.A.**, v. 35, n. 2, p. 122–126, 2006.
- GRAHAM, R. L.; BARIC, R. S. Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. **Journal of virology**, v. 84, n. 7, p. 3134–3146, 2010.

GROSSOEHME, N. E. et al. Coronavirus N Protein N-Terminal Domain (NTD) Specifically Binds the Transcriptional Regulatory Sequence (TRS) and Melts TRS-cTRS RNA Duplexes. **Journal of Molecular Biology**, v. 394, n. 3, p. 544–557, 2009.

HAGEMEIJER, M. C.; ROTTIER, P. J. M.; DE HAAN, C. A. M. Biogenesis and dynamics of the coronavirus replicative structures. **Viruses**, v. 4, n. 11, p. 3245–3269, 2012.

HURST, K. R. et al. An interaction between the nucleocapsid protein and a component of the replicase-transcriptase complex is crucial for the infectivity of coronavirus genomic RNA. **Journal of virology**, v. 84, n. 19, p. 10276–10288, 2010.

ICMCBIO. **Relatório Anual de Rotas e Áreas de Concentração de aves migratórias no Brasil**. Brasília, DF: CEMAVE/ICMBio, 2014. 87 p.

IGNJATOVIĆ, J.; SAPATS, S. Avian infectious bronchitis virus. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 19, n. 2, p. 493–508, 2000.

KOPECKY-BROMBERG, S. A et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists. **Journal of virology**, v. 81, n. 2, p. 548–557, 2007.

LANE, B. et al. The ecology of bird migration patterns. n. Newton 2008, p. 1–3, 2011.

LI, K. S. et al. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. **Nature**, v. 430, n. 6996, p. 209–213, 2004.

LIAIS, E. et al. Novel Avian Coronavirus and Fulminating Disease in Guinea Fowl, France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 105–108, 2014.

LU, X. et al. SARS-CoV nucleocapsid protein antagonizes IFN- β response by targeting initial step of IFN- β induction pathway, and its C-terminal region is critical for the antagonism. **Virus Genes**, v. 42, n. 1, p. 37–45, 2011.

MAEDA, J. et al. Membrane topology of coronavirus E protein. **Virology**, v. 281, n. 2, p. 163–169, 2001.

MCBRIDE, R.; VAN ZYL, M.; FIELDING, B. The Coronavirus Nucleocapsid Is a Multifunctional Protein. **Viruses**, v. 6, n. 8, p. 2991–3018, 2014.

MCDONALD, S. M.; PATTON, J. T. Viral Genome Replication. **Genome**, p. 201–224, 2009.

MIHINDUKULASURIYA, K. A et al. Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray. **Journal of virology**, v. 82, n. 10, p. 5084–5088, 2008.

MILNE-PRICE, S.; MIAZGOWICZ, K. L.; MUNSTER, V. J. The emergence of the Middle East Respiratory Syndrome coronavirus. **Pathogens and Disease**, v. 71, n. 2, p. 121–136, jul. 2014.

MURADRASOLI, S. et al. Prevalence and phylogeny of coronaviruses in wild birds from the bering strait area (Beringia). **PLoS ONE**, v. 5, n. 10, p. 1–7, 2010.

NARAYANAN, K. et al. Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells. **Journal of virology**, v. 74, n. 17, p. 8127–8134, 2000.

OSVALDO, W. et al. Evolução da avicultura de corte no Brasil. p. 1666–1684, 2014.

PERLMAN, S.; NETLAND, J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. **Nature reviews. Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 439–450, 2009.

PINTO, C. D. O. **As grandes migrações continentais**. 2002. 29 f. Monografia (Licenciado em Ciências Biológicas). Faculdade de Ciências da Saúde, Centro Universitário de Brasília, Brasília. 2002.

POON, L. L. M. et al. Identification of a Novel Coronavirus in Bats Identification of a Novel Coronavirus in Bats. **Society**, v. 79, n. 4, p. 2001–2009, 2009.

SATIJA, N.; LAL, S. K. The molecular biology of SARS coronavirus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1102, p. 26–38, 2007.

SAWICKI, S. G.; SAWICKI, D. L.; SIDDELL, S. G. A contemporary view of coronavirus transcription. **Journal of virology**, v. 81, n. 1, p. 20–29, 2007.

SILVA, M. A. D. P. et al. Oferta de exportação de carne de frango do Brasil, de 1992 a 2007. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 49, n. 1, p. 31–53, 2011.

VALENTE, R. D. M. et al. **Conservação de Aves Migratórias Neárticas no Brasil**. 1ª Ed. Belém: Conservação Internacional – CI-Brasil, 2011. 400 p.

VILLARREAL, L. Y. B. et al. Molecular epidemiology of avian infectious bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in breeders, broilers, and layers. **Avian diseases**, v. 54, n. 2, p. 894–898, 2010.

VOILÀ, M.; TRICHES, D. A cadeia de carne de frango: uma análise dos mercados brasileiro e mundial de 2002 a 2010. **Pesquisas Econômicas e Sociais**, n. 044. 2013.

WERTHEIM, J. O. et al. A case for the ancient origin of coronaviruses. **Journal of virology**, v. 87, n. 12, p. 7039–45, 2013.

WOO, P. C. Y. et al. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. **Viruses**, v. 2, n. 8, p. 1805–1820, 2010.

WOO, P. C. Y. et al. Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavi. **Journal of Virology**, v. 86, n. 7, p. 3995–4008, 2012.

World Health Organization (WHO). Alert, verification and public health management of SARS in the post-outbreak period, 2004. Disponível em <http://www.who.int/csr/sars/postoutbreak/en>. Acesso em: 20/05/15

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Summary of Current Situation , Literature Update and Risk Assessment. July, 2015. Disponível em http://www.wpro.who.int/outbreaks_emergencies/wpro_coronavirus/en/. Acesso em: 20/05/15.

WU, K. et al. Mechanisms of host receptor adaptation by severe acute respiratory syndrome coronavirus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 12, p. 8904–8911, 2012.

ZIEBUHR, J. Molecular biology of severe acute respiratory syndrome coronavirus. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 412–419, 2004.

ZÚÑIGA, S. et al. Coronavirus nucleocapsid protein facilitates template switching and is required for efficient transcription. **Journal of virology**, v. 84, n. 4, p. 2169–2175, 2010.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ANEXO

A - Tabela de amostras positivas para o Nested-PCR, nome popular, nome científico, local e data de coleta. Amostras sombreadas foram confirmadas por sequenciamento.

Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Local de coleta	Data de coleta
1809	Peru	<i>Meliagres gallopavo</i>	Ilha de Marajó- PA	13/07/2006
1810	Peru	<i>Meliagres gallopavo</i>	Ilha de Marajó - PA	13/07/2006
1812	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	Ilha de Marajó - PA	13/07/2006
DEP4	Ganso Chinês	<i>Anser cygnoides</i>	Parque do Ibirapuera - São Paulo - SP	/07/2013
DEP5	Ganso Chinês	<i>Anser cygnoides</i>	Parque do Ibirapuera - São Paulo - SP	/07/2013
DEP10	Ganso Chinês	<i>Anser cygnoides</i>	Parque do Ibirapuera - São Paulo - SP	/07/2013
DEP13	Ganso Chinês	<i>Anser cygnoides</i>	Parque do Ibirapuera - São Paulo - SP	/07/2013
DEP16	Ganso Chinês	<i>Anser cygnoides</i>	Parque do Ibirapuera - São Paulo - SP	/07/2013
DEP18	Ganso Chinês	<i>Anser cygnoides</i>	Parque do Ibirapuera - São Paulo - SP	/07/2013
DEP26	Ganso Chinês	<i>Anser cygnoides</i>	Parque do Ibirapuera - São Paulo - SP	/07/2013
DEP41	Ganso Chinês	<i>Anser cygnoides</i>	Parque do Ibirapuera - São Paulo - SP	/07/2013
A 593	Maçarico rasteiro	<i>Calidris pusilla</i>	Ilha de Canelas - PA	18/12/2009
A 632	Batuíra de bando	<i>Charadrius semipalmatus</i>	Ilha de Canelas - PA	18/12/2009
A 634	Vira pedras	<i>Arenaria interpres</i>	Ilha de Canelas - PA	18/12/2009

PNLP11	Pernilongo	<i>Himantopus melanurus</i>	Parque Nacional da Lagoa do Peixe - RS	12/11/2009
PNLP23	Maçarico de sobre branco	<i>Calidris fuscicollis</i>	Parque Nacional da Lagoa do Peixe - RS	12/11/2009
PNLP24	Vira-pedras	<i>Arenaria interpres</i>	Parque Nacional da Lagoa do Peixe - RS	12/11/2009
PNLP34	Narceja de bico torto	<i>Nycticriphes semicollaris</i>	Parque Nacional da Lagoa do Peixe - RS	13/11/2009
PNLP62	Bobo pequeno	<i>Puffinus puffinus</i>	Parque Nacional da Lagoa do Peixe - RS	14/11/2009
PNLP74	Maçarico de sobre branco	<i>Calidris fuscicollis</i>	Parque Nacional da Lagoa do Peixe - RS	15/11/2009
PNLP77	Talha mar	<i>Rynchops niger</i>	Parque Nacional da Lagoa do Peixe - RS	15/11/2009
PNLP88	Biguá	<i>Phalacrocorax brasilianus</i>	Parque Nacional da Lagoa do Peixe - RS	17/11/2009
PNLP100	Maçarico Branco	<i>Calidris alba</i>	Parque Nacional da Lagoa do Peixe - RS	18/11/2009
PNLP115	Talha mar	<i>Rynchops niger</i>	Parque Nacional da Lagoa do Peixe - RS	19/11/2009
PNLP159	Maçarico de sobre branco	<i>Calidris fuscicollis</i>	Parque Nacional da Lagoa do Peixe - RS	19/11/2009