

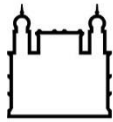
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS COXSACKIEVÍRUS B5 ASSOCIADOS A
INFECÇÕES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL NO BRASIL**

RAIANA SCERNI MACHADO

Rio de Janeiro
Outubro de 2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

RAIANA SCERNI MACHADO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS COXSACKIEVÍRUS B5 ASSOCIADOS A
INFECÇÕES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo Pedro de Sousa Junior

Rio de Janeiro

Outubro de 2021

Scerni Machado, Raiana.

Caracterização molecular dos coxsackievírus B5 associados a infecções no sistema nervoso central no Brasil / Raiana Scerni Machado. - Rio de Janeiro, 2021.

66 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2021.

Orientador: Ivanildo Pedro de Sousa Junior.

Bibliografia: f. 53-60

1. enterovirus . 2. coxsackievirus B5. 3. sistema nervoso central. I. Título.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: RAIANA SCERNI MACHADO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS COXSACKIEVÍRUS B5 ASSOCIADOS A
INFECÇÕES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL NO BRASIL**

ORIENTADOR: Dr. Ivanildo Pedro de Sousa Junior

Aprovada em: 13/ 10 / 2021

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a Luciane Almeida Amado Leon	Presidente (IOC/FIOCRUZ)
Prof. Dr. Tulio Machado Fumian	Membro (IOC/FIOCRUZ)
Prof.^a Dr.^a Luana da Silva Soares Farias	Membro (IEC)
Prof. Dr. Jorlan Fernandes de Jesus	Suplente (IOC/Fiocruz)
Prof.^a Dr.^a Renata Tourinho Santos Cantinho Bricio	Suplente (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 13 de outubro de 2021

Dedico este trabalho à minha mãe, Socorro Scerni, pelo exemplo de mulher. Às minhas irmãs, Raissa e Rafaela, aos meus amados avós, Benedito e Nair, e aos meus queridos tios, Ana Lúcia, Afrânio, Regina, Élcio e Márcio, por todo amor, apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ter colocado pessoas maravilhosas no meu caminho e por ser meu porto seguro sempre. E a todos os amigos de luz e anjos protetores que me cercam e me protegem.

À minha mãe, Socorro Scerni, que com muita força, vontade e sabedoria que uma mãe pode ter, criou três filhas sozinha. Obrigada por ter abdicado de muita coisa para nos dar o melhor sempre. Obrigada por todo amor, aperto de orelha e incentivo. Obrigada pelo exemplo de mulher que és. Obrigada por tudo.

Às minhas irmãs, Rafaela Scerni e Raissa Scerni, por sempre estarem ao meu lado compartilhando todos os momentos bons e difíceis da minha vida.

Aos meus amados avós, Benedito e Nair Scerni, por todo amor e cuidado.

Aos meus queridos tios, Afrânio e Ana Lúcia, por terem me acolhido como filha no Rio de Janeiro, por terem me dado todo suporte, todo amor e cuidado.

Aos meus tios Regina, Élcio e Márcio, por todo amor e incentivo que sempre me deram.

Aos meus filhos de quatro patas, Príncipe (*in memoriam*), Bruce e Neném, por cada fungada no cangote que foi um gás a mais nas horas difíceis.

À minha amiga/irmã de alma, Laryssa, por estar ao meu lado nos momentos bons e ruins e por cada palavra de sabedoria e amor.

Ao meu orientador, Dr. Ivanildo Sousa, por todo o conhecimento que me passou e que levarei por toda a minha vida, por ter confiado esse projeto a mim e por todo apoio que me deu.

Ao Dr. Fernando Tavares, pela amizade e pelas palavras de incentivo nos momentos mais difíceis que passei.

Ao Dr. Edson Elias da Silva, chefe do Laboratório de Enterovírus, pela oportunidade e confiança de desenvolver esse projeto no laboratório.

Aos meus amigos do Laboratório de Enterovírus, Dr^a. Fernanda, Cristiane, Jéssica, Lidiane, Emanuelle, Brendo e Irving, pela amizade e colaboração de todos para a realização deste projeto.

A todos os funcionários do Pavilhão Hélio e Peggy Pereira.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para a realização deste estudo.

A todos da turma de mestrado em Medicina Tropical de 2020, em especial, Ana Luísa, Wagner, Raissa e Gabriel, pelos momentos de descontração durante esse período no mestrado e pela amizade.

“Os sonhos não determinam o lugar que você vai estar, mas produzem a força necessária para o tirar do lugar em que está”.

Augusto Cury

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS COXSACKIEVÍRUS B5 ASSOCIADOS A INFECÇÕES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL NO BRASIL

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Raiana Scerni Machado

Os enterovírus humanos (EV) são vírus de RNA, não envelopados, pertencentes à família *Picornaviridae*. Embora a maioria das infecções por EV sejam assintomáticas e autolimitadas, esses vírus podem causar um amplo espectro de apresentações clínicas, incluindo síndromes graves do sistema nervoso central (SNC). O coxsackievírus B5 (CVB5) é um dos tipos de EV mais prevalentes em humanos e epidemias causadas por esses vírus são relatadas anualmente em todo o mundo. O objetivo deste estudo foi determinar a diversidade genética dos CVB5 associados a infecções no sistema nervoso central no Brasil. Para isso, foram utilizados isolados de CVB5 obtidos a partir de amostras de líquido cefalorraquidiano e fezes de pacientes com meningite asséptica e paralisia flácida aguda, respectivamente. Foi realizada a reinoculação das amostras em linhagens celulares (HEp2C e RD). Em seguida, foi realizada a extração do RNA, síntese do cDNA e PCR para amplificação da principal proteína do capsídeo viral (VP1). Posteriormente, foi realizada a reação de sequenciamento baseada no método de Sanger e a análise filogenética das sequências obtidas. De 2005 a 2019, 58 isolados de CVB5 foram identificados no âmbito do Programa Brasileiro de Vigilância da Poliomielite. As análises das sequências de VP1 revelaram dois genogrupos CVB5, A e B, circulando no Brasil. A análise filogenética sugeriu a circulação do genogrupo A (subgenogrupo A4) a partir de 2017 no país, enquanto os isolados de CVB5 pertencentes ao genogrupo B (subgenogrupo B2) antes de 2017. A análise baseada nas sequências de aminoácidos mostrou substituições importantes em resíduos conhecidos por desempenhar papéis importantes no tropismo viral. Este trabalho fornece informações valiosas sobre a diversidade de CVB5 associada à infecção do SNC no Brasil, apontando para a importância da vigilância dos enterovírus não-pólio em doenças neurológicas.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF COXSACKIEVIRUS B5 ASSOCIATED
WITH CENTRAL NERVOUS SYSTEM INFECTION IN BRAZIL**

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

Raiana Scerni Machado

Human enteroviruses (EV) are non-enveloped RNA viruses belonging to the Picornaviridae family. Although most EV infections are asymptomatic and self-limiting, these viruses can cause a wide spectrum of clinical outcomes, including severe central nervous system (CNS) syndromes. Globally, coxsackievirus B5 (CVB5) is one of the most prevalent EV-types in humans and epidemics caused by these viruses are reported annually. The aim of this study was to determine the genetic diversity of CVB5 associated with infections in the central nervous system in Brazil. For this purpose, assays were performed with CVB5 isolates obtained from cerebrospinal fluid and stool samples of aseptic meningitis and acute flaccid paralysis patients, respectively. Specimens were inoculated in cell lines (HEp2C and RD). After cytopathic effect (CPE), RNA extraction, cDNA synthesis and PCR were performed to amplify the main viral capsid protein (VP1). Subsequently, we performed the sequencing reaction based on the Sanger method and phylogenetic analysis. From 2005 to 2019, 58 isolates of CVB5 were identified in the scope of the Brazilian Poliomyelitis Surveillance Program. VP1 sequence analyzes revealed two CVB5 genogroups, A and B, circulating in Brazil. A. Phylogenetic analysis suggested the circulation of genogroup A (subgenogroup A4) from 2017 in the country, while CVB5 isolates belonging to genogroup B (subgenogroup B2) showed a circulation prior to 2017. Network analysis based on deduced amino acid sequences showed important substitutions in residues known to play critical roles in viral host tropism, cell entry and viral antigenicity. This work provides valuable information on CVB5 diversity associated with CNS infection in Brazil, pointing to the importance of surveillance of non-polio enteroviruses in neurological diseases.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 HISTÓRICO	16
1.1.1 Paralisia Flácida Aguda	17
1.1.2 Meningite Asséptica	18
1.1.3 Classificação	18
1.1.4 Organização genômica e proteica	19
1.1.5 Ciclo de replicação	22
1.1.6 Patogenia	24
1.1.7 Diagnóstico laboratorial dos enterovírus	26
1.1.8 Epidemiologia dos enterovírus associados a infecções no sistema nervoso central	27
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	31
4.2 DESENHO DO ESTUDO	31
4.3 AMOSTRAS CLÍNICAS	31
4.4 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS	33
4.4.1 Isolamento em cultivo celular	33
4.4.2 Extração do RNA viral	34
4.4.3 Síntese do cDNA	35
4.4.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do gene que codifica a proteína VP1	35
4.4.5 Eletroforese e purificação do produto amplificado	35
4.4.6 Purificação do produto de PCR	36
4.4.7 Avaliação quantitativa dos produtos de PCR purificados	36
4.4.8 Reação de sequenciamento nucleotídico (Sanger)	37
4.4.9 Edição das sequências nucleotídicas	37
4.4.10 Número de acesso de depósito das sequências no GenBank	38
4.4.11 Análise filogenética	38
5 RESULTADOS	39
5.1 PERFIL DAS AMOSTRAS ANALISADAS	39

5.2	AMPLIFICAÇÃO DO GENE VP1 COMPLETO DO CVB5	39
5.3	ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE VP1 DE CVB5	40
5.4	ANÁLISE DOS AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA VP1	43
6	DISCUSSÃO	46
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	51
8	CONCLUSÕES	52
9	REFERÊNCIAS	53
10	ANEXOS	61
10.1	ANEXO 1- PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP) FIOCRUZ.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1.1	Representação esquemática do genoma dos enterovírus. VP0, VP1, VP2, VP3 e VP4- proteínas estruturais que formam o capsídeo viral; VPg-proteína covalentemente ligada ao genoma viral; IRES- sítio de entrada e ligação do ribossomo interno presente na 5'NC; P1, P2 e P3- precursores proteicos; 2A, 2B, 2C, 3A, 3C, 3D- proteínas não estruturais.	20
1.2	Representação esquemática da disposição das quatro proteínas estruturais que formam o capsídeo dos enterovírus.	21
1.3	Representação esquemática do ciclo de replicação dos enterovírus.	24
1.4	Patogenia dos enterovírus.	26
4.1	Fluxograma simplificado do processamento laboratorial das amostras analisadas no estudo.	33
4.2	Efeito do isolamento dos enterovírus em cultivo celular	34
5.1	Produtos da amplificação do gene VP1 completo do CVB5 obtidos por PCR e visualizados em gel de agarose 1,5%.	40
5.2	Árvore filogenética construída usando um algoritmo de máxima verossimilhança (PhyML) com base nas sequências do CVB5 do gene VP1 (849pb).	41
5.3	Alinhamento de sequências de aminoácidos deduzidas da proteína VP1 das cepas do CVB5.	44

LISTA DE TABELAS

Tabelas	Título	Página
1.1	Classificação taxonômica dos enterovírus humanos.	19
4.1	Dados socioepidemiológicos das amostras utilizadas no estudo.	32
4.2	Oligonucleotídeos utilizados na PCR e na reação de sequenciamento.	37
5.1	Distribuição das amostras analisadas provenientes dos casos de Paralisia Flácida Aguda (PFA) e Meningite asséptica (MA) conforme local de coleta.	39
5.2	Semelhança de nucleotídeos e de aminoácidos entre os isolados de CVB5 analisados neste estudo com a cepa protótipo Faulkner.	42
5.3	Mudanças de aminoácidos que ocorreram dentro do gene VP1 dos isolados de CVB5.	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
µL	Microlitro
2Apro	Região 2A protease no genoma dos enterovírus
2C	Região da polimerase no genoma dos enterovírus
3' NC	Região 3' não codificante do genoma dos enterovírus
3D	Região da polimerase no genoma dos enterovírus
A	Alanina
aa	Aminoácido
AL	Alagoas
BA	Bahia
CAR	Receptor coxsackievírus-adenovírus
CE	Ceará
CVA	coxsackievírus do grupo A
CVB	coxsackievírus do grupo B
CVB5	coxsackievírus B5
D	Ácido aspártico
DAF	Aceleração da decadência do complemento
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
ECP	Efeito citopático
EV	Enterovírus
EVNP	Enterovírus não-pólio
G	Glicina
HEp2-C	Células de carcinoma epidermoide humano
HPeVs	parechovírus humanos
IEC	Instituto Evandro Chagas
IRES	Sítio de entrada e ligação do ribossomo interno
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
L20B	Células L de camundongo geneticamente modificadas
LEV	Laboratório de Enterovírus
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MA	Meningite asséptica
MFA	Mielite flácida aguda
MS	Ministério da Saúde
N	Asparagina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Pernambuco
PFA	Paralisia flácida aguda
pH	Potencial de hidrogênio
pmol	Picomol
PR	Paraná
Primer	Oligonucleotídeo iniciador
PV	Poliovírus
Q	Glutamina
RD	Células de rhabdomiosarcoma humano
RJ	Rio de Janeiro
RNA	Ácido ribonucleico
RS	Rio Grande do Sul

SNC	Sistema nervoso central
SP	São Paulo
T	Treonina
TAE	Tris-Acetato-EDTA
VP0	Proteína viral estrutural imatura
VP1	Proteína viral estrutural 1
VP2	Proteína viral estrutural 2
VP3	Proteína viral estrutural 3
VP4	Proteína viral estrutural 4
VPg	Proteína viral G ligada à região 5'NC
Y	Tirosina

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

Os *Enterovirus* (EV) (família *Picornaviridae*) são vírus de transmissão predominantemente entérica, podendo ser encontrados em todas as regiões do mundo sendo um dos agentes mais prevalentes entre os causadores de doenças em humanos. Somente nos Estados Unidos são registradas, aproximadamente, 10 a 15 milhões de infecções por enterovírus anualmente (WELLS; COYNE, 2019).

A família *Picornaviridae* teve um papel de extrema importância no desenvolvimento da virologia moderna. A pesquisa original sobre “agentes infecciosos ultrafiltráveis”, como o vírus da febre aftosa e o poliovírus (PV), deu início à era da virologia animal. A história dos enterovírus está intimamente relacionada à história dos poliovírus (PV), que é o tipo de enterovírus mais amplamente conhecido, sendo este um ponto de referência não apenas no estudo dos vírus pertencentes à família *Picornaviridae*, mas de toda a virologia (CIFUENTE; MORATORIO, 2019).

Durante um surto de poliomielite que ocorreu em 1948, Dalldorf e Sickles isolaram um novo vírus a partir de amostras fecais de crianças com suspeita clínica da doença. As suspensões fecais foram inoculadas em camundongos recém-nascidos e acabaram induzindo paralisia, o que normalmente não ocorre com os poliovírus, que tendem a causar a doença somente em primatas. Esses vírus foram denominados coxsackievírus, referindo-se à região no qual eles foram isolados pela primeira vez, em Coxsackie, Nova York. No ano seguinte, foram isolados os coxsackievírus B (CVB), a partir de casos de meningite asséptica (SURESH et al., 2020).

A introdução do cultivo celular nos laboratórios de virologia permitiu o isolamento de novos tipos de enterovírus, que não se replicavam em modelos animais. Os ecovírus, assim como os coxsackievírus, foram isolados durante a investigação dos casos de poliomielite, mas não possuíam propriedades patogênicas em modelos experimentais. A denominação ecovírus (“Enteric Cytopathogenic Human Orphan Virus”) foi escolhida devido à ausência de associação com doença humana naquela época. Estudos posteriores revelaram que estes vírus eram responsáveis por várias doenças em humanos (PALLANSCH et al., 2013). Desde então, com o avanço no desenvolvimento de novas tecnologias voltadas para a detecção e caracterização viral, novos tipos de enterovírus vêm sendo descobertos (SURESH et al., 2020).

A maioria das manifestações clínicas associadas aos EV são assintomáticas e autolimitadas. Entretanto, esses vírus podem causar um amplo espectro de manifestações clínicas, tais como doença de mão-pé e boca, conjuntivite hemorrágica aguda, doença hemorrágica multi-sistêmica em recém-nascido, mialgia, miocardite, diabetes tipo I, uveíte. Além disso, estes vírus são comumente associados a doenças neurológicas graves tais como meningites, encefalites e paralisia flácida aguda (poliomielite) (WELLS; COYNE, 2019; PONS-SALORT et al., 2015; FERNANDEZ-GARCIA et al., 2017).

1.1.1 Paralisia Flácida Aguda

A paralisia flácida aguda (PFA), caracterizada pelo início súbito de uma paralisia assimétrica dos membros, pode ser causada por agentes infecciosos ou não infecciosos (SOLOMON; WILLISON, 2003). Sua ocorrência mundial faz com que seja um grande problema de saúde pública, principalmente devido a prevalência em crianças. A doença pode danificar a medula espinhal, os nervos periféricos, as junções neuromusculares e músculos. A PFA é a expressão clínica característica da poliomielite aguda, causada pelos PV selvagens. Além dos PV, outros picornavírus podem causar doença semelhante à PFA, como alguns enterovírus não-pólio (EVNP) e os parechovírus humanos (HPeVs) (MAAN et al., 2013).

À medida que nos aproximamos da erradicação de todas as três cepas dos PV, a incidência de poliomielite diminuiu drasticamente (JORBA et al., 2018). Entretanto, os quadros de comprometimento do sistema nervoso central (SNC), incluindo os quadros semelhantes à paralisia causada pelos PV, ainda constituem ocorrências em todo mundo. Desta forma, outros agentes infecciosos certamente têm participação nesses quadros clínicos (MAAN et al., 2019).

A PFA pode ser determinada por inúmeros EVNP, incluindo os coxsackievírus A e B e pelos ecovírus. As manifestações de PFA por esses vírus se apresentam de forma esporádica, existindo, no entanto, relatos de epidemias ocorridas na Escócia causadas pelo CVA7 e pelo ecovírus 11 na região do Caribe (PALLANSCH et al., 2013). Além disso, a associação dos EVNP com os casos de PFA já foi demonstrada em diferentes estudos (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2017; BINGJUN et al., 2008; KAPOOR et al., 2008).

1.1.2 Meningite Asséptica

A meningite asséptica (MA) representa a inflamação das membranas que revestem o cérebro e a medula espinhal, conhecida como meninges (RHOADES et al., 2011). É uma das manifestações mais comuns nas infecções virais envolvendo o sistema nervoso central, no qual os enterovírus são os principais agentes etiológicos envolvidos (PALLANSCH et al., 2013). O número exato da incidência da MA disponíveis mundialmente ainda são inconsistentes, mas estima-se que 80% dos casos ocorrem devido à infecção pelos enterovírus (MAJER et al., 2020).

A apresentação clínica da MA varia com a idade do paciente e o estado imunológico. Normalmente está associada à febre, mal-estar, cefaleia, fotofobia e sinais meníngeos (PALLANSCH et al., 2013). O termo meningite implica ausência do envolvimento do cérebro (encefalite) ou da medula espinhal (encefalomielite). Quando a infecção se propaga das meninges para as células do parênquima cerebral ocorre a meningoencefalite (DA SILVA et al., 2005).

Os principais EV identificados em casos de MA no mundo incluem o coxsackievírus B5 (CVB5), além dos CVA9, CVB1, CVB4, E4, E6, E9, E11, E13, E18, E30, E32 e E33 (SURESH et al., 2020). No Brasil, existe um número limitado de estudos sobre EV que estão associadas às MA. Atualmente, os dados disponíveis se restringem a relatos isolados de surtos que ocorrem anualmente envolvendo principalmente o E6 e o E30 (DA SILVA et al., 2005; DOS SANTOS et al., 2006; RAMALHO et al., 2019).

1.1.3 Classificação

Segundo a classificação taxonômica atual, os enterovírus encontram-se classificados dentro do reino *Orthornavirae*, filo *Pisuviricota*, classe dos *Pisoniviricetes*, ordem *Picornavirales*, família *Picornaviridae* e gênero *Enterovirus* (ICTV, 2021). Atualmente, a família *Picornaviridae* consiste em 158 espécies agrupadas em 68 gêneros. Desses, apenas sete possuem representantes que infectam o homem (*Enterovirus*, *Hepatovirus*, *Parechovirus*, *Cardiovirus*, *Cosavirus*, *Salivirus* e *Kobuvirus*) (ADAMS et al., 2016).

O gênero *Enterovirus* é composto por 15 espécies e com base nas características moleculares e antigênicas, os enterovírus que infectam humanos são atualmente classificados em quatro espécies denominadas de A -D, com mais de 100 tipos descritos, incluindo os

rinovírus de A -C (PICORNAVIRUS HOME PAGE, 2021). Este grande grupo de vírus inclui os poliovírus (3 tipos), os coxsackievírus A (21 tipos), coxsackievírus B (6 tipos), os ecovírus (28) e 48 tipos de enterovírus numerados sequencialmente (Tabela 1.1) (SIMMONDS et al., 2020).

Espécie EV	Tipos de EV
A	CVA 2–8, 10, 12, 14, 16, EV-A71, 76, 89–92, 114, 119–121
B	CVA9, CVB 1-6, E 1–7, 9, 11–21, 24–27, 29–33, EV-B69, 73–75, 77–88, 93, 97, 98, 100, 101,106, 107
C	PV 1–3, CVA 1, 11, 13, 17, 19–22, 24, EV-C95, 96, 99, 102, 104, 105, 109, 113, 116–118
D	EV-D68, 70, 94, 111

Tabela 1.1: Classificação taxonômica dos enterovírus humanos.

Fonte: Picornaviridae, 2021.

1.1.4 Organização genômica e proteica

Os enterovírus, incluindo os coxsackievírus, possuem uma estrutura genômica composta por um RNA de fita simples, de polaridade positiva, com um peso molecular de cerca de $2,6 \times 10^6$ daltons (aproximadamente 7.500 nucleotídeos). O RNA genômico funciona como RNA mensageiro, com uma cauda poliadenilada na extremidade 3' não codificante (NC) e uma pequena proteína (VPg) (“Virion Protein genome”) ligada covalentemente à extremidade 5' NC. Os primeiros nucleotídeos (cerca de 740) que compõe o genoma dos enterovírus a partir da extremidade 5' NC, possuem regiões extremamente conservadas entre todos os tipos de EV. Nesta região, está localizado o sítio de entrada e ligação do ribossomo interno (IRES), no qual se inicia a tradução. O RNA viral termina na região 3' não codificante contendo aproximadamente 70 nucleotídeos, seguida por uma cauda poli-A de 40 a 100 nucleotídeos (Figura 1.1) (VAN DER LINDEN et al., 2015).

Os enterovírus são vírus pequenos, medindo aproximadamente 30 nm de diâmetro (nanômetros), icosaédrico e não envelopados. O RNA desses vírus codifica uma poliproteína, que é clivada durante o processo de replicação, dando origem as proteínas virais estruturais (VP1, VP2, VP3 e VP4) e não estruturais (2A-C e 3A-3D) importantes para a replicação. As clivagens são realizadas por proteínas codificadas pelo próprio vírus, gerando diversos produtos

proteicos com diferentes funções, como as proteínas do capsídeo, proteinase e RNA polimerase (PALLANSCH et al., 2013).

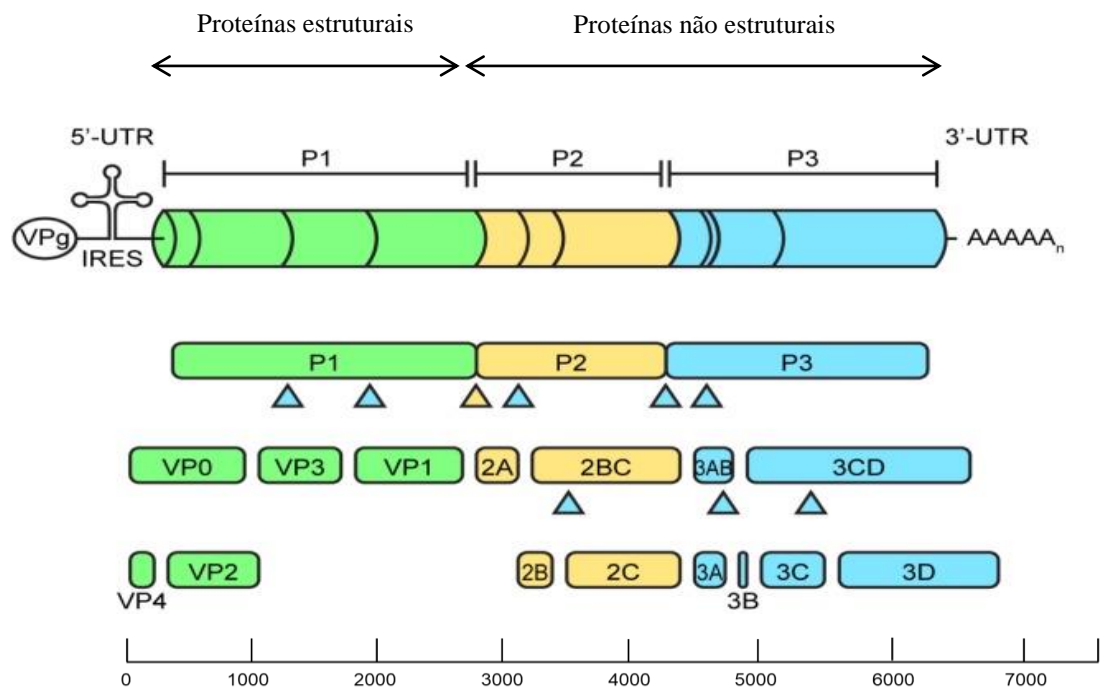


Figura 1.1: Representação esquemática do genoma dos enterovírus. VP0, VP1, VP2, VP3 e VP4- proteínas estruturais que formam o capsídeo viral; VPg-proteína covalentemente ligada ao genoma viral; IRES- sítio de entrada e ligação do ribossomo interno presente na 5'NC; P1, P2 e P3- precursores proteicos; 2A, 2B, 2C, 3A, 3C, 3D- proteínas não estruturais. Fonte: Adaptado de van der Linden et al., 2015.

O capsídeo apresenta simetria icosaédrica, composto de 60 subunidades idênticas (protômeros), constituído de 4 polipeptídeos ou proteínas, denominadas: VP1, VP2, VP3 e VP4, que são produtos de reações proteolíticas do segmento P1. As proteínas VP1, VP2 e VP3 estão expostas na superfície do vírion, enquanto a proteína VP4 fica internalizada no cerne do capsídeo e está associada ao RNA viral (Figura 1.2) (PALLANSCH et al., 2013).

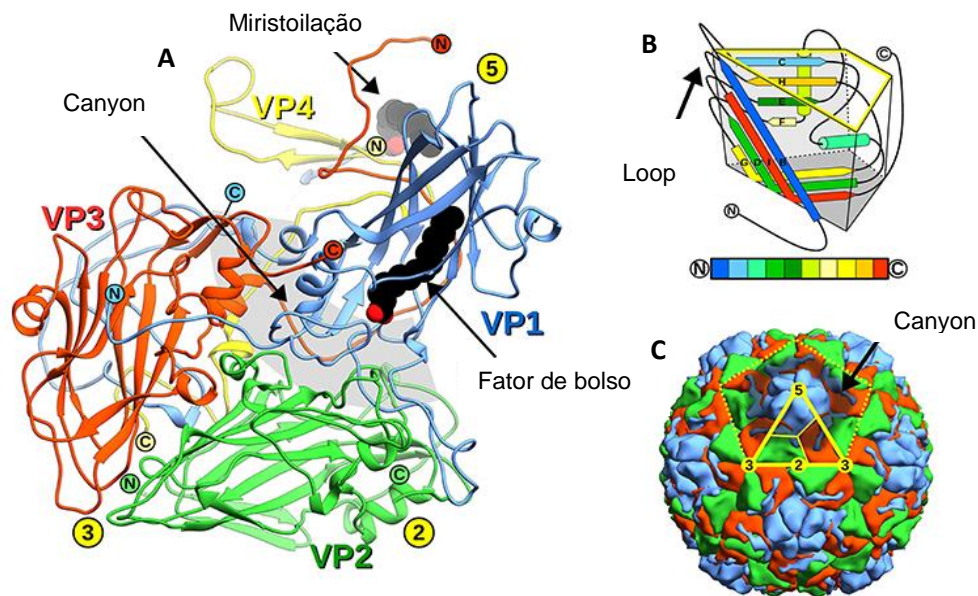


Figura 1.2: Representação esquemática da disposição das quatro proteínas estruturais que formam o capsídeo dos enterovírus.

Legenda: (A) Visão geral do protômero dos enterovírus com as proteínas VP1 (azul), VP2 (verde), VP3 (vermelho) e VP4 (amarelo). Os terminais N e C da proteína são indicados pelas letras correspondente, e os círculos amarelos mostram as posições dos eixos de simetria 5, 3 e 2. Componentes lipídicos como a miristoilação VP4 e o “fator de bolso” são representados como esferas pretas. A região do “canyon” é mostrada como uma sombra de segmento circular cinza. (B) Esquema da dobra das proteínas VP1-3 inscritas em um prisma trapezoidal onde a face destacada em amarelo corresponde à superfície externa do capsídeo, e a base cinza escura está voltada para o capsídeo interno. Os elementos da estrutura secundária são coloridos do terminal N ao C de acordo com a barra de código de cores abaixo. (C) Visão geral do capsídeo dos picornavírus mostrando a superfície externa de VP1 (azul), VP2 (verde) e VP3 (vermelho).

Fonte: Adaptado de Cifuenten; Moratorio, 2019.

Os epítomos responsáveis pela indução de anticorpos neutralizantes estão localizados nas três proteínas estruturais (VP1, VP2 e VP3), em sua maioria na VP1, que é a proteína mais exposta e a principal proteína utilizada para estudos de epidemiologia molecular dos enterovírus (CIFUENTEN; MORATORIO, 2019).

As três proteínas estruturais (VP1- VP3) apresentam uma dobra comum, formado por duas folhas β antiparalelas de quatro fitas e duas hélices (Figura 1.2B). As fitas β das proteínas do capsídeo viral estão conectadas por alças de aminoácidos, denominadas de loops (Figura 1.2B). Já a proteína VP4 fica localizada dentro do capsídeo apresentando um anel de miristoil em seu terminal N (Figura 1.2A). As principais características da superfície do capsídeo incluem uma protrusão principal construída pela interação de cópias de VP1 formando um vértice de 5x em forma de estrela e um vale circundante de 5 dobras chamado de "canyon" hidrofóbico (MUCKELBAUER et al., 1995). As diferenças de loop resultam em traços de superfície distintos entre os enterovírus. Além disso, alguns picornavírus exibem uma molécula

lipídica, o "pocket fator" (fator de bolso), ligada a uma cavidade localizada dentro da VP1, que garante a estabilidade das partículas (Figura 1.2A) (CIFUENTE; MORATORIO, 2019).

A proteína VP1 apresenta 6 loops em sua superfície (BC, DE, DE/aB, GF, GH e HI) que estão localizadas no eixo 5x do capsídeo. O sítio de neutralização específico do sorotipo está localizado no loop BC, uma região encontrada na extremidade carboxila da proteína e associada à antigenicidade viral, portanto, é um determinante chave do genótipo (NORDER et al., 2003). Na resposta imune ao vírus, anticorpos capazes de neutralizar a infectividade viral são normalmente produzidos contra as sequências presentes nos loops, que são, portanto, os componentes mais importantes dos sítios antigênicos de neutralização. Além disso, são essas regiões que normalmente estão associadas ao neurotropismo viral e a evasão imune. (PALLANSCH et al., 2013).

1.1.5 Ciclo de replicação

O ciclo de replicação dos enterovírus inicia com a adsorção da partícula viral aos receptores específicos localizados na superfície da membrana plasmática da célula, resultando em endocitose mediada por receptor. Os enterovírus podem usar diferentes vias endocíticas, dependendo do tipo de EV e do tipo de célula. Por exemplo, a proteína de superfície CD55 (também conhecida como fator de aceleração da decadência do complemento- DAF) é um receptor para certos coxsackievírus A e B. A ligação ao DAF ativa eventos de sinalização em células epiteliais polarizadas, que liberam o receptor de desencapsulamento (coxsackievirus-receptor de adenovírus-CAR) de junções estreitas, tornando CAR acessível ao vírus (BAGGEN et al., 2018a; COYNE; BERGELSON, 2006). Os fatores de ligação podem ser determinantes do tropismo viral, o que foi destacado por um estudo recente sobre a variante do CVA24, no qual foi demonstrado que a adaptação ao receptor de ligação ácido siálico estava associada ao surgimento de pandemias de conjuntivite hemorrágica aguda (BAGGEN et al., 2018b).

A ligação ao receptor e/ou mudanças de pH no sistema endossomal induzem o desencapsulamento do vírus, que consiste na liberação do genoma viral do capsídeo para o citoplasma. Embora diferentes enterovírus possam usar diferentes receptores e vias de entrada, muitas etapas pós-entrada são altamente conservadas. Após a liberação no citosol, o RNA viral, que funciona como RNA mensageiro, é traduzido em uma grande poliproteína, que é clivada nos intermediários P1, P2 e P3 pelas proteinases virais 2A^{pro}, 3C^{pro} e 3CD^{pro}. A região P1 é clivada para produzir as quatro proteínas do capsídeo (VP1, VP2, VP3 e VP4). A região P2

codifica três proteínas não estruturais (2A-2C), incluindo uma protease, e a região P3 codifica quatro proteínas não estruturais (3A-3D), sendo uma delas a RNA-polimerase, que é RNA-dependente e necessária para a replicação do RNA (BAGGEN et al., 2018a).

A replicação do genoma dos enterovírus ocorre em estruturas de membrana induzidas denominadas organelas de replicação. A replicação do genoma pela RNA-polimerase 3D^{pol} dependente de RNA começa com a síntese da fita complementar (negativa), que é iniciada na região 3'NC do RNA viral e utiliza a proteína VPg como um iniciador. A fita negativa gera um intermediário de replicação de RNA de fita dupla e quando a fita complementar é gerada, serve como molde para a síntese de novas fitas positivas. Os RNAs virais recém-sintetizados servem como molde para posterior tradução e replicação ou são encapsulados em novos vírions (BAGGEN et al., 2018a; PALLANSCH et al., 2013).

As partículas dos enterovírus se formam pela montagem das proteínas estruturais do capsídeo VP0, VP1 e VP3 em protômeros e pentâmeros. Junto com o RNA viral, os pentâmeros formam o provirion, em um processo que está intimamente ligado à replicação do RNA viral. O processamento induzido por RNA de VP0 em VP2 e VP4 produz os vírions maduros. Embora os enterovírus sejam descritos como vírus líticos obrigatórios que são liberados de células rompidas, agora já existem evidências de que os enterovírus também podem sair antes da lise celular em estruturas ligadas à membrana que podem acomodar vários vírions (autofagossomos) (LAI et al., 2016; ROBINSON, 2014). Na Figura 1.3 está esquematizado todo o processo de replicação dos enterovírus.

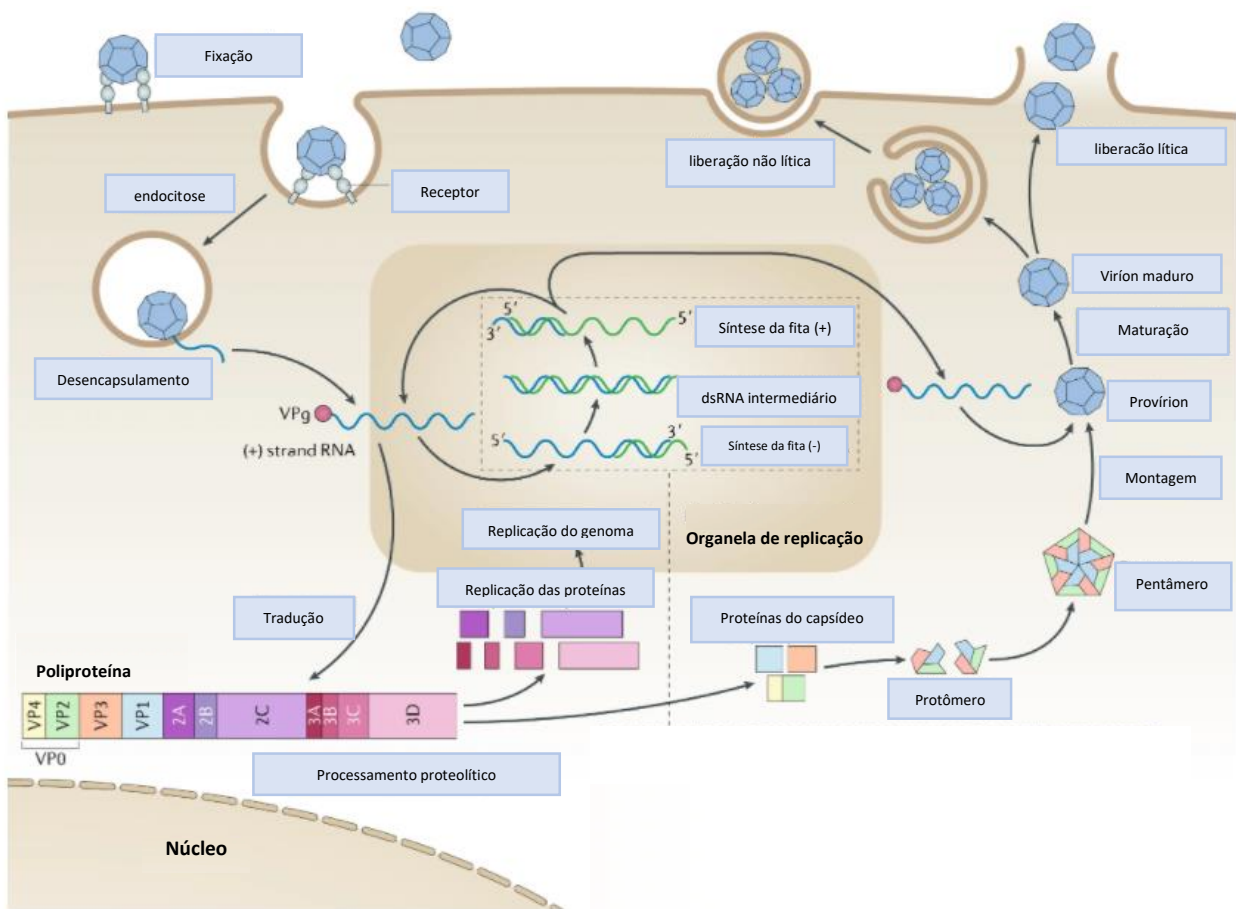


Figura 1.3: Representação esquemática do ciclo de replicação dos enterovírus.

Legenda: Após a ligação ao receptor, ocorre a liberação do genoma viral do capsídeo para o citoplasma. O genoma viral está covalentemente ligado à proteína viral VPg, que é usada como um sítio de iniciação para a replicação. A tradução do genoma produz uma poliproteína, que é clivada proteoliticamente em proteínas de replicação (2A–2C e 3A–3D) e proteínas nas proteínas cápsídeo (VP1, VP2, VP3 e VP4). A replicação do genoma pela RNA polimerase começa com a síntese de um RNA de fita negativa (-) que serve como modelo para a síntese de novas fitas de RNA (+). As proteínas do capsídeo formam os protômeros e pentâmeros e, em seguida se reúnem em provírios, que formam os vírions maduros sobre a clivagem induzida pelo genoma de VP0 em VP4 e VP2. Os vírions maduros saem da célula hospedeira via liberação não lítica de vesículas extracelulares ou via lise celular. dsRNA- RNA de fita dupla.

Fonte: Adaptado de Baggen et al., 2018.

1.1.6 Patogenia

Os enterovírus são transmitidos principalmente pela via fecal-oral e têm como alvo o epitélio gastrointestinal. Alguns enterovírus também podem ter acesso ao trato respiratório superior, como por exemplo o EV-D68, que se propaga pela via respiratória através da inalação direta de partículas suspensas em aerossol ou por meio do contato com superfícies contaminadas, podendo causar doença respiratória leve ou, em casos mais graves, mielite flácida aguda (MFA) (WELLS; COYNE, 2019). Além disso, os EV-D70 e o CVA24, que causam conjuntivite hemorrágica aguda, podem ser transmitidos por contato direto com

secreções oculares ou indireto através do contato com fômites contaminados (SOUSA et al., 2021; PALLANSCH et al., 2013; DA SILVA et al., 2005).

A mucosa intestinal e o trato respiratório superior são os sítios da infecção primária, com a disseminação secundária para o sistema nervoso central (SNC) e outros tecidos (Figura 1.4). A infecção do trato gastrointestinal ocorre devido os EV serem resistentes ao meio ácido do estômago e ao meio alcalino do duodeno. Durante os primeiros dias de infecção, ocorre uma cadeia de eventos que se inicia com a penetração e replicação viral em tecido linfoide da faringe e do intestino (tonsilas, linfonodos e placas de Peyer) (PALLANSCH et al., 2013). O período de incubação desses vírus é geralmente entre 7 e 14 dias, podendo variar de 2 a 35 dias, dependendo do tipo de EV e do quadro clínico associado. Nesse período de incubação que pode ocorrer a viremia primária no trato gastrointestinal e a disseminação do vírus para o SNC no qual se verifica uma viremia secundária (PALLANSCH et al., 2013).

Duas rotas para a entrada do vírus no SNC têm sido sugeridas e envolvem a viremia, após o vírus ter se replicado nos tecidos linfáticos do trato gastrointestinal. Para ter acesso ao SNC, os EV cruzam a barreira hematoencefálica (BHE), infectando células endoteliais cerebrais ou células imunológicas, usando estas últimas como veículos em um mecanismo conhecido como “cavalo de Tróia” (RHOADES et al., 2011). Um segundo modelo de entrada do EV propõe a propagação do vírus dos músculos para o SNC ao longo das vias neurais. Eles podem se espalhar através de junções neuromusculares para os neurônios motores, por meio do transporte axonal retrógrado. O poliovírus é um exemplo de enterovírus que usa o transporte axonal retrógrado dentro dos neurônios motores para evadir o SNC (MAJER et al., 2020). Além disso, o transporte axonal retrógrado foi demonstrado para vários enterovírus não-pólio, como, por exemplo, o EV-A71 (CHEN et al., 2007) e EV-D68 (HIXON et al., 2019).

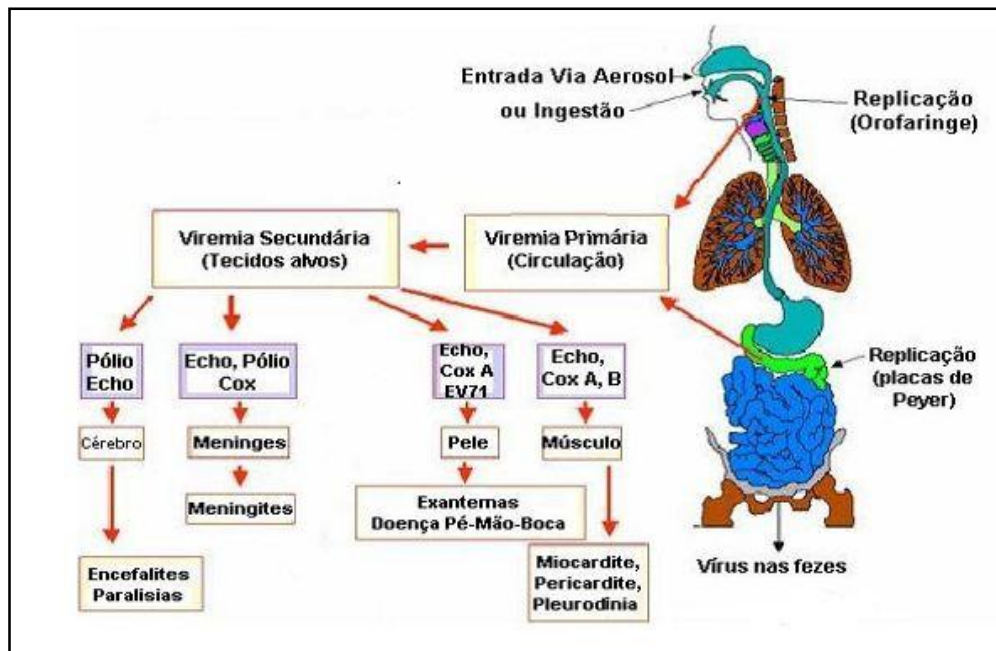


Figura 1.4: Patogenicidade dos enterovírus.

Legenda: O principal local de infecção dos enterovírus é o tecido da mucosa do trato gastrointestinal ou do trato respiratório. Após sua entrada no hospedeiro, há uma replicação viral em alguns sítios de implantação (da orofaringe e dos intestinos), podendo haver uma viremia primária no trato gastrointestinal e o vírus ser excretado nas fezes ou a ocorrência de uma viremia secundária, que pode resultar na disseminação do vírus para o sistema nervoso central e outros tecidos.

Fonte: Santos, 2005.

1.1.7 Diagnóstico laboratorial dos enterovírus

O diagnóstico laboratorial de infecções por enterovírus é realizado a partir do isolamento viral. O isolamento é realizado em linhagens celulares RD (células de rhabdomiosarcoma humano), Hep2C (células de carcinoma epidermóide humano) e L20B (células L de camundongo geneticamente modificadas que expressam um receptor humano para poliovírus), de acordo com o procedimento padrão da Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2004).

A partir da inoculação das amostras clínicas em culturas celulares, ocorre à alteração da morfologia da célula em decorrência da degeneração celular durante a infecção, resultando em um efeito citopático (ECP) característico. O agente viral isolado pode, em seguida, ser identificado por meio de testes sorológicos (ensaios de soroneutralização com o uso de soros imunes sorotipo específicos) ou métodos moleculares (reação em cadeia da polimerase- PCR). A técnica de PCR amplifica sequências nucleotídicas específicas presentes no genoma viral, permitindo reconhecer o vírus isolado como pertencente ao gênero *Enterovirus*.

1.1.8 Epidemiologia dos enterovírus associados a infecções no sistema nervoso central

A epidemiologia dos enterovírus é importante para o entendimento da doença clínica e para o entendimento da variabilidade genética dos tipos de EV circulantes. O poliovírus é o principal EV neurotrópico, no entanto, devido ao estágio avançado de erradicação da pólio, o papel dos enterovírus não-pólio associados aos casos de PFA, além de outras infecções do SNC, vêm sendo destacados (TAPPAREL et al., 2013, CHEN et al., 2020; SURESH et al., 2018).

Além dos poliovírus, outros tipos de enterovírus foram associados a várias infecções do SNC, como a PFA, a MFA e a MA. Os tipos de EV mais comuns são EV-A71, CVA2 e CVA4 (espécies EV-A); CVB3, CVB5, E6, E7, E11, E13 e E30 (espécies EV-B); CV-A24 (espécies EV-C); e EV-D68 (espécies EV-D). Essa ampla diversidade de tipos de EV relacionados a infecções do SNC destaca seu alto tropismo para células neuronais e seu potencial neuropatogênico (TAPPAREL et al., 2013).

No Brasil, a meningite asséptica é a principal doença neurológica associada à EVNP (BASTOS et al., 2014). Diversos estudos têm demonstrado que o E30 é o principal tipo de EV associado aos casos de MA em diferentes áreas geográficas do país, seguido pelo E6 (RAMALHO et al., 2019; PINTO et al., 2009; LUCHS et al., 2008; DOS SANTOS et al., 2006). Além disso, embora outros tipos de EV tenham sido identificados nos últimos anos no Brasil, quatro tipos importantes de EV pertencentes às espécies EV-B são destacados, incluindo o CVB5, seguido do E7, E11 e E18. Esses vírus também estão associados a uma alta taxa de detecção em casos MA no Brasil (COMPAGNOLI et al., 2020; RAMALHO et al., 2019; DOS SANTOS et al., 2006).

O último caso de poliomielite parálitica causada por PV selvagem no Brasil ocorreu em 1989 e com a erradicação eminente desses vírus, uma proporção significativa de EVNP vêm sendo associada a esse distúrbio neurológico (QUADROS et al., 1991, DA SILVA et al., 1996). Dados de vigilância mostram que na Europa, EUA e África, a maioria dos casos de PFA foi associada a espécie de EV-B, enquanto as espécies de EV-A são normalmente mais prevalentes na Ásia, onde se manifestam principalmente como doenças de mão, pé e boca (SURESH et al., 2018; FERNANDEZ-GARCIA et al., 2017; TSENGET al., 2007).

No Brasil, as espécies EV-B são as mais frequentemente detectadas nos casos de PFA. (RAMALHO et al., 2019; SOUSA et al., 2020). Entre os vírus da espécie EV-B, o coxsackievírus B5 é um dos tipos mais predominantes em humanos e epidemias ocasionadas por esses vírus são reportadas anualmente em diferentes partes do mundo, muitas das quais

associadas com infecções no SNC (PENG et al., 2013; LIU et al., 2014). Aproximadamente metade de todos os casos relatados de infecções por CVB5 ocorrem em crianças (TSUEY et al., 2015; HUANG et al., 2018).

O CVB5 é consistentemente um dos cinco tipos de EV mais comumente identificados nos Estados Unidos e na França e exibiu a maior prevalência anual em vários países (KIM et al., 2016; KHETSURIANI et al., 2006). A MA é a apresentação clínica típica em surtos de CVB5, no entanto, esse vírus já foi associado a um surto de doença neurológica consequente de infecção de mão, pé e boca na China (THOELEN et al., 2003). Estudos anteriores forneceram algumas informações sobre a diversidade genética do CVB5 (HAN et al., 2012) e uma análise filogenética mostrou que CVB5 teve uma origem estimada em 1854 (REZIG et al., 2011).

No caso específico do Brasil, as informações acerca da distribuição geográfica e dos genótipos de CVB5 circulantes no país são limitadas, mas revelam que o CVB5 juntamente com E6 e o E30 são os principais enterovírus não-pólio associados a infecções no SNC (RAMALHO et al., 2019; SOUSA et al., 2020).

2 JUSTIFICATIVA

Embora possam frequentemente causar infecções assintomáticas e autolimitadas, os enterovírus também podem estar envolvidos em condições clínicas mais graves e potencialmente fatais. A circulação dos EVNP vem sendo demonstrada em diferentes estudos envolvendo infecções no SNC (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2017; SAEED et al., 2007; SHIJA et al., 2007; MAAN et al., 2019). Vários tipos de coxsackievírus foram diretamente relacionados a quadros de comprometimento motor, assim como casos e epidemias já foram anteriormente relacionados aos enterovírus 71, que parece ter um tropismo particular pelo SNC, frequentemente conduzindo a um quadro de PFA (MAAN et al., 2019; DA SILVA et al., 1996).

Os EV apresentam uma alta diversidade genética, consequência de mutações e/ou recombinações (MUSCLIN et al., 2019). Estes eventos são frequentemente observados inter e intra espécies, favorecendo o surgimento/ressurgimento de vírus com patogenicidade desconhecida e resultados clínicos imprevisíveis (SOUSA et al., 2019).

Surtos de infecções por coxsackievírus B ocorrem anualmente em todo o mundo e, entre os seis diferentes tipos, o tipo 5 foi um dos mais comumente associado a meningite asséptica, principalmente em neonatos. Apesar da alta frequência de infecções ocasionadas pelo CVB5, sua associação com diversas doenças em humanos e sua capacidade de causar surtos em todo o mundo, pouco se sabe sobre a epidemiologia molecular, variabilidade genética e padrões de transmissão desse vírus, principalmente no Brasil (PALLANSCH et al., 2013, PENG et al., 2013).

Este estudo visou determinar a diversidade genética dos CVB5 circulante no Brasil, com o objetivo de fornecer informações sobre a circulação desses vírus associados a casos de infecções no SNC no país. A utilização de novas técnicas, principalmente as moleculares, permitiu analisarmos com maior sensibilidade e robustez os resultados até então desconhecidos. Todas as informações obtidas ajudarão a entender o padrão de circulação deste importante EV, além de servir de suporte para futuros estudos sobre a diversidade de CVB5 circulante no Brasil.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar, molecularmente, os CVB5 isolados a partir de infecções associadas ao sistema nervoso central no Brasil, obtidos durante os anos de 2005 a 2019.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a diversidade genética dos CVB5 nas amostras analisadas e como estes vírus estão distribuídos pelo país através da análise filogenética;
- Analisar a sequência nucleotídica e de aminoácidos em busca de mutações que sugerem o neurotropismo destes vírus;
- Analisar um importante segmento do gene VP1 (*loop BC*).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Fundação Oswaldo Cruz (CEP/Fiocruz/IOC), sob o Nº: 4.597.096, CAAE: 44205321.0.0000.5248 (Anexo 1), em obediência à resolução 466/12.

4.2 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional transversal, retrospectivo.

4.3 AMOSTRAS CLÍNICAS

No período de janeiro de 2005 a dezembro de 2019, o Laboratório de Enterovírus (LEV) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), Centro de Referência Nacional em Enterovirose, dentro do âmbito do Programa Brasileiro de Vigilância da Poliomielite e da Meningite asséptica, recebeu ao todo 6.808 amostras de LCR e 8.229 amostras fecais, provenientes dos casos de MA e dos PFA no Brasil, respectivamente. No LEV, essas amostras são rotineiramente submetidas à pesquisa de enterovírus por isolamento viral em cultura de células RD (células de rhabdomiosarcoma humano), L20B (células L de camundongo geneticamente modificadas) e HEp2-C (células de carcinoma humano epidermoide de laringe).

Para o desenvolvimento deste estudo, a amostragem analisada foi composta de 58 isolados de cultura de células de vírus (CVB5) (Tabela 4.1), previamente identificadas por RT-PCR. Adotou-se como critérios de inclusão: Amostras associadas a infecções no sistema nervoso central, que apresentaram efeito citopático (ECP) característico de EV e que foram identificadas como CVB5.

Amostra	Ano de isolamento	Origem	Espécime	Agravo
34672	2005	RS	LCR	MA
32895	2005	PE	Fezes	PFA
35043	2006	BA	Fezes	PFA
36032	2006	PR	LCR	MA
36182	2007	CE	Fezes	PFA
36208	2007	SP	Fezes	PFA
36321	2007	MG	LCR	MA
36323	2007	MG	LCR	MA
36599	2007	MG	LCR	MA
37294	2007	RS	LCR	MA
37476	2007	PR	LCR	MA
37478	2007	PR	LCR	MA
39693	2010	BA	Fezes	PFA
40413	2010	PR	LCR	MA
41003	2011	PE	LCR	MA
41432	2011	PE	LCR	MA
41454	2011	PE	LCR	MA
41814	2011	PE	LCR	MA
42942	2012	PR	Fezes	PFA
42979	2012	PE	LCR	MA
43135	2012	PR	LCR	MA
43137	2013	MG	Fezes	PFA
43142	2013	AL	Fezes	PFA
43330	2013	PE	Fezes	PFA
43677	2013	PE	LCR	MA
43712	2013	SP	Fezes	PFA
44475	2014	RJ	LCR	MA
44476	2014	RJ	LCR	MA
44979	2014	RJ	LCR	MA
44983	2014	RJ	LCR	MA
45074	2014	RJ	Fezes	PFA
45519	2015	PR	LCR	MA
45556	2015	PR	Fezes	PFA
45726	2015	PR	LCR	MA
45740	2015	PR	LCR	MA
45808	2015	PR	LCR	MA
45888	2015	PR	LCR	MA
45964	2015	PE	LCR	MA
45974	2015	PR	LCR	MA
45978	2015	PR	LCR	MA
45996	2015	PE	LCR	MA
46049	2015	PR	LCR	MA
46052	2015	PR	LCR	MA
46120	2015	PR	LCR	MA
46130	2015	PE	LCR	MA
46541	2015	PR	LCR	MA
46764	2015	PE	LCR	MA
46773	2015	PE	LCR	MA
48209	2016	SP	Fezes	PFA
51403	2017	PR	LCR	MA
51507	2017	RS	LCR	MA
51602	2017	PR	LCR	MA
51651	2017	PR	LCR	MA
51660	2017	PR	LCR	MA
51681	2017	RS	Fezes	PFA
51793	2017	PR	LCR	MA
52744	2018	RJ	Fezes	PFA
54423	2019	AL	Fezes	PFA

Tabela 4. 1: Dados das amostras utilizadas no estudo.

4.4 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

O processamento das amostras seguiu o fluxograma ilustrado abaixo, na Figura 4.1.

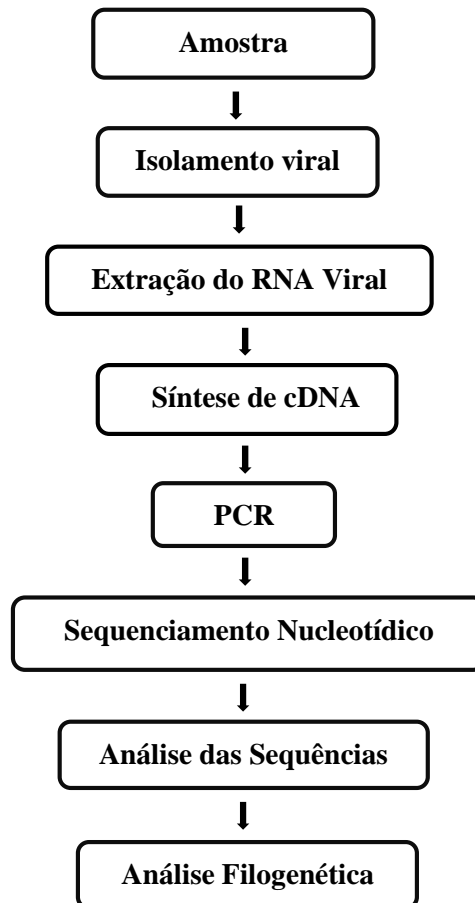


Figura 4.1: Fluxograma simplificado do processamento laboratorial das amostras analisadas no estudo.

4.4.1 Isolamento em cultivo celular

As amostras foram reinoculadas em linhagens celulares HEp2-C e RD, sensíveis ao isolamento do gênero *Enterovirus*, segundo protocolo seguido pelos laboratórios de referência da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2004). Para a inoculação, 0,2 mL dos isolados foram adicionados em diferentes tubos contendo as linhagens celulares. Os tubos foram incubados a uma temperatura de 37°C e submetidos a leituras diárias em microscópio óptico invertido por cinco dias consecutivos para observação ECP característico para EV (Figura 4.2), seguido de

uma segunda ou terceira passagem caso necessário. Os isolados foram armazenados a -20°C até o seu uso.

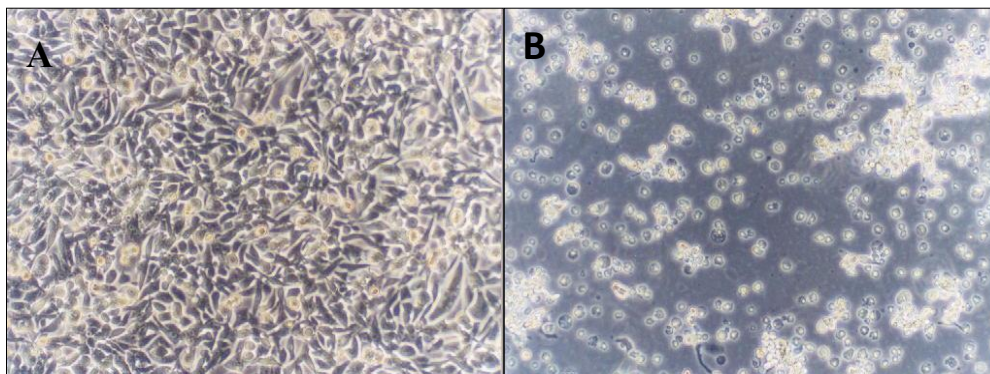


Figura 4.2: Efeito do isolamento dos enterovírus em cultivo celular.
Legenda: (A) Ausência de efeito citopático; (B) Presença de efeito citopático.

4.4.2 Extração do RNA viral

Todas as amostras foram submetidas à extração de ácido nucleico (RNA) a partir de um volume de $140\mu\text{L}$ do sobrenadante do cultivo celular de células HEP2-C e RD, utilizando o método de purificação em coluna, com o kit comercial *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Germany), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, adicionou-se $140\mu\text{L}$ do vírus isolado e $560\mu\text{L}$ de *Buffer AVL*, já contendo carreador de RNA (a proporção de carreador é de $5,6\mu\text{L}$, para $560\mu\text{L}$ do *Buffer*), em um tubo eppendorf. Essa mistura foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se $560\mu\text{L}$ de etanol (100%) e a mistura foi agitada em vórtex por 15 segundos. Em seguida, realizou-se uma breve centrifugação para baixar possíveis gotículas que estivessem na tampa do tubo. Após a centrifugação, $630\mu\text{L}$ dessa mistura foi aplicada na coluna acoplada a um tubo coletor de 2mL , ambos encontrados no kit, e o tubo foi centrifugado à 8.000 rpm por 1 minuto. Esse processo foi realizado duas vezes. O tubo contendo o filtrado foi descartado e colocou-se um novo. Adicionou-se $500\mu\text{L}$ do *Buffer AW1*, centrifugou-se a 8.000 rpm por 1 minuto. Descartou-se o tubo contendo o filtrado novamente. Adicionou-se $500\mu\text{L}$ do *Buffer AW2*, centrifugou-se a 14.000 rpm por 3 minutos. O filtrado foi descartado e a coluna foi conectada a um eppendorf de $1,5\text{mL}$. Por fim, foram adicionados $60\mu\text{L}$ do *Buffer AVE* e o tubo foi incubado por 1 minuto à temperatura ambiente e posteriormente centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto. Após a centrifugação a coluna foi descartada e o RNA extraído foi utilizado na síntese de cDNA.

4.4.3 Síntese do cDNA

Após a extração, o RNA foi submetido a etapa de transcrição reversa utilizando a enzima *SuperScript II Reverse Transcriptase*TM (Invitrogen, USA), seguindo as recomendações do fabricante. A reação foi realizada em três etapas. Na primeira etapa, foi utilizado 1µL do iniciador randômico (Promega®) (500µL/mL) e 9µL do RNA extraído. A mistura foi incubada a 65°C por 10 minutos. Na segunda etapa, foram utilizados 4µL do tampão 5X concentrado, 2µL de DTT (0,1M), 1,5µL de dNTP's (10mM/µL), 0,5µL de RNaseOUT (40U/µL) e 1µL de água livre de RNase. A mistura foi incubada a 42°C por 2 minutos. Na terceira etapa, foi adicionado 1µL da enzima *SuperScript*® II (20U/µL), resultando em um volume final de 20µL. A reação de síntese foi realizada a 42°C por 50 minutos em termociclador *GeneAmp*® PCR System 9700 (Applied Biosystems). O cDNA sintetizado foi estocado à -20°C até sua utilização.

4.4.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do gene que codifica a proteína VP1

Para a detecção dos CVB5, foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos que amplificam um fragmento de 1100 pb da região que codifica a proteína VP1 (849pb) do genoma viral (MIRAND et al., 2006) (Tabela 4.2). A mistura da reação foi preparada em um tubo de 0,2 mL previamente identificado, utilizando 1,5 µL do cDNA; 12,5µL de *GoTaq*® Master Mix (Promega®); 1µL do *primer* senso (HEVBS1695) e 1µL do *primer* antisenso (HEVBR132) a 50 pmol/µL e 10µL de água livre de DNase, resultando em um volume final de 25µL. A reação foi submetida a uma etapa de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C por 15 segundos, 55°C por 20 segundos e 72°C por 50 segundos, e a uma extensão final de 72°C por 5 minutos em termociclador *GeneAmp*® PCR System 9700 (Applied Biosystems).

4.4.5 Eletroforese e purificação do produto amplificado

A amplificação do produto de PCR foi avaliada em gel de agarose à concentração de 1,5%, preparado com tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1x e corado com *SYBR*® Safe DNA Gel Stain 10x (Invitrogen, USA). Foi aplicado ao gel o volume total do produto da PCR (25µL) e 4µL do corante *Orange DNA Loading Dye* (6X) (Promega®). Além disso, foi utilizado 2µL do peso molecular de 100 pb (Invitrogen, USA). A eletroforese foi realizada a uma corrente de

90 v por aproximadamente 40 minutos. Os fragmentos obtidos na PCR foram visualizados em transiluminador de ultravioleta, e os resultados foram documentados sob a forma de fotografia. As bandas apresentando o tamanho esperado foram cortadas com auxílio de uma lâmina de bisturi e colocadas em microtubos de 1,5mL para posterior purificação e quantificação do produto.

4.4.6 Purificação do produto de PCR

Para a purificação do produto de PCR do gel de agarose, foi utilizado o *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, foi adicionado o tampão de solubilização (QG) em cada tubo contendo as bandas de gel (proporção de 400µL/100mg de gel). O tubo foi incubado por 10 minutos a 50°C em termobloco, com agitação a intervalos de 2 minutos, garantindo a total solubilização do gel. Posteriormente, a mistura foi transferida para a coluna disposta sobre os tubos coletores de 2mL e centrifugada por 1 minuto a 13.000 rpm. O filtrado foi descartado e foram adicionados 500µL do tampão QG e o tubo foi novamente centrifugado a 13.000 rpm por 1 minuto. Uma etapa de lavagem foi realizada com a adição de 750µL de tampão de lavagem (PE) a coluna, seguida de centrifugação a 13.000 rpm. O filtrado foi descartado e a coluna foi transferida para um tubo eppendorf de 1,5mL. A eluição do material foi realizada utilizando 50µL do tampão EB. O tubo foi incubado por 2 minutos em temperatura ambiente e centrifugado a 13.000 rpm por 1 minuto. Por fim, a coluna foi descartada e o produto purificado foi estocado à -20°C até o seu uso.

4.4.7 Avaliação quantitativa dos produtos de PCR purificados

A quantificação foi realizada utilizando uma alíquota de 4µL do DNA purificado e 2µL de corante *Orange DNA Loading Dye 6X* (Promega®). A mistura foi aplicada em gel de agarose à concentração de 1%, preparado com tampão TAE. A intensidade da banda de cada produto foi avaliada por comparação com um padrão de marcador de massa *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen, USA), indicando a concentração aproximada de DNA contida em cada amostra. A eletroforese foi realizada a 90 v por 40 minutos. O gel foi visualizado em transiluminador de ultravioleta e os resultados foram documentados sob a forma de fotografia.

4.4.8 Reação de sequenciamento nucleotídico (Sanger)

Para as reações de sequenciamento nucleotídico, foi utilizado o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Nesta etapa, por se tratar de um produto com peso molecular relativamente alto (1100pb), o sequenciamento do fragmento alvo foi realizado nos dois sentidos (senso e antisenso), utilizando os dois primers, um em cada reação de “cycle sequencing”. Os oligonucleotídeos utilizados na reação estão descritos na tabela 4.2.

A reação foi preparada para um volume final de 10µL contendo: o DNA purificado (a concentração do DNA na reação foi baseada na quantificação do produto de PCR), 1µL do primer a 1pmol/µL, 1µL do tampão *BigDye terminator sequencing buffer 5X* e 1µL do *BigDye terminator v3.1 cycle sequencing*. O volume da reação foi completado com água livre de DNase. A reação foi processada sob as seguintes condições: 94°C por 3 minutos, seguido de 25 ciclos a 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. As reações foram realizadas em termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems). O produto da reação de sequenciamento foi purificado utilizando método de precipitação com etanol e isopropanol, conforme recomendação do fabricante.

Iniciadores	Sequências	Gene	Localização ^b	Técnica
HEVBS1695 ^a	CTTGTGCTTTGTGTCGGCRTGYAAYGAYTTYTCWG	VP1	2375-2409	PCR
HEVBR132 ^a	GGTGCTCACTAGGAGGTCYCTRTRTARTCYTCCCA	2A	3467-3432	PCR
P1S1695S	CTTGTGCTTTGTGTCGGC	VP1	2375-2392	Sequenciamento
P2R132S	GGTGCTCACTAGGAGGTC	2A	3467-3450	Sequenciamento

Tabela 4.2: Oligonucleotídeos utilizados na PCR e na reação de sequenciamento.

^aPrimers degenerados: Y=C/T; R=A/G; W=A/T; M=A/C; N=qualquer base; I=Inosina;

^bPosições dos primers relativas ao genoma da cepa Bastianni do echovírus 30 (AF311938).

4.4.9 Edição das sequências nucleotídicas

As sequências nucleotídicas obtidas através do sequenciamento do gene VP1 foram analisadas através do programa *BioEdit* versão 7.2.5.0. As sequências foram editadas, deletando-se os “overlaps” correspondente ao início e ao final de cada sequência. Em seguida, foi gerada a sequência consenso entre os dois lados sequenciados. As sequências foram alinhadas com a sequência de referência do CVB5 (Faulkner-AF114383) para realizar a marcação do gene VP1 (1705-2553nt). Por fim, as sequências obtidas foram comparadas com sequências de CVB5 disponíveis na base de dados do NCBI, *GenBank*, utilizando a ferramenta

BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para verificar o percentual de homologia com as sequências existentes depositadas.

4.4.10 Número de acesso de depósito das sequências no GenBank

As sequências completas do gene VP1 do CVB5 determinadas neste estudo foram depositadas no banco de dados do NCBI, GenBank, sob os números de acesso: OK031005 a OK031034 e OK149119 a OK149134.

4.4.11 Análise filogenética

Para a análise filogenética, as sequências deste estudo foram comparadas com 54 sequências de CVB5 disponíveis no *GenBank* (número de acesso: AB695410, AB695414, AF114383, AM711057, AM711063, AM711085, GU300046, GU300056, GU300057, GU300058, GU300059, GU300060, HF9448243, HF948028, HF948029, HF948032, HF948047, HF948060, HF948061, HF948064, HF948068, HF948070, HF948071, HF948076, HF948116, HF948124, HF948132, HF948140, HF948146, HF948151, HF948177, HF948179, HF948222, HF948241, HF948249, HF948250, HF948262, HF948278, HG793677, HG793678, KM111284, KY048111, KY048146, LC120344, MK000156, MK000161, MK044534, MK044535, MK044538, MK086205, MK086213, MT350726, MT350730, AF114383- cepa Faulkner, referência do CVB5). As sequências foram alinhadas utilizando o algoritmo *Mafft* versão 7 (KATO et al., 2002) e a árvore foi construída usando um algoritmo de máxima verossimilhança (RAxML), com um modelo de substituição de nucleotídeo GTR + I + G, como estimado no *JModeltest* versão 2.1.7 (DARRIBA et al., 2012). A robustez de cada ramo foi avaliada pelo teste de bootstrap com 1000 réplicas. A árvore filogenética foi editada usando o *software Figtree* versão 1.4.3.

5 RESULTADOS

5.1 PERFIL DAS AMOSTRAS ANALISADAS

Entre janeiro de 2005 e dezembro de 2019, o Laboratório de Enterovírus recebeu 15.107 amostras enviadas para o diagnóstico de MA e de PFA e 1.321 apresentaram ECP característico de enterovírus no isolamento. Dessas 1.321 amostras positivas no isolamento viral, 58 (4,4%) foram detectadas e identificadas como CVB5 (42 amostras de LCR e 16 amostras de fezes). Os isolados que fizeram parte deste estudo seguiram o seguinte perfil de acordo a localidade da coleta da amostra representado na Tabela 4.1.

Região	Estado	Nº de amostras (% do total)	Agravo
Nordeste	Ceará	1 (1,8)	
	Pernambuco	13 (22,4)	PFA/MA
	Alagoas	2 (3,4)	
	Bahia	2 (3,4)	
Subtotal		18 (31)	7/11
Sudeste	Minas Gerais	4 (6,9)	
	Rio de Janeiro	6 (10,3)	PFA/MA
	São Paulo	3 (5,2)	
Subtotal		13 (22,4)	6/7
Sul	Paraná	23 (39,7)	
	Rio Grande do Sul	4 (6,9)	PFA/MA
Subtotal		27 (46,6)	23/4
Total		58 (100)	16/42

Tabela 5.1: Distribuição das amostras analisadas provenientes dos casos de Paralisia Flácida Aguda (PFA) e Meningite asséptica (MA) conforme local de coleta.

5.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENE VP1 COMPLETO DO CVB5

As amostras identificadas como CVB5 foram submetidas ao PCR visando a obtenção do gene VP1 completo (tamanho de 849pb), utilizando o protocolo descrito por Mirand e colaboradores (2006). Dos 58 isolados, todos produziram “amplicons” com o tamanho esperado de 1100pb. O controle negativo das reações não apresentou banda, mostrando que não houve

contaminação. Na Figura 5.1 pode ser observado o perfil eletroforético representativo dos produtos amplificados de algumas amostras analisadas.

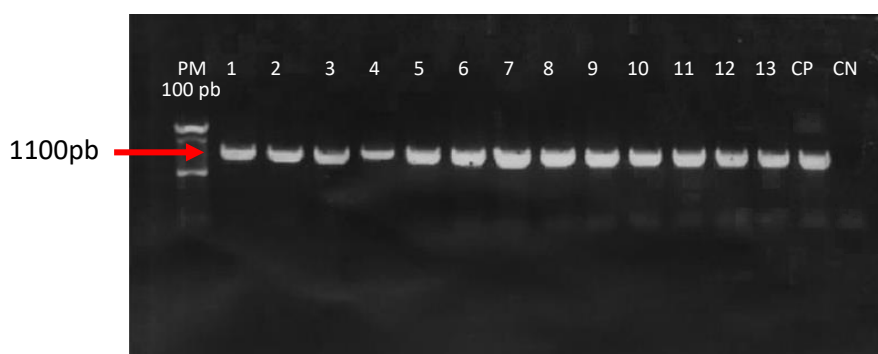


Figura 5.1: Produtos da amplificação do gene VP1 completo do CVB5 obtidos por PCR e visualizados em gel de agarose 1,5%.

Legenda: PM= peso molecular; pb= pares de bases; 1-13= amostras positivas; CP= controle positivo; CN= controle negativo. A seta indica a altura esperada para o amplicon (1100pb).

5.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE VP1 DE CVB5

A sequência nucleotídica do gene VP1 do CVB5 foi determinada em 46 (46/58; 79,3%) dos isolados analisados. Os outros 12 isolados (12/58; 20,7%) apresentaram “gaps” no meio das sequências, impossibilitando a leitura do eletroferograma nos dois sentidos das sequências.

A análise filogenética de sequências completas do gene da VP1 (849 pb) mostrou que os isolados de CVB5 segregaram em dois grandes grupos distintos (A e B) e em 2 subgenogrupos (A4 e B2). O genogrupo A incluiu 4 sequências de isolados brasileiros de CVB5 e compreendeu os isolados mais recentes (2017 e 2018). O genogrupo B formou um clado grande em comparação com o genogrupo A e compreendeu a maioria das sequências identificadas neste estudo (n= 42) isoladas entre os anos de 2005 e 2019, incluindo isolados do surto de B5 que ocorreu em Pernambuco em 2015. Além disso, a análise filogenética revelou que os CVB5 do subgenogrupo A4 estavam filogeneticamente relacionados com isolados do Haiti (2016) e com isolados da China (2010, 2011 e 2014), de Taiwan (2011) e da França (2005, 2008 e 2010). Os isolados brasileiros do subgenogrupo B2 agruparam com CVB5 identificados na França (2003-2007, 2009-2012 e 2015), na Polônia (2018), na Turquia (2016) e com um isolado identificado no Brasil em 2012 (Figura 5.2).

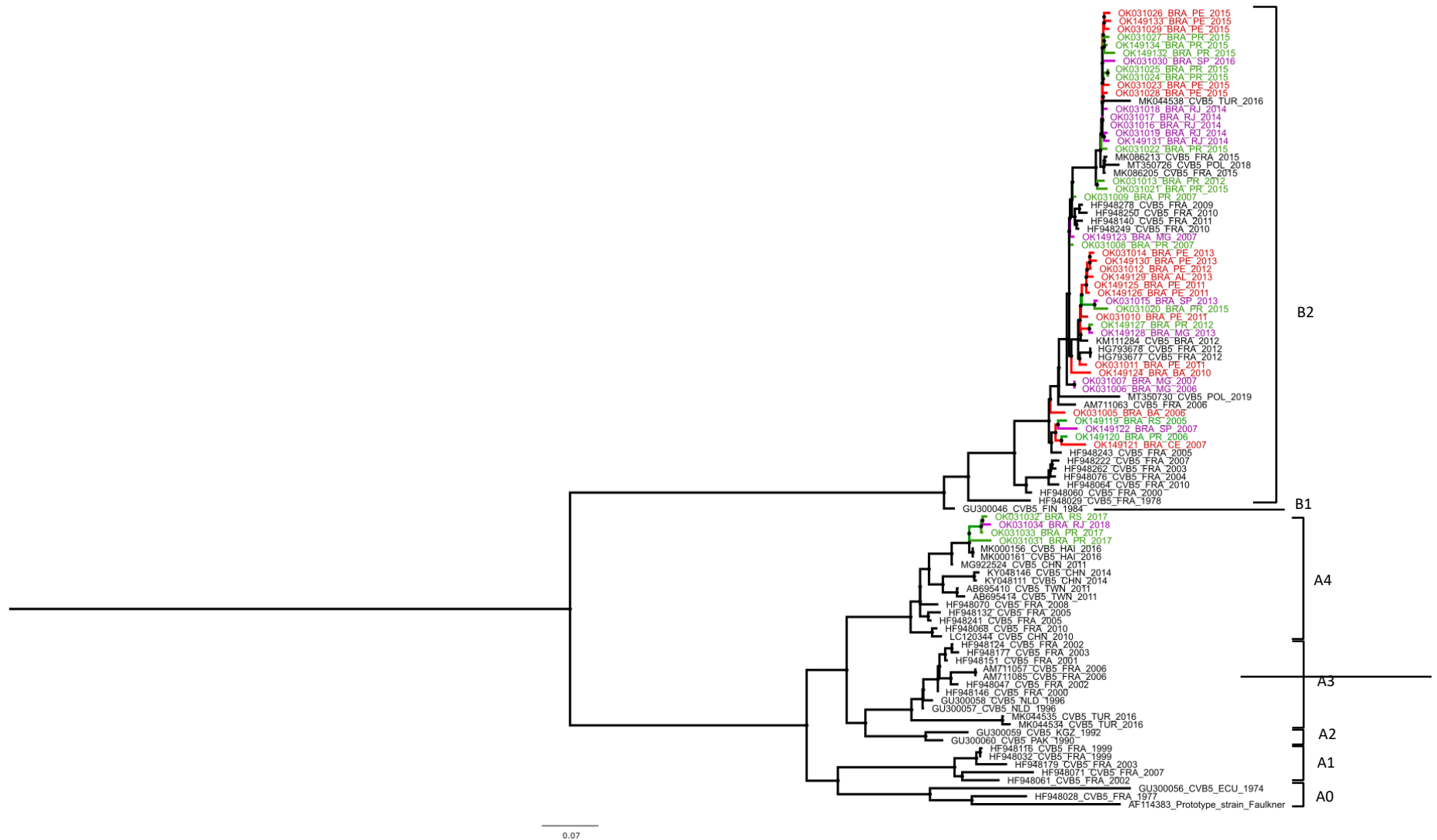


Figura 5.2: Árvore filogenética construída usando um algoritmo de máxima verossimilhança (RAxML), com base nas sequências do CVB5 do gene VP1 (849 pb). Legenda: As sequências foram coloridas de acordo com a região geográfica brasileira. As cepas deste estudo são identificadas pelo número de acesso do GenBank (OK031005-OK031034 e OK149119-OK149134). Os estados brasileiros foram identificados como Nordeste (vermelho: Alagoas-AL, Pernambuco-PE, Bahia-BA, Ceará-CE), Sudeste (roxo: São Paulo-SP, Rio de Janeiro-RJ, Minas Gerais-MG) e Sul (verde: Paraná-PR, Rio Grande do Sul).

Para investigar a epidemiologia molecular e a diversidade genética do CVB5, as sequências deste estudo foram comparadas com a sequência protótipo do CVB5 (Faulkner-AF114383). Os isolados brasileiros de CVB5 revelaram uma identidade nucleotídica variando entre 76,3-82,4%. As amostras isoladas entre os anos de 2005 e 2016, quando comparadas com a cepa protótipo do CVB5, apresentaram uma identidade nucleotídica variando entre 76,3 a 78,2%. Já as amostras mais recentes, isoladas entre os anos de 2017 e 2018, apresentaram identidade nucleotídica mais alta quando comparadas com a cepa protótipo, variando entre 81,5% a 82,4% (Tabela 5.2). Esses dados mostram que a formação dos subgrupos dos genogrupos A e B determinados neste estudo foi relacionada ao ano de isolamento.

Isolado identificado Nº de acesso GenBank	Ano de isolamento	Local	% de similaridade de nucleotídeos com cepa Faulkner (849 nt)* (%)	% de similaridade de aminoácidos com cepa Faulkner (282 AA)
OK031006	2006	MG	77,1	96,0
OK031007	2007	MG	77,1	96,0
OK031008	2007	PR	77,5	96,4
OK031009	2007	PR	77,8	96,4
OK031010	2011	PE	77,5	96,4
OK031011	2011	PE	77,1	96,0
OK031012	2012	PE	77,1	96,4
OK031013	2012	PR	76,9	96,4
OK031014	2013	PE	77,0	96,4
OK031016	2014	RJ	76,7	96,4
OK031017	2014	RJ	76,7	96,4
OK031018	2014	RJ	76,3	96,0
OK031019	2014	RJ	76,5	96,4
OK031020	2015	PR	77,0	95,7
OK031022	2015	PR	76,6	96,4
OK031023	2015	PE	76,6	96,4
OK031024	2015	PR	77,0	96,4
OK031025	2015	PR	77,0	96,4
OK031026	2015	PE	76,6	96,4
OK031027	2015	PR	77,1	96,4
OK031028	2015	PE	76,9	96,4
OK031029	2015	PE	76,7	96,0
OK031031	2017	PR	82,4	95,7
OK031033	2017	PR	81,7	96,4
OK031005	2006	BA	77,7	96,4
OK031015	2013	SP	77,0	96,4
OK031021	2015	PR	77,1	96,4
OK031030	2016	SP	77,0	95,0
OK031032	2017	RS	81,8	96,4
OK031034	2018	RJ	81,5	96,4
OK149119	2005	RS	78,2	95,7
OK149120	2006	PR	77,7	95,7
OK149121	2007	CE	77,7	96,0
OK149122	2007	SP	77,6	95,3
OK149123	2007	MG	77,7	96,4
OK149124	2010	BA	77,2	95,7
OK149125	2011	PE	77,1	96,4
OK149126	2011	PE	77,1	96,4
OK149127	2012	PR	77,2	96,4
OK149128	2013	MG	77,7	96,4
OK149129	2013	AL	77,5	96,4
OK149130	2013	PE	77,0	96,4
OK149131	2014	RJ	76,5	96,4
OK149132	2015	PR	77,1	96,0
OK149133	2015	PE	77,0	96,4
OK149134	2015	PR	77,1	96,8

Tabela 5.2: Semelhança de nucleotídeos e de aminoácidos entre os isolados de CVB5 analisados neste estudo com a cepa protótipo Faulkner.

5.4 ANÁLISE DOS AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA VP1

As sequências de aminoácidos da proteína VP1 de CVB5 (283 aminoácidos) determinadas neste estudo apresentaram similaridade variando entre 95,0 a 96,8% em comparação com a cepa protótipo Faulkner, demonstrando o alto grau de conservação dos aminoácidos da proteína VP1.

O alinhamento dos aminoácidos revelou 251 (89%) posições conservadas e 31 (11%) variáveis no gene VP1. Além disso, quatro substituições foram encontradas na região do loop BC (aa 84-93) (REZIG et al., 2011). Entre as substituições, uma foi treonina (T) por alanina (A) na posição 84, ácido aspártico (D) para asparagina (N) na posição 87, alanina (A) por glicina (G) na posição 90, exceto em um isolado (OK149132), no qual a alanina foi substituída por treonina. A terceira substituição verificada foi glutamina (Q) por tirosina (Y), verificada em todos os isolados. A análise da frequência das substituições observadas na proteína VP1, realizada no programa *Sequence logo*, revelou que muitos dos aminoácidos presentes na sequência protótipo foram completamente substituídos por outros de características semelhantes ou diferentes (Figura. 5.3).

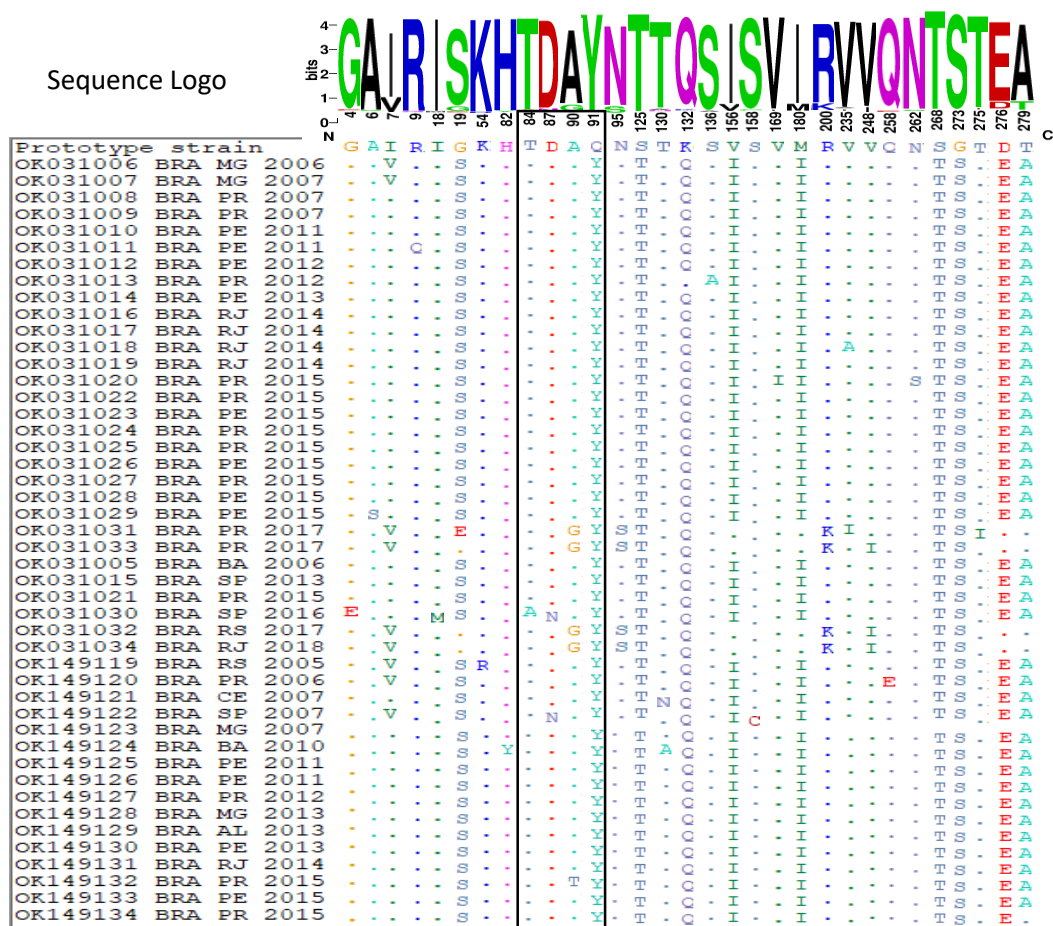


Figura 5.3: Alinhamento de sequências de aminoácidos deduzidas da proteína VP1 das cepas do CVB5.

Legenda: O retângulo marca o loop BC, compreendido entre os aminoácidos (aa) 83-93 de acordo com a cepa protótipo. As sequências dentro do retângulo mostram locais variáveis dentro da região do loop BC. Os pontos (.) representam os aminoácidos idênticos em relação à cepa protótipo e os símbolos de aminoácidos indicam onde existem aminoácidos não relacionados com o protótipo. A sequência de letras no topo da figura indica a frequência dos AA ao longo da proteína.

Com base nas sequências de aminoácidos, o genogrupo A dos isolados de CVB5 deste estudo foi definido pelas substituições I7V, G19E, A90G, Q91Y, N95S, S125T, K132Q, R200Q, V235A, V248A, S268T, G273S e T275I. Já o genogrupo B foi definido pelas substituições G4E, A6S, I7V, R9Q, I18M, G19S, H82Y, T84A, D87N, A90T, A91Y, S125T, T130N/T130A, K132Q, S136A, V156I, S158C, V169I, M180I, V235I, Q258E, N262S, S268T, G273S, D276 e T279A. Foram observadas algumas substituições comuns a ambos genogrupos (subgenogrupos A4 e B2), I17V, Q91Y, S125T, K132Q, S268T e G273S. Além dessas, foram observadas substituições diferentes que ocorreram na mesma posição dos subgenogrupos. Na posição 19, 90 e 235 do genogrupo A4 ocorreram as substituições A19E, A90G e V235F, respectivamente. Já no subgenogrupo B2, nas mesmas posições, ocorreram as substituições G19S, A90T e V235A, respectivamente (Tabela 5.3).

Resíduo de amino ácidos na proteína VP1	Resíduo no protótipo	Genogrupo A				Genogrupo B	
		A1	A2	A3	A4	B1	B2
Posição							
4	G						G4E
6	A						A6S
7	I				I7V		I7V
9	R						R9Q
18							I18M
19	G				G19E		G19S
82	H						H82Y
84	T						T84A
87	D						D87N
90	A				A90G		A90T
91	Q				Q91Y		Q91Y
95	N				N95S		
125	S				S125T		S125T
130	T						T130A/T130N
132	K				K132Q		K132Q
136	S						S136A
156	V						V156I
158	S						S158C
169	V						V169I
180	M						M180I
200	R				R200K		
235	V				V235I		V235A
248	V				V248A		
258	Q						Q258E
262	N						N262S
268	S				S268T		S268T
273	G				G273S		G273S
275	T				T275I		
276	D						D276E
279	T						T279A

Tabela 5.3: Mudanças de aminoácidos que ocorreram dentro do gene VP1 dos isolados de CVB5.

6 DISCUSSÃO

Numerosos estudos sobre infecções no SNC têm sido conduzidos nos últimos anos e revelam um papel importante dos EVNP como um dos principais patógenos associados a casos esporádicos e surtos epidêmicos (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2017; SHOJA et al., 2007; RAMALHO et al., 2019; BINGJUN et al., 2008, KAPOOR e al., 2008). Neste contexto, nós avaliamos as características epidemiológicas e moleculares de CVB5 isolados no Brasil a partir de infecções no SNC entre 2005 e 2019.

O CVB5 foi isolado a partir de 58 amostras de PFA e MA, o que corresponde a aproximadamente a 4,4% do total de enterovírus isolados a partir de amostras de pacientes com sintomas sugestivos destes agravos durante o período do estudo. Em relação a distribuição geográfica dos isolados de CVB5, nós verificamos que muitos dos isolados foram provenientes da região sul do país (27/58; 46,5%). No entanto, embora casos de PFA e MA sejam agravos de notificação compulsória, alguns estados não enviam amostras de casos suspeitos, potencialmente subestimando o número de casos por região. Desta forma, nós não podemos excluir a possibilidade de circulação de CVB5 em outros estados, além dos identificados em nosso estudo.

A identificação de EVNP é dependente do isolamento em cultura de células. No entanto, como relatado por Sousa e colaboradores (2020), um grande problema é que os EV não são frequentemente identificados devido ao fato que alguns tipos replicam com pouca eficiência em algumas linhagens celulares. Embora a cultura de célula venha sendo substituído por métodos moleculares na rotina de detecção (NIX et al., 2006), a OMS preconiza o uso de culturas celulares para identificação de poliovírus (WHO, 2004).

Como relatado anteriormente, a baixa eficiência do isolamento viral verificada em nosso estudo pode estar associada as linhagens celulares utilizadas. Além disso, outros fatores também podem explicar a baixa eficiência do isolamento, tais como o armazenamento prolongado em condições inadequadas e o atraso no envio das amostras para o laboratório de referência, o fato da técnica ser demorada, com um tempo de execução longo e por não apresentar uma sensibilidade tão eficaz como a apresentada pelos métodos moleculares (NIJHUIS et al., 2002).

A região VP1 foi escolhida para ser estudada pois, codifica a principal proteína do capsídeo viral, apresenta alta variação genética e sítios antigênicos determinantes de neutralização específicos (CABRERIZO et al., 2008; KE et al., 2011; LEITCH et al., 2009; LEVEQUE et al., 2010). Devido a estes fatos, ela é utilizada na identificação molecular dos diferentes tipos de EV em estudos de diversidade genética (BAILLY et al., 2002, 2009; DOS SANTOS et al., 2006; KUNKEL; SCHREIER, 2000; LEITCH et al., 2009; PAPA et al., 2009; RAHIMI et al., 2009).

Informações obtidas a partir da análise da sequência do gene VP1 têm sido largamente utilizadas na identificação de estudos evolucionários dos CVB5 (HENQUELL et al., 2013; HUANG et al., 2018). A análise da variabilidade genética é uma importante ferramenta que fornece informações a respeito da epidemiologia molecular das infecções virais. Através da análise filogenética das sequências nucleotídicas é possível obter a classificação de cepas circulantes, bem como seu grau de relacionamento genético e evolutivo (HUANG et al., 2018; BAEK et al., 2011). Estruturalmente, a proteína VP1 é composta por uma estrutura β -barril cônico comumente visto na estrutura viral. Este β -barril é composto de 8 fitas β anti-paralelas (fitas B a I). As principais variações observadas na VP1 entre estão no N- e C-terminais e nos loops que conectam as fitas β , especialmente nos loops BC e DE (OBERSTE et al., 2008)

Em 2015, houve um surto de MA em alguns estados do nordeste, especialmente Pernambuco, evidenciado pelo aumento no número de amostras isoladas. A análise filogenética dos isolados brasileiros revelou a circulação de dois genogrupos do CVB5 no país. A substituição dos genogrupos ao longo do tempo ficou evidente em nossas análises. Até 2016 estava circulando no país apenas o genogrupo B e a partir de 2017, um novo genogrupo começou a circular (genogrupo A). Nosso estudo é o primeiro a demonstrar essa mudança no padrão de circulação dos CVB5 no Brasil.

Devido à alta seletividade para escape do sistema imunológico, o gene VP1 apresenta baixa similaridade nucleotídica dentre todos os genes dos EV. A regra 75/85% (75 % identidade nucleotídica e 85% para similaridade de aminoácidos) é padrão comumente utilizado para a tipagem molecular das diferentes espécies de EV. A análise de nossas sequências mostrou uma baixa identidade nucleotídica (76,3-82,4%) próximo a chamada “zona escura”, onde o sequenciamento do genoma completo se faz necessário para a confirmação do tipo de EV ou o aparecimento de um novo tipo de EV. Resultados similares já foram obtidos com outros EV, onde os valores de identidade nucleotídica eram relativamente baixos, mas a similaridade de aminoácidos era bastante elevada (ANGEZ et al., 2015)

Devido à baixa identidade verificada nos isolados deste estudo, nós também analisamos a proteína VP1 e as possíveis substituições nos diferentes sítios antigênicos e de ligação ao receptor. As principais modificações observadas na VP1 estão no N e C terminal e nos *loops* que conectam as folhas beta da estrutura secundária da proteína, especialmente os loops BC e DE. Nossas análises evidenciaram substituições nos resíduos 7, 19, 90, 95, 156, 180, 248, 273, 275, 276 e 279. Estas substituições também foram verificadas em estudos anteriores (HENQUELL et al., 2013, HUANG et al., 2018). Além disso, outras substituições ainda não reportadas foram identificadas, ao nosso conhecimento, pela primeira vez, nos resíduos 4, 6, 9, 18, 82, 84, 87, 91, 125, 130, 132, 136, 158, 169, 200, 235, 258, 262 e 268. Algumas destas substituições correspondem a sítios antigênicos localizados dentro do loop BC e outras estão localizadas no domínio de ligação ao receptor CAR (receptor coxsackievírus-adenovírus) e estão associadas ao escape de neutralização pelos anticorpos. Além disso, substituições também foram observadas na região do “pocket” hidrofóbico que podem estar associadas ao tropismo por células neuronais.

Três grandes substituições (Q91Y, S125T e K132Q) estavam presentes em todos os isolados de CVB5 do Brasil comparadas com o vírus protótipo. Estas substituições, principalmente Q91Y, já foram observadas em estudos anteriores com CVB5 e parecem estar relacionadas a resistência/afinidade a ligação de anticorpos neutralizantes (BATTISTONE et al., 2014; NORDER et al., 2003). As substituições T84A, D87N, A90G, A90T e Q91Y foram observadas especificamente dentro do loop BC. Estudos anteriores envolvendo EV-A71 revelou que apenas uma substituição (L97R) dentro da região do loop BC aumentou o tropismo viral por células neuronais (CORDEY et al., 2012). Além do seu papel imunogênico, a região do loop BC foi também identificada como um determinante nos poliovírus para adaptação ao hospedeiro (MURRAY et al., 1988).

A proteína VP1 possui 6 loops em sua superfície (BC, DE, DE/aB, GF, GH e HI) que estão localizadas no eixo 5X do capsídeo icosaédrico. Destes, o loop BC é o único sítio antigênico linear. Todos os outros sítios de neutralização são conformacionais. Portanto, um aprofundamento maior do impacto das substituições observadas em outras regiões da VP1 se faz necessário a fim de entender a real contribuição de cada uma delas, correlacionando estrutura/função da proteína. Vale a pena destacar que algumas substituições podem não representar modificações estruturais significantes, mas podem alterar a interação com receptores da célula hospedeira (CORDEY et al., 2012).

Um recente estudo envolvendo CVB5 revelou uma alta variabilidade na substituição de aminoácidos na proteína VP1 (HENQUELL et al., 2013), assim como evidenciado em nossas análises dos isolados de CVB5 do Brasil. Este alto número de modificações é característico de vírus de RNA, resultando em modificações sinônimas (mutação de um nucleotídeo não altera a sequência de aminoácidos de uma proteína) ou não-sinônimas (mutação de um nucleotídeo altera a sequência de aminoácidos de uma proteína) (PYBUS et al., 2007).

Em nosso estudo, uma diversidade genética maior foi observada no genogrupo B (23 substituições) em relação aos isolados do genogrupo A (12 substituições), evidenciado pelo alto número de substituições de aminoácidos, como verificado anteriormente (HENQUELL et al., 2013). Algumas substituições foram características dos isolados do genogrupo A: A90G, N95S e R200K. As duas primeiras substituições estão localizadas dentro ou muito próxima do loop BC, importante sítio imunogênico. Interessante observar que outras substituições foram observadas dentro do loop BC em ambos genogrupos. Algumas substituições observadas em nosso estudo estão localizadas no C-terminal da proteína VP1 (S268T, G273S, D276E e T279A) e estão expostas na superfície do vírus, podendo ter importante papel no processo de reconhecimento celular e interação com receptor exercendo um papel de destaque na história evolucionária dos CVB5 (HENQUELL et al., 2013). Vale a pena destacar que as substituições D276E e T279A não estavam presentes nos representantes do genogrupo A, mas foi marcante a presença nos representantes do genogrupo B.

A condição imunológica do hospedeiro também é um fator importante em definir a capacidade de invasão ao sistema nervoso central. Altas taxas de replicação no trato gastrointestinal estão relacionadas ao aparecimento de quasispecies, diferentes populações virais (PFEIFFER; KIERKEGAARD, 2006; ROSENFELD et al., 2019). A resposta imune reduzida do hospedeiro permite uma viremia prolongada, originando quasispecies virais dentro do trato gastrointestinal que confere uma vantagem seletiva para certos tipos celulares, inclusive células neurais, podendo resultar em uma neuroinfecção. Portanto, é importante correlacionar as informações obtidas neste estudo com a manifestação clínica apresentada pelos pacientes. No entanto, as informações disponíveis são escassas e dificultam qualquer suposição acerca do quadro clínico e as substituições observadas.

É interessante observar também que algumas substituições de aminoácidos na proteína VP1 podem estar relacionadas a uma característica mais agressiva da infecção e são críticos para estabelecimento de infecção, tais como o resíduo 95 (N95S) (LIU et al., 2014; AL-HELLO et al., 2009). Além disso, resíduos que na sequência primária da proteína estão distantes, podem

potencializar seus efeitos quando estão próximos na estrutura tridimensional da proteína (AL-HELLO et al., 2009). Portanto, a análise global das substituições observadas neste estudo através de análises *in silico* se faz necessária para entender melhor o impacto destas modificações na estrutura tridimensional da proteína VP1.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Verificar os possíveis efeitos das mutações na estrutura tridimensional da proteína VP1, através de análises *in silico*;
- Analisar as características cinéticas de crescimento dos dois genogrupos em culturas de células neuronais;
- Publicar em revista científica os resultados obtidos nessa dissertação, que está na fase final de redação.

8 CONCLUSÕES

- O sequenciamento nucleotídico da principal proteína do capsídeo (VP1) permitiu caracterizar os CVB5 que circularam no Brasil no período de 2005 a 2019;
- No período de estudo, os CVB5 circularam principalmente na região Sul do país e foi possível observar a circulação de dois genogrupos do CVB5. Até 2016 estava circulando o genogrupo B e a partir de 2017 começou a circular o genogrupo A no Brasil;
- Foram verificadas importantes substituições na proteína VP1 que podem sugerir o neutropismo viral e escape imune.

9 REFERÊNCIAS

ADAMS, M. *et al.* Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of virology**, [s.l.], v. 161, n. 10, p. 2921-2949, 2016.

AL-HELLO, H. *et al.* Amino acids of Coxsackie B5 virus are critical for infection of the murine insulinoma cell line, MIN-6. **Journal of Clinical Virology**, v. 81, n. 2, p. 296-304, 2009.

ANGEZ, M. *et al.* Molecular epidemiology of enterovirus B77 isolated from non polio acute flaccid paralytic patients in Pakistan during 2013. **Infection, Genetics and Evolution**, n. 29, p. 189-95, 2015.

BAEK, K. *et al.* Epidemics of enterovirus infection in Chungnam Korea, 2008 and 2009. **Virology journal**, v. 8, p. 297, 2011.

BAGGEN, J. *et al.* A role of enhanced receptor engagement in the evolution of a pandemic acute haemorrhagic conjunctivitis virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 2, p. 397–402, 2018b.

BAGGEN, J.; THIBAUT, H. J.; STRATING, J. R. P. M.; KUPPEVELD, F. J. V. V. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 368–381, 2018a.

BAILLY, J.L. *et al.* Genetic diversity of echovirus 30 during a meningitis outbreak demonstrated by direct molecular typing from cerebrospinal fluid. **Journal of Medical Virology**, v. 68, p. 558–567, 2002.

BAILLY, J.L. *et al.* Phylogeography of circulating populations of human echovirus 30 over 50 years: nucleotide polymorphism and signature of purifying selection in the VP1 capsid protein gene. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 699-708, 2009.

BASTOS, M.S. *et al.* Detection of Herpesvirus, Enterovirus, and Arbovirus infection in patients with suspected central nervous system viral infection in the Western Brazilian Amazon. **Journal of Medical Virology**, v. 86, n. 9, p. 1522–1527, 2014.

BATTISTONE, A. *et al.* Sporadic isolation of sabin-like polioviruses and high-level detection of non-polio enteroviruses during sewage surveillance in seven Italian cities, after several years of inactivated poliovirus vaccination. **Applied and environmental microbiology**, vol. 80, n. 15, p. 4491-501, 2014.

BINGJUN, T. *et al.* Molecular typing and epidemiology of non-polio enteroviruses isolated from Yunnan Province, the People's Republic of China. **Journal of Medical Virology**, [s.l.], v. 80, n. 4, p. 670–679, 2008.

CABRERIZO, M. *et al.* Molecular epidemiological study of HEV-B enteroviruses involved in the increase in meningitis cases occurred in Spain during 2006. **Journal of Medical Virology**, v. 80, n. 6, p. 1018-1024, 2008.

CHEN, B. S; LEE, H. C; LEE, K. M; GONG, Y. N; SHIH, S. R. Enterovirus and encephalitis. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 261, 2020.

CHEN, C. S. *et al.* Retrograde axonal transport: a major transmission route of enterovirus 71 in mice. **Journal of Virology**, v. 81, n. 17, p. 8996-9003, 2007.

CIFUENTE, J.O.; MORATORIO, G. Evolutionary and Structural Overview of Human Picornavirus Capsid Antibody Evasion. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n.v283, p. 1-11, 2019.

COMPAGNOLI-CARMONA, R. C. Distribution of species enterovirus B in patients with central nervous system infections in São Paulo State, Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 92, p. 3849–3856, 2020.

CORDEY, S. *et al.* Identification of Site-Specific Adaptations Conferring Increased Neural Cell Tropism during Human Enterovirus 71 Infection. **PLOS Pathogens**, v. 8, n. 7, p. 1-12, 2012.

COYNE, C. B.; BERGELSON, J. M. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. **Cell**, v. 124, n. 1, p. 119–131, 2006.

DA SILVA, E. E.; COSTA, E. V.; AZEVEDO, J. P. R. Enteroviroses de Importância Médica. In: José Rodrigues Coura (Org.). **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, v. 2, 1681-1700 p.

DA SILVA, E. E; WINKLER, M. T; PALLANSCH, M. A. Role of Enterovirus 71 in Acute Flaccid Paralysis after the Eradication of Poliovirus in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 2, N. 3, p. 3231–3, 1996.

DARRIBA, D.; TABOADA, G.; DOALLO, R; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, n. 9, p. 772, 2012.

DE OLIVEIRA, D. B. *et al.* Etiological agents of viral meningitis in children from a dengue-endemic area, Southeast region of Brazil. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 375, p. 390–394, 2017.

DE QUADROS, C. A, *et al.* Eradication of poliomyelitis: progress in the Americas. **The Pediatric Infectious Disease journal**, v. 10, n. 3, p. 222-229, 1991.

DOS SANTOS, G. P, *et al.* Enterovirus meningitis in Brazil, 1998-2003. **Journal of Medical Virology**, v. 78, n. 1, p. 98-104, 2006.

FERNANDEZ-GARCIA, M. D; KEBE, O.; FALL, A. D.; NDIAYE, K. Identification and molecular characterization of non-polio enteroviruses from children with acute flaccid paralysis in West Africa, 2013-2014. **Scientific Reports**, v. 7, n.1, p. 1–11, 2017.

HAN, J.F. *et al.* Recombination of human coxsackievirus B5 in hand, foot, and mouth disease patients, China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, p. 351–353, 2012.

HENQUELL, C. *et al.* Phylogenetic Patterns of Human Coxsackievirus B5 Arise from Population Dynamics between Two Genogroups and Reveal Evolutionary Factors of Molecular Adaptation and Transmission. **Journal Virology**, v. 87, n. 22, p. 12249–59, 2013.

HIXON, A. M.; CLARKE, P.; TYLER, K. L. Contemporary Circulating Enterovirus D68 Strains Infect and Undergo Retrograde Axonal Transport in Spinal Motor Neurons Independent of Sialic Acid. **Journal of Virology**, v. 93, n. 16, 2019.

HUANG, H. W. *et al.* Evolutionary histories of coxsackievirus B5 and swine vesicular disease virus reconstructed by phylodynamic and sequence variation analyses. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

ICTV- International committee on taxonomy of viruses. Virus Taxonomy homepage. Disponível em: <https://www.ictvonline.org>. Acesso em: 18 de setembro de 2021.

JORBA, J. *et al.* Update on Vaccine-Derived Polioviruses - Worldwide, January 2017-June 2018. **Morbidity Mortality Weekly Report (MMWR)**. V. 67, n. 42, p. 1189–1194, 2018.

KAPOOR, A. *et al.* A highly prevalent and genetically diversified Picornaviridae genus in South Asian children. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 51, p. 20482–7, 2008.

KATOH, K.; MISAWA, K.; KUMA, K. I.; MIYATA, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 14, p. 3059–66, 2002.

KE, G.M. *et al.* Molecular epidemiology of Echovirus 30 in Taiwan, 1988–2008. **Virus Genes**, v. 42, n. 2, p. 178–188, 2011.

KHETSURIANI, N. *et al.* Centers for Disease Control and Prevention. Enterovirus surveillance—United States, 1970–2005. **MMWR Surveill**, v. 55, p. 1–20, 2006.

KIM, K. W. *et al.* Coxsackievirus B5 infection induces dysregulation of microRNAs predicted to target known type 1 diabetes risk genes in human pancreatic islets. **Diabetes**, v. 65, n. 4, p. 996–1003, 2016.

KUNKEL, U.; SCHREIER, E. Genetic variability within the VP1 coding region of echovirus type 30 isolates. **Archives of Virology**, v. 145, p. 1455–1464, 2000.

LAI, J. K. F.; SAM, I.-C.; CHAN, Y. F. The autophagic machinery in Enterovirus infection. **Viruses**, v. 8, n. 2, p. 35–44, 2016.

LEITCH, E.C. *et al.* Direct identification of human enterovirus serotypes in cerebrospinal fluid by amplification and sequencing of the VP1 region. **Journal of Clinical Virology**, v. 44, n. 2, p. 119–124, 2009.

LÉVÊQUE, N. *et al.* Phylogenetic analysis of Echovirus 30 isolated during the 2005 outbreak in France reveals existence of multiple lineages and suggests frequent recombination events. **Journal of Clinical Virology**, v. 48, n. 2, p. 137–141, 2010.

LIU, N. *et al.* An outbreak of aseptic meningitis caused by a distinct lineage of coxsackievirus B5 in China. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 23, p. 101–4, 2014.

LUCHS, A. *et al.* Echovirus 6 associated to aseptic meningitis outbreak, in São Joaquim da Barra, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 28–31, 2008.

MAAN, H. S.; CHOWDHARY, R.; SHAKYA, A. K; DHOLE, T. N. Genetic diversity of cosaviruses in nonpolio acute flaccid paralysis cases of undefined etiology, Northern India, 2010–2011. **Journal of Clinical Virology**, v. 58, n. 1, p. 183-187, 2013.

MAAN, H. S.; DHOLE, T. N.; CHOWDHARY, R. Identification and characterization of nonpolio enterovirus associated with nonpolio-acute flaccid paralysis in polio endemic state of Uttar Pradesh, Northern India. **PLoS ONE**, v. 14, n.1, 2019.

MAJER, A.; MCGREEVY, A; BOOTH, T. F. Molecular Pathogenicity of Enteroviruses Causing Neurological Disease, **Frontiers in microbiology**, v. 11, n. 540, p. 1-22, 2020.

MIRAND, A. *et al.* Prospective identification of HEV-B enteroviruses during the 2005 outbreak. **Journal of Medical Virology**, v. 78, p.1624–1634, 2006.

MUCKELBAUER, J. K. *et al.* The structure of coxsackievirus B3 at 3.5 Å resolution. **Structure**, v. 3, p. 653–667, 1995.

MURRAY, M. G. *et al.* Poliovirus host range is determined by a short amino acid sequence in neutralization antigenic site I. **Science**, v. 241, n. 4862, p. 213–215, 1988.

MUSLIN, C.; KAIN, A. M.; BESSAUD, M.; BLONDEL, B.; DELPEYROUX, F. Recombination in enteroviruses, a Multi-Step Modular Evolutionary Process. **Viruses**, v. 11, n. 9, p. 859, 2019.

NIJHUIS, M. *et al.* Rapid and Sensitive Routine Detection of All Members of the Genus Enterovirus in Different Clinical Specimens by Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 40, n. 10, p. 3666–3670, 2002.

NIX, A.; OBERSTE, S.; PALLANSCH, Mark. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Atlanta, v. 44, n. 8, p. 2698- 2704, 2006.

NORDER, H.; BJERREGAARD, L.; MAGNIUS, L.; LINA, B.; AYMARD, M.; CHOMEL, J. J. Sequencing of 'untypable' enteroviruses reveals two new types, EV-77 and EV-78, within human enterovirus type B and substitutions in the BC loop of the VP1 protein for known types. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 4, p. 827-836, 2003.

OBERSTE, M.S. Comparative genomics of the coxsackie B viruses and related enteroviruses. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, n. 323, p. 33-47, 2008.

PALLANSCH, M.; OBERSTE, S.; WHITTON, L. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In: COHEN, J. I.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; RACANIELLO, V. R.; ROIZMAN, B. **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. 490-530 p.

PAPA, A. *et al.* Molecular epidemiology of Echovirus 6 in Greece. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 28, n. 6, p. 683-687, 2009.

PENG, C. *et al.* A Coxsackievirus B5-Associated Aseptic Meningitis Outbreak in Shandong Province, China in 2009. **Journal of Medical Virology**, v. 85, p. 483-489, 2013.

PFEIFFER, J.K.; KIRKEGAARD, K. Bottleneck-mediated quasispecies restriction during spread of an RNA virus from inoculation site to brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 10, n. 14, p. 5520-5525, 2006.

PICORNAVIRIDAE. The picornaviridae homepage. Disponível em: <https://www.picornaviridae.com/>. Acesso em: 18 de setembro de 2021.

PINTO JUNIOR, V. L.; REBELO, M. C.; DA COSTA, E. V.; SILVA, E. E.; BÓIA, M. N. Description of a widespread outbreak of aseptic meningitis due to echovirus 30 in Rio de Janeiro state, Brazil. **Journal of Infectious Disease**, v. 13, n. 5, p. 367-70, 2009.

PONS-SALORT, M.; PARKER, E.P.K.; GRASSLY, N.C. The epidemiology of non-polio enteroviruses: Recent advances and outstanding questions. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 28, p. 479-487, 2015.

PYBUS, O.G. *et al.* Phylogenetic evidence for deleterious mutation load in RNA viruses and its contribution to viral evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 3, p. 845-52. 2007.

RAHIMI, P. *et al.* Direct identification of non-polio enteroviruses in residual paralysis cases by analysis of VP1 sequences. **Journal of Clinical Virology**, v. 45, n. 2, p. 139-141, 2009.

RAMALHO, E, *et al.* Identification and phylogenetic characterization of human enteroviruses isolated from cases of aseptic meningitis in Brazil, 2013–2017. **Viruses**, v. 11, n. 8, p. 2013–7, 2019.

REZIG D. *et al.* Update on molecular characterization of coxsackievirus B5 strains. **Journal Medical Virology**, n. 83, p. 1247–1254, 2011.

RHOADES, R. E.; TABOR-GODWIN, J. M.; TSUENG, G.; FEUER, R. Enterovirus infections of the central nervous system. **Virology**, v. 411, n. 2, p. 288–305, 2011.

ROBINSON, S. M. *et al.* Coxsackievirus B exits the host cell in shed microvesicles displaying autophagosomal markers. **PloS Pathogens**, v. 10, n. 4, p. 1-21, 2014.

ROSENFELD, A.B.; WARREN, A.L.; RACANIELLO, V.R. Neurotropism of Enterovirus D68 Isolates Is Independent of Sialic Acid and Is Not a Recently Acquired Phenotype. **American Society for Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 1-16, 2019.

SAEED, M. *et al.* Epidemiology and clinical findings associated with enteroviral acute flaccid paralysis in Pakistan. **BMC Infectious Diseases**, v. 7, p. 1–6, 2007.

SANTOS, Gina Peres Lima dos. **Estudo da frequência de enterovírus associados a surtos e casos esporádicos de meningite viral ocorridos no Brasil, no período de dezembro de 1998 a dezembro de 2003, e análise do perfil dos pacientes.** 2005. Dissertação (Mestrado)–Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro.

SHOJA, Z. O.; TABATABAIE, H.; SHAHMAHMOUDI, S.; NATEGH, R. Comparison of cell culture with RT-PCR for enterovirus detection in stool specimens from patients with acute flaccid paralysis. **Journal Clinical Laboratory Analysis**, v. 21, n. 4, p. 232–6, 2007.

SIMMONDS, P. *et al.* Recommendations for the nomenclature of enteroviruses and rhinoviruses. **Archives Virology**, v. 165, p. 793–797, 2020.

SOLOMON, T.; WILLISON, H. Infectious causes of acute flaccid paralysis. **Current Opinion Infectious Diseases**, v. 16, p. 375–381, 2003.

SOUSA, I. P. *et al.* Echovirus 30 detection in an outbreak of acute myalgia and rhabdomyolysis, Brazil 2016–2017. **Clinical Microbiology Infection**, v. 25, n. 2, p. 252, 2019.

SOUSA, I. P. Jr. *et al.* Viral and Prion Infections Associated with Central Nervous System Syndromes in Brazil. **Viruses**, v. 13, n. 7, p. 1370, 2021.

SOUSA, I. P. Jr. *et al.* Molecular characterization and epidemiological aspects of non-polio enteroviruses isolated from acute flaccid paralysis in Brazil: a historical series (2005-2017). **Emerging microbes & infections**, v. 9, n. 1, p. 2537-2546, 2020.

SURESH, S.; FORGIE, S.; ROBINSON, J. Non-polio enterovirus detection with acute flaccid paralysis: A systematic review. **Journal Medicinal Virology**, v. 90, p. 3–7, 2018.

SURESH, S.; RAWLINSON, W. D.; ANDREWS, P. I.; STELZER-BRAID, S. Global epidemiology of nonpolio enteroviruses causing severe neurological complications: A systematic review and meta-analysis. **Reviews in Medical Virology**, v. 30, n. 1 p. 1-13, 2020.

TAPPAREL, C.; SIEGRIST, F.; PETTY, T. J.; KAISER, L. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. **Infection Genetics and Evolution**, v. 14, p. 282–293, 2013.

THOELEN, I. *et al.* Molecular typing and epidemiology of enteroviruses identified from an outbreak of aseptic meningitis in Belgium during the summer of 2000. **Journal Medical Virology**, v.70, n. 3, p. 420–9, 2003.

TSENG, F.-C. *et al.* Epidemiological survey of enterovirus infections occurring in Taiwan between 2000 and 2005: Analysis of sentinel physician surveillance data. **Journal of Medical Virology**, v. 79, n. 12, p. 1850–1860, 2007.

TSUEY-LI, L. *et al.* Introduction of Laboratory-based Surveillance System for Enterovirus in Taiwan. **Taiwan Epidem Bull**, v. 31, p. 211–221, 2015.

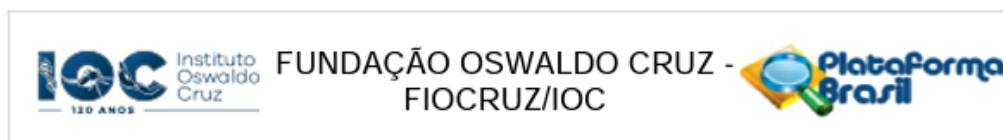
VAN DER LINDEN, L.; WOLTERS, K. C.; VAN KUPPEVELD, F. J. Replication and Inhibitors of Enteroviruses and Parechoviruses. **Viruses**, v. 7, n. 8, p. 4529–4562, 2015.

WELLS, A. I.; COYNE, C. B. Enteroviruses: A Gut-Wrenching Game of Entry, Detection, and Evasion. **Viruses**, v. 11, n. 460, p. 1-20, 2019.

WHO. World Health Organization. Polio Laboratory Manual. 4th ed. Document World Health Organization/IVB/04.10. Geneva, Switzerland. 2004.

10 ANEXOS

10.1 ANEXO 1- PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP) FIOCRUZ.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS COXSACKIEVÍRUS B5 ASSOCIADOS A INFECÇÕES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL NO BRASIL

Pesquisador: Edson Elias da Silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 44205321.0.0000.5248

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.597.096

Apresentação do Projeto:

Os enterovírus humanos (EV) são pequenos vírus de RNA, não envelopados, pertencentes à família Picornaviridae. Atualmente, os EV causadores de doenças em humanos estão inseridos em 4 espécies (EV-A, EV-B, EV-C e EV-D). Embora a maioria das infecções por EV possam ser assintomáticas, esses vírus estão associados a um amplo espectro de apresentações clínicas, incluindo síndromes graves do sistema nervoso central (SNC). Dentre as manifestações que envolvem o SNC, as mais comuns são a paralisia flácida aguda (PFA) e a meningite asséptica (MA). Entre os vírus da espécie EV-B, o coxsackievírus B5 (CVB5) é um dos tipos mais predominantes em humanos e epidemias ocasionadas por esses vírus são reportadas anualmente em diferentes partes do mundo, muitas das quais associadas com infecções no SNC. Portanto, este projeto tem como objetivo realizar a caracterização molecular dos CVB5 isolados a partir de infecções associados ao SNC em diferentes regiões geográficas do Brasil, no período de 2005 a 2019, avaliar a relação evolutiva entre as os diferentes genogrupos de CVB5 circulantes no país e correlacionar com isolados circulantes em diferentes partes do mundo. Para isso, será realizada a extração do RNA viral a partir de células infectadas (RD e HEp2C), seguido da síntese do c-DNA e RT-PCR para amplificação total do gene que codifica a principal proteína do capsídeo viral (VP1). Por fim, será realizada reação de sequenciamento nucleotídico baseada no método de Sanger. As características evolucionárias e a história geográfica destes vírus serão avaliadas através da análise filogenética. Além disso, análises in silico do CVB5 serão realizadas para compreender os efeitos das mutações

Endereço: Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepflocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 4.597.096

observadas na região VP1. Ao término deste estudo, espera-se obter informações sobre a circulação e a diversidade genética dos CVB5 associados aos quadros de PFA e MA no Brasil e obter informações acerca da prevalência e da epidemiologia molecular desses vírus nas regiões estudadas

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Realizar a caracterização molecular dos CVB5 isolados no Brasil, a partir de infecções associadas ao sistema nervoso central, entre os anos de 2005 a 2019.

Objetivo Secundário:

- 1- Determinar a prevalência dos CVB5 e identificar a diversidade de cepas circulantes nas amostras analisadas e como estes vírus estão distribuídos pelo país;
- 2- Analisar a filodinâmica das cepas circulantes no país através da inferência Bayesiana;
- 3- Realizar análise de um importante segmento do gene VP1 (loop BC);
- 4- Analisar a sequência nucleotídica e de aminoácidos em busca de mutações que expliquem o neurotropismo destes vírus;
- 5- Realizar experimentos in silico através de dinâmica molecular para verificar os possíveis efeitos das mutações na estrutura viral.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo o pesquisador:

"Riscos:

Este estudo não envolverá participantes humanos de forma direta ou experimentação animal. Serão utilizados isolados de cultura de células de vírus que fazem parte do acervo biológico do Laboratório de Enterovírus do Instituto Oswaldo Cruz, coletados através da Vigilância Epidemiológica, como parte do Programa de Erradicação da Poliomielite no Brasil. Não será utilizado nenhum dado referente aos sujeitos cujas amostras foram encaminhadas ao LEV para o diagnóstico laboratorial, uma vez que as amostras são identificadas apenas pelo número de registro de entrada no banco de dados do laboratório. Sendo assim, será assegurada a identidade e privacidade dos sujeitos."

"Benefícios:

No Brasil, as informações acerca da distribuição geográfica e dos genótipos de CVB5 circulantes no país são bastante limitadas. Estudos de regiões importantes do vírus pode nos levar a compreender melhor os mecanismos que determinam neurotropismo viral. Além disso, a análise

Endereço: Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepflocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 4.597.096

filodinâmica pode fornecer importantes informações sobre aspectos epidemiológicos e evolucionários deste importante EV circulante no país."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma tese de mestrado.

Apresentou justificativa para dispensa do TCLE: "O presente projeto não envolverá participantes humanos de forma direta ou experimentação animal. Este estudo não envolverá casos humanos, mas o uso de isolados de cultura de células de vírus que fazem parte do acervo biológico do Laboratório de Enterovírus do Instituto Oswaldo Cruz, coletados através da Vigilância Epidemiológica, como parte do Programa de Erradicação da Poliomielite no Brasil, entre os anos de 2005 a 2019.

Portanto, não haverá coleta de amostras pela equipe do LEV e não há contato direto dos pesquisadores envolvidos no projeto com os pacientes da rede do SUS. Entretanto, tendo em vista a importância da abordagem dos aspectos éticos em nossa prática científica, a identidade de todos os pacientes será preservada e não serão utilizados dados relacionados aos pacientes, uma vez que as amostras são identificadas apenas pelo número de registro de entrada no banco de dados do LEV."

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os seguintes termos foram apresentados:

PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1707334.pdf

Carta_anuencia_LEV.docx

Carta de anuência assinada pelo chefe do Lab.

Confidencialidade_Raiana.docx

Confidencialidade_Ivanildo.docx

Confidencialidade Edson

Projeto_PB_CVB5.docx

Isencao_TCLE.docx

Manuseio_material_biologico.docx

Cronograma.docx

Orcamento_detalhado.docx

Orcamento.docx

Folha_de_rosto.pdf

Endereço: Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)

Bairro: Mangueiras **CEP:** 21.040-360

UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepflocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 4.597.096

Recomendações:

O pesquisador deverá apresentar relatório parciais e final.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

não se aplica

Considerações Finais a critério do CEP:

PROTOCOLO APROVADO

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC) em sua 283a Reunião Ordinária, realizada em 16.03.2021, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Este CEP ressalta a importância do envio dos relatórios parciais e final, sendo uma das responsabilidades assumidas pelo pesquisador ao submeter o seu projeto para apreciação (Resolução CNS 466/2012, XI.2.d e Resolução CNS 510/2016, Art. 28, V).

O Relatório Parcial deverá ser encaminhado anualmente e,

O Relatório de Conclusão (Final) deverá ser enviado aproximadamente em 30 a 60 dias após o término do projeto. Ambos os tipos de relatórios deverão ser apresentados via Plataforma Brasil, no modo/ferramenta "Notificação".

A observância dos prazos de envio dos relatórios parciais ou finais é estritamente de responsabilidade do pesquisador. A não obediência aos prazos estipulados poderá implicar na NÃO APROVAÇÃO dos relatórios.

PROTOCOLO APROVADO

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC) em sua 283a Reunião Ordinária, realizada em 16.03.2021, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Este CEP ressalta a importância do envio dos relatórios parciais e final, sendo uma das responsabilidades assumidas pelo pesquisador ao submeter o seu projeto para apreciação (Resolução CNS 466/2012, XI.2.d e Resolução CNS 510/2016, Art. 28, V).

O Relatório Parcial deverá ser encaminhado anualmente e,

O Relatório de Conclusão (Final) deverá ser enviado aproximadamente em 30 a 60 dias após o término do projeto. Ambos os tipos de relatórios deverão ser apresentados via Plataforma Brasil, no modo/ferramenta "Notificação".

A observância dos prazos de envio dos relatórios parciais ou finais é estritamente de

Endereço: Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Mangulhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepflocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 4.597.096

responsabilidade do pesquisador. A não obediência aos prazos estipulados poderá implicar na NÃO APROVAÇÃO dos relatórios.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	Carta_de_anuencia_LEV.docx	15/03/2021 14:26:50	Koko Otsuki	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Confidencialidade_Edson.docx	15/03/2021 14:24:43	Koko Otsuki	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1707334.pdf	06/03/2021 10:32:16		Aceito
Outros	Carta_anuencia_LEV.docx	06/03/2021 10:26:27	Edson Elias da Silva	Aceito
Outros	Confidencialidade_Raiana.docx	04/03/2021 16:43:21	Edson Elias da Silva	Aceito
Outros	Confidencialidade_Ivanildo.docx	04/03/2021 16:43:04	Edson Elias da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_PB_CVB5.docx	26/02/2021 08:52:15	Edson Elias da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Isencao_TCLE.docx	26/02/2021 08:51:55	Edson Elias da Silva	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Manuseio_material_biologico.docx	26/02/2021 08:51:07	Edson Elias da Silva	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	26/02/2021 08:47:38	Edson Elias da Silva	Aceito
Orçamento	Orcamento_detalhado.docx	26/02/2021 08:47:30	Edson Elias da Silva	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	26/02/2021 08:47:18	Edson Elias da Silva	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	26/02/2021 08:46:40	Edson Elias da Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)
 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepflocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 4.597.096

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 17 de Março de 2021

Assinado por:
José Henrique da Silva Pilotto
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepflocruz@ioc.fiocruz.br

Página 06 de 06