



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLÉCULAR

Identificação e caracterização de novos vírus (Anellovirus) em primatas do Distrito Federal

Maurício Macedo Rodrigues

Brasília
2021



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLÉCULAR

Identificação e caracterização de novos virus (Anellovirus) em primatas do Distrito Federal

Maurício Maçedo Rodrigues

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular

Orientador: Bergmann Morais Ribeiro

Coorientador: Leonardo Assis da Silva

Brasília

2021

Resumo

Devido à estreita relação genética entre primatas não humanos e humanos, alguns organismos causadores de doenças, especialmente vírus, podem infectar ambos. Diante desse fato, é extremamente importante estudar vírus de primatas não humanos para prever novas doenças emergentes. Para investigar novos vírus emergentes em primatas não humanos, sequenciamos o ácido nucleico total extraídos de amostras de sangue total de 56 *Callithrix penicillata* e 31 *Sapajus libidinosus* de vida livre do Distrito Federal, Brasil, usando a plataforma HiSeq™ 2000 (Illumina). Os resultados revelaram a presença de dois novos vírus da família Anelloviridae. Os anellovírus são diversos em termos de tamanho e sequência do genoma. Esses vírus têm genoma composto de DNA circular, fita simples, variando de 2,0 a 3,9 quilobases (kb) em tamanho. Um dos genomas montados possui 3.398 nucleotídeos de comprimento, codificando 3 fases abertas de leitura (ORFs), com 46,4% de similaridade com o vírus Torque teno tamarin (número de acesso do GenBank AB041960). O outro genoma possui 2.771 nucleotídeos de comprimento, codificando 2 ORFs, com 25,6% de similaridade com o vírus Torque teno midi (número de acesso do GenBank AB449063). Desta forma, devido às suas relações filogenéticas, denominamos esses possíveis novos vírus como Torque teno vírus Bsb1 (TTVBsb1) e Torque teno vírus Bsb2 (TTVBsb2). TTVBsB1 foi encontrado em 18 *C. penicillata* e 5 *Sapajus libidinosus*, TTVBsB2 foi encontrado em apenas dois *C. penicillata*. De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), o critério de demarcação de uma nova espécie de anellovírus é estabelecido em 35% de divergência na sequência de nucleotídeos da ORF1. Uma vez que TTVBsB1 e TTVBsB2 têm mais de 46% de divergência de sequência em ORF1 com os vírus próximos filogeneticamente, eles devem ser classificados como duas novas espécies na família Anelloviridae. As sequências relativas às ORF1s de cada vírus foram clonadas para expressão em células de inseto usando baculovirus como vetor de expressão. Entretanto, não foi possível detectar a expressão dessas proteínas. O uso de metodologias de sequenciamento de alto desempenho vem revolucionando o estudo da diversidade de micro-organismos e na vigilância epidemiológica de vírus zoonóticos. A descoberta de novas espécies de vírus é de grande importância para a saúde humana, tanto no cenário de surtos de doenças infecciosas emergentes quanto em síndromes de doenças de etiologia desconhecida.

Palavras-chave: Brasil, primatas selvagens, sangue total, Torque Teno Virus, Anelloviridae, Genoma completo.

Abstract

Due to the close genetic relationship between non-human and human primates, some disease-causing organisms, especially viruses, can infect both. Given this fact, it is extremely important to study non-human primate viruses to predict new emerging diseases. To investigate new viruses emerging in non-human primates, we sequenced genetic material extracted from whole blood samples of 56 *Callithrix penicillata* and 31 *Sapajus libidinosus* from Distrito Federal, Brazil. Total nucleic acid sequenced using the HiSeq™ 2000 platform (Illumina). The results revealed the presence of two new viruses from the Anelloviridae family. Anelloviruses are diverse in terms of genome size and sequence. These viruses have a single-stranded circular DNA genome ranging from 2.0 to 3.9 kb in size; for example, human anelloviruses include tenovirus torque (3.6–3.9 kb), teno minivirus torque (2.8–2.9 kb) and teno midi virus (3.2 kb). One of the assembled genomes has a genome of 3,398 nucleotides in length, coding for 3 ORFs, with 46.4% nucleotide identity with the Torque teno tamarin virus (GenBank accession number AB041960). The other genome is 2,771 nucleotides long, encoding 2 ORFs, with 25.6% nucleotide identity with the Torque teno midi virus (GenBank accession number AB449063). So, due to their phylogenetic relationships, we call these new viruses as Torque teno virus BsB1 (TTVBsB1) and Torque teno virus BsB2 (TTVBsB2). TTVBsB1 was found in 18 *C. penicillata* and 5 *Sapajus libidinosus*, TTVBsB2 was found in only two *C. penicillata*. According to the International Virus Taxonomy Committee (ICTV), the demarcation criterion for a new anellovirus species is set at 35% divergence in the ORF1 nucleotide sequence. Since TTVBSB1 and TTVBsB2 have more than 46% sequence divergence in ORF1 with their closely related viruses, they must be classified as two new species in the Anelloviridae family. Sequences relating to the ORF1s of each virus were cloned for protein expression in insect cells using baculovirus as an expression system for heterologous proteins. No protein was detected in the SDS-page and Western Blot analyzes.

Keywords: Brazil, wild primates, whole blood, Torque Teno Virus, Anelloviridae, Complete genome.

Agradecimentos

Agradeço a toda a minha família pelo carinho, apoio e incentivo ao longo de toda minha vida.

Agradeço a minha esposa, Emily, pela dedicação e carinho todos os dias.

Ao meu Professor e Orientador, Bergmann Morais Ribeiro, pela paciência e ensinamentos.

Ao meu coorientador e amigo, Leonardo Assis da Silva.

A todos os meus amigos e amigas do grupo de baculovírus.

À minha chefe, Professora Simone Perecmanis, pelo incentivo. E a todos os amigos e amigas do Laboratório de Microbiologia Veterinária.

A todos que fizeram, de algum jeito, ser possível a realização deste trabalho, me ensinando, me dando força ou, “simplesmente”, sendo amigo!

E, finalmente, a toda forma de Vida existente!

Índice

Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Agradecimentos.....	v
Índice de figuras e tabelas.....	vii
Abreviações e símbolos utilizados.....	ix
Capítulo 1. Introdução.....	11
1.1 Primatas	11
1.2 Anellovírus.....	12
1.3 Replicação e Proteínas dos Anellovírus.....	15
1.4 TTV e Primatas não humanos.....	16
1.5 Primatas do Distrito Federal.....	18
1.6 Expressão heteróloga em células de insetos.....	20
2. Justificativa.....	23
3. Objetivos.....	25
3.1 Objetivo geral.....	32
3.1.2 Objetivos específicos.....	32
4. Materiais e Métodos.....	25
4.1 Área de estudo.....	25
4.1.2 Origem das amostras.....	25
4.2 Preparo e extração de ácido nucleicos.....	26
4.2.1 Sangue.....	26
4.2.2 Fezes.....	27
4.3 Sequenciamento, anotação e análise das sequências	28
4.4 Detecção da presença dos Anellovírus nas amostras individuais.....	30
4.4.1. Amplificação de DNA circular pela técnica de Círculo Rolante (RCA).....	33
4.4.2 Amplificação por PCR e clonagem no vetor de clonagem.....	33
4.5 Construção dos vetores de transferência para expressão das ORF1 dos vírus TTV-Bsb1 e TTV-Bsb2 em células de insetos.....	34
4.6 Construção do baculovírus recombinantes contendo as ORF1s do TTV-Bsb1	

e TTV-Bsb2	35
4.7 Análise da expressão das proteínas recombinantes.....	36
5. Resultados	38
5.1 Análise das sequências virais	38
5.2 PCR dos anellovírus para confirmação nas amostras de sangue e clonagem no vetor pGEM®-T easy E pFASTBac1.....	43
5.2.1 Confirmação das sequências amplificadas.....	47
5.3 Construção dos vetores de transferência com os genes das ORF1s dos vírus TTV-Bsb1 e TTV-Bsb2.....	48
5.4 Construção dos baculovírus recombinantes contendo as ORF1s do TTV-Bsb1 e TTV-Bsb2.....	52
5.5 Análise da expressão das ORF1s recombinantes em células de inseto.....	53
6. Discussão	54
7. Conclusão	58
8. Perspectivas	59
9. Referências bibliográficas	60

Índice de figuras e tabelas

Figura 1. Organização genômica dos Anellovírus.....	15
Figura 2. <i>S. libidinosus</i> observados em um parque aquático na região administrativa de Santa Maria, DF.....	19
Figura 3. O ciclo de infecção de um baculovírus em hospedeiro lepidóptero.....	21
Figura 4. Esquema mostrando as etapas do sistema Bac-to-Bac® para formação de baculovírus recombinantes.....	23
Figura 5. Mapa do Distrito Federal dividido em regiões administrativas.....	26
Figura 6. Combinação de oligonucleotídios utilizados para identificação dos anellovírus nas amostras individuais.	32
Figura 7. Organização genômica dos Anellovírus Mapa dos genomas de TTV-Bsb1 e TTV-Bsb2.....	40
Figura 8. Organização genômica dos Anellovírus Árvore filogenética usando os nucleotídeos da ORF1 completa de 55 membros da família Anelloviridae.....	42
Figura 9. Amplificação do genoma completo dos Anellovírus.....	43
Figura 10. Amplificação do genoma completo e ORF1 do vírus TTV-Bsb1.....	44
Figura 11. Amplificação do genoma completo e ORF1 do vírus TTV-Bsb2.....	45
Figura 12. Amplificação da sequência da ORF1 de TTV-Bsb1 feita nos grupos.....	46
Figura 13. Digestão da ORF1 de TTV-Bsb1 com enzima BamHI.....	48

Figura 14. Mapa do plasmídeo pFastBac1-ORF1-6xHis-TTV1.....	49
Figura 15. Mapa do plasmídeo pFastBac1-6xHis-ORF1 Δ Arg-TTV1.....	50
Figura 16. Mapa do plasmídeo pFastBac1-ORF1-6xHis-TTV2.....	51
Figura 17. A: Mapa do plasmídeo pFastBac1-6xHis-ORF1 Δ Arg-TTV2.	52
Figura 18. Análise do efeito citopático na infecção de células Tn5B com diferentes baculovírus	53
Tabela 1. Taxonomia da Família <i>Anelloviridae</i> (ICTV).....	14
Tabela 2. Organização dos grupos de amostras.....	28
Tabela 3. Oligonucleotídeos usados nesse trabalho.....	30
Tabela 4. Combinação de oligonucleotídeos utilizados para identificação individual dos anellovírus.....	32
Tabela 5. Número de reads totais resultantes do sequenciamento NGS.....	38
Tabela 6. Genomas encontrados no NGS em cada grupo de amostras de primatas.....	39
Tabela 7. Características genômicas, ORFs previstas e localizações de elementos de transcrição das possíveis espécies de Torque teno vírus descobertos em primatas do DF.....	40
Tabela 8. Identidade e Divergências de nucleotídeos das ORFs dos Torque teno vírus encontrados neste estudo e seus parentes mais próximos.....	41
Tabela 9. Amostras positivas para TTV-Bsb1 utilizando as combinações de oligonucleotídios mostradas na tabela 4.....	46
Tabela 10. Características dos possíveis peptídeos traduzidos pela ORF1 de TTV-Bsb1 e TTV-Bsb2 com e sem a região N-terminal produzidos neste trabalho.....	54

Abreviaturas e símbolos

6xHis	cauda dehexa-histidina
<i>g</i>	velocidade de sedimentação gravitacional
AcMNPV	Autographa californica multicaudate nucleopolyhedrovirus
ALT	Alanina Aminotransferase
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
BSA	albumina sérica bovina
BV	“ <i>Budded virus</i> ”
cDNA	DNA complementar
dNTP	deoxinucleotídeos
DNA	ácido desoxirribonucleotrisfosfato
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
g	grama
h	hora
hp.i.	horas após infecção
HCl	ácido clorídrico
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
IPTG	isopropilβ-D-1-tiogalactopiranosídeo
kb	quilobases
kDa	quilodaltons
L	litro
LB	meio Luria-Bertani
M	molar: mol/L
	mg miligrama = 10 ⁻⁶ grama
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro

mM	milimolar
NaCl	cloreto desódio
NaOH	hidróxido desódio
NBT	Nitroazul detetrazólio
ODV	<i>“Occluded-derivedvirus”</i>
ng	nanograma
pb	pares de base
PBS	<i>tampão fosfatosalino</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial de hidrogênio
RT-PCR	transcriptase reversa-PCR
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotação por minuto
s	segundo
SDS	dodecilsulfato desódio
TE	Tampão Tris-EDTA
Tris	tris (hidroximetil)aminometano
TTMDV	Torque teno midi virus
TTMV	Torque teno mini virus
TTV	Torque teno virus
VLP	<i>“Virus like particle”</i>
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactopiranosídeo
µg	micrograma
µl	microlitro
µM	micromolar (micromol por litro)
µm	micrometro
°C	grau Cels

1. INTRODUÇÃO

1.1 PRIMATAS

A ordem Primates (Linnaeus, 1758) é formada por lêmures, társsios, macacos e grandes primatas: incluindo nós, seres humanos. Composta por 508 espécies, distribuídas em 80 gêneros (itis.gov junho2020), é a terceira maior ordem de mamíferos, atrás apenas dos quirópteros (morcegos, Chiroptera) com 1314 espécies e dos roedores (Rodentia) com 2367 espécies. O Brasil é o país com maior diversidade de primatas do mundo, possuindo cerca de 140 táxons (espécies e subespécies) (sbprimatologia.org.br/). Esses animais possuem importante papel ecológico ambiental, por exemplo, na polinização e dispersão de sementes (Carthew e Goldmgay,1997; Fuzessy et al., 2017; Nakashima et al., 2008) e são fundamentais para o estudo e controle de doenças emergentes. Aproximadamente 60% das espécies de primatas do mundo estão ameaçadas de extinção e 75% estão em declínio populacional. As principais ameaças são mudanças climáticas, perda de habitats causada pela exploração humana, a caça para consumo e criação como animal de estimação. Doenças emergentes, antroponóticas e zoonóticas, também são fatores que ameaçam esses animais. (Estrada et al., 2018; Peterson e Riley, 2012).

A proximidade evolutiva entre Primatas humanos e Primatas Não Humanos (PNH) faz com que diversos patógenos sejam compartilhados entre as espécies dessa ordem (Majolo et al., 2013). Muitos estudos ao longo do tempo demonstraram a ocorrência desse tipo de compartilhamento; entre estes, está o primeiro isolamento do Zika vírus (Dick et al., 1952). Em 1946, a floresta de Zika em Uganda foi escolhida como uma das áreas de estudo da febre amarela. Um dos macacos do gênero *Rhesus* sp., colocados em plataformas na copa das árvores, apresentou febre de 40 °C. A partir do sangue deste animal foi possível isolar um patógeno que, futuramente, entre os anos 2015/2016, representaria uma das maiores emergências de saúde pública da história do Brasil (Kelly et al., 2020). A Febre Amarela é outra doença na qual os primatas possuem um grande e importante papel. Encontrada nas regiões tropicais da África e América do Sul, o vírus da febre amarela é uma zoonose transmitida pela picada de mosquitos do gênero *Haemagogus* e *Sabethes*, no ciclo silvestre; no ciclo urbano, o vírus é transmitido pela picada da fêmea do mosquito *Aedes aegypti* (Benchimol, 2001; Couto-Lima et al., 2017). O aparecimento de primatas mortos pode ser uma evidência da presença do vírus em determinada região e o trabalho de monitoramento dessas populações é uma importante ferramenta de controle da doença (Tranquilin et al., 2013; Jesus et al., 2020; Mares-Guia et

al., 2020). Na Costa Rica, alguns macacos das espécies *Ateles geoffroyi*, *Saimiri oerstedii*, *Cebus imitato* e *Alouatta palliata* apresentaram anticorpos contra os vírus da Dengue (DENV) e do Nilo Ocidental (WNV), além de infecções ativas determinadas pela técnica da reação em cadeia da polimerase chamada (RT-PCR) em alguns animais (Dolz et al., 2019). Alguns vírus humanos são letais quando contraídos por PNHs, por exemplo, a infecção por Human herpesvirus 1 (HHV-1) em *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata* de cativeiro descrita por Casagrande et al. (2014).

1.2 ANELLOVÍRUS

Em 1997 no Japão, Nishizawa et al. isolaram um vírus desconhecido a partir de amostra de soro de um paciente com hepatite pós-transfusional de etiologia desconhecida e elevado nível de alanina aminotransferase (ALT). A análise de diferença representacional (“*Representational Difference Analysis*” - RDA) foi realizada para detecção de sequências de ácidos nucleicos presentes no soro do paciente durante o período de hepatite aguda, mas que estavam ausentes antes da transfusão. Nove das 36 sequências obtidas eram semelhantes entre si, e suas sequências foram detectáveis apenas durante o período de hepatite aguda deste paciente. Um sequência representativa nomeada de N22, com 500 pares de base (pb), mostrou baixa identidade com qualquer uma das 1.731.752 sequências depositadas em bancos de dados de DNA em 2 de outubro de 1997. Utilizando oligonucleotídios específicos para região N22, dois pacientes com hepatite pós-transfusional, também com elevados níveis de ALT, apresentaram a mesma sequência. O plasma de um desses pacientes foi fracionado por ultracentrifugação em gradiente de densidade de sacarose e o DNA com a sequência N22 apareceu em frações com densidade de 1,26 g / cm³. O DNA N22 em frações foi resistente à digestão com DNase I, ao contrário do DNA extraído do plasma do mesmo doador, indicando que o DNA com a sequência N22 seria coberto por um revestimento em uma possível partícula viral. Esse novo vírus foi nomeado vírus TT (TTV) devido às iniciais do primeiro paciente (T.T.), de quem o DNA viral foi isolado. Coincidentemente, TTV também poderiam representar *Transfusion Transmitted Virus* (vírus transmitido por transfusão) (Nishizawa et al. 1997).

Posteriormente, foi comprovada a natureza de fita simples do DNA do TTV pois o genoma viral foi sensível à DNase I e resistente à RNase A. Além disso, o material genético do TTV foi sensível à *Mung Bean nuclease*, enzima com atividade para digerir especificamente DNA de fita simples. A densidade do

TTV permaneceu inalterada no gradiente de sacarose, mesmo depois de tratado com Tween 80, assim TTV foi entendido como um vírus sem envelope (Okamoto et al., 1998b). Amostras de fezes e soro de pacientes com carcinoma hepatocelular tipo B ou C estavam infectados com o DNA de TTV (Okamoto et al. 1998a). Em 1999, com a elucidação de todo o genoma do TTV, foram identificadas a natureza circular e polaridade negativa, bem como suas diversas formas de transmissão (Hijikata et al., 1999; Mushahwar et al., 1999; LUO et al., 2000; Tawara et al., 2000). As comparações de sequências com outros vírus de genoma parecido não mostraram semelhanças significativas, então foi criada a família *Anelloviridae*, do latim *anello* (anel) e TTV passou a significar “Torque Teno Vírus” (TTV) do latim “*Torque*” que significa “colar” e “*Tenuis*” significa “fino”, se referindo ao formato circular do vírus (Biagini, 2009).

Após sua descoberta, os anellovírus foram encontrados em muitos hospedeiros vertebrados, incluindo primatas não humanos, roedores, morcegos, gambás, pandas e pinípedes (NG et al., 2009; Kluge et al., 2016; Amatya et al., 2017; Zhang et al., 2017; Souza et al., 2018). Muitos estudos associaram esses vírus a um amplo espectro de doenças, incluindo hepatite e esclerose múltipla (Borkosky et al., 2012). Porém, há estudos que demonstram uma alta prevalência de TTV em pessoas saudáveis (Vasilyev et al., 2009; MAZZOLA et al., 2015; Al-Qahtani et al., 2016).

A família *Anelloviridae* é composta por vírus não envelopados com genoma de DNA circular fita simples e polaridade negativa, variando de 2,0 a 4 kb em tamanho. Por exemplo, os anellovírus humanos incluem os vírus Torque teno vírus -TTV (3,6–3,9 kb) (Nishizawa et al. 1997), Torque teno minivírus -TTMV (2,8–2,9 kb) (Takahashi et al., 2000) e Torque teno midi vírus - TTMDV (3,2 kb)(Jones et al., 2005). Esses vírus possuem partículas virais com simetria icosaédrica, diâmetro de 30-32 nm e densidade em CsCl de 1,31-1,33 g/cm³ para TTV e 1,27–1,28 g/cm³ para TTMVs em soro (Okamoto et al., 1998; Itoh et al., 2000).

Em 2009, o ICTV estabeleceu a nova família *Anelloviridae*, dividindo-a em 11 gêneros. Três outros gêneros, Mutorquevirus, Nutorquevirus e Gyrovirus foram acrescentados até 2017 (Manzin et al., 2015; Rosario et al., 2017). Atualmente, essa família viral, possui aproximadamente 76 espécies distribuídas em 14 gêneros (Tabela 1) (ICTV, 2021). Baseando-se em sua análise filogenética, apresentam pelo menos 39 genótipos com divergência de nucleotídeos maior que 30% um do outro, ou em cinco grupos genéticos

(Genogrupos) principais (grupos 1–5) com uma divergência de sequência maior que 50% um do outro. Além disso, algumas variantes do TTV ainda não foram classificadas em grupos genômicos (Devalle & Niel, 2004; Hsiao et al., 2016; Ninomiya et al., 2009; Nascimento, 2011; WEI et al., 2015).

Tabela 1. Taxonomia da família *Anelloviridae* (ICTV). Os 14 gêneros com seus representantes e o número de acesso do GenBank.

Gêneros	Vírus tipo
<i>Alphatorquevirus</i>	<i>Torque teno virus 1</i> -TA278 [AB008394]
<i>Betatorquevirus</i>	<i>Torque teno mini virus 1</i> -CBD279 [AB026931]
<i>Deltatorquevirus</i>	<i>Torque teno tupaia virus</i> -Tbc-TTV14 [AB057358]
<i>Epsilontorquevirus</i>	<i>Torque teno tamarin virus</i> -So-TTV2 [AB041960]
<i>Etatorquevirus</i>	<i>Torque teno felis virus</i> -Fc-TTV4 [AB076003]
<i>Gammatorquevirus</i>	<i>Torque teno midi virus 1</i> -MD1-073 [AB290918]
<i>Gyrovirus</i>	<i>Chicken anemia virus</i> [NC 001427]
<i>Iotatorquevirus</i>	<i>Torque teno sus virus 1</i> -Sd-TTV31 [AB076001]
<i>Kappatorquevirus</i>	<i>Torque teno sus virus k2a</i> [AY823991]
<i>Lambdatorquevirus</i>	<i>Torque teno zalophus virus</i> – ZcAV [FJ459582]
<i>Mutorquevirus</i>	<i>Torque teno equus virus 1</i> [KR902501]
<i>Nutorquevirus</i>	<i>Torque teno seal virus 4</i> [KM262783]
<i>Thetatorquevirus</i>	<i>Torque teno canis virus</i> -Cf-TTV10 [AB076002]
<i>Zetatorquevirus</i>	<i>Torque teno douroucouli virus</i> – At-TTV3 [AB041961]

Os anellovírus possuem uma organização genômica relativamente bem conservada, dividida em duas regiões: uma região codificadora contendo uma ORF principal, ORF1, uma ORF2 sobreposta à ORF1 e várias ORFs adicionais, e uma região não traduzida (do inglês: *untranslated region* - UTR) (Figura 1). Três principais fases de leitura aberta (do inglês: “Open ReadinG Frame”-ORF), ORF1, ORF2 e ORF3 podem ser identificadas diretamente pela sequência de nucleotídeos ou aminoácidos. A ORF1, maior, pode corresponder até 67% de todo o genoma. A proteína codificada pela ORF1 possui sequências N-terminais hidrofílicas, ricas em arginina e acredita-se que codifica a proteína da capsídeo viral. ORF2 apresenta um motivo altamente conservado, WX7HX3CXCX5H (onde X é qualquer amino ácido, W é o aminoácido triptofano, H, histidina, e C, cisteína) , identificável em sua parte N-terminal. A ORF3, sobreposta à porção C-terminal da ORF1, possui um domínio rico em serina capaz de gerar diferentes locais de fosforilação e pode desempenhar algum papel na manutenção da infecção viral persistente. A presença de uma quarta ORF não é observada em todos os anellovírus. A região UTR, relativamente bem conservada entre os membros da família, contém uma ou duas sequências com alto teor de GC; duas sequências de 15

nucleotídeos (nt) (CGAATGGCTGAGTTT e AGGGGCAATTCGGGC) além das sequências relacionadas aos processos de transcrição e tradução: *TATA box* (ATATAA), *Specificity Protein 1- Sp1* (GGGCGG), *Cap site* (GGGGCAATT) e *Poly(A) signal* (AATAAA) (Hijikata et al., 1999; Okamoto et al., 2000^{ab}, ; Okamoto et al., 2002; Zhang et al., 2016^a; Eibach et al., 2019).

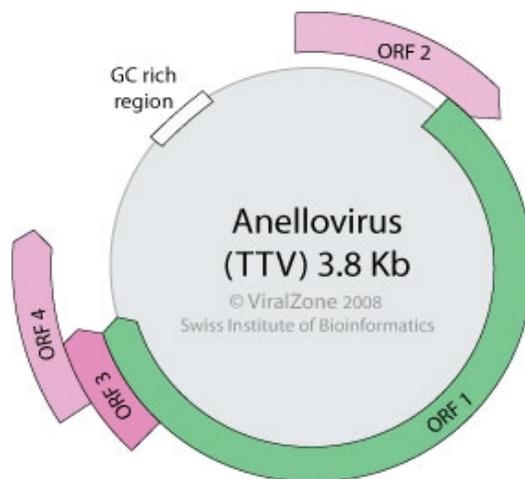


Figura 1. Organização genômica dos Anellovírus, DNA circular, fita simples de polaridade negativa. (O esquema mostra as ORFs 1, 2 e 3; a localização da sequência com alto teor de GC na região UTR). Fonte: Adaptado de Viral Zone, 2021 - <https://viralzone.expasy.org>.

1.3 REPLICAÇÃO E PROTEÍNAS DOS ANELLOVÍRUS

O DNA dos Anellovírus foi detectado em diferentes fluidos biológicos, órgãos e tecidos humanos e de outros animais saudáveis e doentes. No Japão, Torque teno vírus foi detectado na saliva, fezes, sêmen e lágrimas de 59% das pessoas saudáveis, todos os casos com soro positivo para TTV-DNA (Matsubara et al., 2000). TTV também foi encontrado na saliva, no leite materno e em sangue de cordão umbilical de mães saudáveis (Goto et al. 2000). Por outro lado, o DNA de membros dessa família foi encontrado na saliva e em tumores de pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço (Hettmann et al., 2016). TTV foi detectado no pulmão de 36% dos pacientes com fibrose pulmonar idiopática (Bando et al., 2001). O genoma de membros do gênero *Betatorquevirus* foi detectado no líquido cefalorraquidiano de 16% dos pacientes pediátricos internados com encefalite/ meningoencefalite em Gana (Eibach et al., 2019). Todos esses achados mostram uma ausência de tropismo indicando que a replicação do genoma viral pode ocorrer em vários tecidos e órgãos. Além disso, as cargas virais e os genótipos podem variar em diferentes amostras do mesmo indivíduo (Okamoto et al., 1999). Porém, O DNA do TTV foi detectado em todas as células

sanguíneas periféricas, exceto hemácia. Assim, devido a presença do TTV nas células do sistema imunológico, capazes de invadir vários tecidos na inflamação, deve-se determinar cuidadosamente se o TTV realmente se aloja nas células inerentes a cada um dos tecidos (Takahashi et al., 2002).

O mecanismo exato de replicação do TTV não foi totalmente compreendido. Não há, no genoma dos Anellovírus, sequência de DNA que codifique uma DNA polimerase para replicação assim, esses vírus usariam as polimerases celulares. Experimentos feitos com aphidicolina, droga que bloqueia a DNA polimerase celular, inibiram a replicação do DNA do TTV em Células HEK293T (Kakkola et al., 2007). Com base na análise das sequências de nucleotídeos e aminoácidos, os Anellovírus poderiam usar o mecanismo de círculo rolante semelhante ao vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas (C.A.V - Chicken Anemia Virus) (Bendinelli et al., 2001; Hijikata et al., 1999; Mushahwar et al., 1999).

Os vírus da família *Anelloviridae* produzem três mRNA distintos com tamanhos de 3-2,9 kb, 1,2 kb e 1,0 kb. Esses mRNAs foram primeiramente detectados em células da medula óssea de um indivíduo infectado por TTV (Okamoto et al., 2000c). Kamahora et al., (2000) encontrou resultados parecidos transfetando o genoma completo do TTV em células COS1, derivadas de tecido de rim de macaco. Quarenta e oito h pós-transfecção, três espécies de mRNA de TTV de 3,0, 1,2 e 1,0 kb de comprimento foram detectados. Além disso, ambos os trabalhos observaram rearranjos (*splicing* alternativos) nos três mRNAs principais. Posteriormente, identificou-se que TTVs expressam pelo menos seis possíveis proteínas: ORF1-736 aminoácidos (aa); ORF1/1 – 199aa; ORF1/2 – 142aa; ORF2 – 117aa; ORF2/2 - 281aa e ORF2/3 - 275 aa (Kakkola et al., 2002; Qiu et al., 2005). O maior mRNA com tamanho entre 3 e 2,9kb expressa as proteínas ORF1(~81kDa) e ORF2(~13kDa). O mRNA de 1,2 kb expressa as proteínas TTV ORF2/2 e ORF1/1 com tamanhos de 31 e 22 kDa, respectivamente; o menor mRNA de 1,0 kb expressa as proteínas das ORF2/3 e ORF1/2 com tamanhos de 30 e 16 kDa, respectivamente. Qiu et al.(2005), utilizando vetores de expressão com o promotor do Citomegalovírus, expressou em células 293 (células renais embrionárias humanas), todas as seis proteínas de TTV. As proteínas expressas pelas ORFs 1 e 2 foram predominantemente citoplasmáticas, sendo a proteína da ORF1 com menor expressão entre todas. Já as proteínas das ORF2/2 e ORF2/3 foram exclusivamente nucleares mostrando um possível papel na replicação e expressão do genoma. As proteínas da ORF1/1 e ORF1/2 estavam distribuídas entre citoplasma e núcleo. Embora as proteínas ORF1, ORF1/1 e ORF1/2 apresentem a região N-terminal rica em arginina, um possível sinal de localização nuclear, todas apresentaram localização citoplasmática.

1.4 TTV E PRIMATAS NÃO HUMANOS

Os primeiros estudos sobre as propriedades moleculares, biologia e implicações clínicas do Torque teno virus foram realizadas em primatas da espécie *Macaca mulatta* (Rhesus) e do gênero *Pan* (chimpanzé). Em 1999, Mushahwar et al inocularam, intravenosamente, soro de pacientes positivos para TTV em chimpanzés. O DNA de TTV foi detectado no soro de alguns animais até 219 dias pós inoculação. Porém, não foi encontrado TTV nas fezes e nenhuma evidência bioquímica ou histológica de hepatite foi obtida (Mushahwar et al, 1999). Em outro estudo, soro e fezes de pacientes humanos infectados por TTVs foram administrados intravenosa e oralmente em macacos Rhesus, que desenvolveram viremia entre 4 e 10 dias após inoculação. TTV estava presente no citoplasma e nos núcleos dos hepatócitos desses animais, porém nenhuma alteração patológica significativa foi encontrada. Nos animais que permaneceram vivos, o vírus foi detectado nas fezes por mais de 6 meses, porém, nenhuma alteração na enzima ALT foi detectada (LUO et al., 2000). Tawara et al. (2000) também inocularam, por via intravenosa em dois chimpanzés, soro e sobrenadante de fezes contendo TTV. O DNA do TTV foi detectado até 30 semanas pós infecção e as taxas da enzima ALT aumentaram pouco antes do título viral de TTV diminuir. Alterações bioquímicas e histológicas leves em amostras de fígado foram observadas em ambos os chimpanzés em associação com a redução no título de TTV (Tawara et al., 2000). Esses estudos mostraram que TTV pode ser transmitido pelas vias sanguínea e fecal. Prescott & Simmonds (1998) identificaram, pela primeira vez, a presença do vírus em soro de chimpanzés silvestres, na África, e também em populações humanas distribuídas globalmente. Cong et al. (2000), utilizando animais de cativeiro, demonstraram que o TTV apresenta uma grande diversidade de espécies semelhantes, algumas das quais não haviam sido detectadas em humanos e circulavam predominantemente entre chimpanzés. Thom et al. (2003) detectou diversos anellovirus em macacos africanos das espécies dril, mandril, *mangabeys* e gibões e nos grandes primatas: gorilas, chimpanzés e orangotangos.

Nos primatas do Novo Mundo, os anellovírus já foram detectados em diferentes espécies. Em 2000, Okamoto et al. identificaram TTVs no soro de diferentes espécies de primatas; entre eles, macacos selvagens da América do Sul: *Saguinus labiatus*, *Saguinus oedipus* e *Aotus trivirgatus*. Neste estudo, detectou-se o DNA do TTV em 100% de 4 *Saguinus labiatus*, 83% de 6 *Saguinus oedipus* e 100% de 5 *Aotus trivirgatus* (Okamoto et al., 2000a). Leary et al. (1999), utilizando diferentes combinações de oligonucleotídios, obteve positividade de 23,5% no soro de *Saguinus labiatus* e 20% em *Aotus trivirgatus*

(Leary et al., 1999). Outros estudos com espécies americanas não identificaram esses vírus, incluindo as espécies *Callithrix jacchus* e *Cebus apell* (Abe et al., 2000; Barnett et al., 2004; Pujol et al., 2005; Verschoor et al., 1999).

No Brasil, TTVs já foram encontrados em diferentes espécies de primatas a partir de sangue, soro e *swab* oral. Catroxo et al.(2008ab), encontrou anellovírus no soro de 4 (5.3%) de 75 *Cebus apella*, 2 (40%) de 5 *Alouata fusca*, 1 (20%) de 5 *Alouata caraya*, 1 (5.2%) de 19 *Callithrix penicilata*, 1 (4%) de 25 *Callithrix jacchus*, 1 (20%) de 5 *Saimiri sciureus* e 1 (25%) de 4 *Leontopithecus chrysomelas*. Dos Santos et al. (2020), usando análises metagenômicas de *swab* oral de 40 *Sapajus nigritus*, encontrou o genoma completo de uma nova espécie de TTV. Muitas das espécies de TTV encontradas em primatas sul-americanos, incluindo os brasileiros, são filogeneticamente próximas e agrupam-se às espécies encontradas por Okamoto et al.(2000a) em *Saguinus oedipus* e *Aotes trivirgatus* (Catroxo et al., 2008; Dos Santos et al.,2020).

1.5 PRIMATAS DO DISTRITO FEDERAL

Duas espécies principais de primatas não humanos ocupam de forma simpátrica regiões antropizadas do Distrito Federal: *Sapajus libidinosus* Spix, 1823 (macaco-prego) e *Callithrix penicillata* E. Geoffroy, 1812 (sagui-de-tufo-preto) (da Rosa et al., 2017; De Miranda & De Faria, 2001; Vilela, 2007). Essas espécies são constantemente observadas em áreas urbanas e semiurbanas da região, por exemplo, Jardim Zoológico de Brasília (Abreu Sousa et al., 2020;) e Parque Nacional de Brasília (Sacramento, 2014; Saito et al., 2010); e interagem diretamente com outros animais e seres humanos (figura 2). Essas interações podem exercer um importante papel na propagação e transmissão de patógenos entre primatas não-humanos, animais domésticos e homem (Favoretto et al., 2001; la Salles et al., 2018). Além disso, a presença de primatas selvagens em ambientes urbanos e periurbanos pode ser um risco para esses animais, como relatado por Pereira et al. (2020) em estudo sobre *C. penicillata* eletrocutados em ambientes antrópicos no Distrito Federal e arredores.

C. penicillata é uma espécie endêmica do Brasil e tem uma distribuição ampla, ocorrendo principalmente na região do Cerrado no centro-leste do Brasil, mas também pode ser encontrada na Mata

Atlântica e na Caatinga e, em alguns locais, é considerado espécie invasora. Seu estado de conservação é classificado como Menos Preocupante (LC) pela IUCN - União Internacional para Conservação da Natureza (*International Union for Conservation of Nature*) (Bicca-Marques et al., 2018).

S. libidinosus ocorre em uma ampla gama de habitats, como floresta estacional decidual, manguezais, floresta e matagal da Caatinga do nordeste do Brasil, floresta de galeria e matas secas do Cerrado (savana arbustiva) no Brasil central. Podem formar grupos com nove indivíduos, mas já foi relatado um grupo com 53 animais, no oeste do Rio Grande do Norte (Ferreira et al., 2009). Eles são capazes de explorar uma ampla gama de recursos alimentares, incluindo uma variedade de frutas, sementes, artrópodes, sapos e até pequenos mamíferos, complementados por caules, flores e folhas. De hábitos alimentares generalistas e com grande flexibilidade comportamental e ecológica, esta espécie é capaz de usar ferramentas a fim de facilitar a exploração de recursos e é altamente resistente a distúrbios antrópicos (Salles et al., 2018;). Seu estado de conservação é classificado como Quase Ameaçada (NT) pela IUCN devido à perda de contínua de habitat (Martins et al., 2019).



Figura 2. *S. libidinosus* observados em um parque aquático na região administrativa de Santa Maria, DF.

1.6 EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM CÉLULAS DE INSETOS

1.6.1 BACULOVÍRUS – UMA INTRODUÇÃO

Os baculovírus são vírus de insetos pertencentes à família *Baculoviridae* (King et al, 2012) encontrados infectando centenas de espécies de insetos em todo o mundo (Miller, 1997). Esses vírus infectam, principalmente, insetos da ordem Lepidoptera, mas há relatos de baculovírus infectando insetos das ordens Diptera e Hymenoptera. Alguns membros desta família são altamente específicos e patogênicos fazendo destes uma importante ferramenta para controle biológico de pragas como, por exemplo, a lagarta na cultura da soja (*Aticarsia gemmatalis*) e a lagarta do cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*). Além disso, os baculovírus são usados como sistema de expressão de proteínas heterólogas permitindo a produção de vacinas e métodos de diagnósticos, bem como sua aplicação como vetores para terapia gênica (Ribeiro, 2015; van Oers et al, 2015).

São vírus envelopados em forma de bastão, genoma de DNA fita dupla com tamanho variando entre 80 a 180 kpb, codificando entre 90 a 180 open reading frames (ORFs) (Rohrmann, 2013). O ciclo de replicação dos baculovírus é bifásico com a formação de dois tipos de virions fenotipicamente distintos porém, geneticamente idênticos, durante a infecção. O vírus extracelular ou brotado (ECV ou BV, do inglês, extracellular virus ou *budded virus*) responsável pela disseminação da infecção célula a célula, e o vírus derivado da oclusão (ODV, do inglês, *occluded derived virus*) o qual está envolvido na transmissão horizontal de inseto para inseto. Estes ODVs podem conter um único nucleocapsídeo por envelope (SNPV, do inglês *single nucleopolyhedrovirus*) ou múltiplos (MNPV, do inglês *multiple nucleopolyhedrovirus*). Os corpos de oclusão (“*Occlusion Body*” - OB) são cristais formados pelos ODVs reunidos em uma estrutura proteica, composta principalmente pela proteína viral poliedrina, e capazes de resistir às condições ambientais externas. O processo de infecção viral inicia-se quando as larvas de insetos ingerem, ao se alimentarem, os OBs contendo as partículas virais ODVs. Quando os OBs entram em contato com as condições alcalinas presentes no intestino médio do inseto, o corpo de oclusão é dissolvido e ODVs são liberados. Estes ODVs, com o auxílio das enzimas, atravessam a membrana peritrófica do intestino, que é uma camada composta por quitina e proteína (Hegedus et al, 2009), e iniciam o ciclo de infecção celular nas células epiteliais do intestino médio (CASTRO et al., 1999; Clem & Passarelli, 2013; Miller, 1997). Depois do primeiro ciclo de replicação viral no núcleo dessas células, a produção de BVs se inicia (Figura

1, fase 5). Quando liberados, os BVs são transportados pela hemolinfa para infectar novas células. Ao entrar na célula-alvo, o processo de infecção é semelhante ao que acontece na infecção por ODV: os nucleocapsídeos são direcionados para o núcleo celular onde ocorre a replicação do DNA e subsequente expressão das proteínas virais. Durante as fases tardias e muito tardias de infecção, são expressas as proteínas que constituem a matriz dos OBs. O final do ciclo de infecção se dá com a morte e liquefação das larvas pelas enzimas virais quitinase e catepsina, e liberação de OBs para o meio ambiente, onde permanecem estáveis até serem ingeridos por novos insetos.

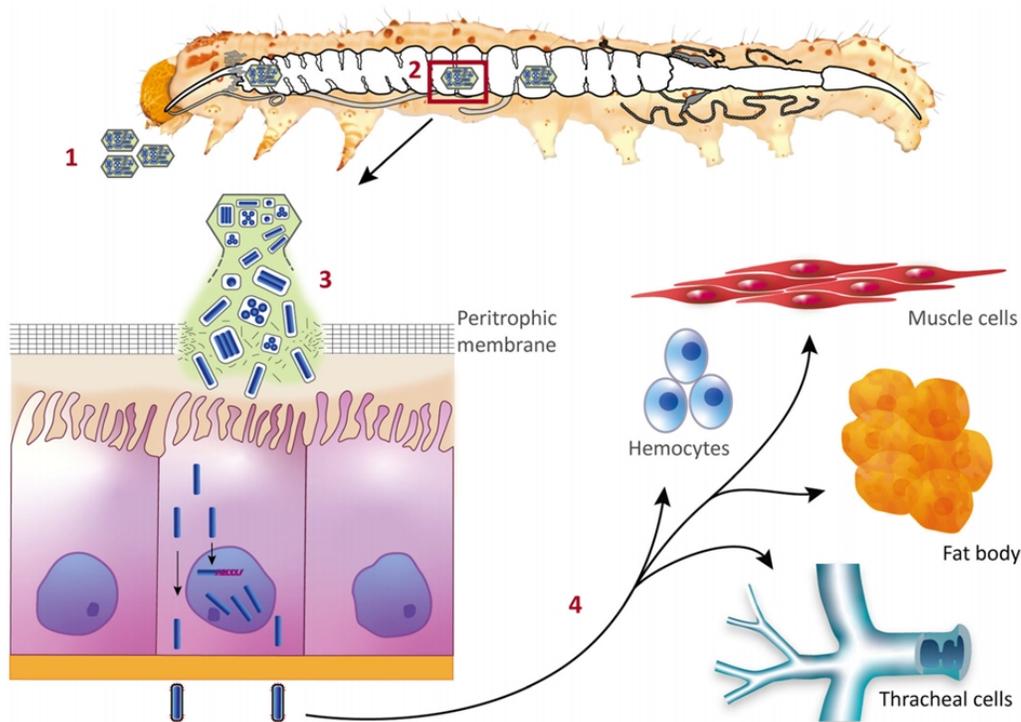


Figura 3. O ciclo de infecção de um baculovírus em hospedeiro lepidóptero. Fases 1 : a ingestão de OBs pelo inseto ao se alimentar. Fases 3: dissolução da matriz proteica do OB e liberação dos ODVs que rompem e cruzam a membrana peritrófica do lúmen intestinal e estabelecendo a infecção de células epiteliais do intestino médio. Fase 4: primeiro ciclo de replicação viral no núcleo dessas células com a produção de BVs se inicia, e em sequência, BVs são transportados para outros tecidos, via hemolinfa, espalhando a infecção para todo o inseto. Fonte: Sosa-Gomes , 2020.

1.6.2 SISTEMA DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA USANDO BACULOVÍRUS COMO VETOR

O principal modelo para o estudo da expressão gênica em baculovírus é o baculovírus da espécie *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) em células de *Spodoptera frugiperda*. A regulação da expressão gênica desses vírus pode ser dividida em duas fases principais de acordo com os genes expressos: fase precoce (*early*) e fase tardia (*late*). Essas fases podem ser subdivididas em fase precoce imediata (*immediately early*) e fase muito tardia (*very late*). A fase precoce imediata inicia-se a partir de 20 min até 8 h pós-infecção e corresponde basicamente à síntese de fatores de transcrição e de proteínas pertencentes à maquinaria de replicação viral (Friesen, 1997). A transição da fase precoce para a fase tardia se dá pelo início da replicação do DNA viral, entre 6h e 24h após a infecção, e intensa produção de proteínas responsáveis pela montagem dos BVs (Lu & Miller, 1997). A fase muito tardia da infecção inicia com a expressão de proteínas que constituem a matriz que envolverão os ODVs para formação dos corpos de oclusão (OB). Nessa fase, a poliedrina (POLH), principal constituinte dos OBs, é produzida em grande quantidade (Jarvis, 1997; Rohrmann, 1986). Embora a poliedrina seja produzida em grande quantidade, seu gene não é essencial para a replicação viral em cultura de células. Assim, o locus dessa proteína e seu promotor são usados para a construção de baculovírus recombinantes capazes de expressar proteínas heterólogas (Rohrmann, 1986).

A maioria dos sistemas comerciais para expressão de proteínas em células de inseto usam o baculovírus AcMNPV como modelo. Um dos métodos mais usados para a construção de baculovírus recombinantes hoje em dia é o sistema comercial Bac-to-Bac (Invitrogen). Esse sistema utiliza a transposição sítio específica Tn7 para gerar um bacmídeo recombinante. Inicialmente, o gene de interesse é clonado em um plasmídeo doador pFastBac™ em uma região flanqueada pelos sítios Tn7R e TN7L. Este plasmídeo é transformado em células competentes DH10Bac™ contendo o genoma do AcMNPV no cromossomo bacteriano artificial bMON14272 (bacmídeo) com um sítio de transposição mini-attTn7. Além do bacmídeo, a célula DH10Bac™ possui o plasmídeo auxiliar (pHelper) responsável por produzir uma enzima de transposição (transposase.). O sítio mini-Tn7 do plasmídeo pFastBac™ é transposto para o sítio de destino mini-attTn7 no bacmídeo com o auxílio da enzima transposase. Junto aos sítios Tn7 está o gene heterólogo que passa a integrar o genoma do bacmídeo. A inserção do gene é feita de forma a romper o gene lacZα presente no bacmídeo. Assim, quando DH10Bac™ é cultivada em meio LB ágar contendo IPTG e X-gal, colônias contendo bacmídeos recombinante apresentam coloração branca devido ao

rompimento do gene *lacZα*. O DNA dos bacmídeos recombinantes é extraído e este é, então, usado para transfecção em células de insetos.

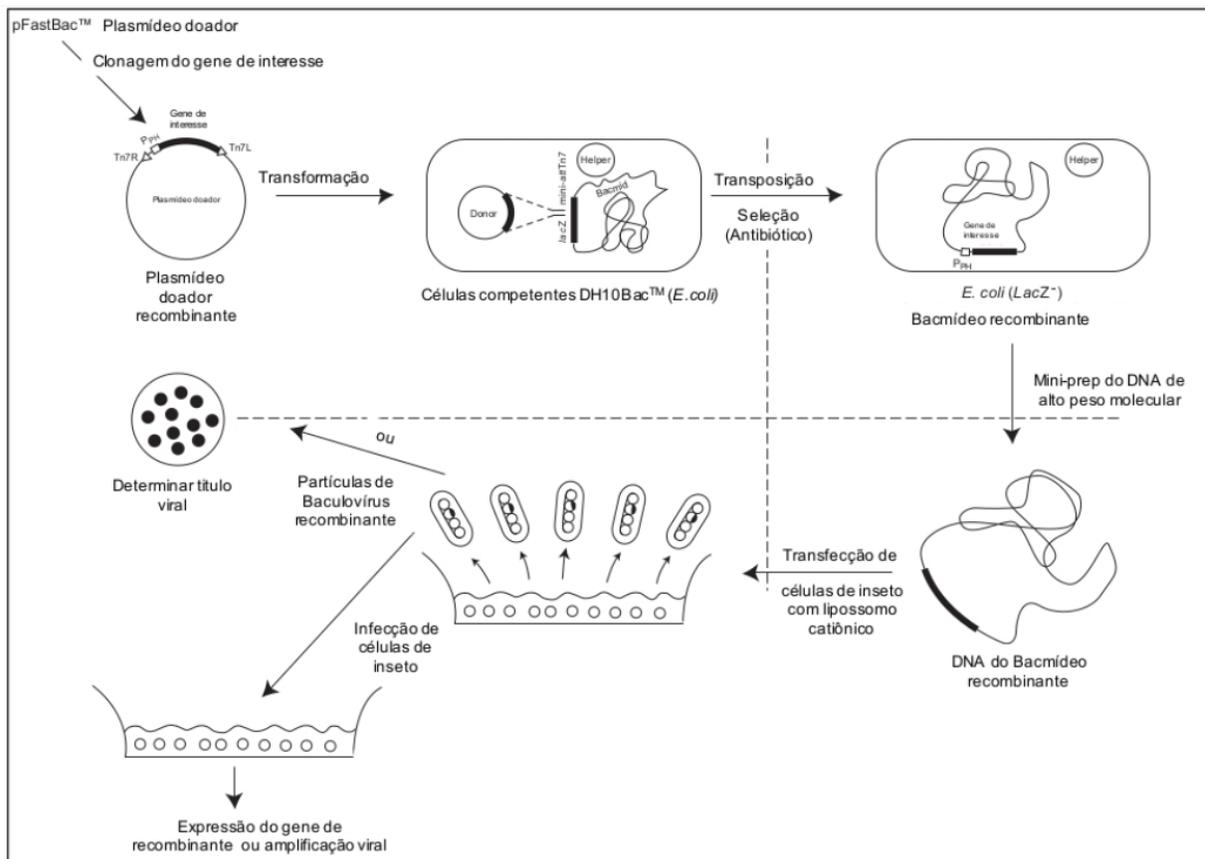


Figura 4. Esquema mostrando as etapas do sistema Bac-to-Bac® (Invitrogen, Carlsbad, USA) para formação de baculovírus recombinantes. Adaptado de: User Guide Bac-to-Bac Baculovirus Expression System, disponível em: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/bactobac_man.pdf.

2. JUSTIFICATIVA

Inicialmente, com a finalidade de identificar e caracterizar geneticamente amostras de arbovírus circulantes em primatas do Distrito Federal, foram analisadas amostras de sangue de animais capturados em diversos locais da região. Apesar da não detecção dos arbovírus, dois anellovírus não descritos em primatas

do Cerrado foram encontrados. As populações de primatas não humanos sofrem pressões em todo o planeta e a crescente degradação ambiental tem forçado o contato entre seres humanos e animais silvestres. Essas interações podem oferecer riscos para ambas as espécies. Muitas doenças emergentes têm colocado em risco a saúde e o bem estar desses animais. Os anellovírus são vírus que infectam diversos animais inclusive o homem. Acreditava-se que os TTVs seriam causadores de hepatite e estudos associaram esses vírus a possíveis doenças mas, seu papel em doenças ainda permanece controverso. Sabe-se que algumas espécies de anellovirus podem ser transmitidas entre humanos e outros animais. Portanto, a avaliação da presença e a caracterização da diversidade genética viral em primatas não humanos é crucial para a compreensão dos padrões de dispersão em populações e comunidades naturais bem como seus possíveis riscos à fauna silvestre e ao homem. Este conhecimento poderá auxiliar tanto no desenvolvimento de estratégias de conservação e preservação da fauna silvestre quando em ações de vigilância em saúde humana.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Esse trabalho tem como objetivo geral identificar e caracterizar geneticamente amostras de anellovírus circulantes em primatas silvestres do Distrito Federal encontradas em sequenciamento de alto desempenho, bem como, a expressão proteica da ORF1 desses vírus em célula de inseto utilizando Baculovírus como vetor de expressão.

3.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar anellovírus circulantes em primatas oriundos de diferentes regiões e cidades-satélites do DF e caracterizá-los geneticamente;

Avaliar comparativamente a presença destes anellovírus entre os animais coletados;

Comparar filogeneticamente os agentes detectados com os já conhecidos anellovírus.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO

Localizado na região centro-oeste do Brasil, o Distrito Federal é a menor unidade da Federação Brasileira. Possui uma área de 5.799,99 km² dividido em 33 regiões administrativas. Todo o seu território está inserido no Bioma Cerrado e o clima é do tipo tropical sazonal, com duas estações bem definidas, uma seca de maio a setembro e outra chuvosa de outubro a abril, sendo a precipitação padrão do centro-oeste brasileiro (Vilela, 2007). O Distrito Federal possui 72 parques ecológicos e urbanos, além de outras 22 unidades de conservação de proteção integral ou de uso sustentável (IBRAN 2013).

4.1.2 ORIGEM DAS AMOSTRAS

Para investigar novos vírus emergentes em primatas não humanos, foram coletadas amostras biológicas (sangue, pelo e fezes) de primatas selvagens capturados em regiões urbana, periurbanas e rurais do Parque Nacional de Brasília, Asa Sul, Asa Norte, Lago Sul, Lago Norte, Sobradinho, Guará, Candangolândia e Park Way; e de animais internados no Hospital Veterinário de animais silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária – UnB (Figura 3). Todos os animais receberam um microchip para identificação e tiveram seus dados morfológicos e morfométricos registrados. As coletas foram realizadas sob licença para coleta de material biológico do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio (número: 54107-7 , data da emissão: 13/05/2016) e certificação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Brasília (número^o 49/2017).

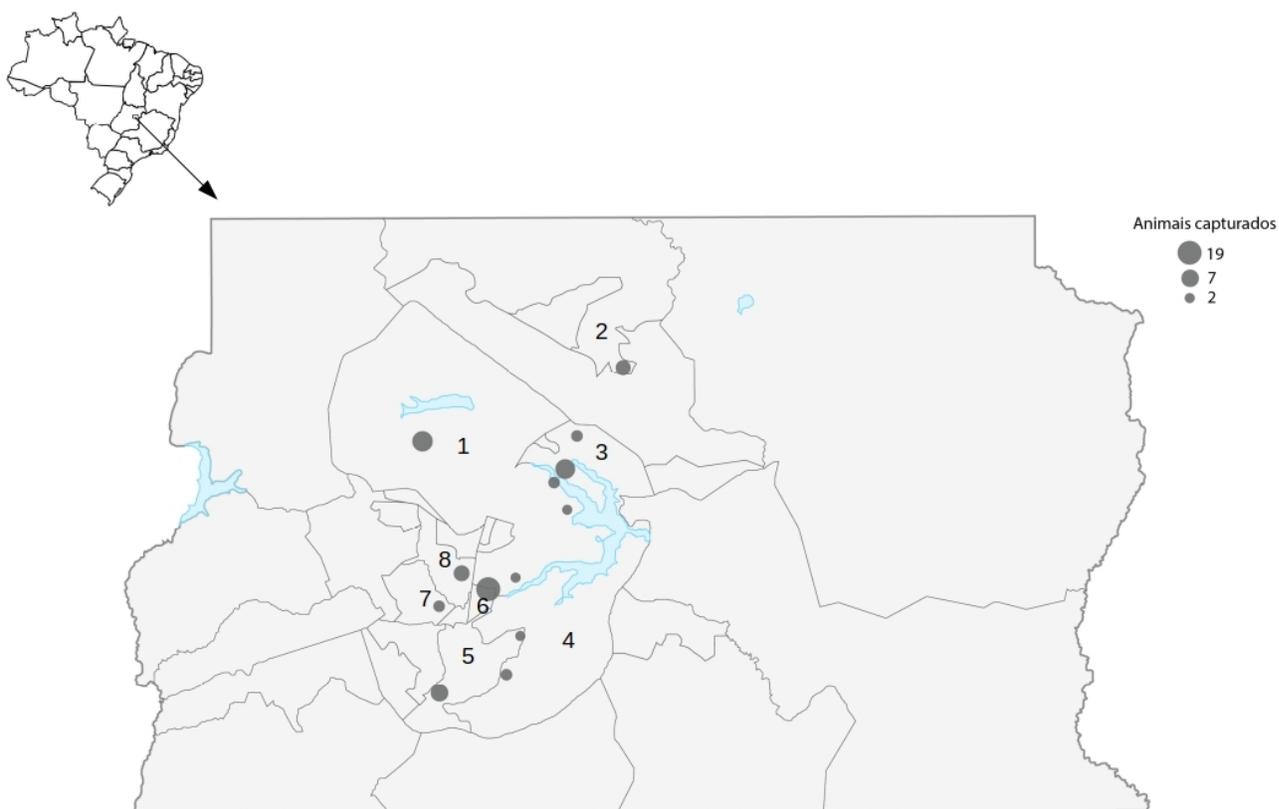


Figura 5. Mapa do Distrito Federal dividido em regiões administrativas. Os números de 1 a 8 representam as regiões administrativas onde foram realizadas as capturas e os círculos representam os pontos de coleta com tamanhos proporcionais ao número de indivíduos capturados. 1: Brasília. 2: Sobradinho II. 3: Lago Norte. 4: Lago Sul. 5: Park Way. 6: Candangolândia. 7: Águas Claras. 8: Guará.

4.2 PREPARO E EXTRAÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICOS

4.2.1 SANGUE

Foram analisadas 87 amostras de sangue de primatas capturados no DF, coletadas entre maio de 2017 e maio de 2019. As amostras de sangue total de 56 *C. penicillata* e 31 *S. libidinosus* tiveram os materiais genéticos (DNA e RNA total) extraídos individualmente utilizando High Pure Viral Nucleic Acid Kit[®] (Roche), seguindo o protocolo do fabricante, e agrupadas em grupos de 20 a 30 indivíduos (2 µL de

cada amostra) (Tabela 2). O material foi enviado para sequenciamento (Macrogen, Coreia do Sul) usando a plataforma HiSeq™ 2000 (Illumina).

4.2.2 FEZES

Foram analisadas 12 amostras de fezes de *C. penicillata*. As extrações de ácidos nucleicos das fezes foram feitas individualmente e em grupos. Para extração individual, foi pesado 100 mg de fezes e diluída em 1 mL de Tampão fosfato-salino - *Phosphate Buffered Saline* [PBS], 137,0 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,0 mM Na₂HPO₄, 2,0 mM KH₂PO₄, pH 7,4). Cada amostra foi processada usando TissueLyser II (Qiagen, EUA), adicionando uma esfera de aço inoxidável de 5 mm durante 5 min a 50 Hz. Os homogeneizados foram centrifugados a 3000 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado, misturado com 1mL de PBS e novamente centrifugado 3000 x g por 10min a 4 °C. Este sobrenadante foi utilizado para a extração de DNA e RNA usado o kit QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, USA) conforme recomendações do fabricante. Para extração em grupos, foi pesado 100 mg de fezes e diluída em 1 mL de PBS e colocados em microtubos de 1mL. As fezes foram separadas em 2 grupos, um grupo com sete e outro com seis amostras. Cada grupo foi processado usando TissueLyser II (Qiagen, EUA), adicionando uma esfera de aço inoxidável de 5 mm durante 5 min a 50 Hz. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados por 10 min a 3000 x g a 4 °C. O sobrenadante de cada grupo foi misturado com 6 mL de PBS e novamente centrifugados: 1 h e 30 min a 2500 x g e 10 min a 6000 x g e a 4°C. O sobrenadante de cada grupo foi filtrado em filtro de 0,45 µm e submetidos à centrifugação (190.000 x g por 4 h a 4°C) em um tubo para ultracentrífuga de 38 mL (Beckman), contendo 5mL de colchão de sacarose (25% de sacarose em PBS). O sedimento foi ressuspensionado em 420 µL de PBS e tratado com 100 U de DNaseI (Promega) e 20 U de RNase (Invitrogen) a 37°C por 2 h e as enzimas inativadas por 10 min a 65°C. Todos os sedimentos ressuspensionados, derivados de grupo foram reunidos em um único tubo (alíquotas de 5µL de cada) de *RNA stable* e enviados para sequenciamento (Macrogen, Coreia do Sul) Todas o restante das amostras foram armazenadas em freezer -80°C (Tabela 2).

Tabela 2. Organização dos grupos de amostras. Os materiais genéticos das amostras foram agrupados de acordo com a ordem de captura dos animais e quantidades variando de 10 a 15 indivíduos por grupo.

Nome do grupo	Espécies
MD1 (DF01 a DF19)	<i>C. penicillata</i> (n=9) e <i>S. libidinosus</i> (n=6)
MD2 (DF20 a DF33)	<i>C. penicillata</i> (n=3) e <i>S. libidinosus</i> (n=11)
2M1 (DF29 a DF42)	<i>S. libidinosu</i> (n=14)
2M2 (DF43 a DF67)	<i>C. penicillata</i> (n=9) e <i>S. libidinosus</i> (n=4)
3M1 (DF68 a DF81)	<i>C. penicillata</i> (n=14)
3M2 (DF82 a DF95)	<i>C. penicillata</i> (n=12)
4M1 (DF96 a DF104)	<i>C. penicillata</i> (n=9) e <i>S. libidinosus</i> (n=1)
Fezes	<i>C. penicillata</i> (n=12)

4.3 SEQUENCIAMENTO, ANOTAÇÃO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

Um total de 6 grupos foram enviados para sequenciamento (Tabela 2). Para sequenciar o material genético extraídos das amostras de sangue e fezes dos macacos, foi utilizada a plataforma HiSeq™ 2000 (Illumina, San Diego, CA, USA) e a biblioteca usada foi a Illumina TruSeq stranded total RNA with Ribo-Zero. Os *reads* brutos resultantes do sequenciamento (Tabela 5) foram trimados pelo programa BBDuk e montados utilizando a ferramenta *De Novo Assembly* implementados no programa Geneious 11.1.5 (Biomatters Ltd., Auckland, Nova Zelândia) para gerar os *contigs*. Os *contigs* resultantes relacionados aos *anellovírus* foram identificados usando BLASTx contra um banco de dados (RefSeq viral interno) criado a partir de sequências de *anellovírus* extraída do Genbank. Posteriormente, as sequências foram estendidas usando os *reads* trimados, tanto quanto possível, para completar os possíveis genomas. Os genomas montados foram mapeados contra os *reads* trimados para verificar a cobertura do genoma. A anotação do genoma também foi realizada usando o mesmo software, no qual as ORFs foram confirmadas usando BLASTx contra o banco de dados de proteínas não redundantes do NCBI (10/2020).

As configurações padrão foram usadas, com a configuração “Mapper: Geneious”; “Sensitivity: Medium - Low Sensitivity/Fast” e “Trim before Mapping: Trim sequences”. Os *reads* e *contigs* foram submetidos à análise de inferência filogenética com auxílio do software Kaiju (<http://kaiju.binf.ku.dk>) e Genome Detective (<https://www.genomedetective.com/>). Foi realizado o *upload* das sequências (fastq.gz) dos reads

no servidor online do programa Kaiju e as análises feitas utilizaram as opções *Reference Database:NCBI BLAST nr +euk, Run mode: Greedy mode, Minimum match length:11, Minimum match score: 75 e Allowed mismatches: 5.*

As análises de identidade, similaridade e homologia foram feitas usando o programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) comparando as sequências de bases nitrogenadas e de aminoácidos montadas com sequências de genomas e de proteínas depositadas no banco de dados do NCBI - GenBank. As sequências com maior similaridade às sequências montadas foram baixadas do GenBank e alinhadas usando as ferramentas *Pairwise Align* e *Multiple sequence alignment*, Geneious 11.1.5, nas opções *Geneious Alignment; Alignment type: Global alignment whit free and gaps; Cost Matrix: 65% Similarity (5,0/ -4.0),70% Similarity (5,0/ -4.5) ou 93% Similarity (5,0/ -9.026168) ; Gap open penalty:12; Gap extension penalty: 3; Refinement iterations: 2.* Para análise de sequências proteicas, classificando-as quanto à famílias, presença de domínios e sítios conservados, foi utilizado o programa Interproscan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>).

As predições das ORFs foram feitas usando a ferramenta “Finder ORFs” do programa Geneious 11.1.5 e o programa “ORF finder” disponível no site do NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>. As configurações usadas no “Finder ORFs” foram *Minimal ORF length (nt): 150, Genetic code: 1. Standart e ORF start codon to use: "ATG" only.* As ORFs encontradas foram submetidas a análise do programa BLAST. As escolhas e classificação das ORFs foi feita de acordo com a similaridade encontrada no BLAST e com as homologias encontradas nos *Pairwise Align* e *Multiple sequence alignment*.

Análise filogenética dos TTVs foram feitas com base na sequência de aminoácidos e nucleotídeos da ORF1 de acordo com as recomendações do ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) que estabeleceu os parâmetros de demarcação de novos gêneros e espécies de anellovírus com base em valores de divergência na sequência de nucleotídeos de toda a ORF1: Divergência >56%, novo Gênero e Divergência >35%, nova Espécie. 51 sequências de nucleotídeos de anellovírus citadas na página do ICTV (setembro 2020) foram baixadas do GenBank e uma sequência identificada por dos Santos *et al.*, 2020 isolado de *Sapajus nigritus* da região Sul do Brasil. Seis sequências de referência para os cinco Genogrupos foram utilizadas: Grupo 1 (AB017610), Grupo 2 (AF261761, AF435014), Grupo 3 (AB017613), Grupo 4 (AB038621) e Grupo 5 (AB064604) (Devalle & Niel, 2004; Ninomiya et al., 2009; Nascimento, 2011; WEI et al., 2015). As distâncias genéticas foram calculadas com o modelo de evolução Jukes-Cantor. A árvore

foi construída pelo método Neighbor-Joining usando o software Geneious 11.1.5 e validada usando 100 pseudo-réplicas de bootstrap.

4.4 DETECÇÃO DA PRESENÇA DOS ANELLOVIRUS NAS AMOSTRAS INDIVIDUAIS

A confirmação da presença dos Anellovírus nas amostras foi realizada por Reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos específicos com alvos em diferentes regiões do genoma desse vírus (Tabela 3).

Tabela 3. Oligonucleotídeos usados nesse trabalho. A sequência na direção 5'>3' e a posição no genoma estão indicados para cada oligonucleotídeo. As letras sublinhadas representam as sequências dos sítios de restrição de cada enzima. Em negrito, a sequência de nucleotídeo responsável pela adição 6 histidinas à proteína.

TTV-Bsb1			
Oligonucleotídeos	Sequência (5'>3')	Posição no genoma	Alvo
TTV-Bsb1_FW (Completo)	AAAAACCCGCATGCAACGAA	25 - 44	Região UTR
TV-Bsb1_RV (Completo)	CCCGCTTCCCGAAAAAATA	24 - 5	Região UTR
TV-Bsb1_RV_SEQ	TACCCCTTCTGAGAGTGCCT	1721 - 1740	ORF 1
TTV-Bsb1_ORF1_FW_X	TACT <u>TCTAGACATCATCATCATCAT</u> ATGGCTTACTGGTGGAGGA	613 - 229	ORF 1 N-terminal
baI_6xHis	G*		
TTV-Bsb1_ORF1_ReV_HindIII	TAGCA <u>AGCTTT</u> CACCCGAGGAGTAAGCGG*	2895 - 2913	ORF 1 C-terminal
pFAST-ORF1_ΔArg_XhoI	<u>CTCGAG</u> CTGTGGTGGGGAAGCAACGC*	871 - 896	ORF 1
TTV-Bsb1_FW			
pFAST-ORF1_6xHis_ΔArg_XhoI_TTV-Bsb1_RV	<u>CTCGAGATGATGATGATGATGATGCAT</u> *	610 - 615	ORF 1/ pFAST6xHis
TTV-Bsb2			
oligonucleotídeos	Sequência	Posição no genoma	Alvo
TTV_Bsb2_Completo_FW	TATTTAAGTAACTGGGGTGACGAATGGCTGAGTT	35-68	Região UTR
TTV_Bsb2_Completo_R	GGTTTTTGGGTATGACGTATGCTGTTATCAAGAG	34-1	Região UTR
TTV-Bsb2_RV_SEQ	ACAAATTTAGTGGGTGGTTTTATTCT	1005 - 1030	ORF 1

TTV_Bsb2_ORF1_	<u>TAGCGGAATTC</u> ATGCATCATCATCATCATCATATGCCTACTTGGTAT	348 - 371	ORF 1 N-terminal
FW_6xHis_EcoRI	AGGAAAAGA*		
TTV_Bsb2_ORF1_	<u>TAGCCTCGAGCTACT</u> CCCACATGTTTCGCC*	2093 - 2074	ORF 1 C-terminal
RV_XhoI			
pFAST-	<u>TCTAGACTGTGGATGGG</u> AACAATCA*	621 - 640	ORF 1
ORF1_ΔArg_XbaI_			
TTV-Bsb2_FW			
pFAST-	<u>TCTAGAATGATGATGATGATGATGATG</u> ATGCAT*	619 - 616	ORF 1/ pFAST6xHis
ORF1_ΔArg_XbaI_			
TTV-Bsb2_RV			
M13-F	GCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC*		Vetor pGEM ® -T Easy e bacmídeo
M13-R	CACAGGAAACAGCTATGACCATGATT		Vetor pGEM ® -T Easy e bacmídeo

* A sequência de nucleotídeos em **negrito** corresponde a adição de 6 aminoácidos Histidina. As sequências sublinhadas correspondem aos sítio de restrição: XbaI (TCTAGA), HindIII (AGCTT), EcoRI (GAATTC) e XhoI (CTCGAG).

Quatro combinações de oligonucleotídios foram montadas para identificação dos genomas dos anellovírus em todas as amostras individualmente.

Para TTV-Bsb1, a **Combinação A**, oligonucleotídios *TTV-Bsb1_ORF1_FW_XbaI_6xHis* e *TTV-Bsb1_ORF1_FW_XbaI_6xHis*, amplifica toda a ORF1. A **Combinação B** possui os oligonucleotídios *TTV-Bsb1_FW (Completo)*, para a região UTR, e o oligonucleotídio *TV-Bsb1_RV_SEQ* no interior da OF1, gerando um fragmento de 1716 pb (Figura 4 e Tabela 4).

Para TTV-Bsb2, a **Combinação C**, oligonucleotídios *TTV_BsB2_ORF1_FW_6xHis_EcoRI* e *TTV_Bsb2_ORF1_RV_XhoI*, amplifica toda a ORF1 e a **Combinação D**, oligonucleotídios *TTV_Bsb2_Completo_FW* e *TTV-Bsb2_RV_SEQ*, amplifica um fragmento de 1393pb (Figura 4 e Tabela 4).

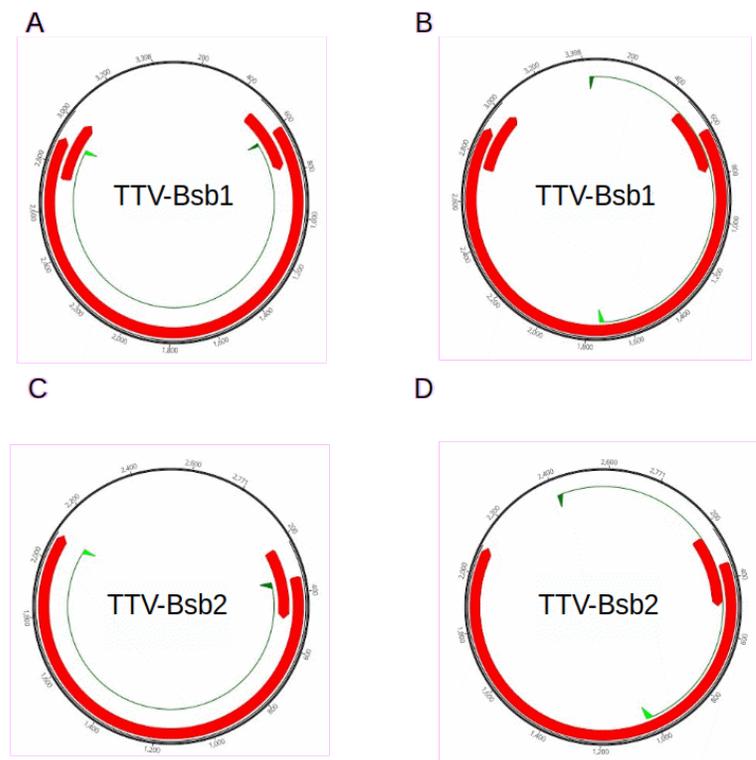


Figura 6. Combinação de oligonucleotídios utilizados para identificação dos anellovirus nas amostras individuais.. Os semicírculos internos com extremidades triangulares mostram as regiões a serem amplificadas. A) **Combinação A** para amplificar toda a ORF1TTV-Bsb1. B) **Combinação B** com oligonucleotídio para região UTR de TTV-Bsb1 e região interna da ORF1TTV-Bsb1. C) **Combinação C** para amplificar toda a ORF1TTV-Bsb2. D) **Combinação D** com oligonucleotídio para região UTR de TTV-Bsb2 e região interna da ORF1TTV-Bsb2(Tabela 4).

Tabela 4. Combinação de oligonucleotídeos utilizados para identificação individual dos anellovirus nas amostras individuais.

	Combinação A (TTV1)	Combinação B (TTV1)	Combinação C (TTV2)	Combinação D (TTV2)
TTV-Bsb1_ORF1_FW_XbaI_6xHis	X			
TTV-Bsb1_ORF1_ReV_HindIII	X			
TTV-Bsb1_FW (Completo)		X		
TV-Bsb1_RV_SEQ		X		
TTV_Bsb2_ORF1_FW_6xHis_EcoRI			X	
TTV_Bsb2_ORF1_RV_XhoI			X	
TTV_Bsb2_Completo_FW				X
TTV-Bsb2_RV_SEQ				X
Tamanho esperado (pb)	2304	1716	1746	1393

4.4.1. AMPLIFICAÇÃO DE DNA CIRCULAR PELA TÉCNICA DE CÍRCULO ROLANTE (RCA)

Para aumentar a quantidade de genomas circulares e enriquecer as amostras com os possíveis anellovírus, o DNA total de todas as amostras referentes ao grupo MD1 foi amplificado individualmente pela técnica de círculo rolante, do inglês *rolling circle amplification* (RCA) (Biagini et al., 2007; Nishiyama et al., 2014; Zhang et al., 2016b). Cada reação (10µL) continha 1µL de DNA total (1ng - 10ng), 1µL dNTPs (Concentração final de 2 mM de cada), 1µL do oligonucleotídeo *Random Hexamer* [5''-(NNNNNN)-3'] (10 µM), 4,9 µL de água destilada, filtrada (0,45µm) e autoclavada, 1 µL de BSA (10X), 1µL de tampão 10x da enzima Phi29 e 0,1µL de Phi29 DNA *polymerase* (10 U/µL)(New England Biolabs Inc). A mistura foi incubada durante 18 h a 30 °C. Os produtos da reação de RCA (1µL) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8%, e corado com brometo de etídio (EtBr) para verificar a eficiência das reações comparando aos controles negativo e positivo (Green & Sambrook, 2012).

4.4.2 AMPLIFICAÇÃO POR PCR E CLONAGEM NO VETOR DE CLONAGEM

Os genomas completos dos vírus existentes no grupo MD1 foram amplificados utilizando a técnica da PCR como descrito abaixo, a partir do material genético extraído e do produto da reação de RCA diluída 100x. Todas as reações de PCR (25 µL) foram preparadas usando a enzima Taq DNA Polimerase recombinante (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. O programa de PCR consistiu em um ciclo de desnaturação inicial de 94 °C por 2min, seguido por 35 ciclos (94 °C por 30s, 55 °C por 30s, 72 °C por 5min) e concluído por um ciclo de polimerização final de 72 °C por 10min. Os ciclos de PCR foram realizadas em termociclador marca Switft Maxi (ESCO ®). O DNA amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio (EtBr), exposto à luz ultravioleta e fotografado em um fotodocumentador (Syngene, InGenius 3). Os fragmentos com tamanhos compatíveis com o tamanho esperado foram cortados do gel com auxílio de uma lâmina e purificados utilizando-se o 'GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit' (GE Healthcare). Os fragmentos purificados foram clonados no vetor pGEM®-T easy (Promega) de acordo com instruções do fabricante. Os plasmídeos resultantes foram transformados pelo método de eletroporação em células *Escherichia coli* DH10β eletrocompetentes preparadas como descrito por Sambrook et al. (1989). As células transformadas foram cultivadas em placas de ágar LB contendo 100 µg / mL de ampicilina, 100 µg/mL de X-gal e 40 µg/mL de IPTG. Os plasmídeos de clones selecionados foram extraídos usando o kit Wizard ® Plus SV Minipreps

DNA Purification System (Promega, Madison, Wisconsin, USA). A inserção do fragmento de DNA foi confirmada por PCR para ORF1 de cada vírus (Tabela 3, 4 e Figura 3) e perfil de digestão com enzimas de restrição *Bgl*II e *Bam*HI (Promega) segundo instruções do fabricante, capazes de digerir o genoma dos anellovirus em pontos específicos. Posteriormente, os produtos de PCR bem como os plasmídeos obtidos foram sequenciados pelo Método Sanger na empresa Macrogen Inc. (Coreia do Sul) usando oligonucleotídeos M13 (Tabela 3), que se pareiam em regiões presentes no pGEM®-T easy, e com os oligonucleotídeos usados na reação de amplificação.

4.5 CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE TRANSFERÊNCIA PARA EXPRESSÃO DAS ORF1 DOS VÍRUS TTV-Bsb1 E TTV-Bsb2 EM CÉLULAS DE INSETOS

Para facilitar a clonagem no vetor de expressão pFastBac™1 (Invitrogen), as ORFs1 foram amplificadas usando oligonucleotídeos capazes de acrescentar sítios de restrição para as enzimas de restrição *Xba*I/ *Hind*III para TTV-Bsb1 e *Eco*RI/ *Xho*I para TTV-Bsb2 (Promega/NEB) nas extremidades 5' e 3' das sequências amplificadas. A reação de amplificação também adicionou seis códonos de histidina (CATCATCATCATCAT/6xHis) na região 5' da ORF 1 para futura detecção da expressão proteica usando anticorpo anti-hexa-histidina (anti-6xHis) na técnica de *Western blot* (Tabela 3).

Todas as reações de PCR (50 µL) foram preparadas usando a enzima Taq DNA Polimerase recombinante (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. O programa de PCR consistiu em um ciclo de desnaturação inicial de 94 °C por 2min, seguido por 35 ciclos (94 °C por 30s, 55 °C por 30s, 72 °C por 3,5min) e concluído por um ciclo de polimerização final de 72 °C por 10min. Os ciclos de PCR foram realizados em termociclador marca Switft Maxi (ESCO ®). O DNA amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio (EtBr), exposto à luz ultravioleta e fotografado em um fotodocumentador (Syngene, InGenius 3). Os fragmentos com tamanhos compatíveis com o tamanho esperado foram cortados do gel com auxílio de uma lâmina e purificados utilizando-se o 'GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit' (GE Healthcare). Os vetores pFastBac1, bem como os produtos da PCR foram digeridos sequencialmente usando as enzimas de restrição *Xba*I/ *Hind*III (PROMEGA/NEB, EUA) para TTV-Bsb1 e *Eco*RI/ *Xho*I (PROMEGA/NEB, EUA) para TTV-Bsb2 e ligados usando a enzima T4 DNA Ligase (Promega) de acordo com orientações do fabricante.

Para construção dos vetores (pFastBac1-6xHis-ORF1 Δ Arg-TTV1 e pFastBac1-6xHis-ORF1 Δ Arg-TTV2) contendo uma deleção na sequência 5' do gene e correspondente à uma região N-terminal rica em argininas, da ORF1 de cada vírus; foram desenhados oligonucleotídeos (Tabela 3) capazes de amplificar todo pFAST-6xHis-ORF1 sem a região inicial de cada ORF1 e adicionando os sítios de restrição *XhoI* para TTV-Bsb1 e *XbaI* para TTV-Bsb2 para digestão única com cada enzima e recircularização dos plasmídeos. As reações de PCR foram feitas utilizando LongAmp® Taq DNA Polymerase (NEB) seguindo as recomendações do fabricante. O programa de PCR consistiu em um ciclo de desnaturação inicial de 94 °C por 30s, seguido por 30 ciclos (94 °C por 30s, 55 °C por 30s, 65 °C por 6 min) e concluído por um ciclo de polimerização final de 65 °C por 10min. Os ciclos de PCR foram realizados em termociclador marca Swift Maxi (ESCO ®). O DNA amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio (EtBr), exposto à luz ultravioleta e fotografado em um fotodocumentador (Syngene, InGenius 3).

Os vetores resultantes foram transformados por eletroporação em células *E. coli* DH10 β , como descrito por Sambrook et al. (1989), cultivadas usando placas de meio LB-ágar contendo 50 μ g/mL de ampicilina e 7 μ g/mL de gentamicina (Manual Bac-to-Bac Expression System, Invitrogen, 2004). Os plasmídeos de clones selecionados foram extraídos usando o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Todos os clones positivos foram confirmados por PCR e perfil de digestão com as enzimas *BamHI* e *BglII* (PROMEGA/NEB, EUA), além do sequenciamento da ORF1 pelo método de Sanger (Macrogen).

4.6 CONSTRUÇÃO DO BACULOVÍRUS RECOMBINANTES CONTENDO AS ORF1S DO TTV-Bsb1 E TTV-Bsb2

Para expressão das proteínas da ORF1 dos anellovírus TTV-Bsb1 e TTV-Bsb2, foi escolhido o baculovírus AcMNPV como vetor de expressão (sistema “*Bac-to-Bac*® *Baculovirus Expression System*” da empresa Invitrogen). Os plasmídeos pFastBac1 contendo as ORFs1 de TTV-Bsb1 e TTV-Bsb2 com (pFastBac1-ORF1-6xHis-TTV1/ pFastBac1-ORF1-6xHis-TTV2) e sem a região rica em arginina (pFastBac1-6xHis-ORF1 Δ Arg-TTV1/ pFastBac1-6xHis-ORF1 Δ Arg-TTV2) foram transformados por eletroporação em células *Escherichia coli* DH10-Bac, preparadas como descrito por Sambrook et al. (1989), usando *MicroPulser Electroporator* (BIO-RAD LABORATORIES, Hercules, CA, USA). Após a eletroporação, as células foram incubadas por 4 h em meio caldo SOB (*Super Optimal Broth*), plaqueadas

em placas de Petri com LB-ágar (50 µg/mL de canamicina, 7 µg/mL de gentamicina, 10 µg/mL de tetraciclina, 100 µg/mL de X-gal e 40 µg/mL de IPTG) e incubadas a 37°C por 48 h. As colônias brancas foram coletadas e cultivadas em 10 mL de LB-caldo (50 µg/mL de canamicina, 7 µg/mL de gentamicina, 10 µg/mL de tetraciclina) a 37°C por 16h. Foram coletados 10µL de cada cultura para confirmar a correta transposição das ORFs por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os oligonucleotídios M13-F/M13-R e ORF1-FW/ORF1-R de TTV-Bsb1 e TTV-Bsb2 (Tabela 3). Os bacmídeos recombinantes foram purificados utilizando o kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, Madison, Wisconsin, USA)

Para a construção dos baculovírus recombinantes, um volume de 10 microlitros (µL) de DNA plasmidial dos bacmídeos (1 µg cada) foi adicionado em 90µL de meio de cultura TC-100 sem soro (VitroCell) em microtubos de 1mL (KASVI). Posteriormente, foram adicionados 6 µL de lipossomos catiônico da marca FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega). A mistura contendo os lipossomos/DNA de cada bacmídeo foram misturados e incubados por 15 min à temperatura ambiente. Placas de 6 poços (Greiner bio-one) com células (10⁶) de inseto (TN5B, derivadas de *Tricoplusia ni*, Granados et al., 1994) por poço em 2mL de meio TC-100 suplementado com 10% de soro fetal bovino, foram incubadas com a mistura lipossomos/DNA de cada bacmídeo por 4 horas a 28°C. Após 4 horas, a placa foi recomposta com mais um mililitro (mL) de meio de cultura TC-100 contendo 10% de soro fetal bovino e incubada a 28°C por sete dias. As células de inseto que foram transfectadas com o DNA do bacmídeo recombinante foram capazes de produzir vírus, pois o DNA do baculovírus é infectivo quando introduzido na célula de inseto (Burand et al., 1980). Em uma nova garrafa (T-25) de 25cm² contendo aproximadamente 3x10⁶ células de inseto Tn5B foram adicionados 500 µL do sobrenadante da transfecção para amplificação dos vírus recombinantes. As células foram mantidas em 5 mL de meio TC-100 (Invitrogen) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS), a 28 °C por 72 h. O DNA viral foi purificado das células TN5B utilizando *High Pure Viral Nucleic Acid Kit*® (Roche) e usado para confirmação por meio de reação de PCR utilizando os mesmos oligonucleotídios M13-F/M13-R e ORF1-FW/ORF1-R de TTV-Bsb1 e TTV-Bsb2 (Tabela 3) usados para confirmação dos bacmídeos.

4.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

As células TN5B infectadas foram observadas e fotografadas a cada 24 h durante 3 dias (72 h) em um microscópio de luz invertida Axiovert 100 (Zeiss). As células TN5B foram coletadas 72 h pós-infecção

(h.p.i) e centrifugadas a 2.000 xg por 7min a 4 ° C. O sedimento de células foi lavado três vezes com PBS 1X, ressuspensionado em 100 µL de PBS 1X. A expressão de proteínas foi realizada analisando-se os extratos de células infectadas pelos vírus recombinantes em gel desnaturantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% (Green & Sambrook, 2012) e imuno-deteção de proteínas (*Western-blot*). O preparo das amostras foi feito adicionando 5µL de tampão de amostra 4X [50mM Tris-HCl, 10mM Beta-mercaptoetanol, 2% SDS, 0,2% Azul de bromofenol, 20% Glicerol] em 15µL da suspensão de células, aquecidos por 5 min a 95°C. Dois géis desnaturantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% foram preparados utilizando o aparato Mini-PROTEAN 3 system ® (Bio-Rad) de acordo com as indicações do fabricante. Um dos géis foi corado e fixado em solução de 40 % de metanol e 10 % de ácido acético e azul de Coomassie 0,1 %, por cerca de 12h e descorado em solução de 40 % de metanol e 10% de ácido acético por 4 h, sob leve agitação. O outro gel foi utilizado para transferência das proteínas para uma membrana de Nitrocelulose (GE Healthcare) utilizada no *Western-blot*. As proteínas foram transferidas para membrana de Nitrocelulose, utilizando-se o aparato de transferência da Bio-Rad (*Trans-Blot® SD– Semi Dry Transfer Cell*, para transferência semi-seca), de acordo com o protocolo do fabricante e com tampão de transferência Bjerrum and Schafer-Nielsen (48 mM de Tris; 39 mM de glicina; 20 % metanol, pH 9,2). A seguir, a membrana foi bloqueada por 16h a 4°C com solução de PBS 1X e 3% de albumina bovina-BSA (Sigma Aldrich). Para retirar toda a solução de bloqueio, a membrana foi lavada 3 vezes (5 min cada) com PBS Tween (0,05 %). Em seguida, a membrana foi colocada por 1 h em solução de PBS/albumina bovina (BSA) 0,5 % contendo o anticorpo primário anti-6xHIS (GE Healthcare) de coelho. Essa solução foi retirada e a membrana foi lavada novamente por 3 vezes em PBS Tween (0,05 %) sob agitação suave. A incubação da membrana de Nitrocelulose com o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho conjugado à enzima fosfatase alcalina (Sigma), foi realizada diluindo o anticorpo (1:10.000) em uma solução de PBS/BSA 0,5 % e acrescentando à membrana por mais uma 1 h sob agitação suave. Esta solução foi retirada e a membrana foi lavada com PBS Tween (0,05%) por 3 vezes novamente. A solução reveladora NBT/BCIP (Promega) foi adicionada logo em seguida. A reação foi interrompida através de sucessivas lavagens com água destilada para que não ocorresse marcações inespecíficas ou dano à qualidade do resultado obtido.

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS VIRAIS

As leituras (*reads*) brutos resultantes do sequenciamento (Tabela 5), quando analisados pelo software Kaiju, apresentaram algumas sequências com maior identidade aos vírus Torque teno tamarin virus e Torque teno douroucouli virus (número de acesso no GenBank = AB041961) em todos os grupos, exceto MBPT e Fezes.

Os resultados do *De novo assembler* para os grupos MD1 e MD2 revelaram dois contigs similares aos vírus da família *Anelloviridae* um com 2.771 nucleotídeos (nt) e outro com 3.398 nt. A análise de BLASTX feita com os dois contigs completos também mostrou identidade com anellovírus encontrados em primatas. Assim, os contigs foram nomeados de TTV-Bsb1(3.398 nt) e TTV-Bsb2 (2.771 nt). Esses dois genomas montados foram usados como referência no recurso *Map to reference* do software Geneious para montagem de possíveis genomas nas amostras dos outros grupos. O genoma de TTV-Bsb1 foi encontrado nos grupos MD1, MD2, 2M1, 2M2, 3M1 e 3M2 com cobertura de 100% e identidade de 92,5% entre todos os isolados. Já o genoma de TTV-Bsb2 foi encontrado nos grupos MD1, 3M1 e 3M2 com cobertura de 100% e identidade de 94%. Não foram encontrados anellovírus nos grupos MBPT e Fezes.

Tabela 5. Número de *reads* totais resultantes do sequenciamento NGS e número de *reads* que mapearam nos genomas de TTV-Bsb1 e TTV-Bsb2.

Grupo sequenciado	<i>Reads</i> totais	<i>Reads</i> TTV-Bsb1	<i>Reads</i> TTV-Bsb2
MD1	21,589,506	668	760
MD2	21,590,568	567	435
2M1 e 2M2	30,187,532	753	0
3M1 e 3M2	34,104,54	5951	52916

A pesquisa das ORFs tanto no programa Geneious quanto no *Finder ORFs* obteve as mesmas ORFs de no mínimo 150 nt : 10 ORFs em TTV-Bsb1 e 7 ORFs em TTV-Bsb2; e uma região não-codificadora (UTR). O alinhamento das sequências estudadas com os genomas completos de 50 anellovírus diversos mostrou compatibilidade com 3 ORFs anotadas nos outros genomas. Em ambos os vírus há uma ORF

principal, maior, chamada de ORF1 com uma região rica em arginina na porção N-terminal; uma ORF parcialmente sobreposta à porção inicial da ORF1 chamada de ORF2, que apresenta um motivo de aminoácidos altamente conservado (WX7HX3CXCX5H), identificável em sua parte N-terminal; e uma terceira ORF identificada como ORF3, sobreposta a porção final da ORF1 que possui um domínio rico em serina na região C-terminal. As regiões não-codificadoras (UTR) apresentaram sequências ricas em GC e 2 sequências de 15 nt (CGAATGGCTGAGTTT e AGGGGCAATTCGGGC) conservadas entre os anellovírus (Okamoto *et al.*, 2000). A análise de BLASTX da sequência de amino ácidos da ORF1TTV-Bsb1 completa apresentou maior de similaridade (46.44%) com *Torque teno tamarin virus* (número de acesso no GenBank =AB041960). Já a análise de BLASTX da sequência de amino ácidos da ORF1TTV-Bsb2 apresentou maior similaridade (25.66%) com *Torque teno midi virus* Pt-TTMDV225-1 (AB449063).

Para identificação taxonômica dos vírus encontrados foi construída uma árvore filogenética baseada nas sequências de nucleotídeos da ORF1, seguindo as recomendações do ICTV. Na árvore filogenética (Figura 3), TTV-Bsb1 formou um *cluster* com *Torque teno tamarin virus*, *Torque teno douroucouli virus* e *Torque teno virus* (MH760402). TTV-Bsb2 apareceu distante, mas ainda próximo ao grupo formado por TTV-Bsb1. Assim como na análise feita por BLASTX, TTV-Bsb2 se mostrou mais próximo ao *Torque teno midi virus* (Betatorquevirus). Quanto aos Genogrupos, TTV-Bsb1 e TTV-Bsb2 se agruparam com os vírus que não estão classificados em nenhum dos 5 Genogrupos. A análise de similaridade feita por *Pairwise Align* entre TTV-Bsb1, TTV-Bsb2, *Torque teno tamarin virus*, *Torque teno douroucouli virus*, *Torque teno sapajus virus* e *Torque teno midi virus* Pt-TTMDV225-1 mostrou uma divergência maior que 35% e menor que 56% entre os vírus e identidade menor que 65% classificando-os como possíveis espécies diferentes.

Tabela 6. Genomas encontrados no NGS em cada grupo de amostras de primatas.

Nome do grupo	Genoma encontrado	Espécies
MD1	TTV-Bsb1 e TTV-Bsb2	<i>C. penicillata</i> e <i>S. libidinosus</i>
MD2	TTV-Bsb1	<i>C. penicillata</i> e <i>S. libidinosus</i>
2M1 e 2M2	TTV-Bsb1	<i>C. penicillata</i> e <i>S. libidinosus</i>
3M1 e 3M2	TTV-Bsb1 e TTV-Bsb2	<i>C. penicillata</i>
4M1	Sem presença de TTV	<i>C. penicillata</i> e <i>S. libidinosus</i>
Fezes	Sem presença de TTV	<i>C. penicillata</i>

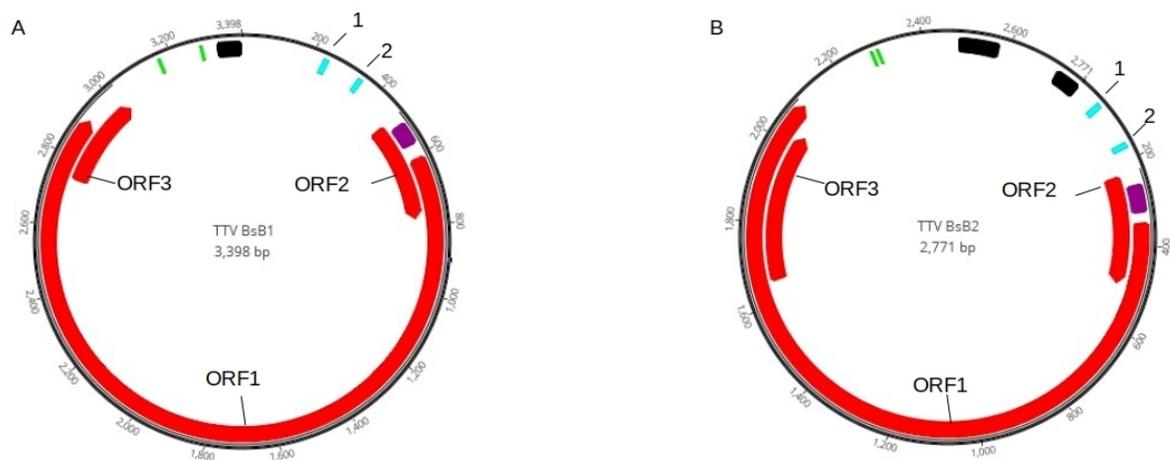


Figura 7. Mapa dos genomas de TTV-Bsb1 (A) e TTV-Bsb2 (B) . Em vermelho: ORFs. Preto: Região rica em GC. Roxo: Região Conservada **W-X7-H-X3-C-X1-C-X5-H** . Azul: Sequências conservadas 1 e 2. Verde: Poly (A) signal (AATAAA) (Tabela 7).

Tabela 7. Características genômicas, ORFs previstas e localizações de elementos de transcrição das possíveis espécies de Torque teno vírus descobertos em primatas do DF.

	TTV-BsB1	TTV-BsB2
Gênero	<i>Epsilontorquevirus</i>	Indefinido ou <i>Gammatorquevirus</i>
Espécie mais próxima	<i>Torque teno tamarin virus</i> (isolado So-TTV2) NC_014085	<i>Torque teno midi virus</i> (isolado Pt-TTMDV225-1) AB449063
Tamanho do Genoma (nt)	3.398	2.771
Região codante	479-3025	229-2093
Possíveis ORFs	ORF1 - 3	ORF1 - 3
ORF1	610-2913 (2304 nt)	348-2093 (1746 nt)
Região rica em Arginina ORF1	610-876	348-620
ORF2	479-778 (300 nt)	229-495 (267 nt)
ORF3	2744-3025 (282 nt)	1657-2031 (375 nt)
TATA box (ATATAA)	209-214	2461-2466
Cap site (GGGGCAATT)	335-343	161-169
Poly(A) signal (AATAAA)	3166-3171 / 3285-3290	2284-2289 / 2298-2303
Região rica em GC	3330-3398	2484-2574 / 2716-2771
Sequência conservada 1	228-242	55-69
CGAATGGCTGAGTTT		
Sequência conservada 2	334-348	160-174
AGGGGCAATTCGGGC		
Motivo conservado (ORF2 N-terminal) W-X7-H-X3-C-X1-C-X5-H*	506-568	259-321

* Aminoácidos conservados na ORF2: W Triptofano (Trp), C Cisteína (Cys), Histidina (His) e X (Qualquer aminoácido).

Tabela 8. Identidade e Divergências de nucleotídeos das ORFs dos Torque teno vírus encontrados neste estudo e seus parentes mais próximos (*Geneious*).

Anelovírus		TTT-Bsb1 Identidade	TTT-Bsb1 Divergência	TTT-Bsb2 Identidade	TTT-Bsb2 Divergência
<i>Torque tamarin virus</i>	<i>teno</i>	59,4%	40,6%	52%	48%
<i>Torque sapajus virus</i> (MH760402)	<i>teno</i>	59,2%	40,8%	52,4%	47,6%
<i>Torque douroucouli virus</i>	<i>teno</i>	52%	48%	47,8%	52,2%
<i>Torque viru</i> TTMDV225-1	<i>teno midi Pt-</i>	51,8%	48,2%	53,1%	46,9%
TTT-Bsb2		52,1%	47,9%	100%	0
TTT-Bsb1		100%	0%	52,1%	47,9%

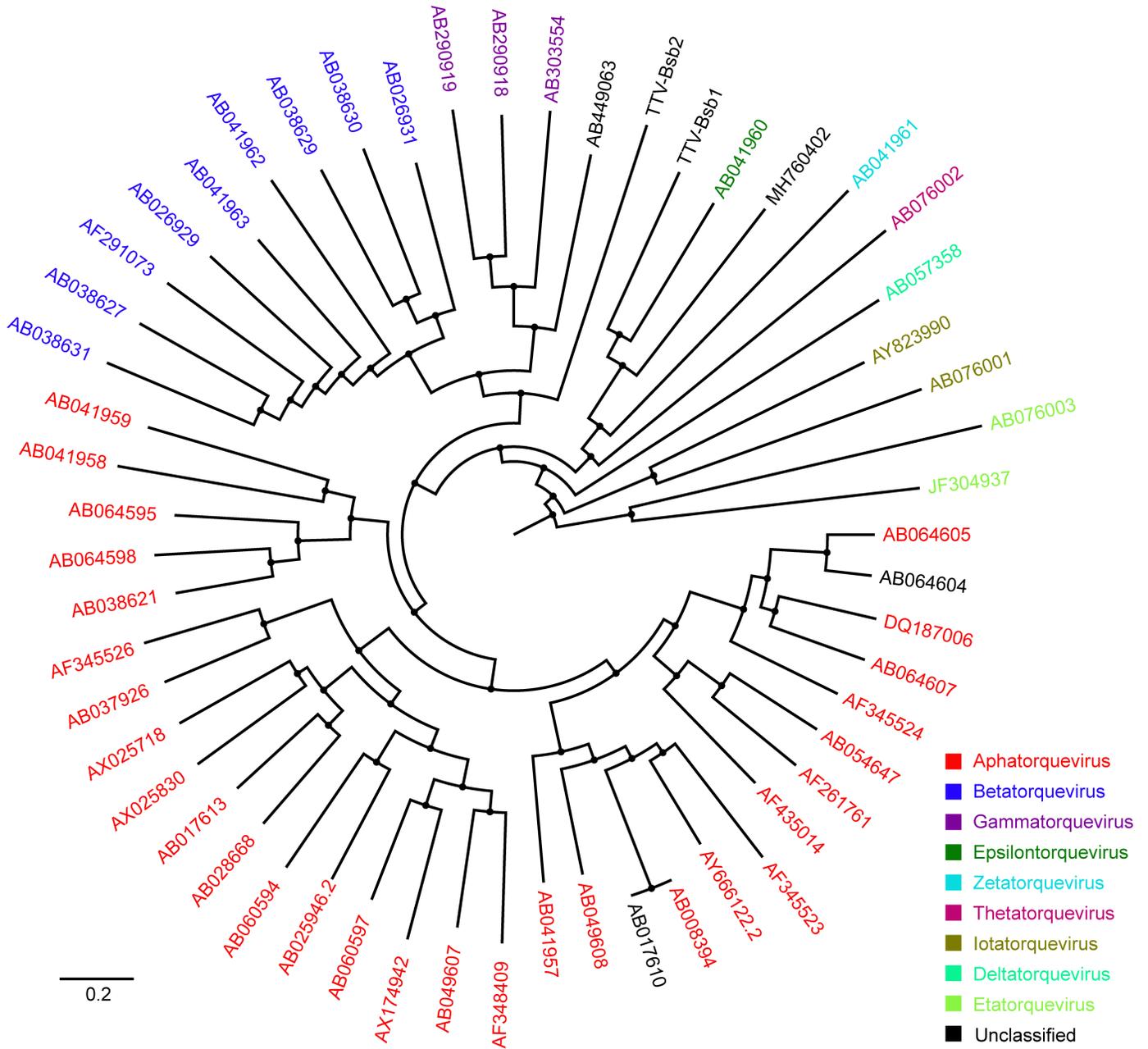


Figura 8. Árvore filogenética usando os nucleotídeos da ORF1 completa de 55 membros da família *Anelloviridae*, construída pelo método neighborjoining, tendo p-distance como modelo de substituição e 100 repetições de bootstrap.

5.2 PCR DOS ANELLOVIRUS PARA CONFIRMAÇÃO NAS AMOSTRAS DE SANGUE E CLONAGEM NO VETOR pGEM®-T easy E pFASTBac1.

Oligonucleotídeos específicos para as sequências dos dois possíveis vírus identificados foram usadas em uma reação de PCR para detecção dos vírus nas amostras de ácidos nucleicos extraídos dos diferentes animais. As ampliações individuais dos genomas completos usando o produto da extração de material genético do sangue total apresentaram bandas inespecíficas mesmo quando diluídas 100x (Figura 4). Os fragmentos com tamanhos compatíveis ao TTV-Bsb1 (3398pb) e TTV-Bsb2 (2771pb) foram purificados e enviados para sequenciamento Sanger.

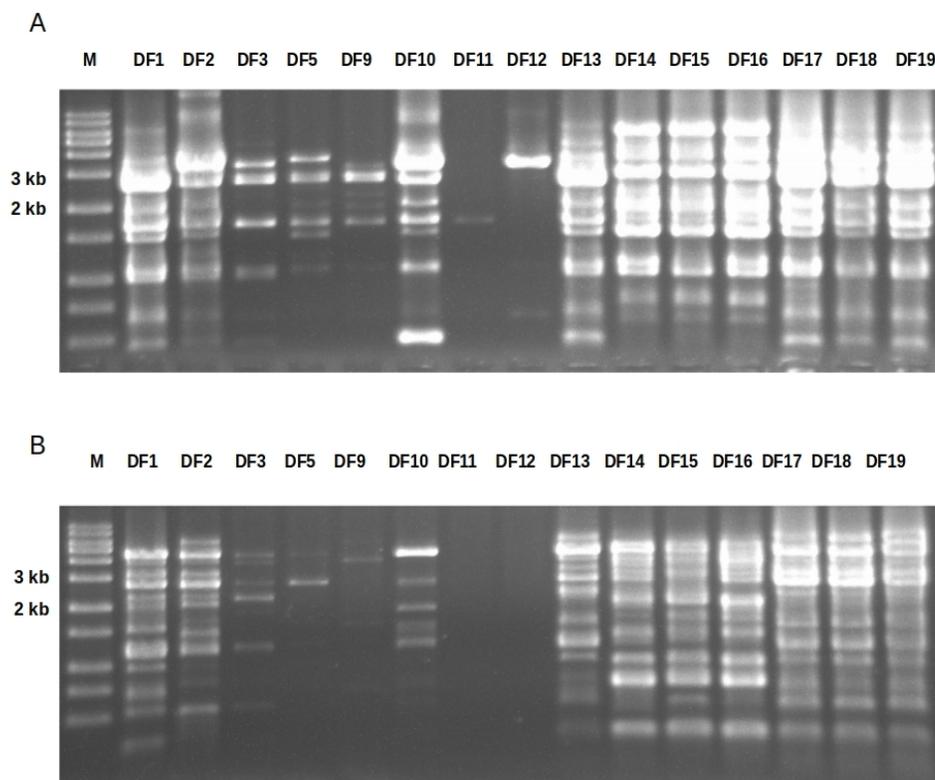


Figura 9. Amplificação do genoma completo dos Anellovirus. A) gel de agarose a 0,8% mostrando resultado da PCR para genoma completo de TTV-Bsb1 (3398pb) nas 15 amostras que formam o grupo MD1; Linha - M: marcador 1 kb. B) gel de agarose a 0,8% mostrando resultado da PCR para genoma completo de TTV-Bsb2 (2771pb) nas 15 amostras que formam o grupo MD1; Linha - M: marcador 1 kb.

As reações de RCA individuais do grupo MD1 (Item 4.4.1.) diluída 100x foram usadas para amplificação por PCR do genoma completo nas amostras do grupo MD1. As amostras positivas para TTV-

Bsb1 foram DF02, DF10, DF12 e DF18 (Figura 10A); para TTV-Bsb2 apenas DF02 mostrou amplificação para genoma completo (Figura 11A). Esse material também foi usado para amplificação da ORF1 de todos os TTVs. As amostras DF01, DF02, DF10, DF12 e DF18 foram positivas para ORF1 de TTV-Bsb1 (Figura 10B). Para ORF1 de TTV-Bsb2, apenas DF02 se mostrou positiva entre os indivíduos do grupo MD1(Figura 11B). Os fragmentos correspondentes a ORF1 do TTVBsb1 das amostras DF01, DF02, DF10 e DF18 e do genoma completo de TTV-Bsb1 e TTV-Bsb2 de DF02 foram clonados no vetor de clonagem pGEM®-T easy (Promega). A ORF1 de TTV-Bsb1 das amostras DF02 e DF10 bem como, a ORF1 de TTV-Bsb2 foram clonados no vetor de transferência pFASTBac1 (Invitrogen) e as sequências confirmadas por sequenciamento Sanger.

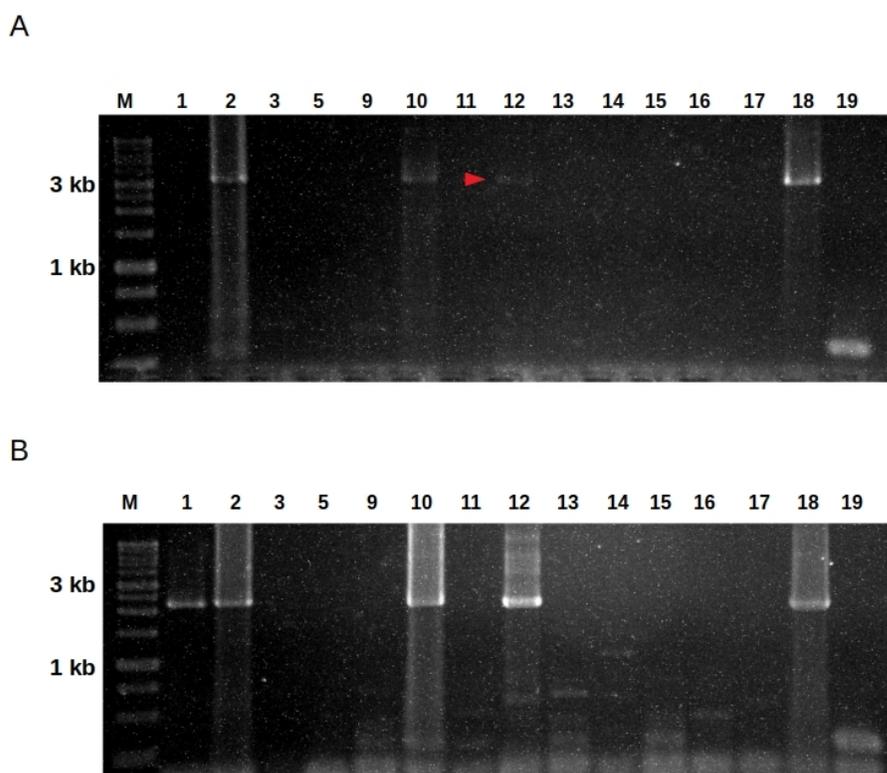
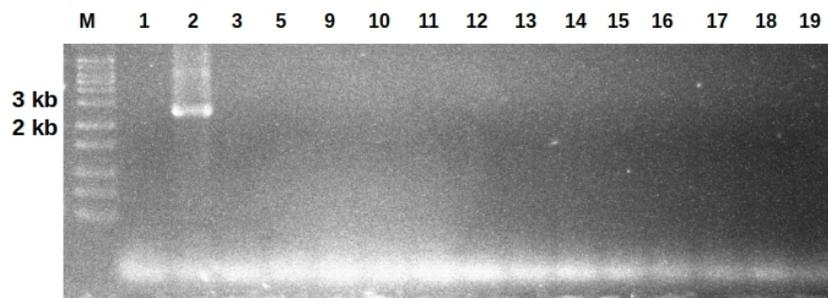


Figura 10. Amplificação do genoma completo e ORF1 do vírus TTV-Bsb1 A) gel de agarose a 0,8% mostrando resultado da PCR para genoma completo de TTV-Bsb1 (3398pb) nas 15 amostras que formam o grupo MD1. A seta vermelha indica uma banda fraca para DF12; Linha - M: marcador 1 kb. B) gel de agarose a 0,8% mostrando resultado da PCR para ORF1 de TTV-Bsb1 (2304pb) nas 15 amostras que formam o grupo MD1; Linha - M: marcador 1 kb.

A



B

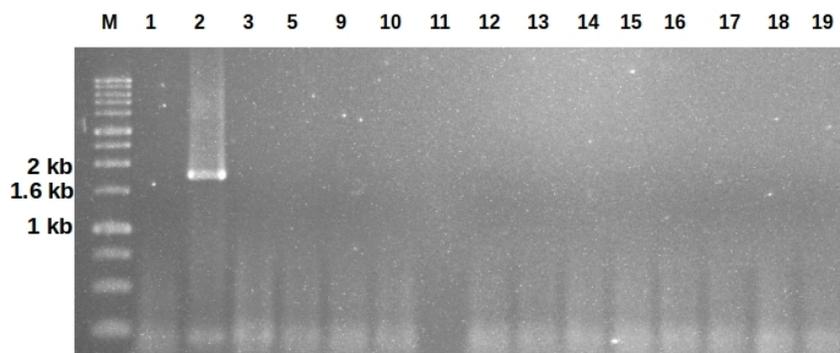


Figura 11. Amplificação do genoma completo e ORF1 do vírus TTV-Bsb2 A) gel de agarose a 0,8% mostrando resultado da PCR para genoma completo de TTV-Bsb2 (2771pb) nas 15 amostras que formam o grupo MD1; Linha - M: marcador 1 kb. B) gel de agarose a 0,8% mostrando resultado da PCR para ORF1 de TTV-Bsb2 (1746pb) nas 15 amostras que formam o grupo MD1; Linha - M: marcador 1 kb.

Também foi realizada PCR para amplificação do genoma completo e ORF1 nas amostras agrupadas nos diferentes grupos (Tabela 2). Todos os grupos apresentaram fragmentos compatíveis para ORF1 de TTV-Bsb1. Não houve amplificação para Genoma completo de TTV-Bsb1, TTV-Bsb2 e ORF1 do TTV-Bsb2 diretamente do grupos, apenas individualmente. Os fragmentos amplificados nos grupos 2M2 e 3M1 foram clonados no pGEM®-T easy e as sequências confirmadas por sequenciamento Sanger.

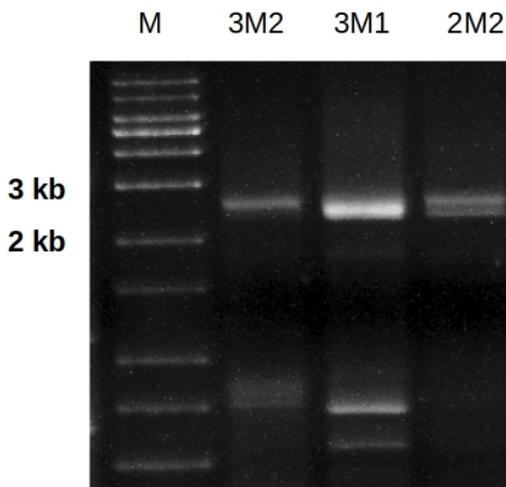


Figura 12. Amplificação da sequência da ORF1 de TTV-Bsb1 feita nos grupos 3M2, 3M1 e 2M2. Gel de agarose a 0,8% mostrando em no poço M: marcador 1 kb ladder (Ludwig Biotecnologia) e o resultado da amplificação com os DNAs dos três grupos nos poços 3M2, 3M1 e 3M2.

Utilizando os oligonucleotídios direcionados para amplificar a ORF1 completa de TTV-Bsb1 (Combinação A) (Figura 3 e Tabela 4), o DNA do TTV-Bsb1 foi detectado em 18 das 56 amostras de *C. penicillata* (32%) e em 5 das 31 amostras de *S. libidinosus* (16%). O total de 23 (26%) das amostras de primatas foram positivas para TTT-Bsb1 (Tabela 9).

Tabela 9. Amostras positivas para TTV-Bsb1 utilizando as combinações de oligonucleotídios mostradas na tabela 4.

ID ANIMAL	ESPÉCIE	Combinação A	Combinação B	ORIGEM
		(TTV1)	(TTV1)	
DF01	<i>Callithrix penicillata</i>	+	-	Hvet/CETAS - Brasília
DF02	<i>Callithrix penicillata</i>	+	+	Hvet/CETAS - Brasília
DF10	<i>Callithrix penicillata</i>	+	-	Parque Nacional de Brasília - Brasília
DF12	<i>Sapajus libidinosus</i>	+	+	Parque Nacional de Brasília - Brasília
DF18	<i>Callithrix penicillata</i>	+	+	Country Club - Park Way
DF22	<i>Callithrix penicillata</i>	+	+	Brasília/ Lago Sul/ Cond. Verde
DF33	<i>Sapajus libidinosus</i>	+	-	Zoológico de Brasília - Brasília
DF39	<i>Sapajus libidinosus</i>	+	-	Zoológico de Brasília - Brasília
DF40	<i>Sapajus libidinosus</i>	+	-	Zoológico de Brasília - Brasília
DF41	<i>Sapajus libidinosus</i>	+	-	Zoológico de Brasília - Brasília
DF51	<i>Callithrix penicillata</i>	+	-	Lago Norte
DF61	<i>Callithrix penicillata</i>	+	-	Clube do Congresso – Lago Norte
DF62	<i>Callithrix penicillata</i>	+	+	Clube do Congresso – Lago Norte
DF63	<i>Callithrix penicillata</i>	+	-	Clube do Congresso – Lago Norte

DF66	<i>Callithrix penicillata</i>	+	-	Lago Norte
DF67	<i>Callithrix penicillata</i>	+	-	Lago Norte
DF68	<i>Callithrix penicillata</i>	+	+	Lago Norte
DF70	<i>Callithrix penicillata</i>	+	+	Lago Norte
DF74	<i>Callithrix penicillata</i>	+	+	Parque Ecológico do Guará
DF75	<i>Callithrix penicillata</i>	+	+	Parque Ecológico do Guará
DF76	<i>Callithrix penicillata</i>	+	-	Parque Ecológico do Guará
DF85	<i>Callithrix penicillata</i>	+	-	Núcleo Rural Corrego do Urubú – Lago Norte
DF87	<i>Callithrix penicillata</i>	+	-	Núcleo Rural Corrego do Urubú – Lago Norte

A presença de TTV-Bsb2 foi confirmada em 2 (duas) amostras de *C. penicillata* utilizando a Combinação C (Figura 3 e Tabela 4) que amplifica a ORF1 completa, o que representa 2,29% do total de amostras e 3,57% nas amostras de *C. penicillata*. A amostra DF02 apresentou amplificação para os dois genomas TTV-Bsb1 e TTV-Bsb2.

5.2.1 Confirmação das sequências amplificadas

Os fragmentos amplificados por PCR das amostras individuais foram sequenciadas pela metodologia Sanger e comparados com o sequenciamento por NGS para os vírus TTV-Bsb1 e TTV-Bsb2. Foram obtidas sequências parciais dos fragmentos amplificados das diferentes amostras mostrando a presença de polimorfismo entre as diferentes sequências. A sequência parcial amplificada da amostra DF02 (798 pb) e da amostra DF12 (481pb) mostraram 100% de identidade com a sequência obtida pelo NGS. Já as sequências parciais da amostra DF18 mostraram uma identidade de 97,7% e 99,9%, respectivamente. As sequências parciais das amostras DF 01 e DF10 tiveram identidade com TTV-Bsb1 variando entre 71,5% a 68,2% em fragmentos de até 1000 pb. O clone da amplificação do grupo 2M2 teve 90,6% de identidade com TTV-Bsb1 em um fragmento com 883 pb. Já o clone 3M2 apresentou identidade variando entre 74% e 79,9% com a sequência consenso de TTV-Bsb1 em fragmentos de 850 pb. A sequência amplificada de TTV-Bsb2 da amostra DF02 mostrou uma identidade de 100%, cobrindo toda a ORF1 além de 309 nt da Região UTR.

Um polimorfismo observado nas amostras sequenciadas foi em um sítio de restrição para a enzima *Bam*HI na porção final da ORF1 da sequência consenso. A ORF1 DF01 apresentou um sítio para *Bam*HI na região N-terminal, 59 pb após o início da ORF1. Já a ORF1 de DF18 não apresentou esse sítio para *Bam*HI, enquanto DF02 e DF10 apresentaram esse sítio na posição esperada. A análise eletroforética (Figura 13) das digestões dos produtos das PCRs das ORFs desses vírus com a enzima *Bam*HI apresentaram padrões compatíveis com o sequenciamento Sanger. Outras amostras também apresentaram variações quanto os sítios de restrição *Bam*HI.

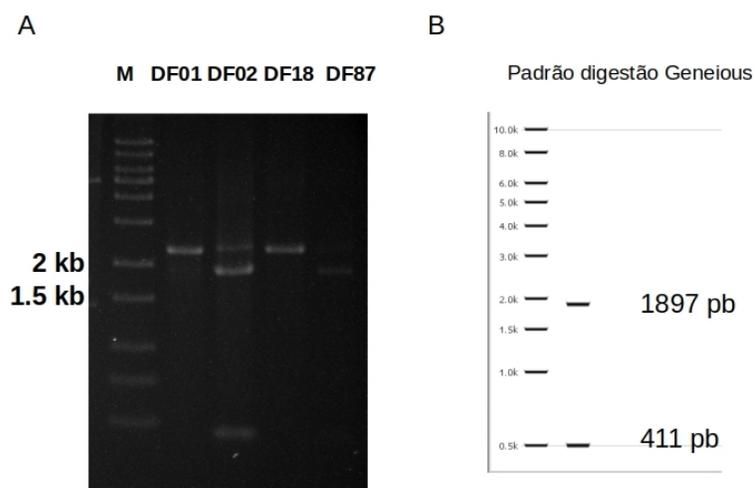


Figura 13. Digestão da ORF1 de TTV-Bsb1 com enzima *Bam*HI. A) Digestão dos produtos da PCR para ORF1 TTV-Bsb1 das amostras DF01, DF02, DF18 e DF87. B) : Simulação in silico do perfil de digestão com a enzima de restrição *Bam*HI. Criado com: Geneious version 11.0 (Biomatters, Auckland, Nova Zelândia).

5.3 CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE TRANSFERÊNCIA COM OS GENES DAS ORFS1 DOS VÍRUS TTV-Bsb1 E TTV-Bsb2

A ORF1 inteira de cada vírus foi amplificada por PCR a partir da extração de DNA, utilizando os pares de oligonucleotídios para ORF1 acrescentando cauda de histidina na região N-terminal (Tabela 3). A construção do pFastBac1/ORF1 sem a região N-terminal rica em arginina, foi feita por PCR, utilizando uma enzima de alta fidelidade, a partir do pFastBac1/ORF1 completa utilizando oligonucleotídios para amplificação de todo o plasmídeo, porém sem a região N-terminal rica em Arginina (Tabela 3 e 10). A

construção dos plasmídeos, com e sem a região rica em arginina, foi confirmada por digestão (Figuras 14, 15, 16 e 17). O vetor pFastBac1-6xHis-ORF1 Δ Arg-TTV1 apresentou padrão diferente do simulado no Geneious version 11.0 (Biomatters, Auckland, Nova Zelândia).

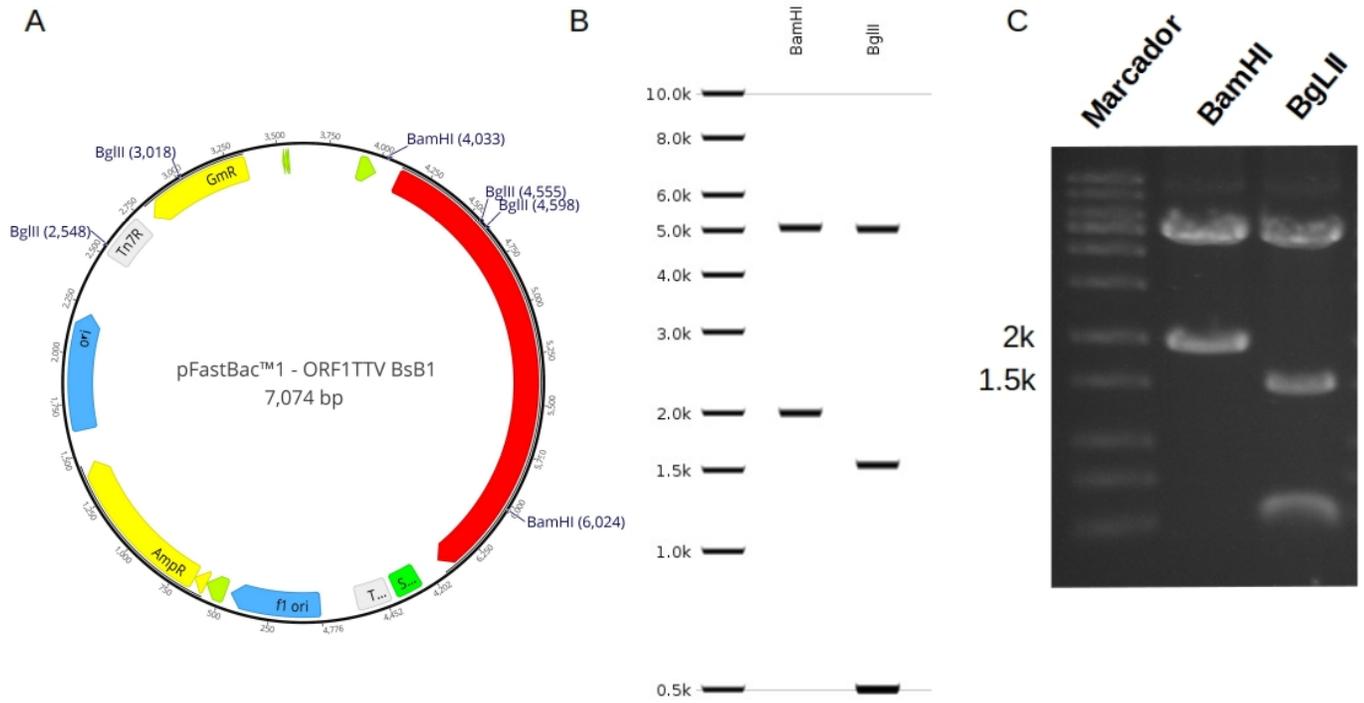


Figura 14. A: Mapa do plasmídeo pFastBac1-ORF1-6xHis-TTV1. Em destaque a ORF1TTV-Bsb1 (vermelho) e os sítios de restrição utilizados para digestões de confirmação (*Bam*HI e *Bgl*II). B: Simulação in silico do perfil de digestão com as enzimas de restrição selecionadas Criados com: Geneious version 11.0 (Biomatters, Auckland, Nova Zelândia) C: Perfil de digestão de confirmação analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando a liberação de segmentos de DNA de tamanhos esperados.

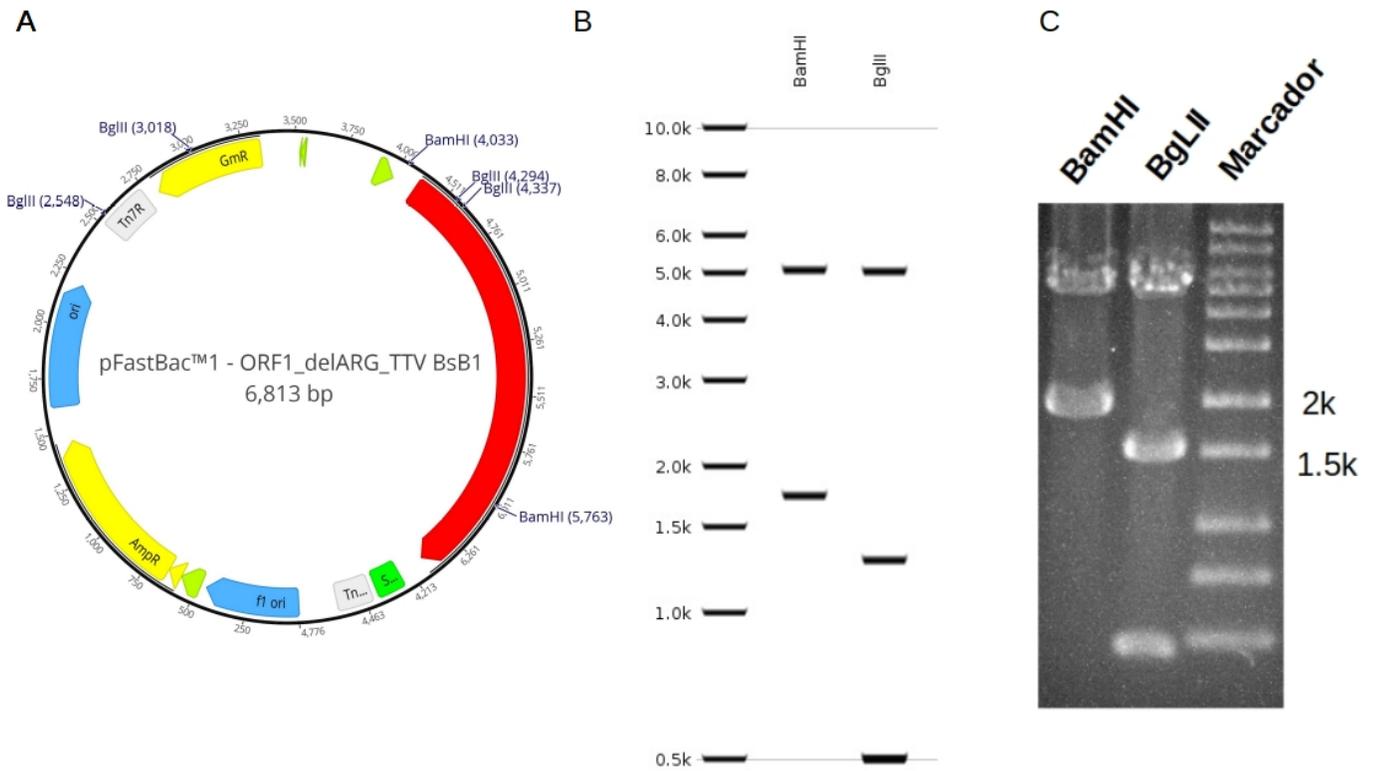


Figura 15. A: Mapa do plasmídeo pFastBac1-6xHis-ORF1 Δ Arg-TTV1. Em destaque a ORF1TTV-Bsb1 (vermelho) e os sítios de restrição utilizados para digestões de confirmação (*Bam*HI e *Bgl*II). B: Simulação in silico do perfil de digestão com as enzimas de restrição selecionadas Criados com: Geneious version 11.0 (Biomatters, Auckland, Nova Nova Zelândia) C: Perfil de digestão de confirmação analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando a liberação de segmentos de DNA de tamanhos esperados.

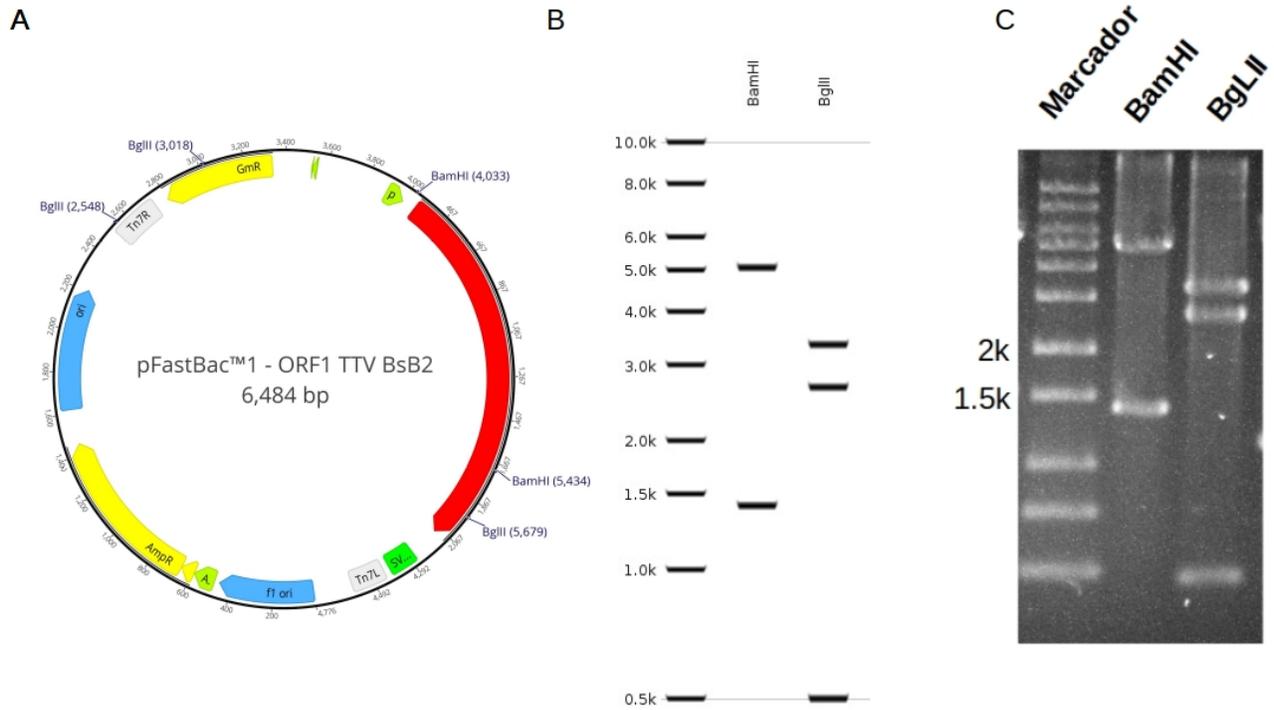


Figura 16. A: Mapa do plasmídeo pFastBac1-ORF1-6xHis-TTV2. Em destaque a ORF1TTV-Bsb2 (vermelho) e os sítios de restrição utilizados para digestões de confirmação (*Bam*HI e *Bgl*II). B: Simulação in silico do perfil de digestão com as enzimas de restrição selecionadas. Criados com: Geneious version 11.0 (Biomatters, Auckland, Nova Zelândia) C: Perfil de digestão de confirmação analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando a liberação de segmentos de DNA de tamanhos esperados.

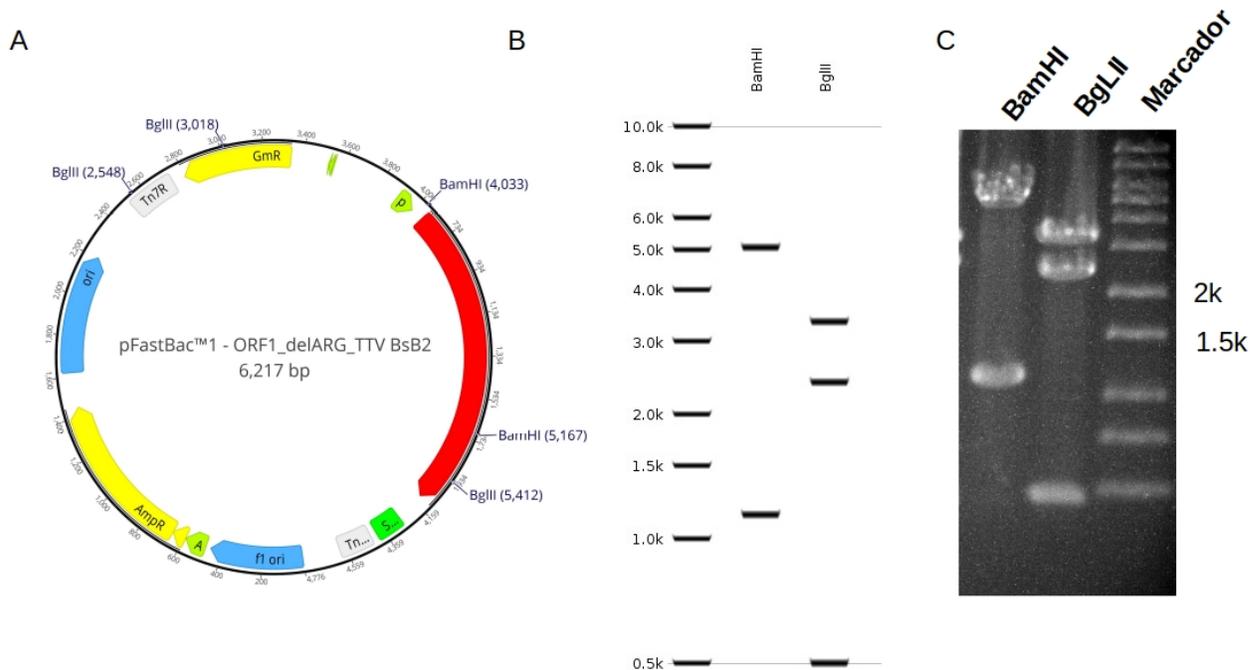


Figura 17. A: Mapa do plasmídeo pFastBac1-6xHis-ORF1 Δ Arg-TTV2. Em destaque a ORF1 Δ ArgTTV-Bsb2 (vermelho) e os sítios de restrição utilizados para digestões de confirmação (*Bam*HI e *Bgl*II). B: Simulação in silico do perfil de digestão com as enzimas de restrição selecionadas. Criados com: Geneious version 11.0 (Biomatters, Auckland, Nova Zelândia) C: Perfil de digestão de confirmação analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando a liberação de segmentos de DNA de tamanhos esperados.

5.4 CONSTRUÇÃO DOS BACULOVÍRUS RECOMBINANTES CONTENDO ORF1 DO TTV-Bsb1 E TTV-Bsb2

Os vetores de transferência pFastBac1-ORF1-6xHis-TTV1/ pFastBac1-6xHis-ORF1 Δ Arg-TTV1 e pFastBac1-ORF1-6xHis-TTV2/ pFastBac1-6xHis-ORF1 Δ Arg-TTV2 foram transformados em célula DH10Bac. Os vírus recombinantes foram amplificados em células de inseto e o DNA viral foi purificado e utilizado para confirmação por meio de de uma reação de PCR para os genes heterólogo utilizando oligonucleotídios para ORF1 dos anellovírus e para região M13 dos bacmídeos (Tabela 3). O resultado das PCRs mostraram que os DNAs dos vírus recombinantes continham os genes heterólogos (dados não mostrados)

5.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS ORFS RECOMBINANTES EM CÉLULAS DE INSETO

As células Tn5B, infectadas (10 pfu/célula) com diferentes vírus recombinantes, foram fotografadas e coletadas 72 h p.i. e apresentaram sinais de infecção como o núcleo hipertrofiado e alterações na forma e tamanho da célula. O extrato proteico foi analisado por SDS-PAGE a 12% e imuno-marcação após a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose. A análise do extrato celular não detectou a presença das proteínas dos TTVs na eletroforese em gel de poliacrilamida e western blot.

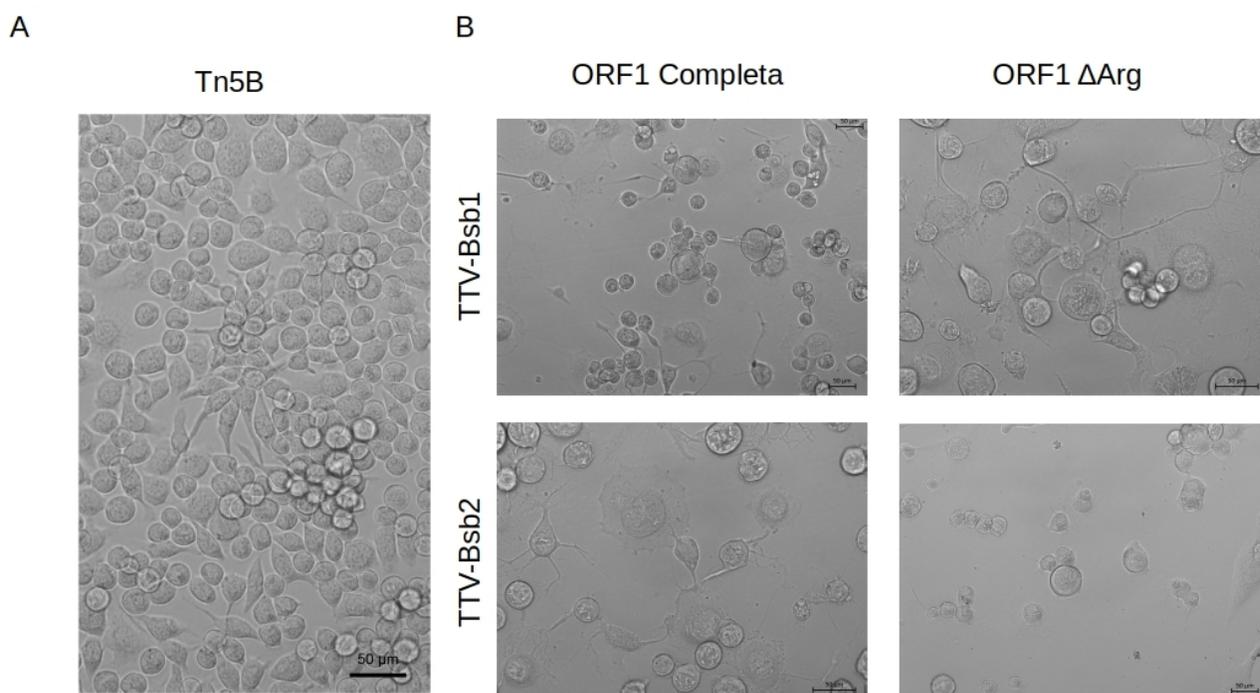


Figura 18. Análise do efeito citopático na infecção de células Tn5B com diferentes baculovírus a 72h.p.i. (A) Células Tn5B não infectadas. (B) O painel superior mostra células infectadas com baculovírus construídos para expressar a ORF1 completa e sem a região N-terminal rica em arginina do TTV-Bsb1. O painel inferior mostra células infectadas com baculovírus construídos para expressar a ORF1 completa e a ORF1 sem a região N-terminal rica em arginina do TTV-Bsb2.

Tabela 10. Características dos possíveis peptídeos traduzidos pela ORF1 de TTV-Bsb1 e TTV-Bsb2 com e sem a região N-terminal rica em Arginina.

Características do Peptídeo	ORF1TTV-Bsb1	ORF1TTV-Bsb1ΔArg	ORF1TTV-Bsb2	ORF1TTV-Bsb2ΔArg
Tamanho (aa)	767	682	581	494
Peso Molecular kDa	91.805	80.017	68.663	57.136
Quantidade de Arginina em toda ORF1	81	43	52	25

6. DISCUSSÃO

Este foi o primeiro trabalho a descrever anellovírus em primatas do Distrito Federal, Brasil. A presença do TTV em primatas não humanos tem sido descrita principalmente em soro e sangue total (Abe et al., 2000; Barnett et al., 2004; Catroxo et al., 2008; Okamoto et al., 2000a; Pujol et al., 2005; Verschoor et al., 1999) embora comprovada a presença também em outros materiais biológicos como saliva e fezes (dos Santos et al., 2020; Sawaswong et al., 2019).

Este trabalho utilizou três estratégias diferentes e complementares: NGS, RCA/PCR e Sequenciamento Sanger; para detecção de anellovírus em amostras de sangue de primatas não humanos. Essas técnicas permitiram a descoberta de dois novos anellovírus existentes na comunidade desses animais no Distrito Federal. Inicialmente, as análises de NGS identificaram dois possíveis novos vírus da Família *Anelloviridae* em grupos de sangue de *C. penicillata* e *S. libidinosus*. A partir de comparações entre as sequências mais similares apontadas pela análise de BLASTX e utilizando os critérios sugeridos pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV), esses anellovírus podem ser consideradas duas novas espécies: *Torque teno vírus Bsb1* (TTV-Bsb1) e *Torque teno midi vírus Bsb2* (TTV-Bsb2).

A metodologia NGS tem sido usada em diversos estudos porém, a montagem de sequências utilizando grupos de amostras com diferentes isolados pode esconder a diversidade intraespecífica como, por exemplo, o polimorfismo de nucleotídeo único e pequenas mudanças que ocasionaram alterações nos sítios de restrição. Devido à grande variabilidade genética do TTV, a escolha da região do DNA viral que servirá de alvo para sua amplificação tem grande influência na sensibilidade do método de PCR. Existem muitos protocolos para detecção de TTV utilizando-se oligonucleotídios para a região N22 da ORF1, ou

para a região UTR do genoma do vírus, porém os resultados podem divergir de acordo com os oligonucleotídeos usados (Leary et al., 1999; Okamoto et al., 1999; Thom et al., 2003; Ninomiya et al., 2008). Para pesquisar a presença de TTV por PCR, foram feitos oligonucleotídeos específicos para as regiões 5' e 3' da ORF1 para amplificação da ORF completa, para a região UTR para amplificação do genoma completo. Uma terceira reação combinou os oligonucleotídeos *forward* da região UTR com uma região interna a ORF1 de cada vírus. Os oligonucleotídeos direcionados às ORFs tiveram melhor resultado pois detectaram a presença dos anellovírus num maior número de amostras.

Inicialmente, as reações de PCR para amplificação dos genomas completos a partir do produto da extração de DNA/RNA como molde apresentou muitas bandas inespecíficas. Os oligonucleotídeos que amplificaram o genoma completo são direcionados para a região UTR do genoma dos vírus Torque tenos deste trabalho. Pujol et al. (2005), utilizando oligonucleotídeos direcionados à região UTR, amplificou em soro de primatas não humanos uma região idêntica ao cromossomo 21 humanos (Pujol et al., 2005). Uma das sequências amplificadas pelos oligonucleotídeos direcionados a ORF1 de TTV-Bsb1 (Figura 3 e Tabela 4) e sequenciada pelo método Sanger, quando analisada pelo BLASTX, amplificou região com alta similaridade com sequências do cromossomo 19 humano e cromossomo 22 de *Callithrix jacchus*, bem como sequências de *Aotus nancymaae* e outros primatas. Além disso, Leppik et al. (2007) e de Villiers et al., (2011) identificaram, *in vivo* e *in vitro*, a capacidade dos anellovírus produzirem diversos rearranjos subgenômicos com diferentes tamanho e capacidade de propagação na ausência de genomas completos. Assim, a amplificação inespecífica pode corresponder a essas regiões similares ao genoma dos hospedeiros ou a esses rearranjos produzidos pelos próprios anellovírus.

O uso da metodologia RCA para amplificação dos genomas e ORFs dos anellovírus nos diferentes grupos de amostras deste trabalho aumentou a qualidade diminuindo a quantidade de fragmentos inespecíficos em todas as reações. Por exemplo, o produto da RCA usado para amplificar a ORF1 de TTV-Bsb1 melhorou o resultado da reação, fazendo com que a amostra DF01, antes negativa para ORF1, fosse amplificada. A técnica de RCA para detecção de anellovírus tem sido amplamente utilizada (Biagini et al., 2007; Macera et al., 2011; Cornelissen-Keijsers et al., 2012; Nishiyama et al., 2014; Zhang et al., 2016b) e mostrou-se eficiente na detecção desses vírus neste trabalho.

Fezes

Não houve detecção de Anellovírus em nenhuma amostra de fezes. A amostra DF87 apresentou resultado positivo para TTV-Bsb1 no sangue, mas não nas fezes. Okamoto et al. (1998a) analisou as fezes de cinco pacientes infectados por TTV, mas só encontrou o vírus em três, incluindo dois com altos títulos virais no soro. Em estudos nos quais soro e fezes de pacientes humanos infectados com TTV foram administrados pelas vias oral e intravenosa em macacos, a presença de TTV nas fezes desses animais estava, geralmente, associada a elevados títulos virais no sangue (Luo et al., 2000; Mushahwar et al., 1999; Tawara et al., 2000). Outras análises feitas por NGS em amostras de primatas neotropicais das espécies *Saimiri collinsi*, *Alouatta caraya* e *S. libidinosus* não identificaram a presença de anellovírus nesses animais (A Duarte et al., 2019; Moreira, 2016). Desta forma, acreditamos que a não detecção de anellovírus nas fezes dos animais capturados possa ser devido ao baixo título viral. Isso é corroborado com a quantidade de sequências (*reads*) específicas para esses vírus obtidas no sequenciamento por NGS (Tabela 5).

TTV-Bsb1

As análises metagenômicas e moleculares identificaram a presença de TTV-Bsb1 no sangue das duas espécies de primatas não humanos estudadas *C. penicillata* (18 indivíduos) e *S. libidinosus* (5 indivíduos). Esse vírus possui maior identidade de sequência com os vírus Torque teno tamarin virus e Torque teno douroucouli virus, ambos anellovírus isolados de primata da América do Sul (Okamoto et al, 2000a).

Outras espécies semelhantes foram encontradas em primatas do Brasil. Em 2008, Catroxo et al. detectou, pela Semi-Nested-PCR das regiões N22 e UTR, a presença de anellovírus similares em *Cebus apella*, porém as regiões analisadas foram muito pequenas sendo impossível classificá-los. Dos Santos et al. (2020) analisando, por metagenômica, a diversidade viral da cavidade oral de *Sapajus nigritus* encontrou o vírus *Torque teno sapajus virus* 59,2 % idêntico ao TTV-Bsb1 e 56,4% ao *Torque teno tamarin virus*, encontrado por Okamoto et al, (2000a). Muitos anellovírus apresentam especificidade em relação aos seus hospedeiros demonstrando uma possível coevolução entre eles (Devalle & Niel, 2004; Ninomiya et al., 2007). Todos os hospedeiros nos quais os anellovírus similares ao TTV-Bsb1 foram encontrados pertencem

às mesmas famílias *Callitrichidae* e *Cebidae* (Schneider & Sampaio, 2015). Neste estudo, encontramos o mesmo vírus infectando duas espécies simpátricas, porém os resultados do sequenciamento Sanger mostraram uma grande diversidade em relação à sequência consenso, indicando a possível presença de variantes virais na amostra. Assim, para determinar se os vírus encontrados são variantes da mesma espécie, novos sequenciamentos serão feitos com diferentes clones para se obter todos os nucleotídeos que compõem a ORF1.

TTV-Bsb2

As análises de NGS identificaram TTV-Bsb2 em três grupos: MD1, 3M1 e 3M2. O grupo MD1 é formado por *C. penicillata* e *S. libidinosus*. Já os outros grupos, 3M1 e 3M2 são formados apenas por *C. penicillata*. Não houve confirmação por PCR direto dos grupos, mas a presença de TTV-Bsb2 foi detectada em duas amostras de *C. penicillata* - DF02 (MD1) e DF86 (3M2).

A análise filogenética com a sequência completa de nucleotídeos da ORF1 para esse vírus (Figura 8) mostrou TTV-Bsb2 afastado de TTV-Bsb1, em um ramo da base que forma os cladogramas TTMV e TTMDV. Esses dois grupos formam os gêneros *Betatorquevirus* e *Gammatorquevirus*, respectivamente, e foram isolados principalmente de Humanos e chimpanzés (M. Ninomiya et al., 2007; Masashi Ninomiya et al., 2009; Okamoto et al., 2000a). Catroxo et al., (2008ab), analisando fragmentos de 271pb da PCR semi-nested para a região N22 e 110pb para região UTR, encontrou em *Leontopithecus crysomelas* (Mico-leão-dourado) uma sequência com características semelhantes, porém similar ao TTMV, mas a falta da sequência de nucleotídeos completa da ORF não permite afirmar a proximidade das sequências. De acordo com os critérios do ICTV, que usa a sequência completa de nucleotídeos da ORF1, TTV-Bsb2 tem como parente mais próximo o *Torque teno midi virus* (isolado Pt-TTMDV225-1) então classificado como *Gammatorquevirus*. Os resultados do sequenciamento Sanger mostraram pouca divergência com a sequência consenso. Porém o único vírus sequenciado foi o TTV-Bsb2 isolado de DF02, assim, é necessário a análise do outro genoma encontrado em DF86 para confirmar se são variantes da mesma espécie ou são espécies diferentes.

A amostra DF02, *C. penicillata*, foi a única infectada pelos dois vírus TTV-Bsb1 e TTV-Bsb2. Relatos de coinfeção com diferentes anellovírus já foram descritos principalmente em suínos e humanos doentes e saudáveis, mas não há registro para essa espécie de primata (Al-Qahtani et al., 2016; Huang et al., 2011; Jelcic et al., 2004; Niel et al., 2000, 2005; Takahashi et al., 2000).

Expressão da ORF1 em células de insetos

Existem poucos trabalhos sobre expressão de proteínas da família *Aneloviridae* em células de inseto. Em 1990, Noteborn et al. estudou a expressão genética da proteína gp85 do vírus da leucemia aviária (*chicken anaemia virus* - CAV) em um sistema do baculovírus AcMNPV e células de inseto Sf9 derivadas de *Spodoptera frugiperda*. O lisado bruto de células Sf9 contendo a proteína gp85 foi inoculado em galinhas. Esses animais desenvolveram anticorpos contra o CAV mas, não foram capazes de neutralizar o vírus (Noteborn et al., 1990). Koch et al. (1995) e Noteborn et al. (1998) expressaram as 3 proteínas VP1, VP2 e VP3 do CAV utilizando, também, AcMNPV e células Sf9. Ambos chegaram a conclusão que as proteínas VP1 e VP2 precisam estar juntas para produção de anticorpos neutralizantes e que um baculovírus recombinante expressando VP1 e VP2 seria um potencial sistema de produção para uma vacina contra a infecção por CAV (Koch et al., 1995; Noteborn et al., 1998). O único trabalho de expressão de proteínas de Anellovírus isolados de mamífero foi realizado por Kakkola et al. (2008). Neste estudo, foram expressas as seis possíveis proteínas do TTV genótipo-6 isolado HEL32 (AY666122) identificado em pessoas assintomáticas.

A maior parte dos estudos de expressão proteica foi realizada em bactérias. Em 2002, Kakkola et al expressaram três possíveis ORFs do TTV genótipo 6 em *E. coli* BL21. Duas proteínas foram expressas com sucesso, ambas correspondiam a porções diferentes da ORF2. Porém, não houve expressão da ORF1 completa. Qiu et al. 2005 expressaram as seis possíveis proteínas também do TTV genótipo 6 em células COS de primata utilizando vetores com promotores de citomegalovírus (CMV). Obtiveram pouca expressão da proteína correspondente a ORF1, detectada apenas por imunofluorescência. A ORF1 dos anellovírus possuem uma região N-terminal rica em arginina característica de um sinal de localização nuclear (Hibbard & Sandri-Goldin, 1995). Porém, as proteínas do TTV genótipo 6, geradas por *splice* alternativo, que possuem essa região apresentam uma distribuição citoplasmática (Qiu et al., 2005). Huang

et al. (2011) e Mankotia & Irshad, (2014) conseguiram expressar peptídeos menores da ORF1 (100kDa), sem a porção N-terminal, em *E. coli* Rosetta e BL21. Já em células de inseto, a expressão proteica da ORF1 completa não foi observada. Assim como apontado por Qiu et al. (2005), as proteínas que possuem a região rica em arginina apresentam pouca ou nenhuma expressão. Porém, quando essa parte é retirada, a expressão proteica é observada.

Desta maneira, a não expressão da ORF1 completa dos anellovírus (TTV-Bsb1 e TTV-Bsb2) devido a região N-terminal (Tabela 12) corrobora com os estudos anteriores. Porém, a não expressão dessas proteínas quando essa região é suprimida não é justificada, fazendo-se necessários novos estudos.

7. CONCLUSÃO

Os dados aqui apresentados mostram a presença de dois novos Anellovírus em primatas de vida livre no Distrito Federal. Embora a família *Anelloviridae* possua uma grande diversidade e distribuição global, esses vírus compartilham proximidades evolutivas refletidas no nível taxonômico dos seus hospedeiros. Os vírus de primatas encontrados no DF apresentam maior identidade com outros vírus de primatas da América do Sul. Além disso, os vírus de primatas, incluindo o homem, apresentam maior identidade entre si quando comparados com anellovírus que infectam outras ordens. Muitas espécies de anellovírus foram descobertas nos últimos anos, mas pouco se sabe sobre sua biologia e sobre seu papel em doenças. Assim, novos estudos são necessários para melhor caracterização genética dos vírus identificados.

8. PERSPECTIVAS

Caracterização dos Genomas

Completar as sequências de todas as ORFs clonadas para identificar possíveis variantes;

Depositar as sequências no GenBank;

Redigir um artigo com os resultados obtidos.

Expressão proteica de novos Anellovírus

Repetir o experimento de expressão em baculovírus das ORFs e outras regiões dos genomas;

Realizar a transfecção dos genomas completos em células Vero;
Analisar a coinfecção dos dois genomas em células Vero;
Redigir um artigo com os resultados obtidos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A Duarte, M., F Silva, J. M., R Brito, C., S Teixeira, D., L Melo, F., M Ribeiro, B., Nagata, T., & S Campos, F. (2019). Faecal Virome Analysis of Wild Animals from Brazil. *Viruses*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/v11090803>

Abe, K., Inami, T., Ishikawa, K., Nakamura, S., & Goto, S. (2000). TT Virus Infection in Nonhuman Primates and Characterization of the Viral Genome: Identification of Simian TT Virus Isolates. *Journal of Virology*, 74(3), 1549–1553. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.3.1549-1553.2000>

Abreu Sousa, G., Regina Paludo, G., Simonini Teixeira, D., & Morais Ribeiro, B. (2020). Haematological and biochemical parameters of wild capuchin monkeys in Brasília, Federal District—Brazil. *Journal of Medical Primatology*, 49(4), 211–217. <https://doi.org/10.1111/jmp.12468>

Al-Qahtani, A. A., Alabsi, E. S., AbuOdeh, R., Thalib, L., El Zowalaty, M. E., & Nasrallah, G. K. (2016). Prevalence of anelloviruses (TTV, TTMDV, and TTMV) in healthy blood donors and in patients infected with HBV or HCV in Qatar. *Virology Journal*, 13(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0664-6>

Barnett, O. E., Worobey, M., Holmes, E. C., & Cooper, A. (2004). Detection of TT virus among chimpanzees in the wild using a noninvasive technique. *Journal of Wildlife Diseases*, 40(2), 230–237. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.2.230>

Bando, M., Ohno, S., Oshikawa, K., Takahashi, M., Okamoto, H., & Sugiyama, Y. (2001). Infection of TT virus in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Medicine*, 95(12), 935–942. <https://doi.org/10.1053/rmed.2001.1151>

Bendinelli, Mauro; PISTELLO, Mauro; MAGGI, Fabrizio; FORNAI, Claudia; FREER, Giulia; VATTERONI, Maria Linda. Molecular Properties, Biology, and Clinical Implications of TT Virus, a Recently Identified Widespread Infectious Agent of Humans. *Clinical Microbiology Reviews*, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 98-113, 1 jan. 2001. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.14.1.98-113.2001>.

Benchimol, J. L. (2001). Febre amarela: a doença e a vacina, uma história inacabada. *Febre Amarela: A Doença e a Vacina, Uma História Inacabada*, 36(2), 275–293. <https://doi.org/10.7476/9788575413951>

Biagini, P., Uch, R., Belhouchet, M., Attoui, H., Cantaloube, J. F., Brisbarre, N., & de Micco, P. (2007). Circular genomes related to anelloviruses identified in human and animal samples by using a combined rolling-circle amplification/sequence-independent single primer amplification approach. *Journal of General Virology*, 88(10), 2696–2701. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83071-0>

Biagini, P. (2009). Classification of TTV and related viruses (anelloviruses). *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 331, 21–33. https://doi.org/10.1007/978-3-540-70972-5_2

Borkosky, S. S., Whitley, C., Kopp-Schneider, A., Hausen, H., & de Villiers, E. M. (2012). Epstein-barr virus stimulates torque teno virus replication: A possible relationship to multiple sclerosis. *PLoS ONE*, 7(2), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032160>

Burand, J. P., Summers, M. D., & Smith, G. E. (1980). Transfection with baculovirus DNA. *Virology*, 101(1), 286–290. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(80\)90505-X](https://doi.org/10.1016/0042-6822(80)90505-X)

Carthew, S; Goldmgay, R.L.. Non-flying mammals as pollinators. *Trends In Ecology & Evolution*, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 104-108, mar. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-5347\(96\)10067-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-5347(96)10067-7).

Casagrande, Renata A.; Pannuti, Cláudio S.; Kanamura, Cristina; Freire, Wilton S.; Grespan, André; Matushima, Eliana R.. Fatal Human herpesvirus 1 (HHV-1) infection in captive marmosets (*Callithrix jacchus* and *Callithrix penicillata*) in Brazil: clinical and pathological characterization. *Pesquisa Veterinária*

Brasileira, [S.L.], v. 34, n. 11, p. 1109-1114, nov. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2014001100013>.

CASTRO, M., SOUZA, M., SIHLER, W., RODRIGUES, J., & RIBEIRO, B. (1999). Biologia molecular de baculovirus e seu uso no controle biologico de pragas no Brasil. Http://Www.Scielo.Br/Scielo.Php?Script=sci_arttext&pid=S0100-204X1999001000001&lng=en&nrm=iso, 1733–1761.

Catroxo, M. H. B., Nishiya, A., Sabino, E., Teixeira, P. S., Petrella, S., Milanelo, L., Vieira, J. C. F., & Diaz, R. S. (2008a). Research of torque teno virus (TTV) in serum and total blood of brazilian non-human primates and in chicken plasma (*Gallus gallus domesticus*) by the PCR N22 region. *International Journal of Morphology*, 26(2), 377–384. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022008000200020>

Catroxo, M. H. B., Nishiya, A., Sabino, E., Teixeira, P. S., Petrella, S., Milanelo, L., Vieira, J. C. F., & Diaz, R. S. (2008b). Torque teno virus (TTV) is prevalent in Brazilian non-human primates and chickens (*Gallus gallus domesticus*). *International Journal of Morphology*, 26(2), 363–372. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022008000200018>

Cleavinger, P. J., Persing, D. H., Li, H., Moore, S. B., Charlton, M. R., Sievers, C., Therneau, T. M., & Zein, N. N. (2000). Prevalence of TT virus infection in blood donors with elevated ALT in the absence of known hepatitis markers. *American Journal of Gastroenterology*, 95(3), 772–776. [https://doi.org/10.1016/S0002-9270\(99\)00879-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9270(99)00879-5)

Clem RJ, Passarelli AL (2013) Baculoviruses: Sophisticated Pathogens of Insects. *PLoS Pathogens* 9: e1003729-e1003729

Cornelissen-Keijsers, V., Jiménez-Melsió, A., Sonnemans, D., Cortey, M., Segalés, J., van den Born, E., & Kekarainen, T. (2012). Discovery of a novel Torque teno sus virus species: Genetic characterization, epidemiological assessment and disease association. *Journal of General Virology*, 93(PART 12), 2682–2691. <https://doi.org/10.1099/vir.0.045518-0>

Cong, Mian-Er et al. Related TT Viruses in Chimpanzees. *Virology*, [S.L.], v. 274, n. 2, p. 343-355, set. 2000. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.2000.0471>.

Couto-Lima, Di., Madec, Y., Bersot, M. I., Campos, S. S., Motta, M. D. A., Dos Santos, F. B., Vazeille, M., Da Costa Vasconcelos, P. F., Lourenço-De-Oliveira, R., & Failloux, A. B. (2017). Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent Aedes populations. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05186-3>

da Rosa, C. A., de Almeida Curi, N. H., Puertas, F., & Passamani, M. (2017). Alien terrestrial mammals in Brazil: current status and management. *Biological Invasions*, 19(7), 2101–2123. <https://doi.org/10.1007/s10530-017-1423-3>

De Miranda, G. H. B., & De Faria, D. S. (2001). Ecological aspects of black-pinellated marmoset (*Callithrix penicillata*) in the cerrado and dense cerrado of the Brazilian Central Plateau. *Brazilian Journal of Biology*, 61(3), 397–404. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842001000300008>

Devalle, S., & Niel, C. (2004). Distribution of TT Virus Genomic Groups 1-5 in Brazilian Blood Donors, HBV Carriers, and HIV-1-Infected Patients. *Journal of Medical Virology*, 72(1), 166–173. <https://doi.org/10.1002/jmv.10564>

de Villiers, E.-M., Borkosky, S. S., Kimmel, R., Gunst, K., & Fei, J.-W. (2011). The Diversity of Torque Teno Viruses: In Vitro Replication Leads to the Formation of Additional Replication-Competent Subviral Molecules. *Journal of Virology*, 85(14), 7284–7295. <https://doi.org/10.1128/jvi.02472-10>

DICK, G.W.A; KITCHEN, S.F; HADDOW, A.J. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene*, [S.L.], v. 46, n. 5, p. 509-520, set. 1952. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4).

Dolz, G., Chaves, A., Gutiérrez-Espeleta, G. A., Ortiz-Malavasi, E., Bernal-Valle, S., & Herrero, M. V. (2019). Detection of antibodies against flavivirus over time in wild non-human primates from the lowlands of Costa Rica. *PLoS ONE*, 14(7), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219271>

Dos Santos, R. N., Campos, F. S., Finoketti, F., dos Santos, A. C., Campos, A. A. S., Wagner, P. G. C., Roehe, P. M., Batista, H. B. C. R., Franco, A. C. (2020). Viral diversity in oral cavity from *Sapajus nigritus* by metagenomic analyses. *Brazilian Journal Of Microbiology*, [S.L.], v. 51, n. 4, p. 1941-1951, 11 ago. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s42770-020-00350-w>.

Eibach, D., Hogan, B., Sarpong, N., Winter, D., Struck, N. S., Adu-Sarkodie, Y., Owusu-Dabo, E., Schmidt-Chanasit, J., May, J., & Cadar, D. (2019). Viral metagenomics revealed novel betatorquevirus species in pediatric inpatients with encephalitis/meningoencephalitis from Ghana. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38975-z>

ESTRADA, Alejandro; GARBER, Paul A.; MITTERMEIER, Russell A.; WICH, Serge; GOUVEIA, Sidney; DOBROVOLSKI, Ricardo; NEKARIS, K.A.I.; NIJMAN, Vincent; RYLANDS, Anthony B.; MAISELS, Fiona. Primates in peril: the significance of brazil, madagascar, indonesia and the democratic republic of the congo for global primate conservation. *Peerj*, [S.L.], v. 6, p. 1-57, 15 jun. 2018. *PeerJ*. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.4869>.

Favoretto, S. R., De Mattos, C. C., Morais, N. B., Alves Araújo, F. A., & De Mattos, C. A. (2001). Rabies in marmosets (*Callithrix jacchus*), Ceará, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 7(6), 1062–1065. <https://doi.org/10.3201/eid0706.010630>

Ferreira, R.G.; Jerusalinsky, L.; Silva, T.C.F.; Fialho, M.S.; Roque, A.A.; Fernandes, A. & Arruda, F. 2009. On the occurrence of *Cebus flavius* (Schreber 1774) in the Caatinga, and the use of semi-arid environments by *Cebus* species in the Brazilian state of Rio Grande do Norte. *Primates* 50: 357-362.

Friesen PD (1997) Regulation of baculovirus early gene expression. In *The baculoviruses*, pp 141-170. Springer

Fuzessy, L. F., Janson, C. H., & Silveira, F. A. O. (2017). How far do Neotropical primates disperse seeds? *American Journal of Primatology*, 79(7), 1–6. <https://doi.org/10.1002/ajp.22659>

Gariglio, Ana Clara Rolla Senna. VALORES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICO SANGUÍNEO de *Callithrix geoffroyi* SOB INFLUÊNCIA ANTRÓPICA NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO. 2017. 33 f. Dissertação (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.

GRANADOS, R. R.; GUOXUM, L.; DERKSEN, A. C. G.; McKENNA, K. A. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology*. v. 64, p. 260-266, 1994.

Green M, Sambrook J (2012) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York

Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, Toprak U (2009) New Insights into Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function. In *Annual Review of Entomology* Vol. 54, pp 285-302. Palo Alto: Annual Reviews

Hettmann, A., Demcsak, A., Bach, A., Decsi, G., Dencs, A., Palinko, D., Rovo, L., Nagy, K., Minarovits, J., & Takacs, M. (2016). Detection and phylogenetic analysis of torque teno virus in salivary and tumor biopsy samples from head and neck carcinoma patients. *Intervirology*, 59(2), 123–129. <https://doi.org/10.1159/000452974>

Hibbard, M. K., & Sandri-Goldin, R. M. (1995). Arginine-rich regions succeeding the nuclear localization region of the herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP27 are required for efficient nuclear localization and late gene expression. *Journal of Virology*, 69(8), 4656–4667. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.8.4656-4667.1995>

Hijikata, M., Takahashi, K., & Mishiro, S. (1999). Complete circular DNA genome of a TT virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Virology*, 260(1), 17–22. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9797>

Hettmann, A., Demcsak, A., Bach, A., Decsi, G., Dencs, A., Palinko, D., Rovo, L., Nagy, K., Minarovits, J., & Takacs, M. (2016). Detection and phylogenetic analysis of torque teno virus in salivary and tumor biopsy samples from head and neck carcinoma patients. *Intervirology*, 59(2), 123–129. <https://doi.org/10.1159/000452974>

Hsiao, K. L., Wang, L. Y., Lin, C. L., & Liu, H. F. (2016). New phylogenetic groups of torque teno virus identified in eastern Taiwan indigenes. *PLoS ONE*, 11(2), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149901>

Huang, Y. W., Harrall, K. K., Dryman, B. A., Beach, N. M., Kenney, S. P., Opriessnig, T., Vaughn, E. M., Roof, M. B., & Meng, X. J. (2011). Expression of the putative ORF1 capsid protein of Torque teno sus virus 2 (TTSuV2) and development of Western blot and ELISA serodiagnostic assays: Correlation between TTSuV2 viral load and IgG antibody level in pigs. *Virus Research*, 158(1–2), 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.03.013>

Huang, Y.-W., Patterson, A. R., Opriessnig, T., Dryman, B. A., Gallei, A., Harrall, K. K., Vaughn, E. M., Roof, M. B., & Meng, X.-J. (2012). Rescue of a Porcine Anellovirus (Torque Teno Sus Virus 2) from Cloned Genomic DNA in Pigs. *Journal of Virology*, 86(11), 6042–6054. <https://doi.org/10.1128/jvi.00175-12>

IBGE (2010) Resource document. Brazilian Institute of Geography and Statistics. <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/df/panorama>. Accessed 29 Jan 2021

IBRAN (2013) Guia de parques do Distrito Federal. <http://ibram.df.gov.br/wp-content/uploads/2018/03/GUIA-DE-PARQUES.compressed.pdf>. Accessed 29 Jan 2021

Itoh, Y.; Takahashi, M.; Fukuda, M.; Shibayama, T.; Ishikawa, T.; Tsuda, F.; Tanaka, T.; Nishizawa, T.; Okamoto, H. Visualization of TT virus particles recovered from the sera and feces of infected humans. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 279, p. 718–724. 2000.

Jarvis DL (1997) Baculovirus expression vectors. In *The baculoviruses*, pp 389-431. Springer

Jehle, J. A., Blissard, G. W., Bonning, B. C., Cory, J. S., Herniou, E. A., Rohrmann, G. F., Theilmann, D. A., Thiem, S. M., & Vlak, J. M. (2006). On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Archives of Virology*, 151(7), 1257–1266. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0763-6>

Jelcic, I., Hotz-Wagenblatt, A., Hunziker, A., zur Hausen, H., & de Villiers, E.-M. (2004). Isolation of Multiple TT Virus Genotypes from Spleen Biopsy Tissue from a Hodgkin's Disease Patient: Genome Reorganization and Diversity in the Hypervariable Region. *Journal of Virology*, 78(14), 7498–7507. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.14.7498-7507.2004>

Jesus, Jaqueline Goes de; GRÄF, Tiago; Giovanetti, Marta; Mares-Guia, Maria Angélica; Xavier, Joilson; Maia, Maricelia Lima; Fonseca, Vagner; Fabri, Allison; Santos, Roberto Fonseca dos; Pereira, Felicidade Mota. Yellow fever transmission in non-human primates, Bahia, Northeastern Brazil. *Plos Neglected Tropical Diseases*, [S.L.], v. 14, n. 8, p. 1-13, 11 ago. 2020. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0008405>.

Jones, M. S., Kapoor, A., Lukashov, V. V., Simmonds, P., Hecht, F., & Delwart, E. (2005). New DNA Viruses Identified in Patients with Acute Viral Infection Syndrome. *Journal of Virology*, 79(13), 8230–8236. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.13.8230-8236.2005>

Kakkola, L., Tommiska, J., Boele, L. C. L., Miettinen, S., Blom, T., Kekarainen, T., Qiu, J., Pintel, D., Hoeben, R. C., Hedman, K., & Söderlund-Venermo, M. (2007). Construction and biological activity of a full-length molecular clone of human Torque teno virus (TTV) genotype 6. *FEBS Journal*, 274(18), 4719–4730. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06020.x>

Kamahora, T., Hino, S., & Miyata, H. (2000). Three Spliced mRNAs of TT Virus Transcribed from a Plasmid Containing the Entire Genome in COS1 Cells. *Journal of Virology*, 74(21), 9980–9986. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.21.9980-9986.2000>

Kelly, A. H., Lezaun, J., Löwy, I., Matta, G. C., de Oliveira Nogueira, C., & Rabello, E. T. (2020). Uncertainty in times of medical emergency: Knowledge gaps and structural ignorance during the Brazilian Zika crisis. *Social Science and Medicine*, 246(January), 112787. <https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2020.112787>

King AMQ, Adams MJ, Lefkowitz EJ, Carstens EB (2012) Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Vol. 9: Elsevier.

Kluge, M., Campos, F. S., Tavares, M., de Amorim, D. B., Valdez, F. P., Giongo, A., Roehe, P. M., & Franco, A. C. (2016). Metagenomic survey of viral diversity obtained from feces of subantarctic and South American fur seals. *PLoS ONE*, 11(3), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151921>

Koch, G., van Roozelaar, D. J., Verschueren, C. A. J., van der Eb, A. J., & Noteborn, M. H. M. (1995). Immunogenic and protective properties of chicken anaemia virus proteins expressed by baculovirus. *Vaccine*, 13(8), 763–770. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(94\)00034-K](https://doi.org/10.1016/0264-410X(94)00034-K)

la Salles, A. Y. F. de, Carreiro, A. da N., Medeiros, G. X., Muniz, J. A. P. C., & Menezes, D. J. A. de. (2018). Aspectos biológicos e comportamentais de *Sapajus libidinosus*: Revisão. *Pubvet*, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.22256/pubvet.v12n1a8.1-13>

Leary, T. P., Erker, J. C., Chalmers, M. L., Desai, S. M., & Mushahwar, I. K. (1999). Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. *Journal of General Virology*, 80(8), 2115–2120. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-8-2115>

Leppik, L., Gunst, K., Lehtinen, M., Dillner, J., Streker, K., & de Villiers, E.-M. (2007). In Vivo and In Vitro Intragenomic Rearrangement of TT Viruses. *Journal of Virology*, 81(17), 9346–9356. <https://doi.org/10.1128/jvi.00781-07>

Lu A, Miller LK (1997) Regulation of baculovirus late and very late gene expression. In *The baculoviruses*, pp 193-216. Springer

LUO, Kangxian et al. Experimental infection of nonenveloped DNA virus (TTV) in Rhesus monkey. *Journal Of Medical Virology*, [S.L.], v. 61, n. 1, p. 159-164, maio 2000. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9071\(200005\)61:13.0.co;2-h](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1096-9071(200005)61:13.0.co;2-h).

Macera, L., Cortey, M., Maggi, F., Segalés, J., & Kekarainen, T. (2011). A novel rolling circle amplification assay to detect members of the family Anelloviridae in pigs and humans. *Virus Research*, 160(1–2), 424–427. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.06.025>

Majolo, B, van Lavieren, E, Maréchal, L, Maclarnon, A, Marvin, G, Qarro, M, & Semple, S (2013) Monyet Yang Dihargai, Monyet Yang Dibenci: The Human-Macaque Interface in Indonesia*. Pages 149-166, in *The Macaque Connection: Co-operation and Conflict between Humans and Macaques*. Eds. Radhakrishna, S, Huffman, M & Sinha, A. Springer: New York. DOI 10.1007/978-1-4614-3967-7

Mankotia, D. S., & Irshad, M. (2014). Cloning and expression of N22 region of Torque Teno virus (TTV) genome and use of peptide in developing immunoassay for TTV antibodies. *Virology Journal*, 11(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-96>

Manzin, A., Mallus, F., Macera, L., Maggi, F., & Blois, S. (2015). Global impact of torque teno virus infection in wild and domesticated animals. *Journal of Infection in Developing Countries*, 9(6), 562–570. <https://doi.org/10.3855/jidc.6912>.

MARES-GUIA, Maria Angélica Monteiro de Mello; HORTA, Marco A.; ROMANO, Alessandro; RODRIGUES, Cíntia D. S.; MENDONÇA, Marcos C. L.; SANTOS, Carolina C. dos; TORRES, Maria C.; ARAUJO, Eliane S. M.; FABRI, Allison; SOUZA, Everton R. de. Yellow fever epizootics in non-human primates, Southeast and Northeast Brazil (2017 and 2018). *Parasites & Vectors*, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-8, 19 fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-020-3966-x>.

Martins, A.B., Bezerra, B., Fialho, M., Jerusalinsky, L., Laroque, P., Lynch Alfaro, J., Melo, F. & Valença Montenegro, M. 2019. *Sapajus libidinosus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T136346A70613454. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-3.RLTS.T136346A70613454.en>

Matsubara, H., Michitaka, K., Horiike, N., Yano, M., Akbar, S. M. F., Torisu, M., & Onji, M. (2000). Existence of TT virus DNA in extracellular body fluids from normal healthy Japanese subjects. *Intervirology*, 43(1), 16–19. <https://doi.org/10.1159/000025018>

Mazzola, J. C., Saito, P. K., Yamakawa, R. H., Watanabe, M. A. E., da Silva Junior, W. V., Matta, A. C. G., & Borelli, S. D. (2015). Prevalence of Torque teno virus in healthy donors of Paraná State, southern Brazil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 37(5), 336–340. <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2015.07.005>

Miller LK (1997) *The baculoviruses*: Springer Science & Business Media. New York.

Moreira , Diego Reymão. ANÁLISE DE VIROMAS EM *Alouatta caraya* e *Saimiri collinsi* MANTIDOS EM CATIVEIRO NO CENTRO NACIONAL DE PRIMATAS, ANANINDEUA, PARÁ Dissertação. 2016. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós- Graduação em Virologia, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, 2016.

Mushahwar, I. K.; Erker, J. C.; Muerhoff, A. S.; Leary, T. P.; Simons, J. N.; Birkenmeyer, L. G.; Chalmers, M. L.; Pilot-Matias, T. J.; Dexai, S. M.. Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 96, n. 6, p. 3177-3182, 16 mar. 1999. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.6.3177>.

Nakashima, Y., Lagan, P., & Kitayama, K. (2008). A study of fruit-frugivore interactions in two species of durian (*Durio*, *Bombacaceae*) in Sabah, Malaysia. *Biotropica*, 40(2), 255–258. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2007.00335.x>

Nascimento, Carlos Augusto Pinho do. Torque Teno Virus em amostras fezes de pacientes com gastroenterite: prevalência, distribuição por genogrupos e carga viral. 2011. 47 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/5715>. Acesso em: 03 jul. 2019.

Ng, T. F. F., Suedmeyer, W. K., Wheeler, E., Gulland, F., & Breitbart, M. (2009). Novel anellovirus discovered from a mortality event of captive California sea lions. *Journal of General Virology*, 90(5), 1256–1261. <https://doi.org/10.1099/vir.0.008987-0>

Ng, T. F. F., Willner, D. L., Lim, Y. W., Schmieder, R., Chau, B., Nilsson, C., Anthony, S., Ruan, Y., Rohwer, F., & Breitbart, M. (2011). Broad surveys of DNA viral diversity obtained through viral metagenomics of mosquitoes. *PLoS ONE*, 6(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020579>

Niel, C., Diniz-Mendes, L., & Devalle, S. (2005). Rolling-circle amplification of Torque teno virus (TTV) complete genomes from human and swine sera and identification of a novel swine TTV genogroup. *Journal of General Virology*, 86(5), 1343–1347. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80794-0>

Niel, C., Saback, F. L., & Lampe, E. (2000). Coinfection with multiple TT virus strains belonging to different genotypes is a common event in healthy Brazilian adults. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(5), 1926–1930. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.5.1926-1930.2000>

Ninomiya, M., Takahashi, M., Shimosegawa, T., & Okamoto, H. (2007). Analysis of the entire genomes of fifteen torque teno midi virus variants classifiable into a third group of genus Anellovirus. *Archives of Virology*, 152(11), 1961–1975. <https://doi.org/10.1007/s00705-007-1046-6>

Ninomiya, M., Takahashi, M., Nishizawa, T., Shimosegawa, T., & Okamoto, H. (2008). Development of PCR assays with nested primers specific for differential detection of three human anelloviruses and early acquisition of dual or triple infection during infancy. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(2), 507–514. <https://doi.org/10.1128/JCM.01703-07>

Ninomiya, Masashi, Takahashi, M., Hoshino, Y., Ichiyama, K., Simmonds, P., & Okamoto, H. (2009). Analysis of the entire genomes of Torque teno midi virus variants in chimpanzees: Infrequent cross-species infection between humans and chimpanzees. *Journal of General Virology*, 90(2), 347–358. <https://doi.org/10.1099/vir.0.007385-0>

Nishiyama, S., Dutia, B. M., Stewart, J. P., Meredith, A. L., Shaw, D. J., Simmonds, P., & Sharp, C. P. (2014). Identification of novel anelloviruses with broad diversity in UK rodents. *Journal of General Virology*, 95(PART 7), 1544–1553. <https://doi.org/10.1099/vir.0.065219-0>

Nishizawa, Tsutomu; Okamoto, Hiroaki; Konishi, Keiko; Yoshizawa, Hiroshi; Miyakawa, Yuzo; Mayumi, Makoto. A Novel DNA Virus (TTV) Associated with Elevated Transaminase Levels in Posttransfusion Hepatitis of Unknown Etiology. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, [S.L.], v. 241, n. 1, p. 92-97, dez. 1997. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1997.7765>.

Noteborn, M. H.M., De Boer, G. F., Kant, A., Koch, G., Bos, J. L., Zantema, A., & Van der Eb, A. J. (1990). Expression of avian leukaemia virus env-gp85 in *Spodoptera frugiperda* cells by use of a baculovirus expression vector. *Journal of General Virology*, 71(11), 2641–2648. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-11-2641>

Noteborn, Mathieu H.M., Verschueren, C. A. J., Koch, G., & Van Der Eb, A. J. (1998). Simultaneous expression of recombinant baculovirus-encoded chicken anaemia virus (CAV) proteins VP1 and VP2 is required for formation of the CAV-specific neutralizing epitope. *Journal of General Virology*, 79(12), 3073–3077. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-12-3073>

Okamoto, H., Akahane, Y., Ukita, M., Fukuda, M., Tsuda, F., Miyakawa, Y., & Mayumi, M. (1998a). Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non A G hepatitis. *Journal of Medical Virology*, 56(2), 128–132. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9071\(199810\)56:2<128::aid-jmv5>3.3.co;2-i](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9071(199810)56:2<128::aid-jmv5>3.3.co;2-i)

Okamoto, H., Nishizawa, T., Kato, N., Ukita, M., Ikeda, H., Iizuka, H., Miyakawa, Y., & Mayumi, M. (1998b). Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatology Research*, 10(1), 1–16. [https://doi.org/10.1016/s1386-6346\(97\)00123-x](https://doi.org/10.1016/s1386-6346(97)00123-x)

Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Ukita, M., Fukuda, M., Tsuda, F., Miyakawa, Y., & Mayumi, M. (1999). Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated

by PCR with primers from coding and noncoding regions. *Virology*, 259(2), 428–436. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9770>

Okamoto, H., Kato, N., Iizuka, H., Tsuda, F., Miyakawa, Y., & Mayumi, M. (1999). Distinct genotypes of a nonenveloped DNA virus associated with posttransfusion non-A to G hepatitis (TT virus) in plasma and peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Medical Virology*, 57(3), 252–258. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199903\)57:3<252::AID-JMV7>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199903)57:3<252::AID-JMV7>3.0.CO;2-Q)

Okamoto, H., Fukuda, M., Tawara, A., Nishizawa, T., Itoh, Y., Hayasaka, I., Tsuda, F., Tanaka, T., Miyakawa, Y., & Mayumi, M. (2000a). Species-Specific TT Viruses and Cross-Species Infection in Nonhuman Primates. *Journal of Virology*, 74(3), 1132–1139. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.3.1132-1139.2000>

Okamoto, H., Nishizawa, T., Tawara, A., Peng, Y., Takahashi, M., Kishimoto, J., Tanaka, T., Miyakawa, Y., & Mayumi, M. (2000b). Species-specific TT viruses in humans and nonhuman primates and their phylogenetic relatedness. *Virology*, 277(2), 368–378. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0588>

Okamoto, H., Nishizawa, T., Tawara, A., Takahashi, M., Kishimoto, J., Sai, T., & Sugai, Y. (2000c). TT virus mRNAs detected in the bone marrow cells from an infected individual. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279(2), 700–707. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4012>

Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Tawara, A., Fukai, K., Muramatsu, U., Naito, Y., & Yoshikawa, A. (2002). Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia. *Journal of General Virology*, 83(6), 1291–1297. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-6-1291>

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. Baculovirus expression vectors: a laboratory manual. *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual.*, 1992.

Pereira, A. A. B. G., Dias, B., Castro, S. I., Landi, M. F. A., Melo, C. B., Wilson, T. M., Costa, G. R. T., Passos, P. H. O., Romano, A. P., Szabó, M. P. J., & Castro, M. B. (2020). Electrocutions in free-

living black-tufted marmosets (*Callithrix penicillata*) in anthropogenic environments in the Federal District and surrounding areas, Brazil. *Primates*, 61(2), 321–329. <https://doi.org/10.1007/s10329-019-00760-x>

Peterson, Jeffrey V.; Riley, Erin P.. Monyet Yang Dihargai, Monyet Yang Dibenci: the human-macaque interface in indonesia. *The Macaque Connection*, [S.L.], p. 149-166, 25 jul. 2012. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-3967-7_10.

Prescott, L.E.; Simmonds, P. Global distribution of transfusion-transmitted virus. *New Engl.J.Med.*, 339(11):776-777, 1998. PMID: 9742036 DOI: 10.1056/NEJM199809103391118

Pujol, F. H., Mejías, E., Loureiro, C. L., Ludert, J. E., Liprandi, F., & Pernalette, J. M. (2005). Infection with transfusion-transmitted virus (TTV) in humans and other primates in Venezuela. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 99(2), 173–180. <https://doi.org/10.1179/136485905X24193>

Qiu, J., Kakkola, L., Cheng, F., Ye, C., Söderlund-Venermo, M., Hedman, K., & Pintel, D. J. (2005). Human Circovirus TT Virus Genotype 6 Expresses Six Proteins following Transfection of a Full-Length Clone. *Journal of Virology*, 79(10), 6505–6510. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.10.6505-6510.2005>

Ribeiro BMM, F. S. ; ARDISSON-ARAÚJO, D. M. P. ; SILVA, L. A. ; CHAVES, L. C. S. ; QUIRINO, M. S.; ANDRADE, M. S. ; CORREA, R. F. T. (2015) Baculovírus para expressão de proteínas recombinantes em células de insetos. In *Biotecnologia Aplicada à Saúde Vol. 2*, pp 255-306. In: Rodrigo Ribeiro Resende; Carlos Ricardo Soccol. (Org.) 1ed.São Paulo: Blucher

Rodríguez, V., Defler, T.R., Guzman-Caro, D., Link, A., Mittermeier, R.A., Palacios, E. & Stevenson, P.R. 2020. *Saguinus oedipus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T19823A115573819. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-2.RLTS.T19823A115573819.en>

Rohrman G (1986) Polyhedrin structure. *Journal of General Virology* 67: 1499-1513

Rohrman GF (2013b) *Baculovirus molecular biology*, 3rdEd edn. National Center for Biotechnology Information (Bethesda MD).

Rosario, K., Breitbart, M., Harrach, B., Segalés, J., Delwart, E., Biagini, P., & Varsani, A. (2017). Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. *Archives of Virology*, 162(5), 1447–1463. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3247-y>

Sacramento, T. S. (2014). Influência da disponibilidade de alimentos sobre os comportamentos de um grupo de *Sapajus libidinosus* e análise das interações e conflitos entre humanos e macacos-prego no Parque Nacional de Brasília, DF. *Dissertação Apresentada Como Requisito Para Obtenção Do Grau de Mestre Em Biologia Animal Pelo Programa de Pós-Graduação Em Biologia Animal Da Universidade de Brasília*, 1–79.

Saito, C. H., Brasileiro, L., Almeida, L. E. de, & Tavares, M. C. H. (2010). Conflitos entre macacos-prego e visitantes no Parque Nacional de Brasília: possíveis soluções. *Sociedade & Natureza*, 22(3), 515–524. <https://doi.org/10.1590/s1982-45132010000300008>

Sawaswong, V., Fahsbender, E., Altan, E., Kemthong, T., Deng, X., Malaivijitmond, S., Payungporn, S., & Delwart, E. (2019). High diversity and novel enteric viruses in fecal viromes of healthy wild and captive Thai cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Viruses*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/v11100971>

Schneider, H., & Sampaio, I. (2015). The systematics and evolution of New World primates - A review. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82(PB), 348–357. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.10.017>

SEGOV (2021) Secretaria de Estado de governo do Distrito Federal:Administrações Regionais <https://https://segov.df.gov.br/category/administracoes-regionais/>. Accessed 29 Jan 2021

Silva, L. A. da, (2016). *UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA FACULDADE DE MEDICINA PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR Expressão de antígenos virais fusionados a uma proteína formadora de corpos de oclusão de um vírus de inseto*. <https://repositorio.unb.br/handle/10482/23068>

SOUZA, William Marciel de et al. Discovery of novel anelloviruses in small mammals expands the host range and diversity of the Anelloviridae. *Virology*, [s.l.], v. 514, p.9-17, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2017.11.001>.

Takahashi, K., Iwasa, Y., Hijikata, M., & Mishiro, S. (2000). Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Archives of Virology*, 145(5), 979–993. <https://doi.org/10.1007/s007050050689>

Tawara, A., Akahane, Y., Takahashi, M., Nishizawa, T., Ishikawa, T., & Okamoto, H. (2000). Transmission of Human TT Virus of Genotype 1a to Chimpanzees with Fecal Supernatant or Serum from Patients with Acute TTV Infection. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, [S.L.], v. 278, n. 2, p. 470-476, nov. 2000. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2000.3825>.

Thom, K., Morrison, C., Lewis, J. C. M., & Simmonds, P. (2003). Distribution of TT virus (TTV), TTV-like minivirus, and related viruses in humans and nonhuman primates. *Virology*, 306(2), 324–333. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(02\)00049-1](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(02)00049-1)

TRANQUILIN, Marcos Vinicius; LEHMKUHL, Ricardo Coelho; MARON, Angela; SILVA, Lineu Roberto da; ZILIOTTO, Liane; SEKI, Meire Christina; SALOMON, Gabriela Ronchi; CARRASCO, Adriano de Oliveira Torres. First report of yellow fever virus in non-human primates in the State of Parana, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, [S.L.], v. 46, n. 4, p. 522-524, jul. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0106-2013>.

van Oers MM, Pijlman GP, Vlak JM (2015) Thirty years of baculovirus--insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. *Journal of General Virology* 96: 6-23

Vasilyev, E. V., Trofimov, D. Y., Tonevitsky, A. G., Ilinsky, V. V., Korostin, D. O., & Rebrikov, D. V. (2009). Torque Teno Virus (TTV) distribution in healthy Russian population. *Virology Journal*, 6, 8–11. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-134>

Verschuur, E. J., Langenhuijzen, S., & Heeney, J. L. (1999). TT viruses (TTV) of non-human primates and their relationship to the human TTV genotypes. *Journal of General Virology*, 80(9), 2491–2499. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-9-2491>

Vilela, S. L. (2007). Simpatria e dieta de *Callithrix penicillata* (Hershkovitz) (Callitrichidae) e *Cebus libidinosus* (Spix) (Cebidae) em matas de galeria do Distrito Federal, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 24(3), 601–607. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752007000300012>

Zhang, Y., Li, F., Shan, T. L., Deng, X., Delwart, E., & Feng, X. P. (2016a). A novel species of torque teno mini virus (TTMV) in gingival tissue from chronic periodontitis patients. *Scientific Reports*, 6, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep26739>

Zhang, W., Wang, H., Wang, Y., Liu, Z., Li, J., Guo, L., Yang, S., Shen, Q., Zhao, X., Cui, L., & Hua, X. (2016b). Identification and genomic characterization of a novel species of feline anellovirus. *Virology Journal*, 13(1), 13–15. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0601-8>

Matsubara, H., Michitaka, K., Horiike, N., Yano, M., Akbar, S. M. F., Torisu, M., & Onji, M. (2000). Existence of TT virus DNA in extracellular body fluids from normal healthy Japanese subjects. *Intervirology*, 43(1), 16–19. <https://doi.org/10.1159/000025018>