

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DAS ESTIRPES LaSota E SÃO JOÃO DO
MERITI DO VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE**

**CAMILA CESARIO FERNANDES
BIÓLOGA**

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
FEVEREIRO – 2014**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DAS ESTIRPES LaSota E SÃO JOÃO DO
MERITI DO VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE**

Camila Cesario Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Hélio José Montassier

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL

Fevereiro – 2014

Fernandes, Camila Cesario

F363e Epidemiologia molecular das estirpes LaSota e São João do
Meriti do vírus da doença de Newcastle / Camila Cesario Fernandes. –
– Jaboticabal, 2014

xiv, 93 f. : il.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014

Orientador: Helio José Montassier

Banca examinadora: Samir Issa Samara, Alessandro de Mello
Varani, João Pessoa de Araujo Junior, Ricardo Luiz Moro de Sousa

Bibliografia

1. Vírus da doença de Newcastle. 2. Genoma completo. 3.
Análise filogenética. 4. Estirpe brasileira. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.5:616.988.73

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CAMILA CESÁRIO FERNANDES – Nascida em abril de 1982, em Jaboticabal, SP, Brasil. Graduiu-se em Ciências Biológicas, modalidade Licenciatura, pela Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, em março de 2006, e modalidade bacharelado em abril de 2007. Em agosto de 2007 iniciou o curso de mestrado pela mesma universidade tendo obtido o título de Mestre em Microbiologia Agropecuária em dezembro de 2009. Ingressou no curso de doutorado em março de 2010, no programa de Microbiologia Agropecuária da FCAV/UNESP/Jaboticabal.

Coisas que vivi

Coisas que vivi me mudaram pra melhor
E tudo que eu perdi, vi o teu amor restituir
Apurando meu coração

Viver experiências que eu nunca esqueci
Que me levaram pra perto de ti
Pude ver
Em meio a dor entendi o teu querer
Eu vi agir em mim o teu poder

Eu pude ver tua mão em tudo que passei
Ouví tua voz me ensinando
Eu pude ver tua mão nas lutas que enfrentei
Em cada momento que eu vivi

Adriana Arydes

DEDICATÓRIA

Para meus queridos pais *Neusa e António Carlos...*
Que me incentivaram no caminho da educação, mostrando que
devia seguir o que queria e que com garra tudo é possível,
sempre presentes em minha vida.

Catarine, minha irmã....
Pela amizade incondicional ao longo desta jornada

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, obrigada Senhor por mais esta conquista. *“Confia em mim, vou com você, não te deixarei só. Se for fiel, te honrarei e te farei vencer”*.

A família que Deus me deu: **Antonio Carlos, Neusa e Catarine**, obrigada pela compreensão e apoio, todo o esforço é por vocês.

Ao **Prof. Dr. Hélio José Montassier**, obrigada por ter permitido que eu tivesse um caminho a trilhar. Obrigada pelo exemplo de competência e dedicação. Obrigada por tudo!

A banca examinadora, Prof. Dr. João Pessoa de Araújo Júnior, Prof. Dr. Ricardo Luis Moro, Prof. Dr. Alessandro M. Varani, Prof. Dr. Samir Issa Samara, obrigada pelas correções e sugestões que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

Membros da banca do exame de qualificação, Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, Prof. Dr. Alessandro M. Varani, Prof. Dr. Antonio Carlos Paulillo, Prof. Dr. Aramis A. Pinto, obrigada pela contribuição e atenção.

A família **Imunovir**: Mariana, Elisa, Filipe, Ketherson, Maria de Fátima, Mariana Monezi, obrigada por toda ajuda, pelo apoio, pelos conselhos e pelo prazer de conviver com vocês!

A **Maria de Lourdes**, obrigada pela imensa ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pela grande contribuição na minha formação profissional e crescimento pessoal.

A família **LBMP**

A **Prof^a. Dr^a. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos**

Aos funcionários e professores do Departamento de Patologia Veterinária, obrigada por toda a colaboração e boa vontade.

Aos funcionários da sessão de Pós-Graduação, obrigada pelas orientações sempre dadas de forma tão gentil.

Aos funcionários da Biblioteca da Unesp, Câmpus Jaboticabal, obrigada pelas informações e correções.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária da FCAV – UNESP – Jaboticabal.

A **Capes**, obrigada pela bolsa concedida.

Ao **CNPq** pelo auxílio concedido.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO –	ix
ABSTRACT –	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
I. INTRODUÇÃO	15
II. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. A Doença de Newcastle.....	19
2.1.1. Histórico e aspectos gerais.....	19
2.1.2. Patologia.....	21
2.2. O agente etiológico da Doença de Newcastle.....	22
2.2.1. Classificação.....	22
2.2.2. Características estruturais e genéticas.....	25
2.2.3. Replicação.....	28
2.3. Hospedeiros do Vírus da Doença de Newcastle.....	30
2.4. Epidemiologia da Doença de Newcastle.....	31
2.5. Medidas de controle da Doença de Newcastle.....	33
2.5.1. Vacinação.....	33
2.5.2. Monitoramento sorológico.....	34
2.6. Diagnóstico Laboratorial.....	35
2.7. Sequenciamento de Genomas.....	38
2.8. Tecnologias de sequenciamento.....	39
2.8.1. Plataforma Illumina®.....	40
III. OBJETIVOS	43
IV. MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1. Amostras virais.....	44
4.2. Extração do RNA viral.....	44
4.3. Construção das bibliotecas de RNA.....	45
4.4. Sequenciamento do genoma do VDN.....	46
4.5. Análise das Sequências e Anotação genômica.....	47

4.6. Alinhamento das sequências e Análise Filogenética.....	47
4.7. Análise das distâncias filogenéticas das estirpes do genótipo V.....	48
4.8. Análise de seleção positiva dos genes F e HN do genótipo V	48
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1. Análise dos genomas e proteínas deduzidas	49
5.1.1. Estirpe vacinal lentogênica LaSota	49
5.1.2. Isolado APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75	52
5.3. Análise filogenética	61
5.2. Análise de ocorrência de seleção positiva e recombinação nos isolados do genótipo V.....	70
VI. CONCLUSÕES	75
VII. REFERÊNCIAS.....	76

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DAS ESTIRPES LaSota E SÃO JOÃO DO MERITI DO VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE

RESUMO – O vírus da doença de Newcastle (VDN) é o agente causador de uma das mais importantes enfermidades em aves e representa uma ameaça para a indústria avícola. O VDN é membro da família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae*, gênero *Avulavirus*. São vírus envelopados, não-segmentados dotados de genoma RNA de fita simples sentido negativo, associado à doença do trato respiratório, digestivo e nervoso das aves. O controle da DN se baseia em biossegurança, uso de vacinas e detecção precoce de lotes infectados. No presente estudo foi feito o sequenciamento do genoma completo da estirpe vacinal lentogênica (LaSota) e de um isolado de campo brasileiro patogênico (APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75) do VDN, seguido de análise filogenética. Os resultados revelaram que o genoma das estirpes LaSota e APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 estão constituídos respectivamente por um total de 15.186 e 15.192 nucleotídeos, seis genes na ordem 3'-NP-P-M-F-HN-L-5'. Para a estirpe LaSota o local de clivagem da proteína de fusão (F) apresenta a sequência de aminoácidos correspondentes às encontradas em estirpes não virulentas do VDN, oposto ao que acontece com a estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75, no qual o sítio de clivagem da proteína F apresenta a sequência de aminoácidos correspondente às encontradas nas estirpes virulentas do VDN. O genoma completo da estirpe LaSota não apresentou grandes diferenças genômicas, de forma que na análise filogenética ficou evidenciado que esta estirpe está classificada no genótipo II, já a estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 apresentou grandes diferenças genômicas nas sequências deduzidas de aminoácidos de suas principais proteínas estruturais, de forma que na análise filogenética do genoma completo foi demonstrado que esse vírus está classificado no genótipo V. Os dados obtidos a partir do presente estudo podem contribuir consideravelmente para se entender a evolução genômica do VDN no Brasil e no continente Americano, já que estirpes virulentas não foram mais isoladas no Brasil após 1975, enquanto que continuaram a ser isoladas na América do Norte.

Palavras-chave: Vírus da Doença de Newcastle, genoma completo, análise filogenética, estirpe brasileira

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF LaSota AND SÃO JOÃO DO MERITI STRAINS OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS

ABSTRACT – Newcastle disease virus (NDV) is the agent that causes one of the most important diseases in birds and represents a threat to industrial aviculture. NDV is a member of the *Paramyxoviridae* family, *Paramyxovirinae* subfamily, *Avulavirus* genus. Viruses consist of single-stranded, non-segmented, negative-sense, RNA, associated with diseases in respiratory tract, digestive and nervous in birds. The ND control is based on biosafety, use of vaccines and early detection of infected batches. Here we present the complete genome sequence and phylogenetic analysis of a lentogenic strain (LaSota) and a velogenic strain (APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75) of NDV. The results revealed that the genome of LaSota and APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 are constituted respectively by a total of 15,186 and 15,192 nucleotides and six genes in the order 3'-NP-P-M-F-HN-L-5'. The cleavage site of fusion protein (F) in LaSota strain shows the amino acid sequence found in non-virulent NDV strains, as opposed to happen with APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 strain, the cleavage site of the F protein has the amino acid sequence corresponding to that found in virulent strains of NDV. The complete genome of LaSota strain showed no genomic differences and the phylogenetic analysis evidenced that this strain is classified in genotype II. The APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 strain there are large differences in the genomic sequences and in the deduced amino acid sequences of its major structural proteins, so the phylogenetic analysis of the complete genome was demonstrated that this virus is classified in genotype V. This study can contribute significantly to understand better the genomic evolution of NDV in Brazil and in Americas, such as these strains with genotypic and phenotypic characteristics were no longer isolated in Brazil after 1975, while continued to be isolated in North America.

Keywords: Newcastle disease virus, complete genome, phylogenetic analysis, brazilian strain

LISTA DE ABREVIATURAS

aa: aminoácido
APMV: Paramixovírus aviário
cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar
DEPC: Dimetil pirocarbonato
DN: Doença de Newcastle
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DSA: Departamento de Saúde Animal
ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
F: Glicoproteína de fusão
GF: Gene Final
GI: Gene Inicial
HA: Teste de Hemaglutinação
HI: Teste de Inibição da Hemaglutinação
HN: Glicoproteína Hemaglutinina-Neuraminidase
ICTV: International Committee for the Taxonomy of Virus
IPIC: Índice de Patogenicidade Intracerebral
IPIV: Índice de Patogenicidade Intravenosa
L: Grande proteína
LCA: Líquido Córion Alantoide
LCAi: Líquido Córion Alantoide infectado
M: Proteína de Matriz
MAbs: Anticorpos Monoclonais
MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mRNA: RNA mensageiro
MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis
NGS: *Next Generation Sequencing* – Sequenciamento de nova geração
NP: Proteína do nucleocapsídeo
OIE: Organização Mundial de Saúde Animal
ORF: *Open Read Frame* – Regiões Abertas de Leitura
P: Fosfoproteína
PCR: Reação em cadeia pela polimerase
RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism* – Polimorfismo no comprimento de fragmentos
RNA: Ácido ribonucleico
RT: Reação da Transcrição Reversa
RT-PCR: Reação da transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase
SI: Sequências Intergênicas
SPF: *Specific Pathogen Free* – Livres de Patógenos Específicos
TMME: Tempo Médio de Morte Embrionária
VDN: Vírus da Doença de Newcastle
vVDN: Isolados virulentos do vírus da doença de Newcastle

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Características genômicas e aminoácidos deduzidos da estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75.....	53
Tabela 2. Comparação das sequências de nucleotídeo e aminoácido entre a estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 e as estirpes representantes de cada genótipo da classe II ^a	54
Tabela 3. Resíduos de aa únicos na sequência deduzida da proteína F e HN do isolado APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 em comparação com as estirpes representantes de cada genótipo da classe II, classificados como genótipos antigos e recentes.	60
Tabela 4. Distâncias filogenéticas entre a estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 e outros isolado representantes do genótipo V.....	67
Tabela 5. Resíduos de aa únicos na sequência deduzida da proteína F e HN do isolado APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 em comparação com os isolados do genótipo V.	65

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Classificação dos membros da família <i>Paramyxoviridae</i> (adaptado de COLLINS, 2001).....	23
Figura 2. Análises filogenéticas classificam os VDN em duas classes: I e II. A classe I os vírus são encontrados principalmente em aves silvestres aquáticas. A classe II é dividida em 16 genótipos, I ao XVI, e os vírus encontrados principalmente em galiformes. (a) Vírus da classe I. (b) Vírus da classe II (Adaptado de MILLER et al., 2010).	25
Figura 3. Esquema do genoma do Vírus da Doença de Newcastle e organização estrutural das proteínas. Estão destacadas as seis proteínas estruturais principais: a proteína de nucleocapsídeo (NP); a fosfoproteína (P); a grande proteína polimerase (L); a proteína de matriz (M); a glicoproteína hemaglutinina-neuraminidase (HN) e a glicoproteína de fusão (F). Disponível em: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/556.html	26
Figura 4. Representação esquemática do ciclo de vida dos paramixovirus (Adaptado de LAMB, 2007).	29
Figura 5. Processo inicial de sequenciamento na plataforma Illumina (Adaptado de CARVALHO e SILVA, 2010).	40
Figura 6. Processo intermediário de sequenciamento na plataforma Illumina (Adaptado de CARVALHO e SILVA, 2010).	41
Figura 7. Processo final de sequenciamento na plataforma Illumina (Adaptado de CARVALHO e SILVA, 2010).	42
Figura 8. Esquema do genoma da estirpe vacinal lentogênica LaSota, em bases, mostrando a posição dos seis genes codificadores das proteínas virais.	49
Figura 9. Visualização dos “scores” do genoma completo da estirpe vacinal lentogênica LaSota, que foram obtidos pelo programa BLASTn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi)	50
Figura 10. Análise filogenética baseada na sequência completa de nucleotídeos do genoma dos vírus representando as Classes I e II do VDN	

depositadas no GenBank. Sequências representando os genótipos I-X foram utilizadas. A história evolucionária inferida utilizando-se o método de Maximum Likelihood. A análise envolveu 123 genomas completos e foi conduzida no programa MEGA5.	63
Figura 11. Perfil de hidrofiliçidade da sequência de aa da proteína F da estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 mostrando os epítomos neutralizantes.	68
Figura 12. Perfil de hidrofiliçidade da sequência de aa da proteína HN da estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 mostrando os epítomos neutralizantes.	68
Figura 13. Valores de entropia e diferença entre não-sinônimos (dn) e sinônimos (ds) por cada posição de aminoácido da proteína F. Ambos os valores foram calculados utilizando-se o alinhamento de todos os isolados do genótipo V.	72
Figura 14. Valores de entropia e diferença entre não-sinônimos (dn) e sinônimos (ds) por cada posição de aminoácido da proteína HN. Ambos os valores foram calculados utilizando-se o alinhamento de todos os isolados do genótipo V.	72

I. INTRODUÇÃO

A doença de Newcastle (DN) é uma doença viral, aguda, altamente contagiosa que acomete todas as espécies aviárias, com sinais respiratórios (tosse, espirro, estertores) frequentemente seguidos por manifestações nervosas e por diarreia e edema da cabeça. A DN infecta mais de 200 espécies de aves domésticas e silvestres, 27 das 50 ordens existentes da classe *Avis*.

A DN é considerada em todo o mundo uma das mais importantes doenças virais em aves não só devido a sua alta mortalidade e gravidade, mas também por causa do grande impacto econômico que pode resultar, fazendo parte da lista das enfermidades emergenciais do código zoosanitário internacional da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), e sendo de notificação obrigatória, impõe restrições e embargos comerciais às áreas e países onde os surtos ocorrem.

Ademais, tal enfermidade tem sido, até hoje, um dos problemas sanitários mais importantes, seja pelas perdas diretas na produção, seja pela imposição de barreiras na comercialização de produtos avícolas em diferentes partes do mundo.

No Brasil, após o primeiro registro da ocorrência no início da década de 50, a DN permaneceu endêmica nos plantéis avícolas comerciais brasileiros, durante quase 20 anos que se seguiram a esse surto.

Na década de 70, a doença ressurgiu sob uma forma altamente patogênica, conhecida como Newcastle Viscerotrópica. No período de 1970 a 1975 foram registrados focos dessa forma mais severa da doença em todo o país. Nos anos subsequentes e, mais especificamente até 1995, foram registrados vários surtos e/ou casos da DN em aves reprodutoras e de produção e também em aves de fundo de quintal, acarretando prejuízos consideráveis à avicultura do Brasil, inclusive no comércio de exportação de produtos avícolas.

Gradualmente, os surtos de DN, foram diminuindo e sendo limitados a aves caipiras ou de fundo de quintal, tendo sido registrado em 2001 um último foco da doença no Estado de Goiás em galinhas caipiras, o qual foi prontamente controlado.

No ano seguinte, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) realizou um amplo levantamento soro-epidemiológico no território brasileiro, não encontrando evidências da ocorrência da infecção pelo vírus da doença de Newcastle (VDN), o que levou, em 2003, a declaração do país livre da DN pelo Brasil com reconhecimento pela OIE. Após isso, decorreram alguns anos sem a ocorrência de novos casos da DN, mas, em 2006, foi reportado o último surto dessa doença em frangos caipiras e de consumo familiar na região sul do país, sendo que até o momento não mais foram reportados surtos da DN no Brasil.

Um aspecto interessante é que até 1995, a maioria dos focos da DN foram notificados com base na avaliação clínica e/ou anátomo-patológica das aves acometidas, sem que fosse feito o isolamento e caracterização do agente etiológico. No entanto, na década de 70, foi isolada a estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 do VDN a partir de focos de uma forma mais severa da DN ocorridos no Brasil. Essa estirpe foi caracterizada posteriormente como altamente patogênica, tendo ainda sido demonstrado que essa estirpe produzia lesões graves e elevada mortalidade em galinhas livres de patógenos específicos (SPF), enquanto que para outras espécies de aves, tais como perdizes (*Rhinchotus rufescens*), codornas (*Nothura maculosa*), patos (*Anas platyrhynchos*), pombos (*Columba livia*), periquitos (*Melopsittacus undulatus*), gansos chineses (*Anser cygnoides*) era capaz apenas de se replicar sem causar efeitos patogênicos. Nesses estudos, foi também constatado que ocorria após a infecção experimental dessas aves não galiformes a eliminação e a transmissão desse vírus para galinhas SPF colocadas em contato, as quais sofriam a forma mais grave da infecção e apresentavam alta mortalidade.

Além disso, alguns estudos epidemiológicos têm revelado que determinadas estirpes circulantes do VDN, têm sido responsáveis por surtos da DN em alguns países da América do Sul, embora exista pouca informação

disponível sobre a epidemiologia e evolução dessas estirpes do VDN, nessa região ou até mesmo em outras regiões da América Central e do Norte. Isso tudo evidencia a importância de se considerar aqui a necessidade de elucidar um possível papel da estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 na epidemiologia e evolução das estirpes similares do VDN, que circularam ou ainda circulam na América do Sul, e possivelmente nas Américas Central e do Norte.

Portanto, a identificação de estirpes do VDN tem uma importância muito grande no diagnóstico da doença, principalmente em países onde diferentes tipos de vacinas formuladas com estirpes atenuadas são utilizadas, como é o caso do Brasil, onde há quase 50 anos são usadas esses tipos de estirpes vacinais, com destaque para a estirpe vacinal LaSota do VDN. Apesar disso, existe pouca informação disponível sobre a epidemiologia molecular e a evolução dessas e de outras estirpes do VDN em nosso país, o que realça a importância de que seja feita uma vigilância epidemiológica molecular constante, já que uma considerável diversidade genética tem sido detectada entre as estirpes do VDN em outras partes do mundo, as quais podem partilhar parâmetros temporal, geográfico, antigênico e ou epidemiológico.

Dessa forma, e contando com o aprimoramento dos novos procedimentos para o sequenciamento de nucleotídeos, denominados de tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS), surgiu uma alternativa poderosa para estudos de genômica estrutural e funcional de vários organismos. Essas tecnologias promovem o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em um único procedimento, tornando mais acessível a determinação das sequências nucleotídicas de genomas completos de diferentes tipos de organismos.

Ademais, tendo em vista que apenas existem partes do genoma do VDN, isto é, os genes das proteínas de matriz (M) e glicoproteína de fusão (F) de isolados brasileiros do VDN sequenciadas e publicadas nos bancos de dados e de tudo o que foi descrito anteriormente e, sobretudo, em vista da importância desse agente etiológico, o presente estudo se propõe a sequenciar o genoma de uma estirpe vacinal (LaSota) de uso comercial no Brasil e de um

isolado de campo brasileiro patogênico (APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75) do VDN da década de 70, com o intuito de se comparar e caracterizar estas duas estirpes com relação as suas propriedades genômicas e correlacioná-las filogeneticamente com outras estirpes desse mesmo vírus, cujos genomas completos encontram-se disponíveis no Banco de Sequências Genômicas.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Doença de Newcastle

2.1.1. Histórico e aspectos gerais

A DN, também conhecida como pseudo- peste aviária, pneumoencefalite aviária ou desordem neuro-respiratória, faz parte das enfermidades emergenciais listadas no Código Zoosanitário Internacional da Organização Mundial de Saúde Animal – OIE. É considerada em todo o mundo, uma das mais importantes doenças virais em aves não só devido a sua alta mortalidade e gravidade, mas também por causa do grande impacto econômico que resulta na obrigatoriedade de notificação aos órgãos competentes, impondo restrições e embargos comerciais às áreas e países onde os surtos ocorrem com sérias consequências socioeconômicas e/ou de saúde pública (OIE, 2008; BRASIL, 2007).

O primeiro surto da DN no mundo foi relatado em 1926, na Ilha de Java, na Indonésia e também no mesmo ano em Newcastle, na Inglaterra (ALEXANDER, 1997, SEAL et al., 2000). No Brasil, o primeiro surto da DN ocorreu simultaneamente em duas regiões, em Belém do Pará e em Macapá, por volta de 1953 (SANTOS et al., 1954), sendo que o isolamento viral foi realizado por CUNHA e SILVA em 1955. A entrada do VDN no país foi atribuída à importação de carcaças de aves contaminadas procedentes dos EUA para hotéis da capital paraense (CUNHA e SILVA, 1955). Essa amostra de vírus foi designada de M33 e caracterizada biologicamente (OLIVEIRA et al., 2000).

Posteriormente, foram assinalados surtos esporádicos nos Estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais, que foram rapidamente controlados através de vacinação e medidas profiláticas complementares (SANTOS et al., 1954). Após o 1º impacto na década de 50 no Brasil, embora endêmica, foi observada apenas esporadicamente, acometendo plantéis de pequena expressão,

controlando-se rapidamente os focos através de vacinação e medidas profiláticas complementares. A enfermidade da DN ressurgiu na década de 70, sob a forma newcastle viscerotrópica (altamente patogênica). No período de 1970 a 1975 a DN teve uma prevalência de 10.7% (1350 focos) na indústria avícola do Estado Minas Gerais e de catorze Estados do Brasil. Nos vinte anos posteriores vários focos da DN ocorreram no país, porém com menor intensidade.

Após alguns anos sem a ocorrência de novos casos da doença, em 2006, foi isolada uma estirpe do APMV-1 em frangos de consumo familiar na região sul do país. Medidas de controle, entre as quais sacrifício das aves, quarentena, barreiras sanitárias, isolamento e desinfecção da área acometida foram tomadas, restringindo a propagação do VDN (FLORES, et al., 2006). Porém, segundo alguns autores, a DN continua endêmica no Brasil, bem como em toda a América do Sul, servindo, por isso, como fonte constante de disseminação do vírus, principalmente por meio do tráfico de aves silvestres (SEAL, et al., 1998; CLAVIJO et al., 2000).

A DN causa uma variedade de sintomas que vão desde uma doença subclínica, problemas respiratórios leves e diminuição da produção de ovos, até uma infecção respiratória aguda (tosse, espirro e estertores) frequentemente seguida por manifestações nervosas, diarreia e edema da cabeça (ALDOUS e ALEXANDER, 2001). Mortalidades com estirpes patogênicas podem rapidamente exceder 90% em galinhas e perus, porém em aves silvestres, como perdiz, codorna, avestruz, psitacídeos e aves domésticas como patos, marrecos e gansos, a infecção pode não apresentar nenhuma sintomatologia (ALEXANDER, 2009).

Em um estudo sobre a prevalência do VDN em frangos de corte no Brasil, Orsi et al. (2010) demonstraram a presença de vírus circulante, de estirpes não virulentas, em regiões do país onde não há vacinação. A soropositividade e o isolamento do vírus nos Estados onde não é feita a vacinação contra a DN pode ser explicada pelo alto número de pássaros que se concentram em algumas regiões e à possível proximidade entre criação de diferentes tipos de aves ou até mesmo por falhas no manejo sanitário nas

granjas.

2.1.2. Patologia

A DN é considerada uma das maiores causas de perdas econômicas da avicultura mundial, e para alguns autores é uma das doenças animais mais importantes (ALEXANDER, 2001). É uma enfermidade viral aguda, notificável, altamente contagiosa que acomete aves silvestres e comerciais. Os sinais clínicos podem variar entre quadros gastrointestinais agudos, acompanhados de anorexia, letargia e cianose, até conjuntivite, edemas, diarreia (fezes esverdeadas) e doença respiratória aguda com exudatos em trato respiratório superior e dispneia, ou ainda doença crônica do sistema nervoso central com opistótono, torcicolo, tremores e paralisia de membros (ZANETTI, 2005).

A manifestação clínica e a mortalidade variam segundo a patogenicidade da amostra do vírus e a espécie aviária infectada. Infecções pelo VDN já foram estabelecidas em pelo menos 241 espécies de aves, representando 27 das 50 ordens da classe (ALEXANDER et al., 2004).

O VDN é mais severo em galinhas, guínés, faisões, codornas e pombos, pode ser encontrado em uma forma mais branda em perus, patos e gansos; ser carregado por pássaros, canários, psitacídeos e outras aves silvestres; podendo, ainda, não apresentar qualquer sinal clínico da doença (Center for Infectious Disease Research e Policy – CIDRAP, 2003). Muitos subtipos sorológicos do VDN têm sido isolados de aves aquáticas silvestres assintomáticas, por isso acredita-se que as aves silvestres são os reservatórios naturais do vírus, e que possuem um importante papel como agentes transmissores na disseminação da doença para aves domésticas (ALEXANDER, 1995; DEIBEL, 1985).

Tradicionalmente a patogenicidade pode ser medida por testes biológicos e variar como muito alta, intermediária e muito baixa, e ser classificada, respectivamente como velogênica, mesogênica e lentogênica (JONES, 2006). Atualmente, métodos moleculares baseados na reação em cadeia pela polimerase (PCR), sequenciamento de nucleotídeos, e dedução da sequência de aminoácidos no sítio de clivagem da glicoproteína de fusão (F) também têm sido utilizados para determinar a virulência de novos isolados (JESTIN e JESTIN, 1991; SEAL, 1996; ALEXANDER, 2003; WISE, 2004).

Testes de inoculação em pintos de 1 dia de idade e em ovos embrionados de galinha, livres de patógenos específicos (SPF), tais como índice de patogenicidade intracerebral (IPIC), índice de patogenicidade intravenosa (IPIV), ou tempo médio de morte embrionária (TMME), permitem caracterizar e classificar o VDN em cinco patótipos bem definidos. Por patótipo entende-se o grau de patogenicidade do vírus e, portanto, severidade da doença causada por determinada estirpe de vírus.

Estirpes altamente patogênicas do VDN pertencem aos patótipos determinados: viscerotrópico e velogênico ou também conhecida como “forma de Doyle” que causa a doença severa e fatal com alta mortalidade em galinhas e os principais sintomas são apatia, diarreia esverdeada e lesões hemorrágicas principalmente nos intestinos; neurotrópico e velogênico ou “forma de Beach” que provoca problemas respiratórios como espirros e corrimento nasal ou ruído dos pulmões, inchamento da cabeça e face, fraqueza, sintomas nervosos como torcicolo, paralisia das pernas e tremores musculares e finalmente ocorre a mortalidade, a qual pode chegar até a 100% das aves; outros patótipos menos patogênicos são os vírus classificados como mesogênicos ou “forma de Beaudette”, que podem causar apenas leves sintomas respiratórios nas aves, queda de postura em poedeiras e atualmente podem ocorrer também sintomas nervosos, mas a mortalidade das aves é normalmente baixa e mais comum em aves jovens; lentogênicos ou “forma de Hittchner” são comumente usadas como estirpes vacinais e podem causar sintomas respiratórios brandos em aves jovens dependendo da estirpe vacinal utilizada; há ainda um último tipo, não patogênico, conhecido como entérico assintomático, que não causa sintomas ou lesões nas aves e também tem sido utilizado como vacina. Portanto, nem todas as estirpes do VDN causam a doença (BEARD, 1984).

2.2. O agente etiológico da Doença de Newcastle

2.2.1. Classificação

O VDN pertence à Ordem *Mononegavirales*, à Família *Paramyxoviridae* que é subdividida em duas subfamílias: *Pneumovirinae*, composta de um único gênero, o *Pneumovirus*, incluindo os pneumovirus aviários; e a subfamília

Paramyxovirinae, na qual estão incluídos três gêneros, dentre eles o *Avulavirus*, tendo o vírus da Doença de Newcastle - Paramyxovirus Aviário Tipo 1 (APMV1 – “Avian Paramyxovirus Type 1”) como representante (Figura 1).

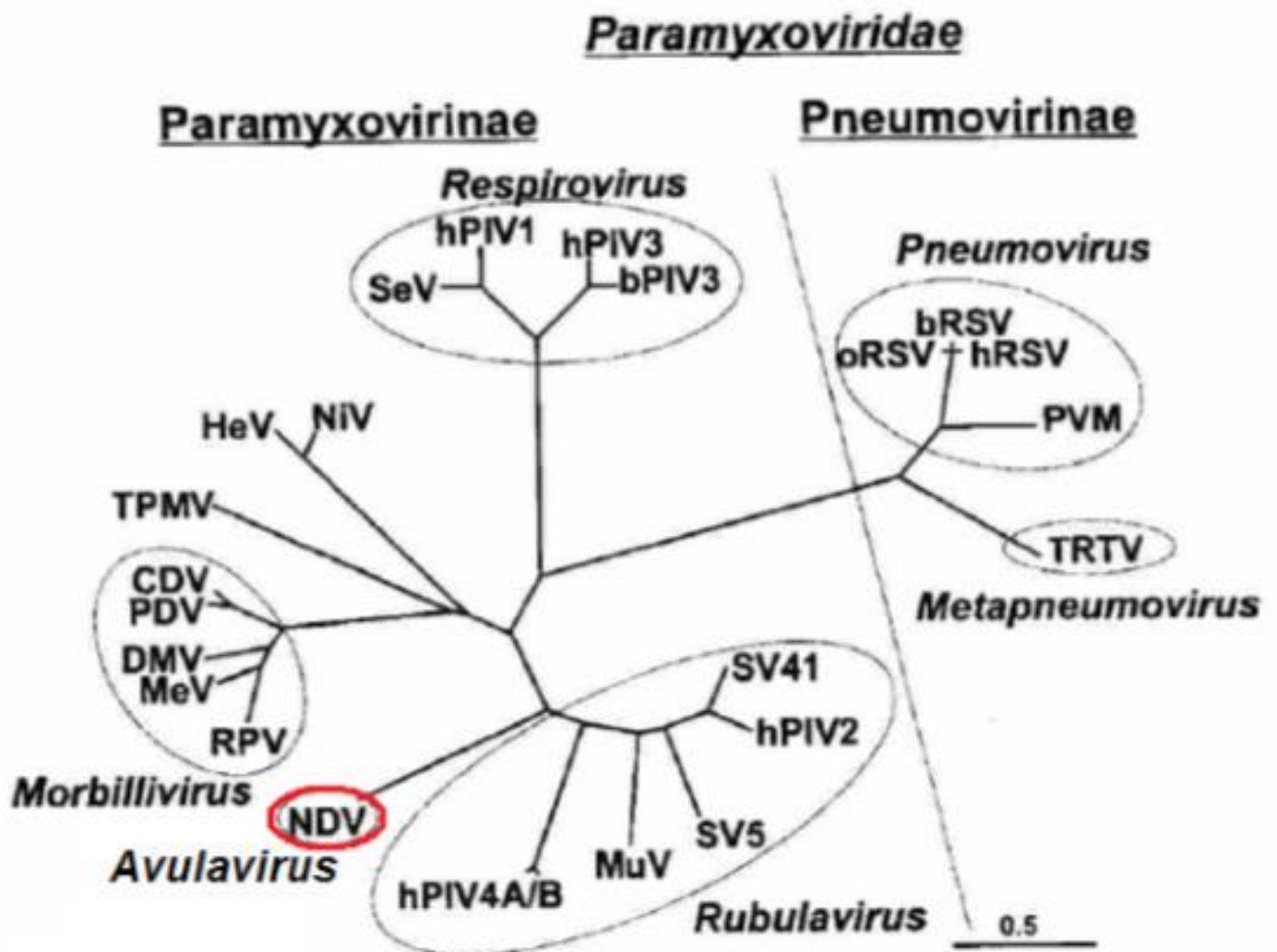


Figura 1. Classificação dos membros da família *Paramyxoviridae* (adaptado de COLLINS, 2001).

De acordo com a OIE, da qual o Brasil é signatário, “A Doença de Newcastle” é uma doença infecciosa das aves causada por um Paramyxovirus aviário do sorotipo 1 (APMV-1), que apresenta um dos seguintes critérios de virulência: apresentar Índice de Patogenicidade intracerebral (IPIC) em aves jovens, da espécie *Gallus gallus*, SPF de um dia de idade, maior que 0,7; ou a

presença de mais de um aminoácido básico (arginina ou lisina) no sítio de clivagem da glicoproteína de fusão (F0), que pode ser demonstrada através de sequenciamento de nucleotídeos do genoma viral, uma sequência codificadora de aminoácidos básicos na posição carboxi-terminal da proteína F2, sendo fenilalanina na posição 117 da extremidade amino-terminal da proteína F1. Nesse caso, o termo “múltiplos aminoácidos básicos” usado para caracterizar a proteína F das estirpes mais virulentas do VDN, refere-se aos três últimos resíduos de arginina ou lisina entre as posições 113 e 116 dessa mesma proteína (ALEXANDER, 2003). Estes critérios é que caracterizam a ocorrência de doença, definindo assim as áreas que oferecem risco ou não de levarem e introduzirem a doença em regiões ou países considerados não endêmicos. Com isso determina-se também o estabelecimento de barreiras sanitárias no comércio interno e externo de aves e subprodutos avícolas, acarretando em enorme prejuízo econômico aos países com notificação da DN (OIE, 2004).

Baseado na análise da sequência de nucleotídeos do gene que codifica a glicoproteína de fusão (F), dezesseis genótipos diferentes foram identificados, sendo dispostos em dois grandes grupos (classes I e II). A classe I contém um genótipo único, os vírus são encontrados no mundo todo e têm sido isolados principalmente de aves aquáticas e marinhas. Já, a classe II é constituída por estirpes virais que são divididas em dezesseis genótipos, sendo os genótipos V, VI, VII e VIII predominantes e circulantes no mundo todo (MILLER et al., 2009; MILLER et al., 2010; DIEEL et al., 2012a; DIEEL et al., 2012b) (Figura 2).

Ainda no gênero *Avulavirus* existem outros sorotipos, Paramyxovirus Aviários Tipo 2 ao 9. Além destes existem ainda estirpes denominadas Paramyxovirus Tipo 1 provenientes de pombos (PPMV-1 – “Pigeon Paramyxovirus Type 1”). Essas estirpes são variantes do APMV-1 que após sucessivas passagens em outras espécies de aves, sofreram um mecanismo de adaptação aos pombos, tornando-se não-patogênicas a essa espécie (ALEXANDER, 2009) (International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV, 2010).

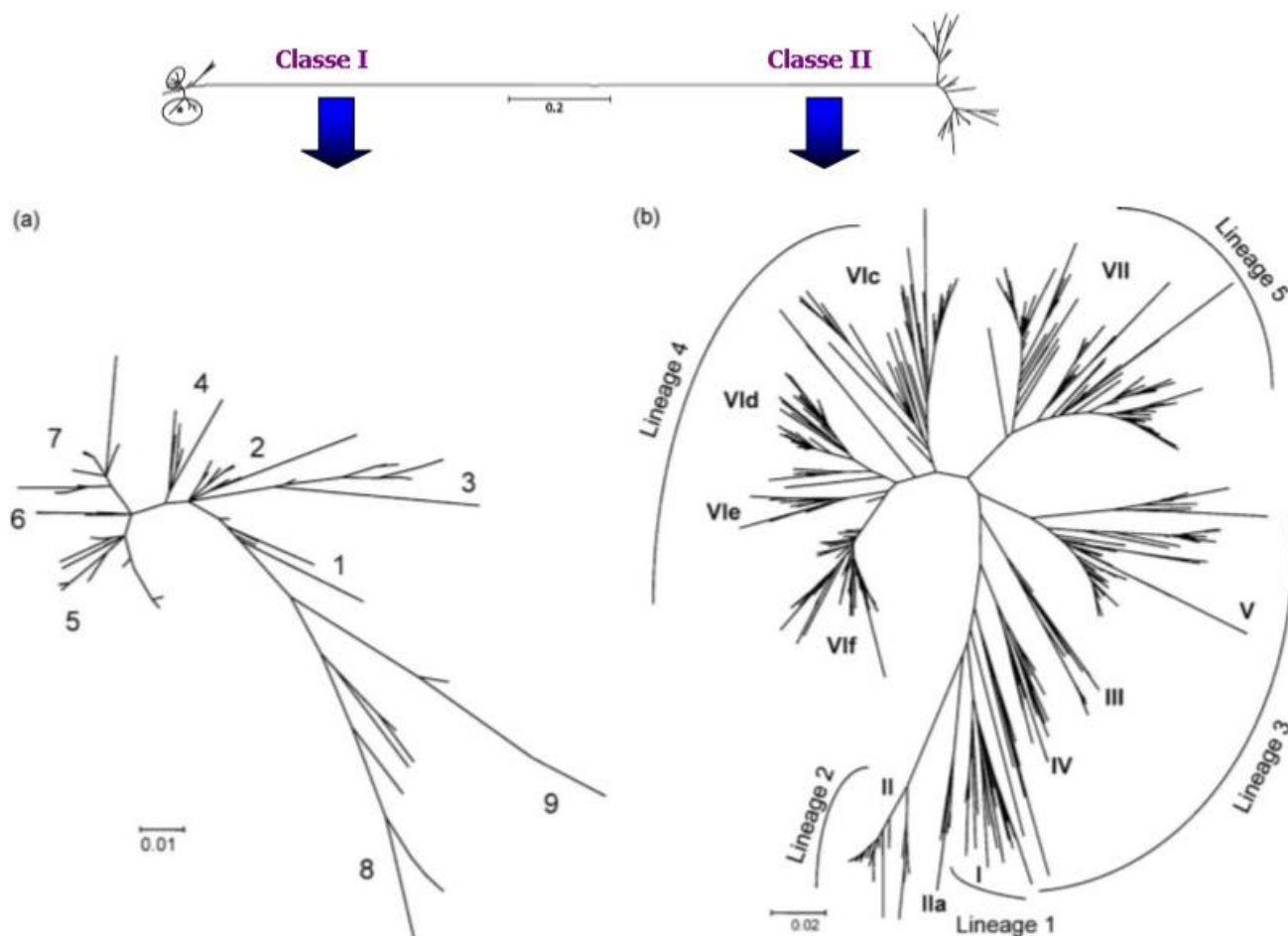


Figura 2. Análises filogenéticas classificam os VDN em duas classes: I e II. Na classe I os vírus são encontrados principalmente em aves silvestres aquáticas. A classe II é dividida em 16 genótipos, I ao XVI, e os vírus encontrados principalmente em galiformes. (a) Vírus da classe I. (b) Vírus da classe II (Adaptado de MILLER et al., 2010).

2.2.2. Características estruturais e genéticas

Os virions do VDN são envelopados, pleomórficos, muitas vezes esféricos de aspecto rugoso e se apresentam com um diâmetro entre 100 a 500 nanômetros. Seu genoma é composto por RNA de fita simples, não segmentado, de polaridade negativa e contendo cerca de 15,2 kilobases (ALEXANDER, 2003; ARNS et al., 2007; SAMSON, 1988), sendo sempre dispostos em múltiplos de seis, o que configura a chamada “rule of six”, fato que se aplica a replicação otimizada deste agente (PEETERS et al., 2000; HUANG et al., 2004; CZEGLÉDI et al., 2006; KATTENBELT et al., 2006; CHO et al., 2007).

O genoma deste vírus codifica seis proteínas estruturais importantes: a proteína de nucleocapsídeo (NP), a fosfoproteína (P) e a grande proteína (L), que são associadas ao nucleocapsídeo; a glicoproteína de fusão (F), que se constitui nas menores projeções na superfície das partículas virais; a glicoproteína hemaglutinina-neuraminidase (HN), responsável pela atividade da hemaglutinina e neuraminidase, sendo que estas últimas formam os dois tipos de projeções vistas na superfície das partículas virais; e a proteína de matriz (M) (YUSOFF e TAN, 2001) (Figura 3).

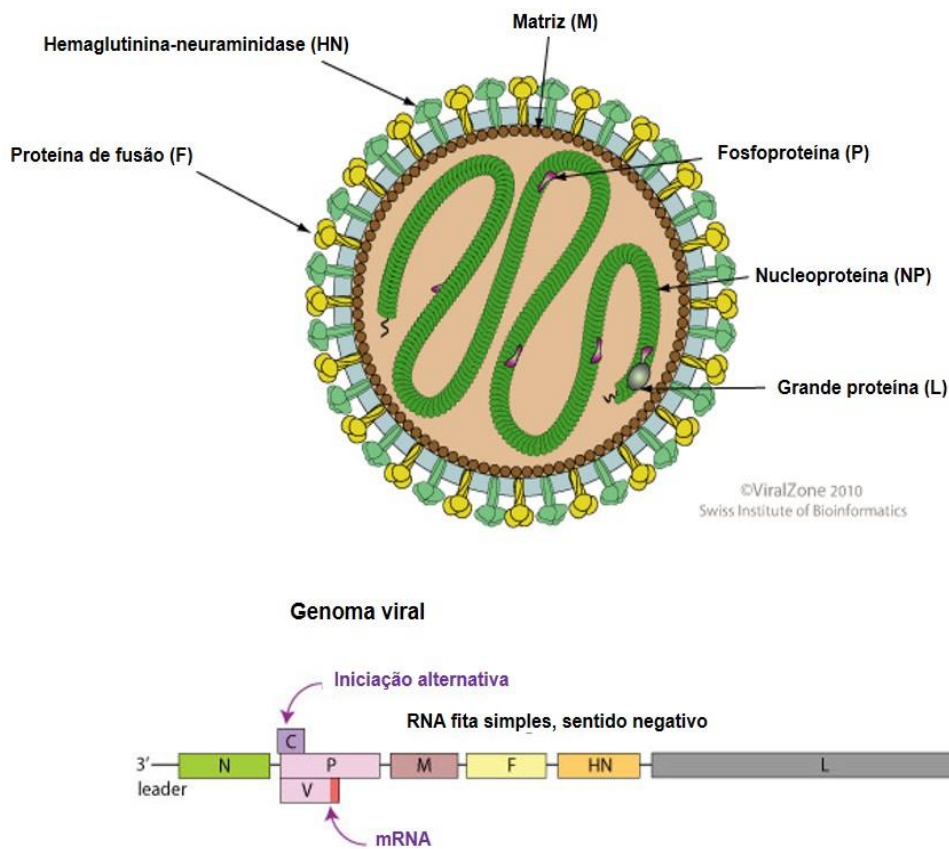


Figura 3. Esquema do genoma do Vírus da Doença de Newcastle e organização estrutural das proteínas. Estão destacadas as seis proteínas estruturais principais: a proteína de nucleocapsídeo (NP); a fosfoproteína (P); a grande proteína polimerase (L); a proteína de matriz (M); a glicoproteína hemaglutinina-neuraminidase (HN) e a glicoproteína de fusão (F). Disponível em: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/556.html. Acesso em 15/11/2013.

As proteínas estruturais de envelope, a glicoproteína HN e a glicoproteína F têm papéis importantes na relação com o hospedeiro, pois

conferem a função de adesão e fusão da partícula viral à membrana celular do hospedeiro.

A glicoproteína HN é responsável pela adsorção do vírus a receptores contendo ácido siálico e também possui atividade de neuraminidase (MIRZA et al., 1994). Esta proteína encontra-se ancorada à membrana viral pela extremidade hidrofóbica N-terminal e é o principal alvo antigênico da resposta imune do hospedeiro (IORIO et al., 1991). Sua estrutura tridimensional ainda não está bem elucidada, mas usando anticorpos monoclonais (MAbs) foram identificados quatro sítios antigênicos distintos que parecem estar associados com regiões conservadas e imunodominantes da proteína HN nas posições 193-201, 345-353, 513-521 e 494-569 (NAGY et al., 1990; NISHIKAWA et al., 1986). A região entre os resíduos 345 a 353 constitui o único epítipo linear da proteína, sendo os demais dependentes de modificações pós-traducionais (ALAMARES et al., 2005). Outro achado relevante é que os epítopos que induzem anticorpos neutralizantes são exclusivamente localizados no domínio globular, a partir do resíduo 47 (PEETERS et al., 2001).

A glicoproteína F é sintetizada em uma forma precursora, a F₀, e só tem capacidade de fusão após a clivagem em dois polipeptídeos, F₁ e F₂. Entretanto, além da clivagem de F₀, ainda é fundamental a ação de HN para que ocorra a fusão (LEEuw e PEETERS, 1999; MERZ et al., 1981). A proteína HN é a responsável pela promoção do mecanismo de fusão mediado pela proteína F, o qual possibilita a penetração do vírus em células hospedeiras. A demonstração dessa dependência confirmou a hipótese de que a virulência do VDN é multigênica (HUANG et al., 2004).

A proteína de nucleocapsídeo (NP) é uma das mais importantes proteínas do VDN. Essa proteína mantém uma relação estreita com o genoma viral durante a replicação do vírus, através da síntese de nucleocapsídeo RNase resistente, proporcionando proteção às novas partículas virais sintetizadas em ação conjunta com as proteínas P e L. Quanto a proteína M, ela está presente em maior quantidade no interior do vírus, com a função de organizar a morfogênese do virion (KHO, 2001).

2.2.3. Replicação

O RNA genômico de todos os vírus de RNA fita negativa tem de servir a duas funções: primeiro como substrato para a síntese de mRNAs (RNA mensageiros), e segundo como substrato para a síntese da fita positiva antigenômica. Vírus de RNA fita negativa codificam e carregam própria RNA polimerase, porém os mRNAs só são sintetizados depois que os vírus infectam as células (LAMB, 1996).

A replicação viral ocorre no citoplasma da célula hospedeira e a adesão da partícula viral a célula se dá por intermédio da suas proteínas de superfície, HN, que é uma proteína multifuncional e o principal determinante antigênico dos paramixovírus. HN é responsável pela adsorção do vírus as moléculas de ácido siálico contidas na superfície celular e por sua clivagem (atividade neuraminidase), analogamente ao papel da proteína neuraminidase (NA) do vírus influenza, para prevenir a auto agregação das partículas virais durante o brotamento na membrana plasmática. Além disso, HN possui atividade promotora da proteína F (LAMB, 2007).

A penetração do vírus ocorre devido a fusão do envelope viral e a membrana plasmática celular, em pH neutro, causada pela proteína F. Como consequência, o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma e, depois de entrar e sofrer o desnudamento, RNAs virais encapsulados são transcritos pela RNA polimerase RNA-dependente associada ao nucleocapsídeo para produzir mRNAs, que serão traduzidos em proteínas virais. Estes catalisam a replicação do RNA através da síntese de fitas antigenômicas. A replicação produz mais fitas genômicas para adicionais transcrições e traduções de genes virais, e para a montagem, com proteínas estruturais, de partículas virais progenitoras (LAMB, 2007). O ciclo total de replicação do VDN está esquematizado na Figura 4.

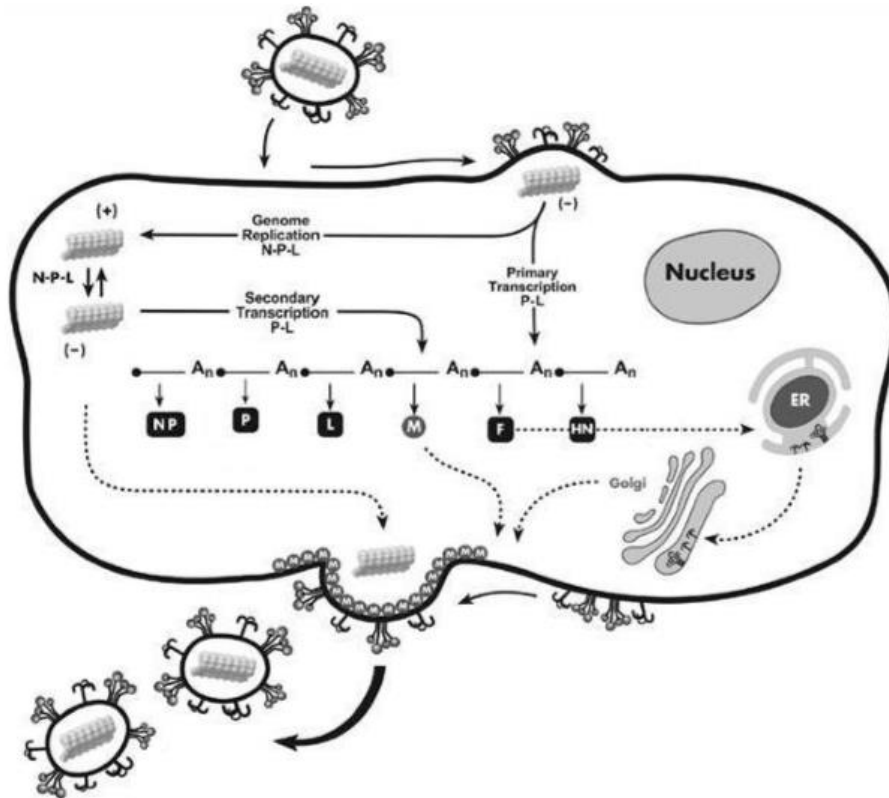


Figura 4. Representação esquemática do ciclo de vida dos paramixovírus (Adaptado de LAMB, 2007).

Além da fusão viral celular, a proteína F inserida na membrana plasmática de células infectadas pode causar sincícios, mediante a fusão com células vizinhas, ao longo da infecção. Este efeito citopático pode levar a necrose do tecido *in vivo* e imagina-se tratar de um mecanismo de disseminação viral (LAMB 2007).

No caso do VDN, a proteína F também é importante por estar correlacionada a virulência do vírus. Linhagens virais com mais de um resíduo de aa básico no sítio de clivagem F₀ são consideradas virulentas e rapidamente se disseminam pelo hospedeiro, enquanto que linhagens virais com a molécula F₀ contendo apenas um único resíduo de aa básico são avirulentas e tendem a permanecerem restritas ao trato respiratório onde a protease secretada pode ser encontrada (NAGAI, 1977).

A proteína F é um homotrímero que é sintetizada como um precursor (F₀). Para ser biologicamente ativa, ela precisa ser clivada pela protease da célula hospedeira no sítio de ativação da clivagem. A clivagem libera o novo N-

terminal de F1, formando assim a proteína biologicamente ativa, que consiste de cadeias de dissulfetos ligados F1 e F2 (é importante ressaltar que F1 e F2 não são domínios separados na estrutura atômica de F e, portanto, não são partes individuais da proteína).

A ativação proteolítica de F0 envolve ação sequencial de duas enzimas, uma protease que cliva o lado carboxílico de um resíduo de arginina, e uma carboxipeptidase que remove resíduos básicos. F0 com mais de um resíduo de aa básico no sítio de clivagem facilita a ação de proteases intracelularmente, e assim, interfere na habilidade destas em clivar a proteína de diferentes patótipos, resultando numa infecção sistêmica fatal (GOTOH, 1992; OGASAWARA, 1992).

Paramixovirus que possuem proteína F com um único resíduo básico de aa no sítio de clivagem, geralmente não são clivados quando crescem em culturas de tecidos celulares e, por isso, apenas um único ciclo de crescimento é obtido. Contudo, o precursor F0 que é expresso na superfície celular e incorporado aos vírus liberados pode ter sua clivagem ativada pela adição de protease exógena, permitindo múltiplas rodadas de replicação (LAMB, 2007).

Ainda no que diz respeito à replicação do VDN, Domingo (2002) demonstrou que devido à baixa fidelidade da enzima polimerase (transcriptase), há certamente a possibilidade de formação de novos genomas e novos virions, relacionados, porém distintos, caracterizando o que se denomina quasispecies. O conjunto de múltiplos genomas gerados na condição de quasispecies está relacionado com a sobrevivência e a evolução dos RNA vírus, caracterizada pela concomitância da ocorrência de mutações e maior adaptabilidade viral às pressões seletivas, especialmente do sistema imune do hospedeiro, gerando assim variação no genoma viral, por mutação espontânea ou por mecanismo de fuga da resposta imune (PERALES et al., 2005; SNOECK, 2008).

2.3. Hospedeiros do Vírus da Doença de Newcastle

A doença ataca com maior frequência os galináceos de todas as idades e particularmente galinhas e perus, de preferência nos meses frios. A susceptibilidade diminui na proporção em que as aves ficam mais idosas. Os

palmípedes (pato, ganso) e o pombo (*Columba livia*) são pouco susceptíveis. O VDN pode atacar outras aves, como o cisne (*Cygnus olor*), o pardal (*Passer domesticus*), a perdiz (*Rhynchotus rufescens*), a codorna (*Nothura maculosa*), o corvo (*Corvus corax*), a pomba-rôla (*Streptopelia turtur*), a coruja (*Tyto alba*), o mergulhão (*Mergus octosetaceus*), o faisão (*Crossoptilon mantchuricum*), a avestruz (*Struthio camelus*) e outras aves. Convém lembrar que poucas espécies de aves seriam refratárias a uma infecção maciça com o VDN. Conforme Paulillo e Doretto Júnior (2009), o VDN é capaz de infectar, experimentalmente ou naturalmente, mais de 241 espécies de aves, representando 27 das 50 ordens de aves existentes.

O VDN tem sido declarado como agente infectante em várias espécies animais. Além das aves, o vírus pode infectar espécies de répteis (principalmente serpentes), e mamíferos (PAULILLO e DORETTO JÚNIOR, 2009). O ser humano é sensível, e a infecção se manifesta em forma de conjuntivite. Há, entretanto, casos de infecções generalizadas nas quais os sintomas possam ser dor de cabeça, mal-estar e calafrios.

2.4. Epidemiologia da Doença de Newcastle

A DN é considerada uma doença de distribuição mundial, com áreas endêmicas e áreas consideradas livres da doença. O VDN possui a capacidade de se difundir por todo o mundo por meio de aves susceptíveis, pessoas, equipamentos, ar, ração e até por espécies não aviárias, entre as quais, pequenos roedores, insetos e artrópodes, que transitam entre as aves infectadas e as não infectadas susceptíveis (LANCASTER, 1964; LANCASTER e ALEXANDER, 1975; ALEXANDER, 1991; ALEXANDER, 1997). Durante o curso da infecção por uma estirpe velogênica do VDN, a maioria das aves excreta grande quantidade de vírus nas fezes, que se constituem no principal meio de disseminação do VDN entre as aves (NISHIZAWA et al., 2007).

No final do ano de 1960, uma panzootia de DN atingiu vários países no Oriente Médio, provavelmente devido ao intenso comércio de espécies de psitacídeos oriundos principalmente da América do Sul, da América Central e do Sudeste da Ásia, transportados por aviões, e atingiu todos os continentes e muitos países até o ano de 1973. Uma terceira panzootia emergiu inicialmente

do Oriente Médio, em 1970, onde a principal forma de difusão deu-se através da exposição, competição e comercialização de pombos e a sua presença foi confirmada em mais de vinte países, incluindo aqueles da Europa, no Canadá, nos EUA, Hong Kong e no Sudão. Em alguns países, a doença acometeu outras aves silvestres assim como a avicultura comercial sob a forma de doença neurotrópica (McNULTY et al., 1988).

Na Inglaterra, em 1984, uma amostra viral isolada de pombos foi responsável por vinte surtos da doença em frangos de corte, como resultado da ingestão de ração contaminada com VDN, o mesmo também ocorreu com um lote de faisões (ALEXANDER, 1988; ALEXANDER et al., 1984).

As aves silvestres são consideradas reservatório natural de estirpes do VDN, com capacidade de causar a doença e podem estar envolvidas nos surtos que ocorrem em aves domésticas (CAMENISCH et al., 2008). A alta densidade populacional e a localização de plantéis em áreas de concentração de aves silvestres ou ainda, próximo a rotas de aves migratórias ou mesmo o tráfico de animais silvestres têm sido responsáveis pelo aumento significativo da DN (VERNOERD, 2000; SEAL et al., 1998; CLAVIJO et al., 2000).

No Brasil, há registros de detecção de anticorpos específicos e de isolamento do VDN em aves silvestres no Estado do Rio de Janeiro e de Pernambuco, sendo que essas espécies de aves foram consideradas reservatórios desse vírus para as aves de produção comercial (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2003; SILVA et al., 2006). Além disso, em outro estudo no município de Galinhos, Estado do Rio Grande do Norte, foi detectada a presença de estirpes do VDN de baixa patogenicidade em suabes cloacais de aves migratórias (ARAÚJO et al., 2010).

As principais vias de transmissão do VDN em criações de aves domésticas ocorrem por aerossóis provenientes de aves infectadas diretamente ou indiretamente através do contato com produtos contaminados por esses aerossóis. Quanto à infecção de seres humanos pelo VDN a transmissão ocorre a partir do contato com aves infectadas.

No Brasil não há relatos de infecção pelo VDN em humanos, porém trabalhos relatam que vírus vacinais ou de campo podem infectar o homem e manifestar sinais clínicos como: cefaleia, lacrimejamento, edema de pálpebra e

consequentemente conjuntivite (HERNÁNDEZ, 1987; BEARD e HANSON, 1984).

O VDN é capaz de sobreviver no meio ambiente, água e matéria orgânica, dependendo das condições de temperatura e umidade, por um longo período de tempo e quase indefinidamente em materiais congelados. As vias de eliminação do vírus se dão através de secreções exsudativas do trato respiratório e das fezes. A transmissão do vírus através dos ovos causa a morte embrionária, e poucos são os embriões infectados que alcançam a eclosão. Entretanto, esses poucos pintos que saem dos incubatórios constituem um importante fator na disseminação da doença (ALEXANDER, 2003).

Os sítios naturais de predileção viral são essencialmente o aparelho respiratório e o tubo digestório; contudo, as mucosas conjuntival e cloacal também funcionam como sítios de infecção (ALEXANDER, 2003).

2.5. Medidas de controle da Doença de Newcastle

2.5.1. Vacinação

Aliada às medidas de biosseguridade que as granjas devem possuir, a vacinação é o instrumento mais eficiente no controle e prevenção da DN (ALEXANDER, 2009). Usualmente, para aves de corte, recomenda-se uma vacinação na água de beber aos 10 a 12 dias e uma revacinação aos 30 a 35 dias de idade. Já no caso das galinhas poedeiras, além destas duas vacinações citadas, há necessidade de que se vacinem aos 90 ou 120 dias, através da via intramuscular profunda, no peito (MALAVAZZI, 1999).

No Brasil, os esforços para a profilaxia da DN estão orientados para a imunização ativa, mediante o emprego convencional de vacinas vivas de caráter lentogênico, sendo empregadas, sobretudo as estirpes B1 e LaSota. No entanto, algumas estirpes vacinais não são indicadas para aves de um dia. Outras, não são apropriadas para serem administradas pela via spray. Alternativamente, para a primeira vacinação, as estirpes B1, Ulster ou VG-GA, que são mais atenuadas podem ser utilizadas. Por outro lado, a estirpe LaSota, por ser menos atenuada, deve ser utilizada para a segunda vacinação (JORGE

et al., 2002; NUNES et al., 2002).

No geral, o calendário vacinal deve ser regulamentado e planejado pelo plano nacional de defesa sanitária de cada país. A avaliação de fatores como a presença da imunidade passiva; estado imune; via de aplicação; estado nutricional; tamanho dos lotes; presença ou não de outros agentes patogênicos; condições de instalação e clima; histórico e custo da vacina são inevitáveis para o desenvolvimento do programa vacinal (ALEXANDER, 2009).

2.5.2. Monitoramento sorológico

Em áreas onde não se utilizam programas de vacinação, e/ou, em área onde a DN está erradicada, os testes sorológicos podem ser utilizados como meio de diagnóstico. Porém, os resultados positivos podem não refletir a manifestação da doença (THAYER, 1986).

A redução gradual na ocorrência da enfermidade é devido a controles intensivos na criação comercial, por meio de programas de vacinação eficientes, além dos esforços do governo federal, através do Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA). Entretanto, a DN continua endêmica no Brasil, bem como no restante da América do Sul, servindo, por isso, como fonte constante de disseminação do vírus, principalmente por meio do tráfico de aves silvestres (SEAL et al., 1998; CLAVIJO et al., 2000; OIE, 2008).

A avaliação da resposta imune humoral é considerada um dos fatores mais importantes para monitoramento de programas vacinais da DN. Brentano et al. (2000) afirmaram que o levantamento sorológico é de extrema importância na avaliação das condições sanitárias de plantéis, definindo a eficácia de programas de vacinação e a real situação do vírus no ambiente.

O Departamento de Saúde Animal (DSA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) tem desenvolvido ações para evitar o ingresso da doença no Brasil. O MAPA realiza vigilância sanitária sobre o material genético no ponto de ingresso (portos, aeroportos e fronteiras), bem como controle de importação de aves destinadas a reposição genética e vigilância ativa para influenza aviária e DN, em aves migratórias, plantéis avícolas comerciais e de subsistência (BRASIL, 2007).

A vacinação e melhoria das condições zootécnicas, para criadores de aves caipiras, o isolamento sanitário de criações industriais das aves de vida livre e a vigilância sorológica constante poderiam contribuir para redução do problema (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2005).

2.6. Diagnóstico Laboratorial

A DN, segundo a OIE, é uma doença de notificação compulsória. O laboratório de referência para diagnóstico do VDN é o Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), que é uma unidade do MAPA localizada em Campinas, São Paulo. A confirmação deve ser feita pelo isolamento e identificação do agente viral e através de testes de patogenicidade como: Índice de Patogenicidade Intracerebral (IPIC), Índice de Patogenicidade Intravenosa (IPIV) e o Tempo Médio de Morte Embrionária (TMME) (BRASIL, 2007). Reações sorológicas positivas servem para fazer o imunodiagnóstico e ainda detectam casos subclínicos da infecção pelo VDN (THAYER, 1986).

Os sinais clínicos e as lesões causadas pela infecção não são caracterizados como patognomônicos para a DN, só o diagnóstico laboratorial é confirmatório. O isolamento e identificação viral são considerados o método de diagnóstico definitivo (ALEXANDER, 2003).

O isolamento viral é realizado em ovos embrionados SPF com 9 a 11 dias de incubação, através da inoculação da amostra na cavidade córion-alantoide. Após 48 horas, ou após a morte dos embriões, o líquido córion-alantoide é colhido e analisado pelo teste de hemaglutinação (HA). Com resultado positivo prossegue-se com o teste de inibição da hemaglutinação (HI), que fornecendo um resultado positivo leva à realização da técnica de neutralização viral e teste de caracterização de patogenicidade, através de inoculação em ovos embrionados e aves (ALEXANDER, 2003; OIE, 2008).

Uma ampla variedade de testes sorológicos foi desenvolvida para detectar anticorpos contra o VDN, entre eles a imunodifusão radial, hemólise radial, neutralização em placa e HI (ALEXANDER e MANVELL, 2002) e mais recentemente os ensaios imunoenzimático em fase sólida (ELISA: “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) (RICTHZENHAIN et al., 1993; CZIFRA et al.,

1996; SOUSA et al., 1999; SILVA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2013).

O teste de HI, entretanto, é tradicionalmente utilizado como prova padrão na detecção de anticorpos contra o VDN em aves (SOUSA et al., 1999). No entanto, o teste de HI tem valor limitado para detecção de anticorpos devido a sua baixa sensibilidade e reatividade cruzada de subtipos (THAYER, 1986; ROWE et al., 1999; PEIRIS et al., 2007; PRABAKARAM et al., 2009). Pesquisadores mostraram que o teste HI pode ter a sensibilidade aumentada com o uso da subunidade HN ao invés do vírus inteiro (ROWE et al., 1999).

Além disso, o ELISA, através do método indireto, tem sido muito usado no lugar do teste de HI, para o monitoramento e estudos de soro prevalência da DN, principalmente devido a possibilidade de processamento de um grande número de amostras de soro (RICHTZENHAIN et al., 1993; SOUSA et al., 1999; YUSOFF e TAN, 2001; SILVA et al., 2009). O ELISA é ainda o teste sorológico mais utilizado na avicultura para outros agentes etiológicos por sua maior sensibilidade, especificidade, rapidez e maior facilidade de padronização (THAYER, 1986).

Outro meio de diagnóstico é a detecção e identificação do VDN por técnicas moleculares. Nesse sentido, ensaios para a detecção do genoma do VDN têm sido descritos na literatura como a hibridização de ácidos nucleicos e análise de RNA genômico viral. Podem ser empregados vários tipos de RT-PCR, tais como a PCR convencional e a PCR em tempo real, que podem ser seguidas por análises como RFLP e sequenciamento (GOHM et al., 2000; ALDOUS et al., 2000; KANT et al., 1997; PHAM et al., 2004; PHAM et al., 2005, YUSOFF e TAN, 2001).

As técnicas moleculares de diagnóstico têm despontado como uma alternativa interessante em comparação à metodologia convencional de caracterização viral, oferecendo vantagens em relação ao tempo de execução e ao custo (VIANNA et al., 2000). No manual da OIE a partir de 2000 a técnica de PCR passou a ser aceita e considerada padrão para diagnóstico da DN, através da avaliação da sequência de nucleotídeos codificadora da sequência de aminoácidos presentes na região de clivagem da proteína F do VDN (CREELAN et al., 2002).

A análise parcial da sequência de aminoácidos da proteína F feita por Orsi et al. (2010) de isolados brasileiros do VDN mostrou ser uma ferramenta poderosa para elucidar a diversidade das estirpes que circulam no país. Os sítios de clivagem da proteína F encontrados nestes isolados foram GKQ↓GR, GRQ↓GR, GKQ↓GA e GRT↓GR, sem aminoácidos dibásicos nas posições 112 e 115, juntamente com uma lisina, em vez de fenilalanina no resíduo 117, indicando que todos os vírus isolados apresentam características de estirpes avirulentas ou de virulência baixa, de acordo com os padrões da OIE (ALEXANDER, 2003).

A RT-PCR permite uma amplificação seletiva de um pedaço do material genético. Essa técnica tem sido muito utilizada no diagnóstico de doenças genéticas humanas, devido a sua capacidade de detectar mudanças passíveis de ocorrer em um segmento específico do genoma (JESTIN e JESTIN, 1991). Estes avanços biotecnológicos e o melhor entendimento da patogenicidade do VDN têm permitido o uso de procedimentos alternativos aos ensaios realizados *in vivo* para a caracterização de estirpes bem como da virulência do VDN (ALDOUS et al., 2000).

Com isso, tornou-se possível responder utilizando apenas um teste molecular, a três importantes questões: a presença ou ausência do vírus; determinação da patogenicidade, em face da existência de uma grande correlação entre biologia molecular e os índices dos testes *in vivo* e utilização dos dados encontrados em estudos de epidemiologia molecular (ALDOUS e ALEXANDER, 2001).

Sendo o VDN um RNA vírus, a RT-PCR é o ponto de partida para a maioria das técnicas moleculares a serem utilizadas para diferenciação de suas estirpes. Por meio da transcrição reversa, o RNA viral passa a DNA complementar (cDNA), que pode ser utilizado na PCR. Posteriormente, associado a outras técnicas moleculares tais técnicas permitem uma completa caracterização da estirpe viral, como por exemplo, o sequenciamento do genoma viral (ALDOUS e ALEXANDER, 2001).

A identificação de estirpes virais tem uma importância muito grande no diagnóstico da doença, principalmente em países onde diferentes tipos de

vacinas vivas são utilizados (BALLAGI-PORDÁNY et al., 1996). Consoante, revelam Aldous e Alexander (2001), em artigo de revisão sobre técnicas moleculares utilizadas no diagnóstico do VDN, apesar da ocorrência de mutações randômicas espontâneas e da existência de uma grande variabilidade genética, as técnicas moleculares certamente serão dominantes para a detecção, diferenciação e caracterização do VDN. Enfatizam ainda que, problemas decorrentes da variabilidade genética e mutações poderão ser solucionados por meio da utilização de oligonucleotídeos iniciadores e sondas altamente específicas.

2.7. Sequenciamento de Genomas

Desde a descoberta da estrutura do DNA por Watson e Crick, já se passaram mais de 50 anos. O DNA é responsável por armazenar as informações genéticas de um organismo, a partir de então iniciou-se uma busca por se obter e decodificar a informação localizada nos cromossomos (MIR, 2004).

O sequenciamento rápido de genomas tem sido um dos grandes desafios da genômica, ciência que estuda a estrutura e funcionamento do material genético de uma espécie (CHAN, 2005).

Enormes progressos têm sido feitos nos últimos anos na obtenção de sequências de um genoma completo. Desde o sequenciamento dos primeiros genomas completos (*Haemophilus influenzae* e *Mycoplasma genitalium*). O surgimento de novas tecnologias de sequenciamento denominadas sequenciamento de nova geração (NGS), tem contribuído para que a informação contida na sequência completa de genomas e genes de interesse aumente cada vez mais (CHAN, 2005; MIR, 2004).

A tecnologia NGS surgiu como uma alternativa poderosa para estudos de genômica estrutural e funcional. Essas tecnologias promovem o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em um único procedimento. O estudo destas informações nos permite entender aspectos integrados da biologia desses

organismos, inter-relacionar sequência, estrutura de proteínas, padrões de expressão gênica, interações e função de proteínas individuais e complexos proteínas-ácidos nucleicos, entender a história evolucionária de um organismo e direcionar modificações científicas de sistemas biológicos, além de apoiar aplicações nas áreas de medicina, agricultura e tecnologia (LESK, 2008).

2.8. Tecnologias de sequenciamento

Tecnologias de sequenciamento podem ser classificadas como o conjunto de instrumentos, materiais, protocolos e métodos que estão envolvidos na coleta, preparação e isolamento da amostra para o sequenciamento e a montagem da sequência final (CHAN, 2005). Um longo caminho é percorrido até o processo final de montagem e análise da sequência, normalmente dividida em duas fases relacionadas: uma fase experimental de bancada e uma fase de análise computacional.

Dentre as várias tecnologias que estão surgindo, podem-se citar as plataformas Solexa da Illumina, Ion Torrent e Ion Proton da Life Technologies, além de outras que começam a ser utilizadas como a Helicos da Heliscope, o PACBIO RS da Pacific Bioscience (CARVALHO e SILVA, 2010).

Estes métodos promoveram aumento exponencial na quantidade de dados gerados, dobrando a quantidade de bases submetidas em bancos públicos de sequências como NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a cada 18 meses. O NCBI em fevereiro de 2014, conta com mais de 75 milhões de sequências de nucleotídeos depositadas. Assim, a disponibilidade dos NGS e o avanço nas plataformas de bioinformática têm revolucionado o estudo de genomas e transcriptomas.

As tecnologias de sequenciamento de DNA em larga escala disponíveis no mercado diferem principalmente quanto ao mecanismo químico empregado no processo, ao volume de dados gerados, à precisão de bases, à tecnologia de operação, ao tamanho de fragmento gerado por leitura e ao custo operacional; sendo que a escolha dessa tecnologia deve se basear principalmente no suprimento de dados necessários para a abordagem experimental (MACLEAN et al., 2009).

2.8.1. Plataforma Illumina®

A Illumina® desenvolveu uma tecnologia de sequenciamento com base em terminadores reversíveis. Nesta plataforma, como no método de Sanger, o sequenciamento é realizado por síntese usando DNA polimerase e nucleotídeos marcados com diferentes fluoróforos (SANGER, et al., 1977). A grande inovação desta técnica é a clonagem dos fragmentos *in vitro* diretamente em uma superfície sólida de vidro, superfície de clonagem, processo conhecido como PCR de fase sólida (FEDURCO et al., 2006; TURCATTI et al., 2008). A superfície consiste de uma lâmina de vidro na qual as extremidades dos fragmentos são ligados. No processo de sequenciamento os fragmentos de DNA têm suas extremidades (5' e 3') ligadas a adaptadores (Figura 5a) e fixados a superfície de clonagem, de modo que a extremidade 3' fique sempre livre para servir na iniciação da reação de sequenciamento dos fragmentos imobilizados no suporte (Figura 5b) (CARVALHO e SILVA, 2010).

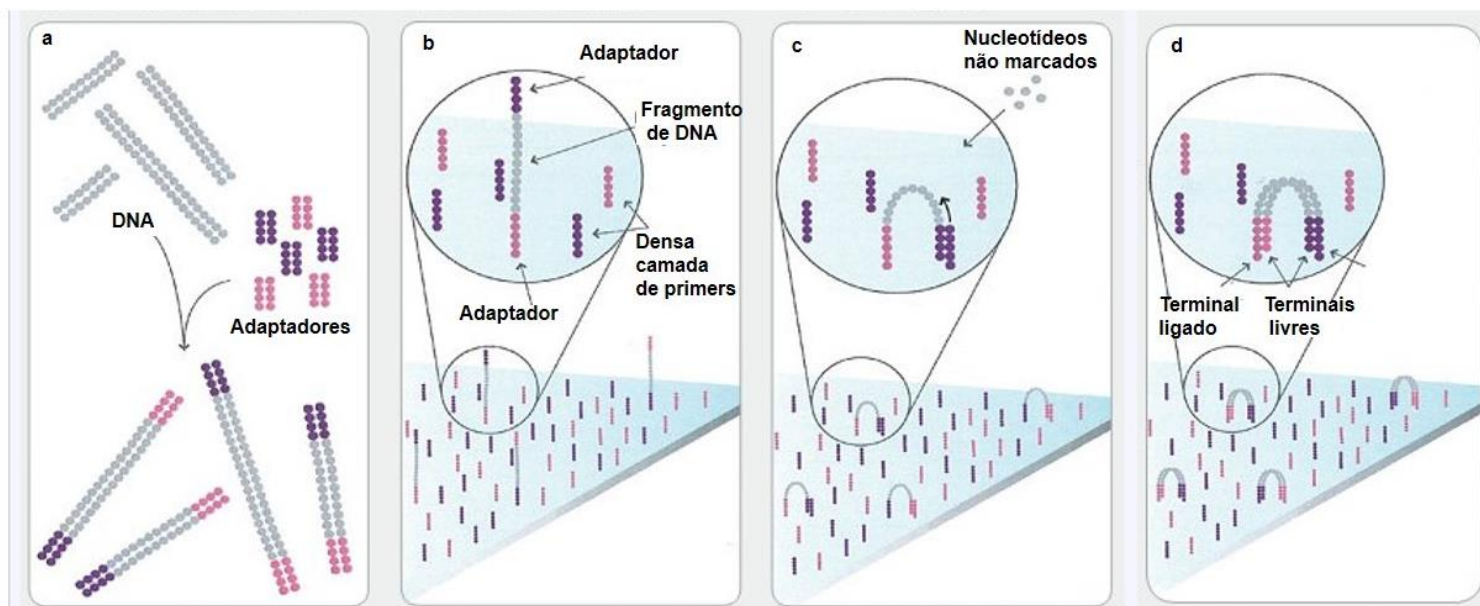


Figura 5. Processo inicial de sequenciamento na plataforma Illumina (Adaptado de CARVALHO e SILVA, 2010).

A grande quantidade de adaptadores fixos na superfície de clonagem facilita a hibridização do adaptador livre (3') e sua sequência complementar fixa, próximo ao clone inicial durante o ciclo de anelamento. No ciclo de

anelamento o fragmento forma uma estrutura em “ponte” na superfície de sequenciamento (Figura 5c e 5d) e após o fornecimento de reagentes necessários a extensão ocorre (PCR), formando a fita complementar também em “ponte”. (METZKER, 2010).

No chamado ciclo de desnaturação (por elevação da temperatura) as fitas são separadas e linearizadas (Figura 6e), o ciclo de anelamento é repetido por 35 vezes (Figura 6f) fazendo com que as mil cópias geradas de cada fragmento se agrupem formando um *cluster* (conjunto) de sequenciamento (Figura 6g). Após esta etapa, nucleotídeos terminadores marcados são fornecidos para as reações que ocorrem dentro do *cluster* (Figura 6h).

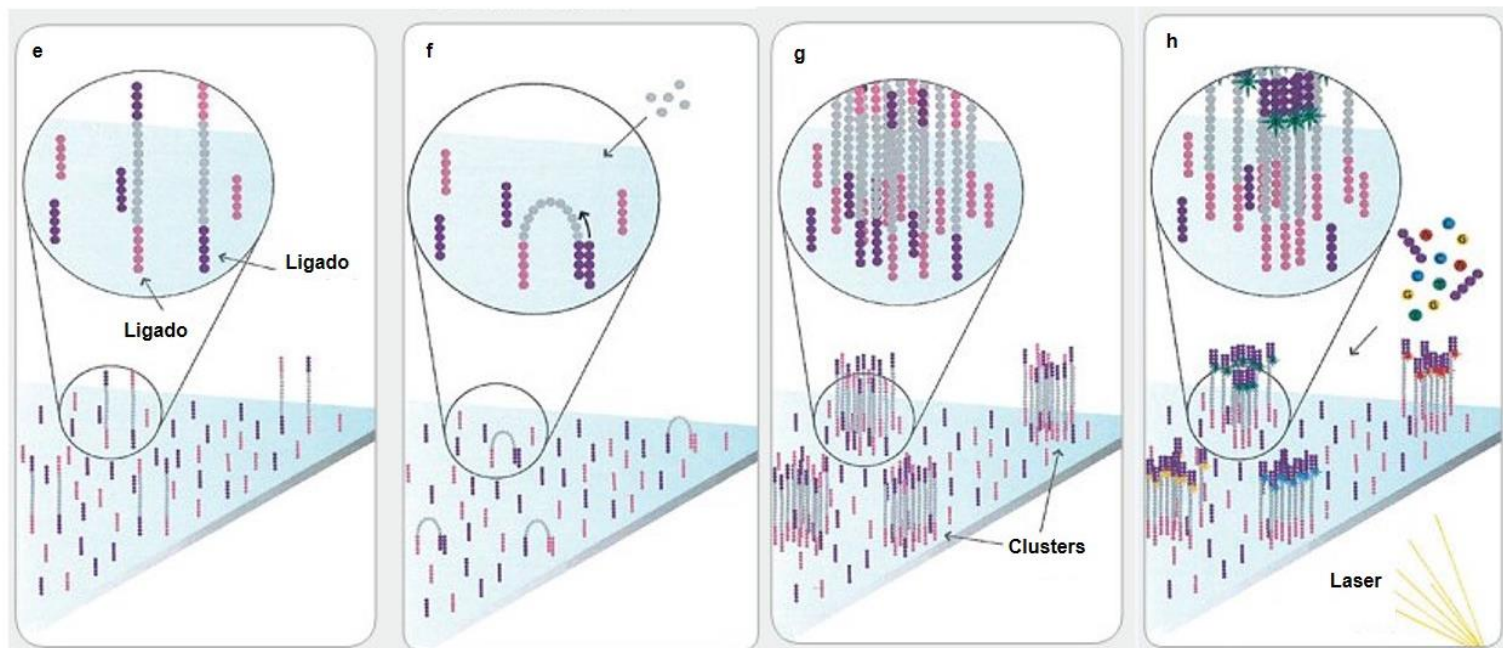


Figura 6. Processo intermediário de sequenciamento na plataforma Illumina (Adaptado de CARVALHO e SILVA, 2010).

A alta densidade de *clusters* formada possibilita que o sinal de fluorescência gerado com a incorporação de cada um dos nucleotídeos terminadores tenha uma intensidade suficiente para a detecção confiável (METZKER, 2010). Na etapa seguinte, com a incorporação de nucleotídeos terminadores marcados e excitação a laser (Figura 6h), é gerado um sinal que é captado por dispositivos de leitura e interpretado como um dos quatro possíveis nucleotídeos marcados (Figura 7i, 7j, 7k), e o processo é repetido

para cada nucleotídeo que compõe a sequência. A leitura das bases é feita pela análise sequencial das imagens capturadas (Figura 7I) em cada ciclo de sequenciamento. Em geral, leituras de 200 bases são obtidas em cada cluster (SHENDURE e JI, 2008; METZKER, 2010).

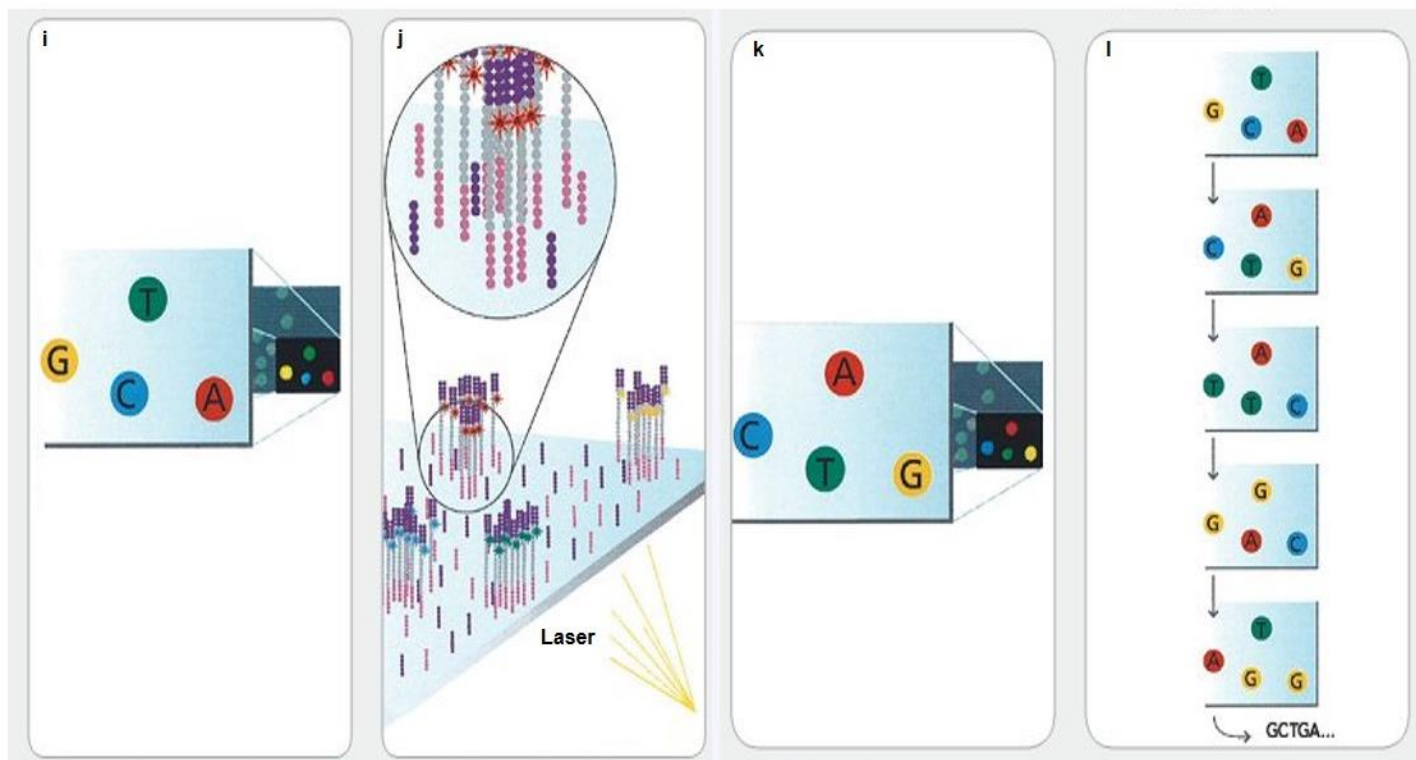


Figura 7. Processo final de sequenciamento na plataforma Illumina (Adaptado de CARVALHO e SILVA, 2010).

A partir de tudo o que foi descrito anteriormente, sobretudo, a importância do agente etiológico no contexto da sanidade avícola, este estudo fez o sequenciamento completo do genoma das estirpes LaSota e APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 do VDN, com o intuito de avaliar a diversidade genética e caracterizá-las filogeneticamente, na tentativa de estudar o seu possível papel na evolução das estirpes do VDN.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Sequenciar, montar, comparar e analisar filogeneticamente os genomas completos de estirpe vacinal LaSota e São João do Meriti do vírus da doença de Newcastle proveniente de um surto de DN na década de 70

3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1. Determinar o genoma completo e as sequências deduzidas de aminoácidos das proteínas estruturais da estirpe LaSota e São João do Meriti do VDN.
- 3.2.2. Comparar os genomas e as sequências deduzidas de aminoácidos das proteínas da estirpe LaSota e São João do Meriti do VDN com os genomas e sequências proteicas deduzidas de outras estirpes do VDN classificadas nos principais genótipos desse vírus, procurando relacionar suas características para se entender melhor a evolução do VDN.
- 3.2.3. Contribuir com estudos de filogenia, epidemiologia e diversidade genética da estirpe LaSota e São João do Meriti do VDN.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras virais

Uma suspensão contendo a amostra da estirpe vacinal LaSota originada de uma vacina comercializada no Brasil e outra suspensão contendo o isolado de campo APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 do VDN foram diluídas a 1:10, em meio Eagle e 0,1mL foi inoculado na cavidade alantoide de ovos embrionados SPF com 9 a 11 dias de incubação, para multiplicação viral. Após 24 horas de incubação a 37,5°C realizou-se o exame de ovoscopia para a identificação e retirada de embriões mortos em decorrência de causas inespecíficas. Decorridas 40 horas de incubação e prévio resfriamento a 4°C, por 18 horas, a suspensão de líquido córion alantoide infectado (LCAi) foi colhida e imediatamente centrifugada a 3000xg, 4°C por 30 minutos, eliminando-se os debrís celulares. O volume total de LCAi contendo as estirpes virais foram aliquotados e estocados a -70°C.

4.2. Extração do RNA viral

O procedimento de extração do RNA viral foi realizado, a partir do líquido córion alantoide infectado (LCAi) com estirpe LaSota e o isolado de campo APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 com o auxílio do reagente comercial Trizol LS Reagent (Invitrogen), seguindo-se as recomendações do fabricante, com algumas adaptações, abaixo explanadas.

A extração foi feita a partir de 500µL de LCA infectado com a estirpe LaSota e o isolado de campo APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75, adicionando-se 500µL de Trizol LS Reagent (Invitrogen) e mais 100µL de uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção 24:1. Em seguida, a mistura foi homogenizada com ajuda do vórtex e deixada em repouso em banho de gelo por 5 minutos sendo ao final desse passo, centrifugadas em 12000xg por 15 minutos a 4°C. A fase líquida, em volume de aproximadamente 500µL, foi transferida para outro microtubo de 1,5mL, no qual foram adicionados o mesmo volume de álcool isopropílico (500µL). Essa mistura foi agitada, delicadamente, por inversão e deixada por 20 minutos a -70°C (precipitação do RNA).

No passo seguinte, centrifugou-se a 12000xg por 15 minutos a 4°C. Ao final dessa etapa, descartou-se o sobrenadante (álcool isopropílico) e adicionou-se 1mL de etanol 75%, homogeneizando-se manualmente, e em seguida, as amostras foram centrifugadas a 7.500xg por 5 minutos a temperatura de 4°C, descartando-se, ao final o sobrenadante. As amostras foram colocadas para secar a temperatura ambiente e ressuspendidas em 12µL de água ultra pura tratada com DEPC (dietil pirocarbonato 0,1% p/v) e mais 1µL de inibidor de ribonuclease. O RNA viral das amostras LaSota e APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 foram quantificados utilizando-se o aparelho Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies) com o kit Qubit™ RNA Assay Kit (Invitrogen®) seguindo-se as recomendações do fabricante

4.3. Construção das bibliotecas de RNA

As bibliotecas de RNA das estirpes LaSota e APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 do VDN foram preparadas de acordo com o protocolo TruSeq® RNA Sample Preparation v2 (illumina®) de acordo com as recomendações do fabricante com algumas adaptações, descritas abaixo.

O primeiro passo foi a fragmentação enzimática do RNA total das estirpes LaSota e APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 e posterior ligação de random primers para se proceder com a síntese da primeira fita de cDNA, utilizando-se para isto a enzima transcriptase reversa (SuperScript/Invitrogen, EUA); após a síntese da primeira fita de cDNA procedeu-se a síntese da segunda fita, tendo ao final do processo um cDNA dupla fita. Após este passo faz-se a reparação das extremidades 3' e 5'. Nesta etapa as extremidades 3' e 5' do cDNA fragmentado, que estão não-coesivas, serão reparadas usando o reagente End-Repair Mix da Illumina. O End-Repair Mix tem atividade exonuclease, que removerá as pontas das extremidades 3' e atividade polimerase que completará as extremidades 3' do cDNA fragmentado, ao final do processo teremos o cDNA fragmentado e com as extremidades coesivas.

Após a etapa de End-Repair um único nucleotídeo A (adenina) é aderido à extremidade 3' do cDNA fragmentado e reparado, este processo previne que este fragmento de cDNA se ligue erroneamente a outro fragmento de cDNA

durante a ligação dos adaptadores, já que a extremidade 3' do adaptador apresenta um único nucleotídeo T (timina), que é complementar ao fragmento de cDNA que foi adenilado. Esta estratégia garante uma baixa formação de quimeras. Só assim então os adaptadores, com barcodes específicos, são ligados nas extremidades dos cDNAs fragmentados, preparando-os para a hibridização na lâmina de sequenciamento.

Após a ligação dos adaptadores há o enriquecimento dos fragmentos de cDNA através da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para enriquecer os fragmentos de cDNA que apresentam adaptadores ligados nas duas extremidades, 3' e 5'. A PCR é feita utilizando-se primers que se anelam as extremidades dos adaptadores, garantindo que apenas os fragmentos de cDNA ligados aos adaptadores sejam amplificados. Para evitar que ocorra distorção da representação da biblioteca, o número de ciclos utilizados na PCR é o mínimo possível, em média 10 ciclos.

Ao final deste processo a biblioteca está pronta e deve ser validada e quantificada antes que seja feito o sequenciamento da mesma. A validação das bibliotecas de cDNA das estirpes LaSota e APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 foi feita através de eletroforese capilar no Agilent Bioanalyzer com o chip DNA1000, para isto foi utilizado 1uL da biblioteca e seguidas as recomendações do fabricante. A quantificação das bibliotecas foi feita através de uma quantificação absoluta qPCR, utilizando-se o aparelho 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems), seguindo-se as recomendações do Illumina Sequencing Library qPCR Quantification Guide.

4.4. Sequenciamento do genoma do VDN

O sequenciamento das bibliotecas de cDNA das estirpes LaSota e APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 do VDN foi realizado utilizando a plataforma Illumina®, equipamento HiscanSQ. Para isto foram utilizados os kits Paired-End Cluster Generation Kit v3 (Illumina®) e TruSeq™ SBS Kit v3 - 200 Cycles (Illumina®) e os procedimentos adotados seguiram as recomendações do fabricante.

4.5. Análise das Sequências e Anotação genômica

Ao término do sequenciamento as bibliotecas das estirpes LaSota e APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 foram separadas e os arquivos .bcl gerados foram transformados em formato fastq, utilizando-se o programa CASAVA 1.8.3.(Illumina). As sequências fastq das estirpes virais LaSota e APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 foram transferidas para o programa CLC Genomics Workbench 6.0.5 o qual inicialmente avaliou a qualidade das sequências com posterior trimagem/corte das regiões onde foram identificadas leituras com baixa qualidade (Phred score < 20). Após esta etapa, foi realizado o procedimento de clusterização ou montagem pelo algoritmo (*De Novo Assembly* – com os parâmetros padrão de montagem) com a finalidade de gerar a sequência consenso de cada estirpe (estimadas em 15.000pb), a fim de permitir a anotação genômica. Para a anotação do genoma das estirpes LaSota e APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 foi utilizado o programa Prokka 1.5.2 (Prokka: Prokaryotic Genome Annotation System – <http://vicbioinformatics.com/>)

4.6. Alinhamento das sequências e Análise Filogenética

Para o alinhamento, comparação e agrupamento das sequências foram realizadas duas abordagens complementares: a primeira levou em consideração o genoma completo das estirpes LaSota e APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 e para a segunda, foram escolhidos dos genes HN e F, utilizando-se as sequências de nucleotídeos e aminoácidos das estirpes LaSota e APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 e outras estirpes de referência da classe I e II do VDN referentes a estes genes, tendo utilizado o software ClustalW, versão 1.83 (THOMPSON et al., 1994) dentro do programa BioEdit v7.2.0.

As sequências completas dos genomas das estirpes LaSota e APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 foram utilizadas para a construção do dendograma e para definir a classificação destas estirpes, em relação a outras estirpes de referência da classe I e II do VDN. As análises filogenéticas foram conduzidas

usando-se o programa MEGA5 (MEGA versão 5) (TAMURA et al, 2011) e a história evolucionária foi inferida utilizando-se o método de Maximum Likelihood e Tamura-Nei Parâmetro (TAMURA e KUMAR, 2002), com valores de 1000 para bootstrap e foram expressas com base no número de nucleotídeos substituídos. Os códons incluídos foram 1st+2nd+3rd+non-coding. Todas as posições contendo gaps e dados perdidos foram eliminadas através da opção *complete deletion*. Os nomes usados no dendograma representam os nomes dados às estirpes virais no GenBank.

4.7. Análise das distâncias filogenéticas das estirpes do genótipo V

A distância filogenética entre a estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 e as estirpes do genótipo V foi conduzida usando-se o programa MEGA5 (MEGA versão 5) (TAMURA et al, 2011) e a história evolucionária foi inferida utilizando-se o método de Maximum Likelihood e Tamura-Nei Parâmetro (TAMURA e KUMAR, 2002), com valores de 1000 para bootstrap.

4.8. Análise de seleção positiva dos genes F e HN do genótipo V

As análises de seleção positiva dos genes F e HN dos isolados representantes do genótipo V foram feitas através do cálculo da taxa média de substituições sinônimas (dS) e de substituições não sinônimas (dN) (dS-dN) usando o programa MEGA5 (MEGA versão 5) (TAMURA et al., 2011). Além disso, para detectar resíduos específicos dentro dos genes F e HN sob forte pressão seletiva foi calculada a dN-dS por códon em relação a entropia da sequência de aminoácidos. A entropia da sequência de aminoácidos foi calculada utilizando-se o programa BioEdit v7.2.0.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise dos genomas e proteínas deduzidas

5.1.1. Estirpe vacinal lentogênica LaSota

O genoma completo da estirpe vacinal lentogênica LaSota apresentou um tamanho de 15.186pb, similar aos outros paramixovírus aviários do tipo 1 (APMV-1) da classe II, classificados como genótipos antigos, ou seja, que foram isolados entre 1930-1960 (CZÉGLEDI et al., 2002). Ainda, este genoma revelou a presença de seis regiões abertas de leitura (ORF) que codificam seis diferentes proteínas, nucleoproteína (NP), a fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), a proteína de fusão (F), a hemaglutinina-neuraminidase (HN) e a grande proteína (L) (3'-N-P-M-F-HN-L-5'). A porcentagem de G+C deste genoma viral é de 46,27%. O tamanho, a posição, e as características destes seis genes estão na Figura 8.

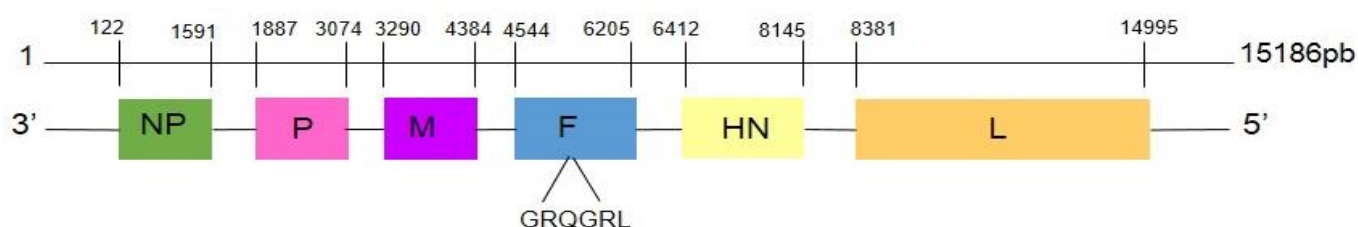


Figura 8. Esquema do genoma da estirpe vacinal lentogênica LaSota, em bases, mostrando a posição dos seis genes codificadores das proteínas virais.

Todas as seis principais proteínas e o genoma completo da estirpe vacinal lentogênica LaSota, apresentaram pelo programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 99% de similaridade na sequência de nucleotídeos com as estirpes VG/GA clone 5 (EU289029), B1 Takaaki (AF3758230), VG/GA (EU289028), B1 (AF309418), LaSota C5 (KC844235) e LaSota (JF950510), que pertencem a classe II genótipo II, entre outros que estão mostrados na Figura 9 e 10.

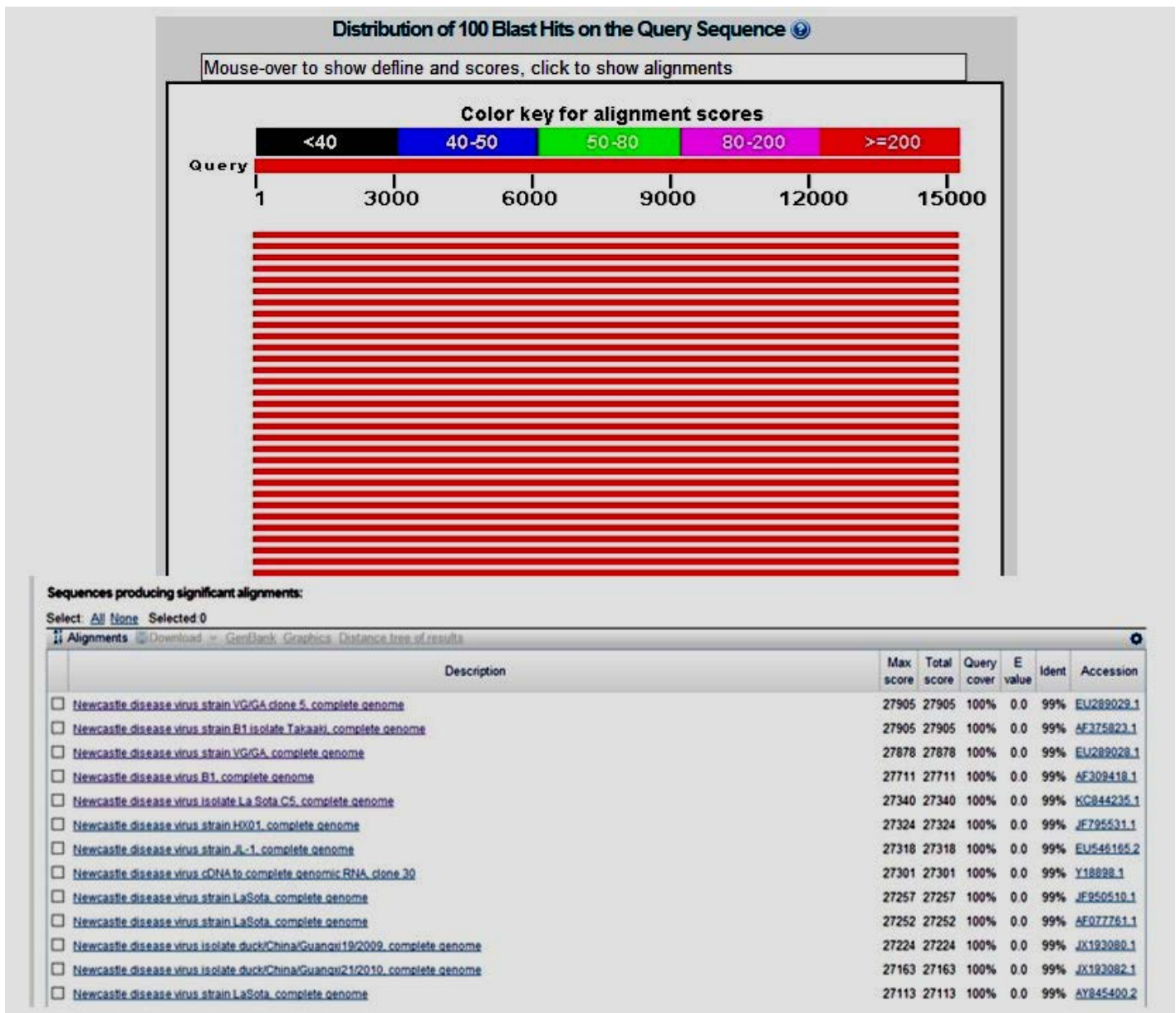


Figura 9. Visualização dos “scores” do genoma completo da estirpe vacinal lentogênica LaSota, que foram obtidos pelo programa BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>).

As estirpes virais pertencentes a classe II, genótipo II, incluem vírus caracterizados como de baixa virulência e que são utilizados no mundo todo como vacinas atenuadas na prevenção da DN, como exemplo temos a estirpe LaSota, sequenciada neste trabalho, e as estirpes B1 e VG/GA.

Outro ponto importante que deve ser considerado na caracterização da virulência dessa estirpe é o sítio de clivagem da proteína F, já que este é bem utilizado como determinante da patogenicidade do VDN em galinhas (MORRISON et al., 1993; LI et al., 1998; PANDA et al., 2004). Em nosso

estudo foi identificado que o sítio de clivagem da proteína F da estirpe vacinal lentogênica LaSota contém a sequência $^{112}\text{G-R-Q-G-R}\downarrow\text{L}^{117}$. Constata-se que não estão presentes nesta sequência mais de um resíduo de aa básicos entre as posições 112-116, o que é característico de estirpes avirulentas do VDN.

Apesar das infecções por estirpes virulentas do VDN se constituírem em uma preocupação maior; as estirpes de baixa virulência podem e, às vezes causam, perdas econômicas em matrizes por queda na produção de ovos e por lesões de aerossaculite em frangos.

Descrições de doenças respiratórias tardias entre as 4 e 7 semanas na Austrália (SCOTT et al., 1999) onde não é utilizada vacina são semelhantes aos relatos de doenças respiratórias nos Estados Unidos e outros países local em que a vacinação é amplamente utilizada. Na Austrália os isolamentos correspondem às estirpes de campo de baixa virulência porém em outros países os isolamentos são parecidos as estirpes de vacinas que são utilizadas (WEHMANN et al., 1999).

Em um estudo sobre a patogenia da DN em frangos SPF, infecções com estirpes lentogênicas não produziram uma infecção entretanto, ácido nucléico viral foi encontrado no miocárdio e sacos aéreos. Infecções lentogênicas podem comprometer estes tecidos e produzir infecções secundárias e/ou diminuição na produtividade. Parece razoável especular que esse fato esteja ligado ao fenômeno da recombinação genética presente em populações e subpopulações de partículas virais do VDN que infectam diferentes hospedeiros de aves.

A propósito, existe alguma evidência de que estirpes patogênicas, do VDN, provenientes de outras espécies, somente demonstram sua verdadeira patogenicidade após sua primeira passagem em frangos de corte (ALEXANDER, 1997), ou após sua adaptação ao novo hospedeiro. Resultados semelhantes foram descritos por Islam et al. (1994), que indicam o aumento da patogenicidade de amostras mesogênicas ou patogênicas do VDN, isoladas de codornas e passadas para galinhas; indução essa possível graças à aquisição de propriedades de neurotropismo e pantropismo através da passagem intracerebral em galinhas susceptíveis.

A quantidade de vacina viva produzida e usada no Brasil, conforme

dados relatados por Orsi et al. (1999; 2001), aliado ao baixo re-isolamento do vírus vacinal no território nacional e a grande variação na virulência dos diferentes isolados do VDN, indicam a necessidade de mais pesquisa sobre esta temática. Fatores que promovem a ocorrência da doença em aves vacinadas podem ser divididos em dois grupos: 1) Fatores que diminuem a resistência do hospedeiro a infecção; e 2) Mudança do vírus que permite tornar-se uma barreira imunológica (PANSWIN et al., 2002). Apesar da redução gradual da DN no país nos últimos anos para alguns autores (SEAL, et al, 1998; CLAVIJO et al., 2000, OIE, 2008) a DN continua endêmica no Brasil, servindo de fonte de disseminação de vírus, principalmente pelo tráfico de aves silvestres; por isso a importância de monitorá-las através do sequenciamento de genomas completos.

5.1.2. Isolado APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75

O genoma completo do isolado APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 apresentou um tamanho de 15.192pb, é similar aos de outros paramixovírus aviários do tipo 1 (APMV-1) (número de acesso GenBank: KJ123642)

. Ainda, este genoma revelou a presença de seis genes que codificam seis diferentes proteínas, nucleoproteína (NP), a fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), a proteína de fusão (F), a hemaglutinina-neuraminidase (HN) e a grande proteína (L) (3'-N-P-M-F-HN-L-5'). A porcentagem de G+C do genoma viral do isolado APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 é de 46,2%. O tamanho, a posição, e as características destes seis genes e suas sequências intergênicas estão na Tabela 1.

As sequências *leader* 5' e da terminação 3' do isolado APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 consistem de 114 e 55 nucleotídeos respectivamente, e revelaram ser iguais as que estão presentes em todas as estirpes do VDN (KRISNAMURTHY e SAMAL, 1998). Além disso, as sequências intergênicas (SIs), que não transcrevem mRNA, variam em tamanho de 1 a 47 nucleotídeos (Tabela 1). As sequências de nucleotídeos do gene inicial (GI), do gene final (GF) e das SIs no genoma do VDN afetam a eficiência da transcrição dos seis genes (RASSA et al., 2000; YAN e SAMAL, 2008).

Tabela 1. Características genômicas e aminoácidos deduzidos da estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75

Gene	Sequência intergênica (SI)	Tamanho Nucleotídeos (nt)	5' UTR	Tamanho ORF (nt)	% G + C	3' UTR	Tamanho aminoácidos deduzidos (aa)
NP	2	1.752	66	1.470	50,5	216	503
P	1	1.451	83	1.188	52,7	180	395
M	1	1.241	34	1.095	48,2	112	364
F	31	1.792	46	1.662	44,9	84	553
HN	47	2.002	91	1.716	46,1	195	571
L	-	6.703	11	6.615	44,2	77	2.204
Genoma	-	15.192	-	-	46,2	-	-

Todas as seis principais proteínas da estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 invariavelmente, mostraram moderada (88-90%) a alta (97-99%) similaridade com as sequências de aminoácidos de outras estirpes representantes de cada genótipo do VDN que já foram bem caracterizadas (Tabela 2). Tal fato indica que o mínimo de mudança na sequência de nucleotídeo das estirpes do VDN pode ter um profundo efeito na patogenicidade deste agente.

Tabela 2. Comparação das sequências de nucleotídeo e aminoácido entre a estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 e as estirpes representantes de cada genótipo da classe II^a

Genótipo:	I		II		III		IV		V		VI		VII		VIII		IX	
Estirpe:	Ulster (AY56291)		LaSota/46 (AY845400)		JS/7/05/Ch (FJ430159)		Herts/33 (AY741404)		Largo/71 (AY562990)		Fontana/72 (AY562988)		ZJ1 (AF431744)		QH4 (FJ751919)		JS/1/02 (FJ436306)	
	% (nt)	(aa)	% (nt)	(aa)	% (nt)	(aa)	% (nt)	(aa)	% (nt)	(aa)	% (nt)	(aa)	% (nt)	(aa)	% (nt)	(aa)	% (nt)	(aa)
Gene																		
NP	90	94	87	93	89	94	91	96	98	99	92	97	90	96	92	96	89	93
P	85	83	84	84	87	85	88	88	96	95	90	89	88	86	89	88	85	83
M	88	90	85	89	88	90	91	94	97	98	91	95	88	94	89	93	88	91
F	88	91	86	89	88	92	90	94	96	96	91	96	89	93	90	95	88	92
HN	86	90	84	88	87	88	89	90	96	96	91	94	89	92	89	93	87	90
L	89	95	86	92	89	95	91	96	98	99	92	97	90	95	92	97	89	95
Genoma	87	-	84	-	87	-	89	-	97	-	91	-	88	-	90	-	87	-

^a O alinhamento foi feito utilizando o programa ClustalW

O genoma completo da estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 é similar a estirpe previamente sequenciada Largo/71 pertencente a classe II genótipo V e que foi isolada pela primeira vez na Flórida, de galinhas, tendo-se suspeitado que a sua introdução nos EUA ocorreu a partir da entrada de aves exóticas provenientes da América Central ou da América do Sul (WALKER et al., 1973). As maiores similaridades entre as duas estirpes foram identificadas nos genes NP e L com 98% de similaridade de nucleotídeos e 99% na sequência deduzida de aminoácidos. No entanto, nessa mesma análise comparativa, as maiores diferenças puderam ser observadas nas sequências gênica e de aminoácidos correspondente à proteína P (similaridade de 96% na sequência de nucleotídeos e 95% na sequência de aminoácidos) (Tabela 2).

Em adição a isso, a sequência deduzida de aminoácidos da proteína F da estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 apresentou elevada similaridade com a estirpe Largo/71 (96%), apesar de que com relação às estirpes Fontana/72 (genótipo VI) e QH4 (genótipo VIII) as similaridades foram também elevadas e corresponderam a 96 e 95%, respectivamente (Tabela 2).

Comparações com as sequências deduzidas de aminoácidos das proteínas que se constituem nos principais antígenos (F e HN) da estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 e as sequências dessas mesmas proteínas de outras estirpes representantes dos oito genótipos da classe II do VDN mostrou similaridade mais baixa com a estirpe LaSota (89% F e 88% HN) e Ulster (91% F e 90% HN) (Tabela 2). Esta diferença está de acordo com o estudo de Miller et al. 2010, no qual foi observada uma grande diversidade genética entre os genótipos I, II e V do VDN. Ainda, essa diferença deve ser levada em consideração, pois atualmente as vacinas mais utilizadas para controle da DN são feitas a partir de estirpes classificadas no genótipo II, como as estirpes vacinais LaSota e B1 e as estirpes classificadas no genótipo I, como a estirpe Ulster.

Atualmente, um programa de vacinação permanente para o VDN está em vigor no Brasil e, durante os últimos anos, a vacinação de aves comerciais tem sido regularmente constatada, utilizando-se com grande frequência a estirpe LaSota, pertencente ao genótipo II. Contudo, é bem conhecido que

todas as estirpes do VDN pertencem a um único sorotipo, o APMV-1, o qual oferece proteção cruzada ou parcial contra estirpes altamente virulentas pertencentes a diferentes genótipos do VDN (NAYAK et al., 2012).

Apesar dessa proteção cruzada que pode ser oferecida pela vacinação, alguns relatos sugerem que a vacinação com uma estirpe mais semelhante ao vírus de desafio no campo, contribui significativamente para a eliminação desse patógeno viral (MILLER et al., 2007). Portanto, faz-se extremamente necessário conhecer detalhadamente quais genótipos do VDN estão circulando ou já circularam em aves comerciais e tentar projetar vacinas que sejam intimamente relacionadas ao VDN isolado.

O teste de patogenicidade previamente realizado com o isolado APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 demonstrou que esta estirpe deve ser classificada como altamente virulenta e velogênica para galinhas, já que o TMME foi de 48h e o ICPI de 1.78 (LIMA et al., 2004). Em adição a isso, a sequência deduzida de aminoácidos do sítio de clivagem da proteína de fusão apresenta alta proporção de aminoácidos básicos, característica de estirpes altamente virulentas (PEETERS et al., 1999).

Nesse sentido, deve-se destacar que o sítio de clivagem da proteína F é bem caracterizado como determinante da patogenicidade do VDN em galinhas (MORRISON et al., 1993; LI et al., 1998; PANDA et al., 2004). Estirpes virulentas do VDN tipicamente contêm um sítio de clivagem que apresenta mais de um resíduo de aminoácido básico (R-X-K/R-R↓F), o qual é reconhecido por proteases do tipo furina, presentes na maioria das células do organismo hospedeiro.

Em nosso estudo foi identificado que o sítio de clivagem da proteína F da estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 contém a sequência ¹¹²R-R-Q-K-R↓F¹¹⁷. Constata-se que estão presentes quatro aminoácidos básicos entre as posições 112-116 dessa sequência, o que é característico de estirpes virulentas do VDN, como havia sido demonstrado quando essa estirpe foi usada na infecção experimental de galinhas SPF, embora tenha sido demonstrado nesses mesmos estudos que esse vírus não cause nenhuma patogenicidade para aves de outras espécies (CAMPIONI et al., 2012,

MARTINS et al., 2012, DENADAI et al., 2011, CARRASCO et al., 2008, NISHIZAWA et al., 2007, PAULILLO et al., 2005, LIMA et al., 2004).

A presença do resíduo de fenilalanina (F) na posição 117, foi associada como um possível papel na indução dos efeitos neuropatológicos que certas estirpes do VDN podem causar em hospedeiros susceptíveis (KATTENBELT, et al., 2006; LAMB et al., 2007).

Além disso, a sequência completa deduzida de aminoácidos do gene F do isolado APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 foi analisada e comparada com diferentes estirpes que pertencem aos genótipos I a IX (Tabela 3).

Nessa análise ficou evidenciado que os sete epítomos neutralizantes da proteína F, que são críticos, tanto para estrutura como função dessa mesma proteína e que estão posicionados em resíduos individuais D⁷², E⁷⁴, A⁷⁵, K⁷⁸, A⁷⁹, L³⁴³ em conjunto com a sequência de aminoácidos ¹⁵⁷ILRLKESIAATNEAVHEVTDG¹⁷¹, são conservados (LIU et al., 2003; YUSOFF et al., 1989; TOYODA et al., 1987). Detectou-se também uma elevada conservação nos doze resíduos de cisteína localizados nas posições 25, 76, 199, 338, 370, 394, 399, 401, 424 e 523 (SCAL, 2004).

Nos sítios deduzidos de N-glicosilação da proteína F (Asn-X-Ser/Thr ou N-X-S/T) onde X pode ser qualquer aminoácido menos ácido aspártico ou prolina, localizados nas posições ⁸⁵N-R-T⁸⁷, ¹⁹¹N-K-T¹⁹³, ³⁶⁶N-T-S³⁶⁸, ⁴⁴⁷N-I-S⁴⁴⁹, ⁴⁷¹N-N-S⁴⁷³ e ⁵⁴¹N-N-T⁵⁴³ (PANDA et al., 2004; CHEN et al., 2001), com exceção do resíduo ¹⁹¹N-N-T¹⁹³, no qual houve a inserção de um N na posição 192 da proteína F. Essas características de conservação da proteína F são comuns de ocorrer nos isolados classificados como genótipos recentes, isto é, que surgiram depois de 1960, englobando os genótipos V-VIII e X, os quais apresentam genoma com tamanho de 15,192 nucleotídeos (nt) (15,186 nt + 6 nt na região não codificante 5' ou NCR do gene NP) (CZEGLÉDI et al., 2002).

Contudo, a análise da sequência deduzida de aminoácidos da proteína F, resíduos de aminoácidos 1-553, revelou seis substituições únicas, que não foram encontradas em estirpes de nenhum outro genótipo do VDN (Tabela 3). Quatro desses aminoácidos estão localizados na porção N-terminal da proteína

F, S¹⁰→P, Q²⁸→P/L, N¹⁰⁷→T, E⁴⁵²→D, enquanto que as outras duas substituições L⁵¹⁰→I/V e V⁵²²→A foram encontradas na estrutura da proteína F.

De acordo com a virulência das estirpes do VDN, a sequência da proteína monomérica HN possui uma diferença no tamanho da sequência de aminoácidos, ou seja, podem ser encontradas proteínas HN constituídas por 571, 577, 581 ou 616 aminoácidos (ROMER-OBERDORFER et al., 2003). O gene HN do isolado APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75, apresentou 1.716 nt e a sua sequência deduzida de aminoácidos revelou ser composta por 571 aa, o que é característico de estirpes virulentas do VDN (LIU et al., 2003; ROMER-OBERDORFER et al., 2003; TSAI, et al., 2004; MILLER et al., 2009).

Neste estudo, diferentes sequências da HN pertencentes aos genótipos I-IX com diferentes tamanhos, foram alinhadas a estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 (Tabela 3). Os resultados das análises desses alinhamentos mostraram que todos os epítomos neutralizantes previamente descritos para a proteína HN, como ¹⁹³LSGCRDHS²⁰¹, R²⁶³, D²⁸⁷, K³²¹, ³³²GR³³³, ³⁴⁶DEQDYQIR³⁵³, K³⁵⁶, N⁴⁸¹, D⁴⁹⁴, ⁵¹³RITRVSS⁵²¹, G/D⁵⁶⁹ (YUSOFF et al., 1988; IORIO et al., 1989; IORIO et al., 1991) apresentaram, para a estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75, modificações em três destes epítomos neutralizantes R²⁶³→K, K³²¹→R, I³⁵²→V.

Os três aminoácidos essenciais E⁴⁰¹, R⁴¹⁶, Y⁵²⁶ para ligação ao receptor da célula alvo da infecção pelo VDN (CRENNELL et al., 2000; CONNARIS et al., 2002) e o sítio de atividade da neuraminidase representado por um conjunto funcional de três argininas nas posições ²³⁴NRKCSI/V/L²⁴⁰ (JORGENSEN et al., 1987) assim como as regiões ³¹⁴FXXYGGV/L/M³²⁰, ³⁹⁹GA/SEGRI/V/L⁴⁰⁵ envolvidas na atividade hemaglutinante (LAMB e LOLAKOFSKY 1996) foram parcialmente conservados, apresentando apenas uma troca de aminoácido na posição S⁴⁰⁰→A.

Em adição a isso, foram também preservados os treze resíduos de cisteína no ectodomínio da sequência linear 123, 172, 186, 196, 238, 247, 251, 344, 455, 461, 465, 531, 542 (SCAL, 2004) e os onze ácidos siálicos presentes no local de ligação ao receptor da proteína HN, R¹⁷⁴, I¹⁷⁵, E²⁵⁸, Y²⁹⁹, Y³¹⁷, E⁴⁰¹, R⁴¹⁶, R⁴⁹⁸, Y⁵²⁶, R⁵¹⁶, E⁵⁴⁷ (CONNARIS et al, 2002).

Entretanto, a análise da sequência de aminoácidos da proteína HN da estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 contém oito resíduos de aminoácidos específicos, $D^{47} \rightarrow S/G$, $N^{75} \rightarrow G/S$, $P^{111} \rightarrow S$, $V^{136} \rightarrow I$, $A^{328} \rightarrow T/I$, $V^{373} \rightarrow I$, $N^{437} \rightarrow T/S/A$, $I^{505} \rightarrow V$, que não foram encontrados em estirpes de nenhum outro genótipo do VDN (Tabela 3).

Além do local de clivagem da proteína de fusão, tem sido relatado que outros cinco genes no genoma viral pode ter um efeito sobre a patogenicidade viral (PANDA et al., 2004; DORTMANS et al., 2010; DORTMANS et al., 2011). A análise da sequência deduzida de aminoácidos da estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 revelou a falta de mutações nos genes P e L, que têm sido implicados na virulência do VDN (DORTMANS et al., 2010; DORTMANS et al., 2011.) Isto sugere a existência de outras regiões ainda não caracterizadas que podem contribuir para aumentar a virulência da estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75, principalmente porque esta estirpe produziu lesões graves e alta mortalidade em galinhas SPF, enquanto que em outras espécies de aves é capaz de se replicar sem efeitos patogênicos (PAULILLO et al., 2005, LIMA et al., 2004).

Tabela 3. Resíduos de aminoácidos únicos na sequência deduzida da proteína F e HN do isolado APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 em comparação com as estirpes representantes de cada genótipo da classe II, classificados como genótipos antigos e recentes.

	<i>Resíduo de aminoácido e sua posição</i>														
	<i>Sequência deduzida de aa da proteína F</i>						<i>Sequência deduzida de aa da proteína HN</i>								
	10	28	107	452	510	522	47	75	111	136	328	373	437	505	
APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75	S	Q	N	E	L	V	D	N	P	V	A	V	N	I	
Genótipos antigos															
Ulster	I	P	P	T	D	I	A	S	G	S	I	T	I	T	V
LaSota	II	P	P	T	D	I	A	S	G	S	I	T	I	T	V
JS/7/05/Ch	III	P	P	T	D	I	A	S	G	S	I	T	I	T	V
Herts/33	IV	P	L	T	D	I	A	S	S	S	I	T	I	T	V
JS/1/02	IX	P	P	T	D	V	A	S	G	S	I	T	I	T	V
Genótipos recentes															
Largo/71	V	P	L	T	D	I	A	G	S	S	I	T	I	T	V
Fontana/72	VI	P	L	S	D	I	A	S	S	S	I	T	I	T	V
ZJ1	VII	P	L	S	D	I	A	S	S	S	I	T	I	T	V
QH4	VIII	L	P	T	D	I	T	S	S	S	I	T	I	T	V

5.3. Análise filogenética

A classe II dos isolados do APMV-1 pode ser dividida em dois tipos de genótipos. Os genótipos considerados antigos que surgiram entre 1930-1960, como genótipos I-IV e IX e os genótipos considerados recentes, que emergiram após 1960, como os genótipos V-VIII e X (CZÉGLEDI et al., 2002).

A inferência filogenética da sequência de nucleotídeos completa do genoma do isolado APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 e da estirpe vacinal lentogênica LaSota, acrescida de mais 123 sequências de genoma completo do VDN (depositadas no GenBank) pertencentes a classe I e classe II (genótipos I-X) pode ser vista na Figura 10.

Nesta análise a estirpe vacinal lentogênica foi caracterizada como pertencente ao genótipo II, e o isolado APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 como pertencente ao genótipo V. Um outro ponto que confirma a caracterização do isolado APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 é a substituição $V^{118} \rightarrow I$ presente no sítio de clivagem da proteína F, o que é característico de estirpes deste genótipo (LOMNIEZI et al., 1998; WEHMANN et al., 2003), que pertence ao conjunto de genótipos recentes. Outra característica importante e que causou uma mudança dramática, responsável pela evolução dos antigos genótipos em recentes, foi a substituição do resíduo $E^{104} \rightarrow G$ na proteína F (YU et al., 2001), a qual pode ser observada no isolado APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75.

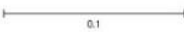
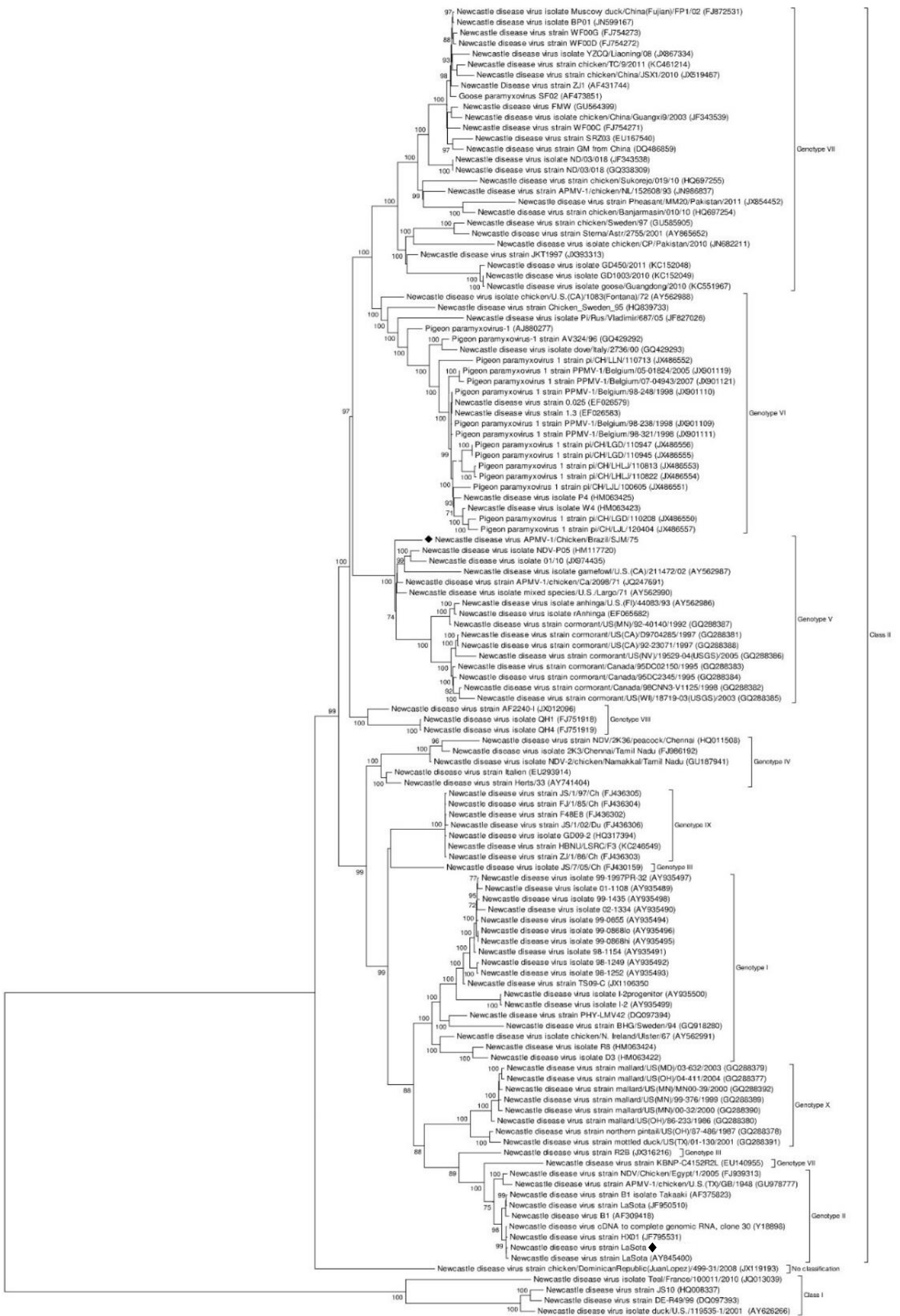


Figura 10. Análise filogenética baseada na sequência completa de nucleotídeos do genoma dos vírus representando as Classes I e II do VDN depositadas no GenBank. Sequências representando os genótipos I-X foram utilizadas. A história evolucionária inferida utilizando-se o método de Maximum Likelihood, matriz Tamura-Nei parâmetro, com bootstrap 1000. A análise envolveu 123 genomas e foi conduzida no MEGA5. As estirpes LaSota e APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 estão identificadas com um losango.

Os genótipos V, VI, VII e VIII são os genótipos predominantes e circulantes em todo o mundo e contêm apenas as estirpes virulentas do VDN. Os vírus pertencentes ao genótipo V surgiram na América do Sul e Central em 1970 e causaram surtos na Europa nesse mesmo ano (BALLAGI-PORDANY et al., 1996). Ademais, esses vírus também causaram surtos na América do Norte, na Flórida (1971, 1993) e na Califórnia (1971, 2002) (WISE et al., 2004) E ainda estão circulando no México (ABSALÓN et al., 2012; PEROZO et al., 2008).

A sequência completa do genoma do isolado APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 mostrou alta similaridade na composição de nucleotídeos (97%) com a estirpe Largo/71, a qual foi isolada na Flórida, Estados Unidos, em surtos da DN no início dos anos 1970 (Tabela 2). Esses surtos afetaram, nessa ocasião, várias regiões dos Estados Unidos e outros países como o México (WALKER et al., 1973). Na época as investigações epidemiológicas apontaram para a probabilidade dessa estirpe e outras assemelhadas isoladas desses surtos terem sido originadas a partir da importação de aves exóticas da América do Sul (STUDILLO, 1972; ACHA e SZYFRES, 2003).

O ponto interessante nesse caso, agora revelado pela análise molecular e filogenética com base no genoma completo da estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 é a coincidência do isolamento desse vírus ter sido proveniente de surtos ocorridos na década de 70 no Brasil, nos quais a doença ressurgiu sob uma forma altamente patogênica, conhecida como Newcastle Viscerotrópica, por atingir com severidade as vísceras das aves infectadas, sendo que no período de 1970 a 1975 foram registrados focos da doença em todo o país (SEAL et al. 1998; CLAVIJO 2000; FLORES et al. 2006).

Os resultados apresentados neste estudo indicam que o isolado APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 pode-se constituir em um provável ancestral das estirpes do genótipo V (Figura 10) que estão circulando na América do Norte e atualmente são responsáveis por inúmeros surtos no México, Canadá e Estados Unidos (ABSALÓN et al., 2012; MILLER et al., 2009).

Corroborando com a afirmação acima foi feita a análise das sequências deduzidas de aminoácidos das proteínas F e HN de todos os isolados do genótipo V, que circulam atualmente em países da América do Norte, buscando assim descobrir quais as modificações que estes isolados sofreram ao longo do tempo em relação ao APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 que se constitui como um provável ancestral dos isolados pertencentes ao genótipo V (Tabela 4 e 5).

Na tabela 4, as distâncias evolutivas entre o genoma completo da estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 e as outras estirpes do genótipo V, variou de um mínimo de 0.007 com um máximo de 0.089 (0.063 ± 0.023), enquanto que no genótipo V estes valores variaram 0.002-0.101 (0.052 ± 0.027), mostrando que existe uma íntima relação com o isolado APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 e outras estirpes que circularam e ainda estão circulando, reforçando a hipótese deste isolado ser um provável ancestral dos isolados do genótipo V.

Tabela 4. Distâncias filogenéticas entre a estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 e outros isolado representantes do genótipo V.

Estirpe	Genótipo V															
	SJM	2098/71	Largo/71	P05	01/10	92-40140/1992	44083/93	95DC02150/1995	rAnhinga	95DC2345/1995	D9704285/1997	92-23071/1997	98CNN3-V1125/1998	211472/02	18719-03(USGS)/2003	19529-04(USGS)/2005
SJM		(0.001)	(0.001)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.003)	(0.002)	(0.002)	(0.003)	(0.002)	(0.003)	(0.003)
2098/71	0.032		(0.001)	(0.001)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)
Largo/71	0.035	0.014		(0.001)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)
P05	0.046	0.025	0.027		(0.001)	(0.002)	(0.003)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.003)	(0.002)	(0.003)	(0.002)
01/10	0.052	0.032	0.034	0.021		(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.003)	(0.002)	(0.003)	(0.003)
92-40140/1992	0.007	0.052	0.052	0.065	0.069		(0.001)	(0.002)	(0.001)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)
44083/93	0.073	0.055	0.054	0.066	0.07	0.009		(0.002)	(0.001)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.003)	(0.002)	(0.002)
95DC02150/1995	0.073	0.057	0.057	0.069	0.073	0.038	0.043		(0.002)	(0)	(0.001)	(0.001)	(0.001)	(0.003)	(0.001)	(0.001)
rAnhinga	0.074	0.057	0.056	0.068	0.072	0.006	0.005	0.043		(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.002)	(0.003)	(0.002)	(0.002)
95DC2345/1995	0.075	0.058	0.059	0.07	0.074	0.039	0.044	0.006	0.043		(0.001)	(0.001)	(0.001)	(0.003)	(0.001)	(0.001)
D9704285/1997	0.075	0.059	0.059	0.071	0.075	0.041	0.046	0.011	0.045	0.011		(0)	(0.001)	(0.003)	(0.002)	(0.001)
92-23071/1997	0.076	0.059	0.059	0.071	0.076	0.041	0.046	0.011	0.046	0.012	0.002		(0.001)	(0.003)	(0.002)	(0.001)
98CNN3-V1125/1998	0.077	0.061	0.061	0.073	0.077	0.043	0.048	0.01	0.047	0.01	0.016	0.016		(0.003)	(0.001)	(0.001)
211472/02	0.078	0.061	0.063	0.063	0.067	0.095	0.097	0.099	0.099	0.101	0.1	0.101	0.101		(0.003)	(0.003)
18719-03(USGS)/2003	0.085	0.07	0.071	0.083	0.087	0.052	0.057	0.021	0.056	0.021	0.026	0.027	0.014	0.11		(0.002)
19529-04(USGS)/2005	0.089	0.072	0.072	0.083	0.088	0.053	0.057	0.026	0.056	0.027	0.021	0.021	0.031	0.1	0.04	

Todos os resultados são baseados na análise em pares de 16 sequências. As análises foram conduzidas usando o método de Maximum Likelihood, KIMURA-2-Parâmetro no programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011). Os valores entre parênteses são os erros padrões obtidos através do método de bootstrap usando 1000 repetições.

Tabela 5. Resíduos de aa únicos na sequência deduzida da proteína F e HN do isolado APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 em comparação com os isolados do Genótipo V.

	<i>Resíduo de aminoácido e sua posição</i>													
	<i>Sequência deduzida de aa da proteína F</i>								<i>Sequência deduzida de aa da proteína HN</i>					
	28	106	107	452	509	510	517	522	47	111	266	328	373	437
APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75	Q	V	N	E	G	L	V	V	D	P	S	A	V	N
NDV/cormorant/Canada/98CNN3-V1125/1998	R	A	T	D	V	T	I	A	S	S	T	T	I	T
NDV/US(NV)/19529-04(USGS)/2005	L	A	T	D	V	T	I	A	S	S	T	T	I	T
NDV-P05	L	A	T	D	-	-	-	-	S	S	T	T	I	T
NDV/cormorant/US(CA)/92-23071/1997	L	A	T	D	V	T	I	A	S	S	T	T	I	T
NDV/cormorant/US(MN)/92-40140/1992	P	A	T	D	V	I	I	A	S	S	T	T	I	T
NDV/mixed species/U.S./Largo/71	L	A	T	D	V	I	I	A	G	S	T	T	I	T
NDV/comorant/US(CA)/D9704285/1997	L	A	T	D	V	T	I	A	S	S	T	T	I	T
NDV/cormorant/Canada/95DC02150/1995	R	A	T	D	V	T	I	A	S	S	T	T	I	T
NDV/cormorant/Canada/95DC2345/1995	R	A	T	D	V	T	I	A	S	S	T	T	I	T
NDV/cormorant/US(WI)/18719-03(USGS)/2003	R	A	T	G	V	A	I	T	S	S	T	T	I	T
NDV isolate rAnhinga	P	A	T	D	V	I	I	A	S	S	T	T	I	T
NDV isolate 01/10	L	A	T	D	V	I	I	A	S	S	T	T	I	T
NDV isolate gamefowl/U.S.(CA)/211472/02	P	A	T	D	I	V	I	A	S	S	T	T	I	T
NDV strain APMV-1/chicken/Ca/2098/71	L	A	T	D	V	I	I	A	S	S	T	T	I	T
NDV isolate anhinga/U.S.(FI)/44083/93	L	A	T	D	V	I	I	A	S	S	T	T	I	T

Como pode ser visto na Tabela 5, no isolado APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 existem oito resíduos de aminoácidos únicos na proteína F ($Q^{28} \rightarrow R/L/P$, $V^{106} \rightarrow A$, $N^{107} \rightarrow T$, $E^{452} \rightarrow D/G$, $G^{509} \rightarrow V$, $L^{510} \rightarrow T/I/A$, $V^{517} \rightarrow I$, $V^{522} \rightarrow A/T$) e seis na proteína HN ($D^{47} \rightarrow S / G$, $P^{111} \rightarrow S$, $S^{266} \rightarrow T$, $A^{328} \rightarrow T$, $V^{373} \rightarrow I$, $N^{437} \rightarrow T$). Algumas dessas modificações ocorreram na porção N-terminal dessas proteínas, em locais onde foram mapeados os principais epítomos neutralizantes (Figura 11 e 12) (YUSOFF et al., 1989; IORIO et al., 1991).

Na proteína F, quatro das oito mutações estão concentradas numa região altamente variável, posição 25-115, sugerindo que as mutações observadas nos outros isolados surgiram ao longo do tempo com as respostas imunes do hospedeiro. Pode-se supor que essas substituições, tenham resultado em desvio antigênico e mudanças na conformação da proteína (Xu et al., 2008).

A proteína F é responsável pela fusão célula-célula, hemólise e penetração do vírus no hospedeiro, sabe-se que esta proteína apresenta sete epítomos neutralizantes que são críticos tanto para a função quanto para a estrutura da mesma, e que mudanças nestes epítomos podem levar a mudanças conformacionais que podem contribuir possivelmente para o aumento da virulência ou evasão imune.

Na proteína HN encontramos seis modificações concentradas principalmente na porção C-terminal. Em um estudo prévio, GRAVEL e MORRISON (2003) demonstraram que substituições de aminoácidos na porção C-terminal da proteína HN são responsáveis pelo aumento ou diminuição da atividade de adsorção/fixação do vírus a determinados receptores de células alvo. A possibilidade que outras mutações na mesma região, ou numa região que tenha função relacionada, pode também contribuir para a virulência ou evasão imune.

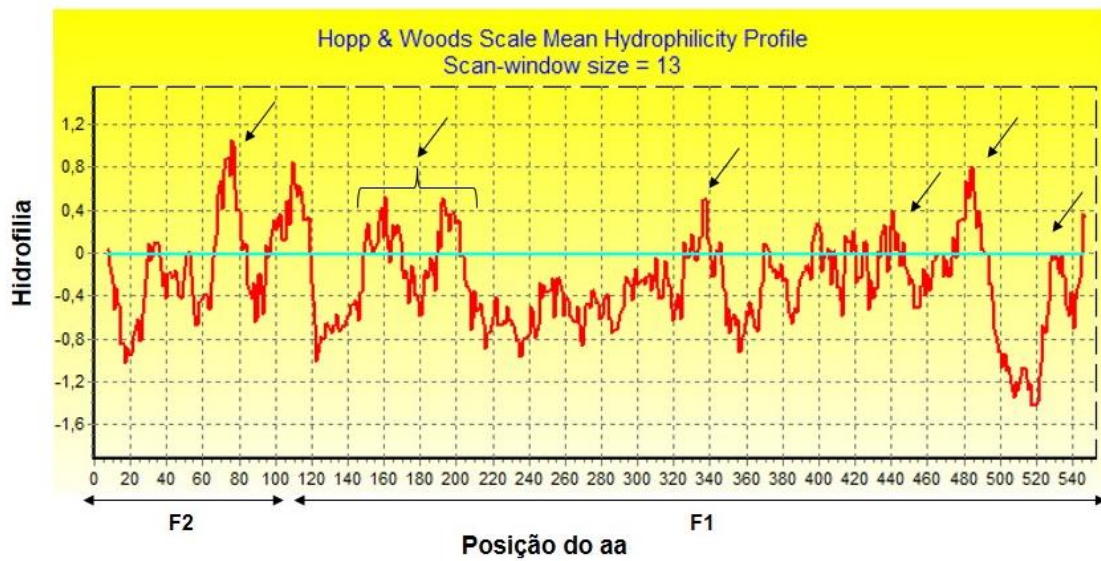


Figura 11. Perfil de hidrofiliçidade da seqüência de aa da proteína F da estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 mostrando os principais epítomos neutralizantes.

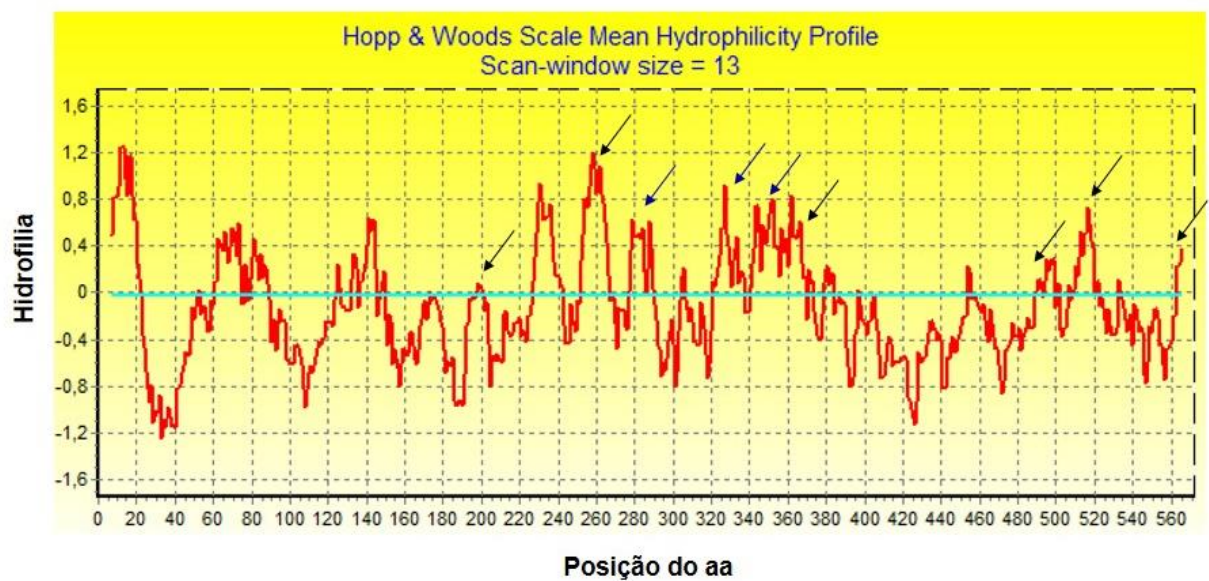


Figura 12. Perfil de hidrofiliçidade da seqüência de aa da proteína HN da estirpe LaSota (linha vermelha) e APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 (linha azul) mostrando os principais epítomos neutralizantes.

Tal fato é que estas modificações (nos genes F e HN) podem desempenhar um papel na virulência ou surgimento de mutações, as quais podem levar a formação de estirpes virulentas, na qual o vírus possa permanecer sob forma latente em algumas espécies de aves e desencadear a doença em outras (ALEXANDER et al., 1985; MONNE et al., 2006).

Confirmando este fato, o isolado APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75, apresenta este comportamento díspar para o VDN, isto é, a capacidade de promover, após a infecção experimental, rapidamente o óbito de aves da espécie *Gallus gallus*, enquanto que outras espécies de aves não galiformes não apresentam quaisquer sinais clínicos uma vez infectadas, apesar de estas aves poderem excretar o genoma viral por mais de 20 dias (CAMPIONI et al., 2012, MARTINS et al., 2012, DENADAI et al., 2011, CARRASCO et al., 2008, NISHIZAWA et al., 2007, PAULILLO et al., 2005, LIMA et al., 2004). Daí, a importância de que sejam realizados estudos adicionais com outras estirpes autóctones do VDN no Brasil para se alcançar uma melhor compreensão da dinâmica do processo infeccioso induzido pelo VDN em uma determinada região ou país.

A razão para essas diferenças de patogenicidade entre estirpes do VDN para diferentes espécies de aves tem sido investigada, e a análise molecular da patogênese dos paramixovírus também é alvo de estudos, de forma que desvendar as mínimas diferenças existentes entre estes inúmeros genomas, que são altamente similares, é de crucial importância.

A capacidade de uma estirpe para induzir a forma mais severa da doença de Newcastle está estreitamente relacionada com a presença de proteases virais que sejam capazes de clivar algumas estruturas polipeptídicas desse mesmo vírus (NAGAI et al., 1976; ALEXANDER et al., 1984; SEAL et al., 2005).

No entanto, a especificidade de hospedeiro não é uma característica típica de APMV-1, uma vez que um grande número de espécies hospedeiras são susceptíveis a diferentes estirpes do VDN (ALEXANDER, 1997; SEAL et al., 2005). Portanto, pode-se inferir que os surtos do VDN podem ocorrer sob condições de campo se uma estirpe patogênica é introduzida em uma área nunca desafiada por esse agente etiológico (ALEXANDER, 1995).

Além disso, outros fatores e marcadores presentes em outras proteínas do VDN, como a proteína HN e o complexo da polimerase (proteína L) podem também exercer atividades no sentido de conferir maior virulência, ou

inversamente, maior atenuação a uma dada estirpe do VDN (KIM et al., 2011; KIM et al., 2012).

Considerando que a taxa de variação de nucleotídeos é de aproximadamente 1% por década, em condições naturais de campo e em períodos de epizootias (CZEGLÉDI et al., 2002; WEHMANN et al., 2003), a acumulação de substituições únicas encontradas entre a estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 e os isolados do genótipo V é compatível com a hipótese de que a estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 é um provável ancestral original das estirpes do genótipo V, e que estas estirpes, isoladas recentemente, continuam a sofrer alterações genômicas pontuais (Tabela 4).

Ademais, como mencionado anteriormente, a acumulação de múltiplas substituições de aa nas proteínas F e HN pode ser resultado da pressão imune, a qual pode contribuir para o aumento da distância filogenética entre a estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 e os outros isolados do genótipo V. A presença dessa pressão seletiva em resíduos específicos de aa são reconhecidos como evolução adaptativa (HAN et al., 2008; MILLER et al., 2009).

5.2. Análise de ocorrência de seleção positiva e recombinação nos isolados do genótipo V

A acumulação de múltiplas substituições de aa nas proteínas F e HN, pode ser resultante de mecanismos de pressão seletiva imunológica e, dessa forma, essas mutações passariam a contribuir para um aumento da distância filogenética entre as diversas estirpes do VDN. Ademais, a pressão desta seleção, em resíduos específicos de aminoácidos são reconhecidas como evolução adaptativa de um dado patógeno (HAN et al., 2008; MILLER et al., 2009). É necessário portanto, descobrir qual estirpe viral está circulando e tentar desenvolver vacinas relacionadas aos vírus circulantes, pois elevadas distâncias antigênicas e filogenéticas entre as vacinas e as estirpes circulantes podem facilitar a evolução de VDN virulentos (MILLER et al., 2007).

Com a finalidade de caracterizar a evolução das estirpes do genótipo V do VDN, foram investigados, através da aplicação do teste de seleção positiva (SCHNEIDER e STEPHENS, 1990), os efeitos causados pelas substituições múltiplas de aa que ocorreram nas proteínas F e HN das demais estirpes do genótipo V em relação à estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75, uma vez que algumas regiões dessas proteínas contêm importantes epítomos vírus-neutralizantes.

Para fazer uma melhor identificação de regiões ou posições específicas dentro dos genes e das proteínas correspondentes F e HN que estão sob seleção positiva, foram calculadas em relação a cada códon as diferenças entre dN-dS e em relação a cada resíduo de aminoácidos foi determinado o valor da entropia.

Os resultados estão apresentados nas figuras 13 e 14, nas quais são plotados os valores das diferenças dN-dS contra os valores da entropia para cada um dos aminoácidos da proteína F e da proteína HN. Ficou evidenciado nessas análises que as posições de códons com valores de dN-dS positivos também apresentaram valores positivos de entropia para os resíduos de aminoácidos correspondentes, e estavam predominantemente localizadas em regiões previamente identificadas como sítios antigênicos de vírus-neutralização ou, no caso da proteína HN, com epítomos de interação com anticorpos inibidores da hemaglutinação.

Assim, apesar de a proporção média dS/dN para toda a sequência de nucleotídeos dos genes F e HN não ser sugestiva de que tenha ocorrido uma alta taxa evolutiva entre estas estirpes do genótipo V, foram encontradas fortes evidências da ocorrência de seleção positiva em determinadas regiões dos genes e das proteínas correspondentes F e HN, o que sugere que as estirpes do genótipo V estão passando por um processo de seleção.

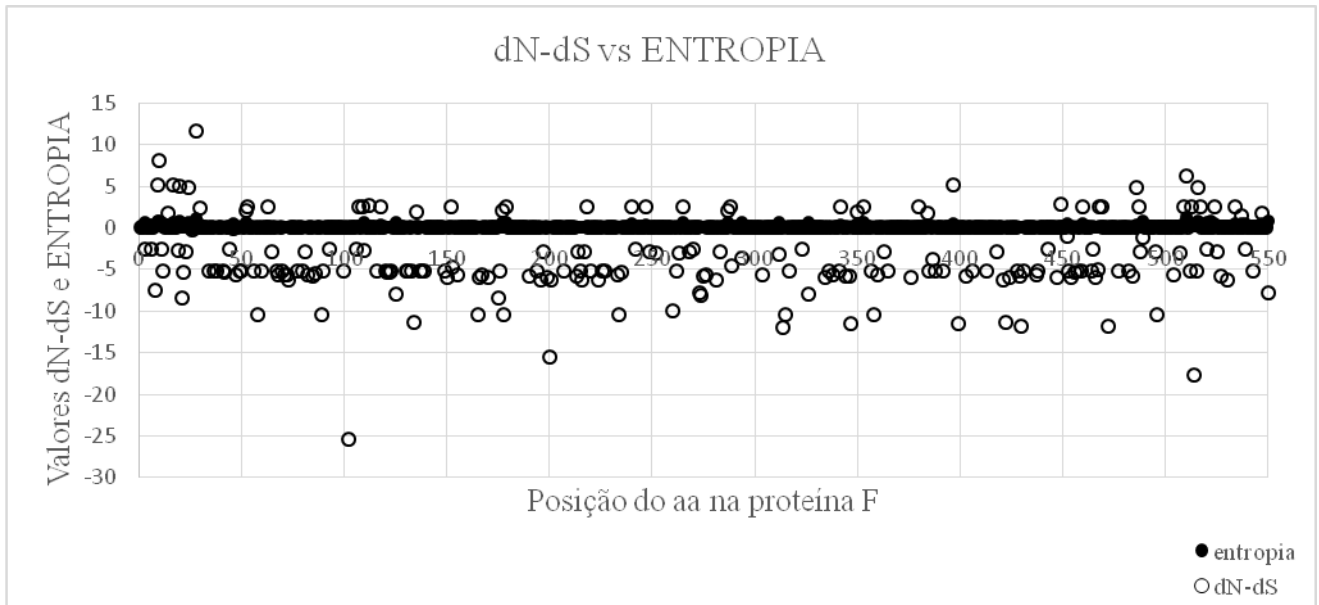


Figura 13. Valores de entropia e diferença entre não-sinônimos (dn) e sinônimos (ds) por cada posição de aminoácido da proteína F. Ambos os valores foram calculados utilizando-se o alinhamento de todos os isolados do genótipo V.

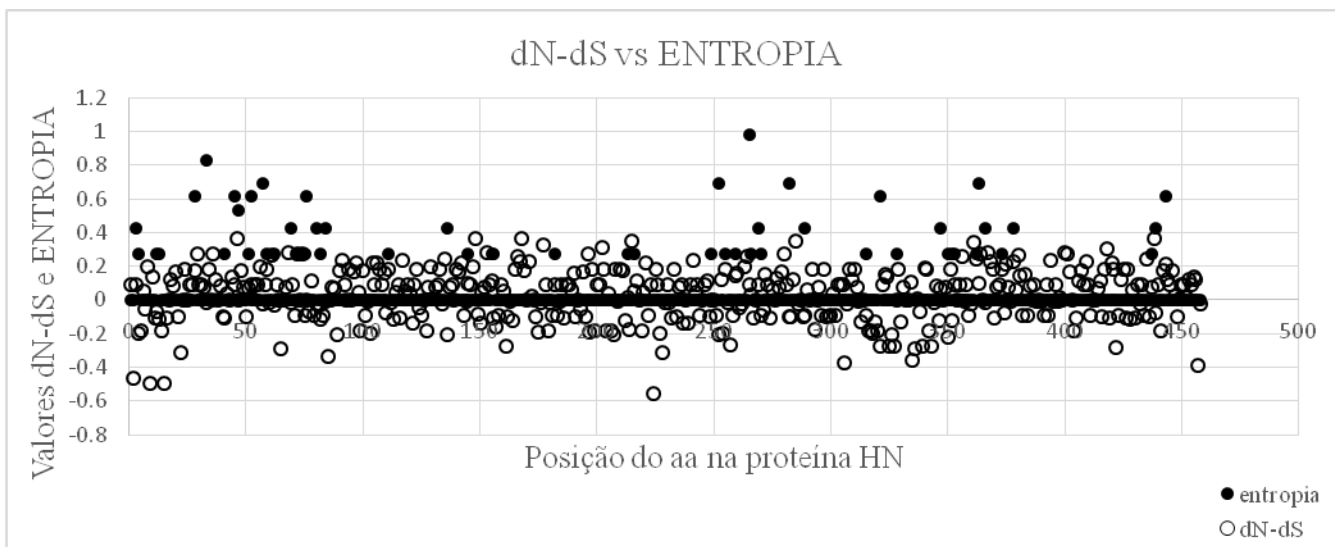


Figura 14. Valores de entropia e diferença entre não-sinônimos (dn) e sinônimos (ds) por cada posição de aminoácido da proteína HN. Ambos os valores foram calculados utilizando-se o alinhamento de todos os isolados do genótipo V.

Neste ponto, uma questão intrigante que surge é em relação aos fatores que podem atuar no sentido de contribuir para criar uma pressão de seleção positiva sobre essas estirpes do VDN, implicando na evolução das mesmas dentro do genótipo V. Nesse caso, as mutações selecionadas como

positivas poderiam levar estes isolados a escapar das respostas imunes do hospedeiro, que tenham sido infectados previamente com estirpes desse mesmo genótipo.

Além disso, evidências da ocorrência de pressão de seleção positiva foram descritas para outros RNA vírus e de forma análoga, foi demonstrado que esse processo seletivo afetou mais os resíduos de aminoácidos pertencentes a estrutura de sítios antigênicos importantes desses vírus e contra os quais a proteção cruzada parcial é induzida após a infecção ou vacinação (GRENFELL et al., 2004; HAYDON et al., 2001; HURST, 2002), o que portanto parece acontecer de forma similar com as estirpes do genótipo V do VDN registradas nesse estudo.

Um dado relevante que deve ser destacado é que a estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 e as estirpes isoladas na América do Norte, especialmente a estirpe Largo/71, que foi identificada pela primeira vez na Flórida no ano de 1971, apresentaram íntima relação filogenética. Isso pode reforçar a suspeita feitas pelos estudos epidemiológicos realizados por ocasião desses surtos de DN nesse país e que afirmavam que a estirpe Largo/71 foi introduzida nos EUA através da importação de aves exóticas portadoras do VDN, provenientes da América Central ou da América do Sul.

Em adição a isso, um outro ponto importante é que, desde 1998 e também durante os últimos anos, têm sido isoladas estirpes do VDN de infecções em aves de produção comercial no México, Honduras e Estados Unidos (OIE, 2003) e as análises filogenéticas desses isolados mais recentes do VDN resultaram numa relação epidemiológica estreita com as estirpes da América do Norte, América Central e América do Sul que estão agrupadas no genótipo V (PEDERSEN et al., 2004). Tal fato destaca a importância desse estudo, e também apontam para a relevância de se fazer uma contínua vigilância de aves comerciais e não-comerciais para a detecção e identificação genotípica mais precoce do VDN.

Devido à natureza altamente contagiosa do VDN e a similaridade de sintomas clínicos deste agente com outros altamente patogênicos, como por exemplo a influenza aviária, um constante monitoramento e rápido diagnóstico

é crucial para o controle e erradicação de aves infectadas. Uma vigilância epidemiológica ativa em aves silvestres e comerciais contribui para aumentar nossa compreensão sobre a predominância e evolução do VDN.

A rápida detecção e diferenciação é um desafio, devido à alta diversidade genética entre os VDN e também porque muitas vezes amostras vacinais e endêmicas são frequentemente indistinguíveis sorologicamente. A rápida diferenciação de estirpes de baixa virulência derivadas de vacinas e novos isolados altamente virulentos do VDN precisam ser investigados. Em adição, análises filogenéticas revelam que as estirpes de baixa virulência e elevada virulência estão continuamente envolvidas.

Neste estudo, realizou-se o sequenciamento completo do genoma da estirpe LaSota, que apresentou 99% de similaridade com estirpes publicadas no GenBank, classificadas como pertencente a classe II genótipo II, no qual a predominância é de estirpes vacinais avirulentas.

Já a análise das distâncias evolutivas do genoma completo e a das proteínas virais da estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 e outras estirpes pertencentes a classe I e classe II (genótipos I-X) do VDN demonstraram que este isolado é diferente, dos outros genótipos típicos do VDN e pertence ao genótipo V, encontra-se estreitamente relacionado a estirpe americana Largo/71 e a outros isolados recentes da América do Norte.

Apesar de o isolado APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75, não estar circulando atualmente entre os plantéis avícolas do Brasil e o nosso país estar há cerca de 7 anos livre de surtos de DN, frequentemente, isolados virulentos do VDN têm sido responsáveis por surtos de DN em outros países da América do Sul e Norte, evidenciando a importância de que seja realizada uma vigilância epidemiológica molecular contínua a fim de se conhecer de forma mais acurada a filogenia e a evolução tanto das estirpes circulantes como as isoladas há mais tempo, e possam assim ser definidas medidas mais efetivas de controle da Doença de Newcastle.

VI. CONCLUSÕES

- 6.1. O genoma de uma estirpe LaSota usada atualmente em vacinas comerciais, apresentou 99% de similaridade com estirpes do VDN publicadas no GenBank, e que são classificadas na classe II e no genótipo II, o qual é constituído predominantemente por estirpes vacinais avirulentas, indicando também, a despeito de sua longa utilização, apresenta pequena variabilidade.
- 6.2. O sequenciamento completo do genoma da estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 mostrou que esta estirpe pertence à classe II genótipo V do VDN.
- 6.3. As distâncias evolutivas do genoma completo e a comparação das sequências de nucleotídeos e deduzidas de aminoácidos das proteínas virais da estirpe APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 com relação a outras estirpes pertencentes a classe I e classe II (genótipos I-X) do VDN demonstraram que este isolado é diferente, da maioria dos outros genótipos típicos do VDN.
- 6.4. O isolado APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75 está estreitamente relacionado a estirpe americana Largo/71 e a outros isolados do genótipo V do VDN mais recentemente isolados na América do Norte, sugerindo que estes vírus estão filogeneticamente relacionados, em adição a associação temporal dos isolados mais antigos da década de 70 desse mesmo genótipo V do VDN.
- 6.5. Há distinções relevantes na comparação genômica e na composição proteica da estirpe vacinal LaSota e do isolado APMV-1/Chicken/Brazil/SJM/75, sobretudo no que concerne à proteína HN e alguns de seus epítomos indutores de anticorpos vírus neutralizantes.
- 6.6. Considerando-se que isolados circulantes do genótipo V do VDN, têm sido responsáveis por surtos da DN em outros países das Américas do Sul, Central e do Norte, fica evidenciada a importância de que seja realizada uma vigilância epidemiológica molecular contínua a fim de se conhecer de forma mais acurada a filogenia e a evolução tanto das estirpes circulantes como as isoladas há mais tempo para que medidas mais efetivas de controle da Doença de Newcastle possam ser definidas.

VII. REFERÊNCIAS

ABSALÓN, A. E. et al. Complete genome sequence of a velogenic Newcastle disease virus isolated in Mexico. **Virus Genes**, Norwell, v. 45, n. 2, p. 304-310, 2012.

ACHA, N. P.; SZYFRES, B. Enfermedad de Newcastle. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3rd ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2003. v. 2, p. 168-175.

ALDOUS E.W. et al. Rapid pathotyping of Newcastle disease virus (NDV) using fluorogenic probes in a PCR assay. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 80, p. 201–212, 2000.

ALDOUS E.W.; ALEXANDER D.J. Technical Review: Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 30, n. 2, p. 117–128, 2001.

ALAMARES, J.G.; LI, J.; IORIO, R.M. Monoclonal antibody routinely used to identify avirulent strains of Newcastle disease virus binds to an epitope at the carboxy terminus of the hemagglutinin-neuraminidase protein and recognizes individual mesogenic and velogenic strains. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 43, n. 8, p. 4229-4233, 2005.

ALEXANDER, D. J.; RUSSELL, P. H.; COLLINS, M. S. Paramyxovirus type 1 infections of racing pigeons: 1 characterization of isolated viruses. **Vet. Rec.**, London, v. 114, n.18, p. 444-446, 1984.

ALEXANDER, D. J. et al. Antigenic and biological characterization of avian paramyxovirus type 1 isolates from pigeons – an international collaborative study. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 14, n. 3, p. 365-376, 1985.

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease virus – an avian paramyxovirus. In: ALEXANDER, D. J. **Newcastle disease**. Boston: Kluwer Academic, 1988. p. 11- 22.

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease and other paramyxovirus infections. In: HOFSTAD, M. S.; BARNES, H. J.; CALNEK, B. W.; REID, W. M.; YODER, H.

N. **Diseases of Poultry**. 9th ed. Ames: Iowa State University Press, 1991. p. 496-519.

ALEXANDER, D. J. The epidemiological and control of avian influenza and Newcastle disease. **J. Comp. Pathol.**, Edinburg, n.112, p.105-126, 1995.

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease and other avian paramyxoviridae infections. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C.; MCDOUGLAD, L. R. (Ed.). **Disease of poultry**. 10th ed. 1997. p. 541-569.

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease – The gordon memorial lecture British. **Poultry Sci.**, London, n.42, p.5-22, 2001.

ALEXANDER, D.J.; MANVELL, R.J. Technical report of the community reference laboratory for newcastle disease, 2001. In: ANNUAL MEETINGS OF THE NATIONAL NEWCASTLE DISEASE AND AVIAN INFLUENZA LABORATORIES OF COUNTRIES OF THE EUROPEAN UNION, 8., 2002, Rome. **Proceedings...**

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease virus, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J.R.; FADLY, A. M.; MCDOUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. **Disease of poultry**. 11th ed. Ames: Iowa State University Press, 2003. p. 63-87.

ALEXANDER, D.J., BELL, J.G., ALDERS, R.G. **Thecnology Review: newcastle disease**. Roma: FAO, 2004. p.161.

ALEXANDER, D.J. Doença de Newcastle. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. (Org.). **Patologia aviária**. São Paulo: Editora Manole, 2009. p. 219-228.

ARAÚJO F. A. A. et al. Inquérito sorológico em aves migratórias and residentes de Galinhos/RN para detecção do vírus da Febre do Nilo Ocidental and outros vírus. **Bol. Elet. Epid.** 2004. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Boletim_eletronico_02_ano04.pdf. Acesso em: 15 nov. 2013

ARNS, C. W. et. al Paramyxoviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia veterinária**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2007. p. 659-687.

BALLAGI-PORDÁN, A. et al. Identification and grouping of Newcastle disease virus strains by restriction site analysis of a region from the F gene. **Arch. Virol.**, New York, v. 141, n. 2, p. 243-261, 1996.

BEARD, C.W., HANSON, R.P. Newcastle disease. In: HOTSTAD, M.S. (Ed.). **Disease of Poultry**. 8th ed. Ames: Iowa State University Press, 1984. p. 452–470.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Programa Nacional de Sanidade Avícola. **Plano de contingência para influenza aviária e doença de Newcastle**. Brasília, 2007. 52 p.

BRETANO, L. et al. Anticorpos para o vírus da anemia das galinhas (CAV) em matrizes de corte no Brasil. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, Campinas, v. 2, n. 2, p. 157-179, 2000.

CAMENISCH, G.; BANDLI, R.; HOOP, R. Monitoring of wild birds for Newcastle disease virus in Switzerland using real time RT-PCR. **J. Wild. Dis.**, Ames, v. 44, n. 3, p. 772-776, 2008.

CAMPIONI, J. M. et al. Relevance of chinese goose (*Anser cygnoides*) in experimental epidemiology of newcastle disease. **Braz. J. Vet. Pathol.**, Botucatu, v. 5, n. 2, p. 47-50, 2012.

CARRASCO, A. O. T. et al. Experimental infection of Newcastle disease virus in pigeons (*Columbia livia*): Humoral antibody response, contact transmission and viral genome shedding. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 129, n. 1-2, p. 89-96, 2008.

CARVALHO, M. C. C. G.; SILVA, D. C. G. Seqüenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 3, p. 735-744, 2010.

CHAN, E. Y. Advances in sequencing technology. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 573, n. 1-2, p. 13-40, 2005.

CHEN, L. et al. The structure of the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus suggests a novel paradigm for the molecular mechanism of membrane fusion. **Structure**, Philadelphia, v. 9, n. 3, p. 255-266, 2001.

CHO, S-H.; KIM, S-J.; KWON, H-J. Genomic sequence of a antigenic variant Newcastle disease virus isolated in Korea. **Virus Genes**, Norwell, v. 35, n. 2, p. 293-302, 2007.

CLAVIJO, A. et al. Velogenic Newcastle disease in imported caged birds. **Can. Vet. J.**, Ottawa, v. 41, n. 5, p. 404-406, 2000.

CONNARIS, H. et al. Probing the sialic acid binding site of the hemagglutinin-neuraminidase of Newcastle disease virus: identification of key amino acid involved in cell binding, catalysis, and fusion. **J. Virol.**, Washington, v. 76, n. 4, p.1816-1824, 2002.

CREELAN J.L., GRAHAM D.A.; MCCULLOUGH S.J. Detection and differentiation of pathogenicity of avian paramyxovirus serotype 1 from field cases using one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 31, n. 5, p. 493–499, 2002.

CRENNELL, S. et al. Crystal structure of the multifunctional paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase. **Nat. Struct. Biol.**, New York, v. 7, n.11, p. 1068-1074, 2000.

CUNHA, R. G.; SILVA, R. A. Isolamento e identificação do vírus da doença de Newcastle no Brasil. **Bol. Soc. Bras. Med. Vet.**, Rio de Janeiro, v. 23, p.17-33, 1955.

CZEGLÉDI, A. et al. The occurrence of five major Newcastle disease virus genotypes (II, IV, V, VI and VIIb) in Bulgaria between 1959 and 1996. **Epidemiol. Infec.**, Cambridge, v. 129, n. 3, p.679-688, 2002.

CZEGLÉDI, A. et al. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. **Virus Res.**, Amsterdam, v.120, n.1-2, p. 36-48, 2006.

CZIFRA, G. et al. Detection of PMV-1 specific antibodies with a monoclonal antibody blocking enzyme-linked immunosorbent assay. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 25, n. 4, p. 691-703, 1996.

DEIBEL, R. et al. Influenza viruses and paramyxoviruses in ducks in the Atlantic flyway, 1977-1983, including an H5N2 isolate related to the virulent chicken virus. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 29, n. 4, p. 970-985, 1985.

DENADAI, J. et al. Relevance of Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) in experimental epidemiology of Newcastle Disease. **Int. J. Poult. Sci.**, London, v. 10, n. 9, p. 691-693, 2011.

DIEL, D. G. et al. Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: Proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. **Infect. Genet. Evol.**, Amsterdam, v.12, p.1770-1779, 2012a.

DIEL, D. G. et al. Complete genome and clinicopathological characterization of virulent Newcastle disease virus isolate from South America. **J. Clin. Microbiol.**, Edinburgh, v. 50, n. 2, p.378-387, 2012b.

DOMINGO, E. Quasispecies Theory in Virology. **J. Virol.**, Washington, v. 76, n. 2, p. 463-465, 2002.

DORTMANS, J. C. F. M. et al. The Viral Replication Complex Is Associated with the Virulence of Newcastle Disease Virus. **J. Virol.**, Washington, v. 84, n. 19, p. 10113-10120, 2010.

DORTMANS, J. C. F. M. et al. Passaging of a Newcastle disease virus pigeon variant in chickens results in selection of viruses with mutations in the polymerase complex enhancing virus replication and virulence. **J. Gen. Virol.**, London, v. 92, n. 2, p. 336-345, 2011.

FEDURCO, M. et al. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. **Nucleic Acids Res.**, Osford, v. 34, n. 3, p. 69-73, 2006.

FLORES, M. L. et al. Epidemiologia da Doença de Newcastle – Revisão Bibliográfica. **Hora Vet.**, Porto Alegre, n. 26, p. 57-61, 2006.

GRAVEL, K. A.; MORRISON, T. G. Interacting domains of the HN and F proteins of Newcastle disease virus. **J. Virol.**, Washington, v. 77, n. 20, p. 11040-11049, 2003.

GRENFELL, B. T. et al. Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. **Science**, Washington, v.303, n.5656, p.327-332, 2004.

GOHM, D.S.; THUR, B.; HOFMANN, M.A. Detection of Newcastle disease virus in organs and faeces of experimentally infected chickens using RT-PCR. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 29, n. 2, p. 143-152, 2000.

GOTOH, B. et al. Mammalian subtilisin-related proteinases in cleavage activation of the paramyxovirus fusion glycoprotein: superiority of furin/PACE to PC2 or PC1/PC3. **J. Virol.**, Washington, v. 66, n. 11, p. 6391-6397, 1992.

HAN, G-Z. et al. Identification of a natural multi-recombinant of newcastle disease virus. **Virology**, New York, v. 371, n.1, p. 54-60, 2008.

HAYDON, D. T. et al. Evidence for positive selection in foot-and-mouth disease virus capsid genes from field isolates. **Genetics**, Austin, v. 157, n. 1, p. 7-15, 2001.

HERNÁNDEZ, M. S. et al. Pesquisa serologica sobre el vírus de la enfermedad de Newcastle em obreros avícolas y um grupo control. **Rev. Cubana de Hig. e Epidemiol.**, La Habana, v. 25, n.1, p. 77-84, 1987.

HUANG, Z. et al. The Hemagglutinin-Neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence. **J. Virol.**, Washington, v. 78, n. 8, p. 4176-4184, 2004.

HURST, L. D. The Ka/Ks ratio: diagnosing the form of sequence evolution. **Trends Genet.**, London, v. 18, n. 9, p. 486, 2002.

ICTV – The International Committee on Taxonomy of viruses. Virus Taxonomy. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/>>. Acesso em: 20 nov. 2013.

IORIO, R. M. et al. Functional and neutralization profile of seven overlapping antigenic sites on the HN glycoprotein of Newcastle disease virus: monoclonal antibodies to some sites prevent viral attachment. **Virus Res.**, Amsterdam, v. 13, n. 3 p. 245-262, 1989.

IORIO, R. M. et al. Neutralization map of the hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus: domains recognized by monoclonal

antibodies that prevent receptor recognition. **J. Virol.**, Washington, v. 65, n. 9, p. 4999-5006, 1991.

ISLAM, M. A. et al. Acquisition of pathogenicity of a Newcastle disease virus isolated from a Japanese quail by intracerebral passage in chickens. **Jpn. J. Vet. Res.**, Sapporo, v. 42, n. 3-4, p. 147-156, 1994.

JESTIN, V.; JESTIN, A. Detection of Newcastle disease virus RNA in infected allantoic fluids by in vitro enzymatic amplification (PCR). **Arch. Virol.**, New York, v. 118, n. 3-4, p. 118-151, 1991.

JONES, J. Provisional profile for Newcastle disease. Veterinary Surveillance Strategy. Department for environment food and rural affairs. 1-29, 2006. Disponível em: <<http://www.defra.gov.uk/animalh/diseases/>>. Acesso em: 29 out. 2013.

JORGE, M. A. et al. Reação respiratória forte não é indicação de melhor resposta imune na vacinação contra a Doença de Newcastle. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, Campinas, v. 3, p. 95, 2002.

JORGENSEN, E. D.; COLLINS, P. L.; LOMEDICO, P. T. Cloning and nucleotide sequence of Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase mRNA: identification of a putative sialic acid binding site. **Virology**, New York, v. 156, n. 1, p. 12-24, 1987.

KANT, A. et al. Differentiation of virulent and non-virulent strains of Newcastle disease virus within 24 hours by polymerase chain reaction. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 26, n. 4, p. 837-849, 1997.

KATTENBELT, J. A.; MEERS, J.; GOULD, A. R. Genome sequence of the thermostable Newcastle disease virus (strain I-2) reveals possible phenotypic locus. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 114, n. 1-2, p. 134-141, 2006.

KHO, C. L.; TAN, W, S; YUSOFF, K. Production of the nucleocapsid protein of Newcastle disease virus in Escherichia coli and its assembly into Ring- and nucleocapsid-like particles. **J. Microbiol.**, London, v. 39, n. 4, p. 293-299, 2001.

KIM, S. H. et al. Roles of the fusion and hemagglutinin-neuraminidase proteins in replication, tropism, and pathogenicity of avian paramyxoviruses. **J. Virol.**, Washington, v. 85, n. 17, p. 8582-8596, 2011.

KIM, S. H. et al. Replication, neurotropism, and pathogenicity of avian paramyxovirus serotypes 1–9 in chickens and ducks. **Plos One**, v. 7, n. 4, p. 34927, 2012.

KRISNAMURTHY, S.; SAMAL, S. K. Nucleotide sequences of the trailer, nucleocapsid protein gene and intergenic regions of Newcastle disease virus strain Beaudette C and completion of the entire genome sequence. **J. Gen. Virol.**, London, v. 79, n. 10, p. 2419-2424, 1998.

LAMB, R. A.; LOLAKOFSKY, D. Paramyxividae: the viroses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.(Ed.). **Fundamental virology**. Philadelphia: Lipincott-Raven, 1996. p. 1177-1204.

LAMB, R.; PARKS, G. Paramyxoviridae: the viruses and their replication, p 1449–1496. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. (Ed.). *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2007.

LANCASTER, H. J. E. Newcastle disease control by vaccination. **Veterinary Bulletin**, Oxon, v. 34, n. 2, p. 57-76, 1964.

LANCASTER, J. E.; ALEXANDER, D. J. **Newcastle disease**: virus and spread: a review of some of the literature. Ottawa: Departament of Agriculture, 1975.

LEEuw, O.; PEETERS, B; Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the exixtence of a new genus within the subfamily *Paramyxovirinae*. **J. Gen. Virol.**, London, v. 80, n. 1, p. 131-139, 1999.

LESK, A. **Introdução a bioinformática**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

LI, Z. et al. Effect of cleavage mutants on syncytium formation directed by the wild-type fusion protein of Newcastle disease virus. **J. Virol.**, Washington, v. 75, n. 5, p. 3789-3795, 1998.

LIMA, F. S. et al. Evaluation of diferente programs of Newcastle disease vaccination in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Int. J. Poult. Sci.**, Rotterdam, v. 3, n. 5, p. 354-356, 2004.

LIU, X. F. et al. Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during 1985-2001. **Arch. Virol.**, New York, n. 148, n. 7, p.1387-1403, 2003.

LOMNIEZI, B. et al. Newcastle disease outbreaks in recente years in Western Europe were caused by na old (VI) and a novel genotype (VII). **Arch. Virol.**, New York, v. 143, n. 1, p.49-64, 1998.

MACLEAN D.; JONES J. D. G.; STUDHOLME D. J. Application of “next generation” sequencing technologies to microbial genetics. **Nat. Rev. Microbiol.**, London, v. 7, n. 4, p. 287-296, 2009.

MALAVAZZI, G. **Avicultura**: manual prático. São Paulo: Liv. Nobel, 1999. p.132-133.

MARTINS, G. R. V. et al. Relevance of Lovebirds (*Agapornisroseicollis* Selby, 1836) in experimental epidemiology of newcastle disease. **Inter. J. Poult. Sci.**, Rotterdam, v. 11, n. 5, p. 338-340, 2012.

MERZ, D. V.; SCHEID, A. S.; CHOPPIN, P.W. Immunological Studies of the Functions of Paramyxovirus Glycoproteins. **Virology**, New York, v. 109, n. 1, p 94-96, 1981.

METZKER, M. L. Sequencing technologies – the next generation. **Nat. Rev. Genet.**, London, v. 11, n. 1, p. 31-46, 2010.

MEULEMANS, G., GONZE, M., MORAIS, D., DECAESSTECKER, M., e LAGRANGE, L. Isolamento, identificação, e caracterização de APMV-1 estirpes de frangos. No E. F.Kaletka, U. Heffels-redmann (Ed.), 1992.

McNULTY, M. S. et al. Isolation of an antigenically unusual paramyxovirus type 1 from chickens. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 17, n. 2, p. 509-513, 1988.

MILLER, P. J. et al. Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge. **Vaccine**, Kidlington, v. 25, n. 41, p. 7238-7246, 2007.

MILLER, P. J. et al. Evolutionary dynamics of Newcastle disease virus. **Virology**, New York, v. 391, n. 1, p.64-72, 2009.

MILLER, P. J.; DECANINI, E. L.; AFONSO, C. L. Newcastle disease: evolution of genotypes and the related challenges. **Infect. Genet. Evol.**, Amsterdam, v.10, n. 1, p.26-35, 2010.

MIR, L. **Genômica**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2004.

MIRZA, A.M.; DENG, R.; IORIO, R.M. Site-directed mutagenesis of a conserved hexapeptide in the paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein effects on antigenic structure and function. **J. Virol.**, Washington, v. 68, n. 8, p. 5093-3099, 1994.

MONNE, I. et al. Pigeon paramyxovirus isolated from a robin in Italy. **Vet. Rec.**, London, v. 158, n. 11, p. 384, 2006.

MORRISON, T. et al. The role of the amino terminus of F1 of the newcastle disease virus fusion protein in cleavage and fusion. **Virology**, New York, v. 193, n. 2, p. 997-1000, 1993.

NAGAI, Y.; KLENK, H. D.; ROTT, R. Proteolytic cleavage of the viral glycoprotein and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. **Virology**, New York, v. 72, n. 2, p.494-508, 1976.

NAGY, E. et al. Cloning and expression on NDV hemagglutinin-neuraminidase cDNA in a baculovirus expression vector-system. **Virology**, New York, v. 176, n. 2, p. 426-438, 1990.

NAYAK, B. et al. Avian paramyxovirus serotypes 2-9 (APMV-2-9) vary in the ability to induce protective immunity in chickens against challenge with virulent Newcastle disease virus (APMV-1). **Vaccine**, Kidlington, v. 30, n. 12, p. 2220-2227, 2012.

NISHIKAWA, K. et al. Topological and operational delineation of antigenic sites on the HN glycoprotein of Newcastle disease virus and their structural requirements. **J. Virol.**, Washington, v. 60, n. 3, p. 987-993, 1986.

NISHIZAWA, M. et al. Newcastle disease in white *Pekinducks*: response to experimental vaccination and challenge. **Braz. J. Poult. Sci.**, Campinas, n.9, p.123-125, 2007.

OFFICE INTERNATIONAL EPIZOOTIES DISEASE INFORMATIONAL. Handistatus II. International animal health code. Paris, 2003. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso em: 15 out. 2013.

OFFICE INTERNATIONAL EPIZOOTIES DISEASE INFORMATION. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 5th ed. Paris: OIE, 2004. Chapter 2.1.15. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso em: 15 out. 2013.

OFFICE INTERNATIONAL EPIZOOTIES DISEASE INFORMATION. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 2008. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/info/hebdo/AIS_59.HTM#Sec8>. Acesso em: 18 out. 2013.

OFFICE INTERNATIONAL EPIZOOTIES DISEASE INFORMATION. Manual of standards for diagnostics tests and vaccines for terrestrial animals: Mammals, Birds and Bees. Paris: OIE, 2009. Chapter 2.3.14. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso em: 15 out. 2013.

OFFICE INTERNATIONAL EPIZOOTIES DISEASE INFORMATION. World Animal Health Information Database (WAHID) Interface. 2011. Disponível em: <<http://web.oie.int/wahis/public.php?page=homeeWAHIDPHPSESSID=4d95e8777ff8b8a615b31617ac4c7835>>. Acesso em: 23 out. 2013.

OGASAWARA, T. et al., Expression of factor X and its significance for the determination of paramyxovirus tropism in the chick embryo. **EMBO J.**, Oxford, v. 2, n.11, p.467-472, 1992.

OLIVEIRA, B.O. et al. Biological characterization of M33 field isolate of Newcastle Disease virus. **Virus Rev. Res.**, Belo Horizonte, v. 5, n. 2, p. 56, 2000.

OLIVEIRA, E.S. et al. A liquid-phase-blocking concanavalin A enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against Newcastle disease virus in serum of free-ranging pigeons. **J. Vet. Diagn. Invest.**, Columbia, v. 25, n. 6, p. 720-726, 2013.

OLIVEIRA JUNIOR, J.G. et al. Vírus da doença de Newcastle em aves não Vacinadas no estado do Rio de Janeiro. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 33, n.2, 2003.

OLIVEIRA JUNIOR, J. G. et al. Isolamento e caracterização biológica da amostra JAP99 do vírus da doença de Newcastle isolada de patos domésticos (Neta SP) no Rio de Janeiro. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 35, n.4, 2005.

ORSI, M.A. et al. Controle de qualidade de vacinas vivas contra a doença de Newcastle no período de 1996 a 1998. **Rev. Brasil. Cienc. Avic.**, Campinas, p. 77, 1999. Suplemento.

ORSI, M.A. et al. Quality control of live vaccines against Newcastle disease in the period 1993 to 2000. **Virus Rev. Res.**, Belo Horizonte, v. 2, n. 6, p. 126, 2001.

ORSI, M. A. L. et al. Prevalence of NDV in broiler chickens (*Gallus gallus*) in Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, n. 41, n. 2, p.349-357, 2010.

PANDA, A. et al. Loss of N-linked glycosilation from the hemagglutinin-neuraminidase protein alters virulence of Newcastle disease virus. **J. Virol.**, Washington, v. 78, n. 10, p. 4965-4975, 2004.

PANSHIN, A. et al. Antigenic heterogeneity amongst the field isolates of Newcastle Disease Virus (NDV) in relation to the vaccine strain. Part II: studies

on viruses isolated from domestic birds in Israel. **Comp. Immunol. Microbiol. Infec.Dis.**, Oxford, v. 25,n. 3, p. 173-85, 2002.

PAULILLO, A. C. et al. Importância das perdizes (*Rhynchotus rufescens*) como fonte potencial de vírus patogênico da doença de newcastle para aves domésticas. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 313-317, 2005.

PAULILLO, A.C.; JÚNIOR, L.D. Doença de Newcastle. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. (Ed.). **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2009. p. 267-276.

PHAM, H. M. et al. Molecular characterization of the nucleocapsid protein gene of Newcastle disease virus strain in Japan and development of a restriction enzyme-based rapid identifying method. **Arch. Virol.**, New York, v. 149, n. 8, p. 1559-1569, 2004.

PHAM, H. M. et al. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Newcastle disease virus. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 43, n. 4, p. 1646-1650, 2005.

PRABAKARAN, M. et al. Development of epitope-blocking ELISA for universal detection of antibodies to human H5N1 influenza viruses. **Plos One**, v. 4, n. 2, 2009.

PEDERSEN, J. C. et al., Phylogenetic relationships among virulent newcastle disease virus isolates from the 2002-2003 outbreak in California and other recent outbreaks in north America. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 42, n. 5, p. 2329–2334, 2004.

PEETERS, B. P. H. et al. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. **J. Virol.**, Washington, v. 73, n. 6, p. 5001-5009, 1999.

PEETERS, B. P. H. et al. Genome replication of Newcastle disease virus: involvement of the rule-of-six. **Arch. Virol.**, New York, v.145, n. 9, p.1829-1845, 2000.

PEETERS, B. P. H, et al. Generation of a recombinant chimeric Newcastle disease virus vaccine that allows serological differentiation between vaccinated and infected animals. **Vaccine**, Kidlington, v.19, n. 13-14, p.1616-1627, 2001.

PEIRIS, J.S.M.; JONG, M.D.; GUAN, Y. Avian Influenza virus (H5N1): a threat to human health. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 20, n. 2, p. 243-267, 2007.

PERALES, C. Monitoring sequence space as test for the target of selection viruses. **J. Mol. Biol.**, London, v. 345, n. 3, p. 451-459, 2005.

PEROZO, F. et al. Biological and phylogenetic characterization of virulent Newcastle disease virus circulating in Mexico. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 52, n. 3, p. 472-479, 2008.

RASSA, J. C. et al. Spacing constraints on reinitiation of paramyxovirus transcription: the gene end U tract acts as a spacer to separate gene end from gene start sites. **Virology**, New York, v. 274, n. 2, p.438-449, 2000.

RICHTZENHAIN, J. L. et al. Relation between the hemagglutination inhibition test and indirect ELISA in serologic monitoring of laying Hens submitted to different systems of vaccination against Newcastle disease. **Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 24, p.187-91, 1993.

ROMER-OBBERDORFER, A. et al. Contribution of the length of the HN protein and the sequence of the F protein cleavage site to Newcastle disease virus pathogenicity. **J. Gen. Virol.**, London, v. 84, n. 11, p. 3121-3129, 2003.

ROWE, T. et al. Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, n. 4, p. 937-943, 1999.

SAMSON, A. C. R. Virus structure. In: ALEXANDER, D.J. (Ed.). **Newcastle disease**. Boston: Kluwer Academic Publisher, 1988. p. 23-44.

SANGER, F. et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phiX174 DNA. **Nature**, London, v. 265 p. 687-695, 1977.

SANTOS, J. A. A ocorrência da doença de Newcastle no Brasil (nota prévia). **Rev. Prod. Anim.**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 5 -12, 1954.

SCAL, B. S. Nucleotide and predicted amino acid sequence analysis of the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase protein genes among Newcastle disease virus isolates. Phylogenetic relationship among the Paramyxovirinae based on attachment glycoprotein sequences. **Func. Int. Genom.**, n. 4, p. 246-257, 2004.

SCHNEIDER, T. D.; STEPHENS, R. M. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 18, p. 6097-6100, 1990.

SEAL, B. S. Analysis of matrix protein gene nucleotide sequence diversity among Newcastle disease virus isolates demonstrated that recent disease outbreaks are caused by viruses of psittacine origin. **Virus Genes**, Norwell, v. 11, n. 2-3, p. 217-224, 1996.

SEAL, B.S. et al. Phylogenetic relationship among high virulent NDV isolates obtained from exotic birds and poultry from 1989 to 1996. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 36, n. 4, p.1141-1145, 1998.

SEAL, B. S; KING, D. J; SELLERS, H.S. The avian response to Newcastle disease virus. **Dev. Immunol.**, London, v. 24, p. 257-268, 2000.

SEAL, B. S. et al. Genomic sequences of low-virulence avian paramyxovirus-1 (Newcastle disease virus) isolates obtained from live-bird markets in North America not related to commonly utilized commercial vaccine strains. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 106, n. 1-2, p. 7-16, 2005.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnol.**, New York, v. 26, n. 10, p. 1135-1145, 2008.

SILVA, J. S. A. et al. Newcastle disease virus infection in sparrows (*Passer domesticus*, Linnaeus, 1758) captured in poultry farms of agreste region of the State of Pernambuco. **Rev. Bras. de Cien. Avic.**, Campinas, v. 8, n. 2, p. 125-129, 2006.

SILVA, K.R. et al. Estudo comparativo entre os testes de HI e o ELISA-lectina para a detecção de anticorpos contra o VDN em frangos de corte vacinados. **Biológico**, São Paulo, v.71, n.2, p.88, 2009.

SNOECK C. J. et al. Newcastle disease virus in West Africa: new virulent strain identified in non-commercial farms. **Arch. Virol.**, New York, v.154, n.1, p.47-54, 2009.

SOUSA, R. L. M.; MONTASSIER, H.J.; PINTO, A. A. Comparison between the Indirect ELISA, Sandwich ELISA and Hemagglutination Inhibition Test for the detection of antibodies against Newcastle disease virus. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, Campinas, v. 01, n. 01, p. 43-47, 1999.

STUDILLO, J. A. Newcastle disease outbreak in captive exotic birds. In: WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE, 21., 1972, San Diego. **Proceedings...**San Diego: University of California, 1972. p. 70-73.

TAMURA, K.; KUMAR, S. Evolutionary distance estimation under heterogeneous substitution pattern among lineages. **Mol. Biol. Evol.**, Chicago, v. 19, n. 10, p. 1727-1736, 2002.

TAMURA, K. et al., MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol. Biol. Evol.**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

THAYER, S. G.; VILLEGAS, P.; FLETCHER, O. J. Comparison of two commercial Enzyme-Like Assays and conventional methods for avian serology. **Avian Dis.**, Kennett Square, v. 31, n. 1, p. 120-124, 1986.

THOMPSON, I. D. et al. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TOYODA, T. et al. Structural comparison of the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus. **Virology**, New York, v. 158, n. 1, p. 242-247, 1987.

TSAI, H-J. et al. Antigenic and genotypical characterization of Newcastle disease virus isolated in Taiwan between 1969 and 1996. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 104, n. 1-2, p. 19-30, 2004.

TURCATTI, G. et al. A new class of cleavable fluorescent nucleotide: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 36, n. 4, p. e25, 2008.

VERNOERD, D. J. Ostrich diseases. **Rev. Sci. Tech. Off Int. Epiz.**, v. 19, n.2, p. 638-661, 2000.

VIANNA, J. S. M. et al. Identificação e caracterização biomolecular do vírus da doença de Newcastle pela técnica de RT-PCR. **Rev. Bras. Med. Vet.**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 4, 2000.

XU, M. et al. Genomic analysis of Newcastle disease virus strain NA-1 isolated from geese in China. **Arch. Virol.**, New York, v.153, n. 7, p. 1281-1289, 2008.

YAN, Y.; SAMAL, S. K. Role of intergenic sequences in Newcastle disease virus RNA transcription and pathogenesis. **J. Virol.**, Washington, v. 82, n. 3, p. 1323–1331, 2008.

YU, L. et al. Characterization of newly emerging Newcastle disease virus isolates from the People's Republic of China and Taiwan. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 39, n. 10, p. 3512-3519, 2001.

YUSOFF, K. et al. Location of epitopes within the haema gglutinin-neuraminidase (HN) protein of Newcastle disease virus by sequencing the HN genes of monoclonal antibody-resistant mutants. **Virus Res.**, Amsterdam, v. 11, n. 3, p. 12-12, 1998.

YUSOFF, K. et al. Location of neutralizing epitopes on the fusion protein of Newcastle disease virus strain Beaudette C. **J. Gen. Virol.**, London, v. 70, n. 11, p. 3105-3109, 1989.

YUSOFF, K.; TAN, W.S. Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 30, n. 5, p. 439-455, 2001.

WALKER, J. W.; HERON, B. R.; MIXON, M. A. Exotic Newcastle disease eradication program in the United States. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 17, n. 3, p. 486-503, 1973.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids. **Nature**, London, v. 171, n. 4356, p. 737-738, 1953.

WEHMANN, O. et al. Lentogenic field isolates of Newcastle disease virus isolated in Canada and Hungary are identical with the vaccine type used in the region. **Avian Pathol.**, Huntingdon, v. 28, n. 1, p. 6-12, 1999.

WEHMANN, E. et al. Genetic analysis of Newcastle disease virus strains isolated in Bosnia-Herzegovina, Croatia, Slovenia and Yugoslavia, reveals the presence of only a single genotype, V, between 1979 and 2002. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 94, n. 4, p. 269-281, 2003.

WISE, M.G. et al. Development of a Real-Time Reverse-Transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 42, n.1, p.329-338, 2004.

ZANETTI, F. et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of Newcastle disease virus isolates from healthy wild birds. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 49, n. 4, p.546-550, 2005.