



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

FLÁVIA VOLPATO VIEIRA

**CORONAVIRUS CANINO: ASPECTOS BIOENERGÉTICOS
RELACIONADOS COM A INFECÇÃO *IN VITRO* DE
MACRÓFAGOS CANINOS**

Araçatuba – SP
2019

FLÁVIA VOLPATO VIEIRA

**CORONAVIRUS CANINO: ASPECTOS BIOENERGÉTICOS
RELACIONADOS COM A INFECÇÃO *IN VITRO* DE
MACRÓFAGOS CANINOS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Orientadora: Profa. Associada
Tereza Cristina Cardoso da Silva

**Araçatuba – SP
2019**

V658c

Vieira, Flávia Volpato

Coronavirus Canino: aspectos bioenergéticos relacionados com a infecção in vitro de macrófagos caninos / Flávia Volpato Vieira. -- Araçatuba, 2019

89 p. : il., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba

Orientadora: Tereza Cristina Cardoso da Silva

1. Enterite. 2. Cães. 3. Mitocôndria. 4. Apoptose. 5. Morte celular. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Coronavírus Canino: Aspectos Bioenergéticos relacionados com a infecção *in vitro* de macrófagos

Título: caninos

AUTORA: FLÁVIA VOLPATO VIEIRA

ORIENTADORA: TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Dra. TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. WAGNER LUIS FERREIRA

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. ROBERTO GAMEIRO DE CARVALHO

Departamento de Apoio Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. ACÁCIO DUARTE PACHECO

Centro de Ciências Biológicas e de Natureza / Universidade Federal do Acre - Câmpus de Rio Branco

Prof. Colaboradora KARINA YUKIE HIRATA

Setor de Veterinária e Produção Animal / Universidade Estadual do Norte do Paraná/UENP

Araçatuba, 28 de junho de 2019.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Flávia Volpato Vieira - nascida em 17 de novembro de 1988 na cidade de Dois Córregos – SP. Médica Veterinária formada pela Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, campus de Araçatuba – SP no ano de 2011. Ingressou em 2012 no programa de residência na área de Clínica e Cirurgia, com ênfase em Clínica Médica de Pequenos Animais pela mesma universidade, tendo-o concluído em 2014. Mestra em Ciência Animal (2015), pela mesma instituição, iniciou o curso de Pós-graduação em Ciência Animal (doutorado), área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, na Faculdade de Medicina Veterinária, Unesp, campus de Araçatuba – SP, em março de 2016, sob orientação da Professora Associado Tereza Cristina Cardoso da Silva. Atuou como docente colaboradora nas disciplinas de Clínica e Semiologia Veterinária na Universidade Estadual do Norte do Paraná, entre os anos de 2015 e 2017. Atualmente é docente efetiva do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas atuando no curso de Graduação em Medicina Veterinária, responsável pela disciplina de Clínica Médica de Cães e Gatos e disciplinas de áreas afins.

Aos meus pais (Edilon e Sueli♥), minha irmã (Marília) e ao meu noivo (Daniel), por me ensinarem o sentido da palavra amor, pelo apoio incondicional e incentivo durante toda minha vida.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao finalizar uma etapa é com o coração cheio de alegria que tenho a oportunidade de agradecer a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que fosse possível chegar até aqui.

Primeiramente agradeço a Deus, por me presentear com a vida e, mais ainda, por me permitir encontrar pessoas maravilhosas em meu caminho e me fazer acreditar que o bem existe. Obrigada por ter me dado forças quando tudo ficou tão difícil e me mostrar que mesmo quando não conseguimos entender, seguir adiante vale a pena, por mais difícil que pareça o caminho.

A minha “eterna” orientadora, Prof^a Dr^a Tereza Cristina Cardoso da Silva, pelas oportunidades a mim oferecidas desde o início da graduação. Obrigada por todo conhecimento que compartilhou comigo e todos os ensinamentos nesses mais de 10 anos! Obrigada por ter me apresentado ao mundo da pesquisa e pela paciência para que eu me adaptasse a um laboratório. Obrigada, principalmente, pela amizade e por todo o incentivo para que eu pudesse seguir em frente. Ter seu apoio e auxílio foi fundamental para que eu chegasse até aqui. A você, “TC”, minha eterna gratidão e admiração!

Agradeço aos meus pais, Odilon e Sueli, por tudo aquilo que eu sou. Sei que os esforços e renúncias não foram poucos para que eu conquistasse meus objetivos. Obrigada por terem me educado para o bem, por terem me dado a oportunidade do estudo e por terem me mostrado que sempre há um caminho correto e, que se houver persistência, tudo se torna possível. Obrigada pelo amor, carinho e incentivo. Por me fazerem ter a certeza que eu vou sempre poder “voltar pra casa” e que vai ficar tudo bem. Mãe, você é minha grande saudade, meu maior exemplo de perseverança e fé. Obrigada por mesmo nesses quase 10 anos de saudade continuar a me ensinar a ser um ser humano melhor. Pai, obrigada por ser nosso herói, cuidar de nós e entender minha ausência a maior parte do tempo. Se não fosse seu apoio e dedicação nada disso seria possível. Amo vocês!

A minha irmã, Marília, companheira dessa vida. Aquela que nasceu para me mostrar que juntas sempre será melhor que sozinha. Obrigada por se fazer tão presente em minha vida, mesmo com os quilômetros que nos separam fisicamente há tantos anos. Seu amor e sua amizade me dão paz e segurança, pois sei que independentemente do que aconteça, você sempre estará ali. Obrigada por me ouvir, me aconselhar e dar forças para que eu sempre siga adiante. Te amo!

Ao meu amor, meu companheiro, Daniel. Você é sem dúvida o meu grande presente. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos e dividir comigo todas as aventuras nessa jornada da vida! Obrigada por ser meu grande apoiador, incentivador e porto seguro. Meu amigo, meu noivo, meu parceiro de profissão. Ter você ao meu lado me motiva a querer ser uma pessoa sempre melhor. Obrigada por me mostrar que juntos é possível e sempre melhor e por cada renúncia que eu sei que fez para que essa conquista fosse possível. Juntos realizaremos todos os nossos sonhos. Você é o motivo do meu sorriso. Te amo!

Aos meus avós, Odilon e Enny, por terem aquele colo que só os avós sabem dar. Pelas palavras sábias e conselhos na hora certa, por todo amor e carinho que dedicam a mim. Amo vocês!

As minhas “meninas” Susi, Polly e Paçoca. Vocês fazem da nossa casa um lar, tornam nossa vida mais feliz e me dão o amor mais puro que uma pessoa pode receber. É também por vocês que desejo ser uma profissional sempre melhor. Em especial, obrigada Susi, por ser minha companheirinha há 17 anos, estando ao meu lado em todos os momentos desde adolescência e por ser minha grande motivação até mesmo quando escolhi uma carreira para seguir. Obrigada por terem me permitido cuidar de vocês. Obrigada também aos meus outros amores caninos Astor, Amora e Ágatha (♥), vocês fazem o meu mundo melhor!

Aos meus amigos “de Araçatuba”: Acácio, Aline “Guria”, Arthur, Bruna, Ju Stephani, Ju Wagatsuma, Karina, Larissa, Mari, Mariah, Matheus. Obrigada pelo convívio

nesses mais 12 anos de Araçatuba. Foi a amizade de vocês que fez dessa cidade um lugar maravilhoso e ter o apoio de vocês nas diferentes fases que vivi aqui foi fundamental para que tudo fosse possível! Sorte a minha em ter vocês na minha vida! Obrigada! Amo vocês!

Aos meus queridos amigos de Bandeirantes: Emília, Petrônio, Léo, Gabi, Thais, Chico e João. Obrigada por me acolherem com tanto amor nessa cidade da qual eu sinto tanta saudade. Por sempre terem bons conselhos e por todos os ensinamentos nesse tempo de UENP. Levo vocês no meu coração onde quer que eu esteja!

Aos meus companheiros de IFAM/Manaus: Alexandre, Camila, Felipe, Isadora, Mamá, Jaqueline, Mariza, Rejane e Rodrigo. Pela amizade, conversas, desabafos, churrascos e por serem família quando estamos tão longe de casa. Obrigada pelo convívio diário. Ter vocês por perto foi essencial para que eu pudesse completar essa jornada.

Ao Prof. Dr. Wagner Luis Ferreira, por ter me apresentado a clínica médica de pequenos animais e despertado meu interesse pela área desde então. Obrigada por todos os ensinamentos desde os tempos da graduação, pela orientação durante a residência e por me mostrar o quanto a integridade e humildade fazem a diferença. Foi uma honra poder ter convivido com o senhor, uma pessoa e profissional exemplar, pelo qual tenho grande admiração! Muito obrigada!

À Profª Drª Kátia Denise Saraiva Bresciani, e ao Prof. Dr. Roberto Gameiro de Carvalho pelas contribuições na banca do exame geral de qualificação, por todo o aprendizado e pela oportunidade de ter sido aluna de vocês.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas pelo afastamento concedido para que eu pudesse concluir o doutorado. Pelo apoio recebido para minha capacitação profissional e a oportunidade de ser docente dessa casa.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA - UNESP), por disponibilizar os meios necessários para desenvolvimento do projeto de pesquisa e por todo aprendizado oferecido desde a graduação até o doutorado. Aqui eu cresci como pessoa, amadureci, me tornei profissional. São inúmeras as memórias quando ouço esse nome ou venho a esse lugar. Nesses mais de 12 anos como aluna eu só tenho a agradecer por tanto que recebi aqui. Obrigada a todos aqueles que fizeram parte dessa minha história, desde a graduação, residência e pós-graduação. É com muito orgulho que sou egressa dessa casa.

Por último, mas não menos importante, aos meus alunos, por me ensinarem sempre e me incentivarem a ser uma pessoa e profissional melhor. Pela paciência e apoio nos meus erros e acertos. É também por vocês que quero sempre continuar! Obrigada!

Muito Obrigada!!

*"Comece fazendo o que é
necessário, depois o que é
possível, e de repente você estará
fazendo o impossível".*

(São Francisco de Assis)

VIEIRA, F.V. **Coronavirus Canino: Aspectos bioenergéticos relacionados com a infecção *in vitro* de macrófagos caninos.** 2019. 89 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

RESUMO

Coronavirus são RNA vírus sentido positivo, envelopados, comumente associados a infecções brandas em aves e mamíferos. A infecção por CCoV é comum em cães jovens, principalmente em animais que vivem em canis e abrigos, associada à ocorrência de diarreia branda e autolimitante, causada pela infecção das células das vilosidades do intestino delgado. São conhecidos dois genótipos: CCoV-I e CCoV-II, o qual é subdividido em CCoV-IIa e CCoV-IIb. O CCoV-IIa, é uma variante altamente patogênica associada à doença sistêmica e acentuada linfopenia. Diferentemente de outros CCoV realiza viremia e, assim, determina a disseminação do vírus para diversos órgãos, incluindo tecidos linfóides. Nesse sentido, o envolvimento da infecção de macrófagos correlacionada à gravidade da doença e linfopenia, vem sendo sugerido. Este trabalho teve por objetivo promover a infecção de macrófagos caninos derivados de monócitos sanguíneos e avaliar a replicação viral, despolarização da membrana mitocondrial e os complexos da cadeia respiratória mitocondrial às 6, 12, 18 e 24 horas pós-infecção. A estatística descritiva incluiu média $\pm$ desvio padrão (s.d.). As médias foram comparadas através da análise de variância, ANOVA. Foi possível observar que a infecção por CCoV induziu a liberação de novas partículas virais entre 18 e 24 horas pós-infecção. Ainda, a infecção viral esteve associada à despolarização e disfunção da membrana mitocondrial, afetando o complexo III da cadeia respiratória. Desse modo, acredita-se que o CCoV induz a uma falha bioenergética mitocondrial, atuando como um desacoplador da cadeia respiratória no complexo III dos macrófagos caninos infectados, sem comprometer a replicação viral. A patogenia da doença causada pela variante pantrópica do CCoV é pouco elucidada e, assim, os achados desse estudo podem auxiliar na compreensão da interação vírus-hospedeiro.

Palavras-Chave: Enterite. Cães. Mitocôndria. Apoptose. Morte celular.

VIEIRA, F.V. **Canine Coronavirus: Bioenergetic aspects related to *in vitro* infection of canine macrophages**. 2019. 89 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

ABSTRACT

Coronaviruses are enveloped positive-sense RNA viruses commonly associated with mild infections in birds and mammals. CCoV infection is common in young dogs, especially kennel and shelter animals, associated with the occurrence of mild, self-limiting diarrhea caused by infection of small intestinal villus cells. Two genotypes are known: CCoV-I and CCoV-II, which is subdivided into CCoV-IIa and CCoV-IIb. CCoV-IIa is a highly pathogenic variant associated with systemic disease and marked lymphopenia. Unlike other CCoV it carries viremia and thus determines the spread of the virus to various organs including lymphoid tissues. In this sense, the involvement of macrophage infection correlated with disease severity and lymphopenia has been suggested. This study aimed to promote the infection of canine macrophages derived from blood monocytes and to evaluate viral replication, mitochondrial membrane depolarization and mitochondrial respiratory chain complexes at 6, 12, 18 and 24 hours post-infection. Descriptive statistics included mean $\pm$ standard deviation (s.d.). Means were compared by analysis of variance, ANOVA. It was observed that CCoV infection induced the release of new viral particles between 18 and 24 hours after infection. Moreover, viral infection was associated with depolarization and mitochondrial membrane dysfunction, affecting respiratory chain complex III. Thus, CCoV is believed to induce mitochondrial bioenergetic failure, acting as a decoupler of the respiratory chain in complex III of infected canine macrophages, without compromising viral replication. The pathogenesis of the disease caused by the CCoV pantropic variant is poorly understood, and thus the findings of this study may help in understanding the virus-host interaction.

Keywords: Enteritis. Dogs. Mitochondria. Apoptosis. Cell death.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1 - Estrutura de um coronavírus.....	19
Figura 2 - Vista frontal e superior da proteína S obtida por análise de microscopia crio-eletrônica. S1 representado pelas cores vermelho, azul e verde. S2 em laranja claro.....	21
Figura 3 - Cadeia transportadora de elétrons.....	26
Figura 4 - Indução de apoptose pela via receptores da morte e por disfunção mitocondrial.....	29

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Caracterização da cultura de macrófagos caninos. A) Citometria de fluxo para avaliação de MHC I/II, revelando que 44,58% das células isoladas são positivas para o fenótipo MHCII; B) Do total de células da cultura, 41,57% são positivas para o fenótipo CD32.....	37
Figura 2 - A) A proliferação celular após a infecção com CCoV diminuiu significativamente às 24h p.i., em contraste com o contínuo aumento dos títulos de CCoV (B); A avaliação do JC-1 revelou aumento contínuo com pico às 24 p.i. (C); D) Maior concentração de RNA viral foi detectada 12h p.i. ($p < 0,005$).....	38
Figura 3 - Atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial após infecção por CCoV às 6, 12, 18 e 24h p.i. A) Atividade do complexo I aumentou conforme o tempo p.i.; B) Instabilidade metabólica do complexo II com significativa diminuição às 18h p.i.; C) Atividade menor do complexo III em comparação aos complexos I e II em todos os momentos p.i.; D) Concentração de ATP teve o maior nível às 12h p.i.; E) Falha no consumo de oxigênio às 18 e 24h p.i.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – graus Celsius
ANP – aminopeptidase
ADP – adenosina difosfato
A-72 – células de adenofibrossarcoma canino
ATCC - *American Type Culture Collection*
ATP – adenosina trifosfato
BAK – proteína K associada ao BCL-2
BAX – proteína X associada ao BCL-2
DNA – ácido desoxirribonucleico
CA – Califórnia
CCCP - m-chlorophenyldrazone
CCoV – coronavirus canino
CMPC – células mononucleares periféricas caninas
CO₂ – dióxido de carbono
CoV – coronavirus
DMSO - dimetilsulfóxido
DNA – ácido desoxirribonucleico
ERRO – espécie reativa de oxigênio
EUA – Estados Unidos da América
et al. – e colaboradores
FAA – fator ativador de apoptose
FADD – domínio de morte associado ao FAZ
FADH₂ – dinucleotídeo de flavina e adenina
FCoV – coronavirus felino
FITC - isotiocianato de fluoresceína
FMVA – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
IBV – vírus da bronquite infecciosa das galinhas
µg – micrograma
µL – microlitro
MHC I – complexo principal de histocompatibilidade tipo I
MHC II – complexo principal de histocompatibilidade tipo II
mg – miligrama
mL – mililitro
µM – micromolar
MOI – multiplicidade de infecção
MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NADH - dinucleótido de nicotinamida e adenina
ng – nanograma
nm – nanômetro
nM – nanomolar

ORF – *open reading frames*

p – probabilidade

PBS – tampão fosfato salina

PE – ficoeritrina

p.i. – pós-infecção

PIF – peritonite infecciosa felina

PRCoV – coronavírus respiratório suíno

ng – nanograma

RNA – ácido Ribonucleico

SARS – síndrome da angústia respiratória grave

s.d. – desvio padrão

SFB – soro fetal bovino

SIV – vírus da imunodeficiência símia

TCID₅₀ – dose infectante de 50% das células da cultura

TGEV – vírus da gastroenterite transmissível dos suínos

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

TNF-R1 – receptor de fator de necrose tumoral tipo 1

UNESP – Universidade Estadual Paulista

VPIF – vírus da peritonite infecciosa felina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	18
1.1 Coronavírus.....	18
1.1.1 Coronavírus canino.....	21
1.1.2 Imunidade e coronavírus.....	24
1.1.3 Respiração celular e a cadeia transportadora de elétrons.....	25
1.1.4 Apoptose e disfunção mitocondrial.....	26
2. CAPÍTULO 1 – CORONAVÍRUS CANINO PANTRÓPICO PREJUDICA O COMPLEXO III MITOCONDRIAL EM MACRÓFAGOS CANINOS DERIVADOS DE CULTURA DE MONÓCITOS.....	30
2.1 Resumo.....	30
2.2 Abstract	31
2.3 Introdução.....	32
2.4 Material e Métodos	33
2.4.1 Células A-72, isolamento de monócitos e geração de macrófagos derivados de monócitos	33
2.4.2 Infecção por CCoV, detecção de antígeno e titulação viral.....	34
2.4.3 Ensaio MTT de viabilidade celular.....	35
2.4.4 Potencial de membrana mitocondrial, avaliação dos complexos I, II, III e IV.....	35
2.4.5 Níveis de ATP e consumo de oxigênio.....	36
2.4.6 Análise estatística	36
2.5 Resultados.....	36
2.6 Discussão.....	40
2.7 Conclusão.....	43
REFERÊNCIAS.....	44
APÊNDICE A.....	52
ANEXO A.....	59

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Coronavírus

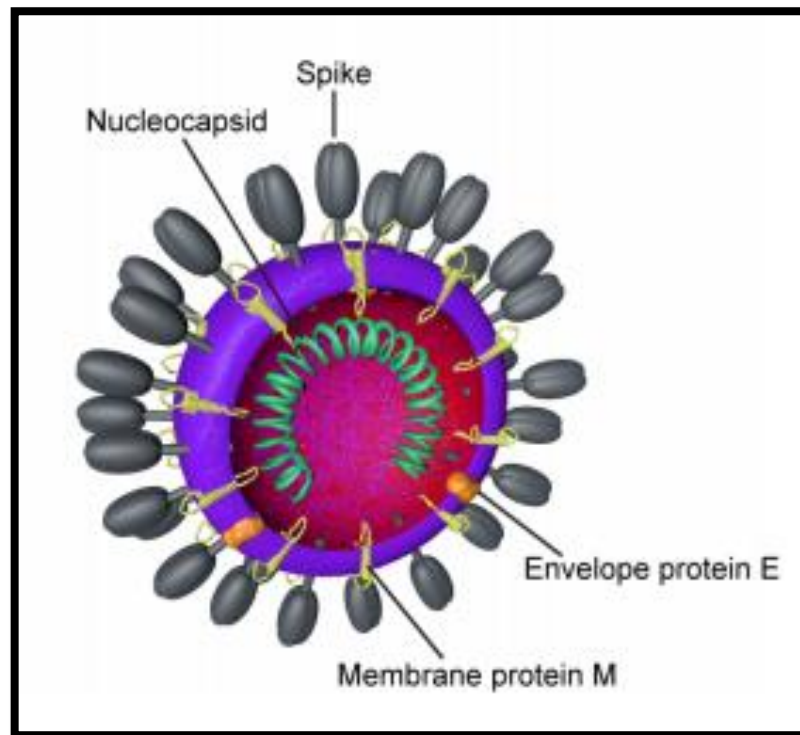
Importantes doenças virais dos animais domésticos e seres humanos têm como agente etiológico o coronavírus (BRANDÃO; LOVATO; SLHESSARENKO, 2012), o qual pertence a ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae* e possuem vírions pleomórficos, RNA sentido positivo, envelopados. A família *Coronaviridae* é subdividida em duas subfamílias: *Coronavirinae* e *Torovirinae*. A subfamília *Torovirinae* inclui dois gêneros causadores de doenças em animais: *Bafinivirus* e *Torovirus*, enquanto a subfamília *Coronavirinae* inclui quatro diferentes gêneros *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus* (GONZÁLEZ, 2003; ADAMS et al., 2016). Os Alpha-CoV e Beta-CoV infectam ou causam doença em mamíferos, enquanto os Gamma-CoV são quase que exclusivamente encontrados em aves. O quarto gênero (Delta-CoV) foi o último a ser identificado e está relacionado à doenças em aves e suínos (WOO et al., 2010).

Embora o primeiro coronavírus tenha sido descrito em 1930 (HUDSON et al., 1932), esse vírus ganhou particular notoriedade após o surto da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV), que abalou o mundo entre os anos de 2002 e 2003 (DROSTEN et al., 2003). O interesse pela família *Coronaviridae* cresceu após esta epidemia, levando a identificação de novos coronavírus (BELOUZARD et al., 2012). Anteriormente, doenças associadas aos coronavírus, eram principalmente, de interesse veterinário (BRANDÃO; LOVATO; SLHESSARENKO, 2012). Após a SARS-CoV foi demonstrado a capacidade dos coronavírus em cruzar a barreira entre as espécies, ressaltando a importância do agente na saúde pública (DROSTEN et al., 2003; BELOUZARD et al., 2012). Os coronavírus são causadores de doenças respiratórias e entéricas, todavia em menor frequência, podem estar relacionados a casos de hepatite e doenças neurológicas, causando infecção aguda ou persistente (WEISS, 2005).

O genoma viral está contido em um nucleocapsídeo helicoidal e o envelope do vírion, contém ao menos três proteínas estruturais: espícula (S), membrana (M) e envelope (E) (Figura 1). Alguns coronavírus possuem, ainda, a proteína hemaglutinina esterase (HE). As proteínas M e E estão associadas a montagem da partícula viral, a proteína S é o principal receptor viral, responsável pela entrada do

vírus na célula, determinando, ainda, a afinidade do vírus pelo hospedeiro (ENJUANES et al., 2006; PERLMAN; NETLAND, 2009).

Figura 1 - Estrutura de um coronavírus



Fonte: BELOUZARD, et al., 2012

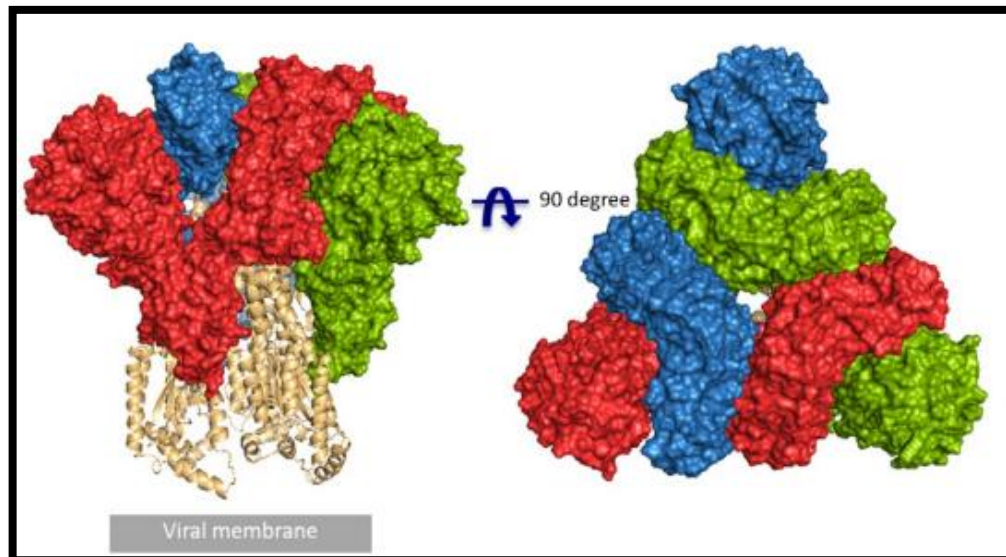
A glicoproteína S mede 20 nm com aproximadamente 150-180 kD e alonga-se para fora do virion, sendo responsável pelo aspecto de coroa que em latim significa *Corona*. Esta proteína está dividida em três domínios estruturais; o domínio externo (maior) é subdividido em dois subdomínios denominados S1 e S2, um domínio transmembrânico e um pequeno domínio interno (BRANDÃO; LOVATO; SLHESSARENKO, 2012). O domínio S1 forma a porção globular da espícula, sendo responsável pela ligação com os receptores celulares da célula hospedeira (HULSWIT et al., 2016). As sequências da S1 são variáveis, e, podem conter deleções e/ou substituições no gene da proteína S em diferentes coronavírus, associadas às alterações de antigenicidade e patogenicidade, bem como o cruzamento intra e inter-espécies (BELOUZARD et al., 2012; HULSWIT et al., 2016). As sequências de S2 são mais conservadas, e contém duas repetições de 7 aminoácidos que lhe conferem formato espiral (Figura 2). A proteína S apresenta

importantes sítios antigênicos que induzem a produção de anticorpos neutralizantes e imunidade celular (LAI; CAVANAGH 1997; HULSWIT et al., 2016).

Os coronavírus, a exemplo de outros vírus de RNA, sofrem mutações frequentes no seu genoma em função dos erros cometidos pela RNA polimerase (ENJUANES et al., 2006). Nesse sentido, alguns coronavírus que causam doenças em animais foram originados a partir de deleções no genoma de vírus preexistentes, como o coronavírus respiratório dos suínos (PRCoV), que se originou a partir do vírus da gastroenterite transmissível dos suínos (TGEV) por uma deleção no gene que codifica a proteína S (SÁNCHEZ et al., 1992). Diante do surgimento de variantes mais virulentas do coronavírus felino entérico (FCoV), foi reportada peritonite infecciosa felina (PIF), também parece estar relacionado à deleções do genoma (BÁLINT et al., 2012). A alta frequência de recombinação é outro aspecto importante na genética dos coronavírus que pode ter reflexos importantes na patogenia e na epidemiologia desses vírus (BRANDÃO; LOVATO; SLHESSARENKO, 2012).

Embora os coronavirus não possuam genoma segmentado, as recombinações provavelmente possam ser explicadas pela complexidade da replicação, envolvendo etapas de transcrição descontínua (ENJUANES et al., 2006; BRANDÃO; LOVATO; SLHESSARENKO, 2012). O mecanismo de recombinação entre variantes de campo já deu origem a diferentes subtipos do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV) e alguns isolados de FCoV parecem ter se originado da recombinação entre o vírus felino e o CCoV (DECARO et al., 2009; BRANDÃO; LOVATO; SLHESSARENKO, 2012).

Figura 2 - Vista frontal e superior da proteína S obtida por análise de microscopia crio-eletrônica. S1 representado pelas cores vermelho, azul e verde. S2 em laranja claro



Fonte: HULSWIT et al., 2016

1.1.1 Coronavirus canino

O coronavirus canino (CCoV) foi isolado na Alemanha, das fezes de cães com suspeita de enterite infecciosa em 1971 (BINN et al., 1974). Desde então, um vírus similar tem sido isolado de vários casos de enterite em todo o mundo (GREENE; DECARO, 2015). A infecção por CCoV é comum em cães jovens (GREENE; DECARO, 2015), principalmente em animais que vivem em canis e abrigos e, tem sido associada à ocorrência de diarreia branda e autolimitante, altamente contagiosa, atingindo as células das vilosidades do intestino delgado. Filhotes, particularmente os que sofrem coinfeção com outros enteropatógenos, incluindo o *Parvovirus canino*, podem desenvolver doença grave e, até mesmo, fatal (DECARO et al., 2011; DUIJVESTIJN et al., 2016).

Dois genótipos são descritos: CCoV-I e CCoV-II, amplamente distribuídos pelo continente europeu (DECARO; BUONAVOGLIA, 2008; DECARO et al., 2010), onde vários surtos já foram relatados. Estes genótipos podem ser distinguidos com base em diferenças genéticas e antigênicas no gene que codifica a proteína de superfície espícula (S). Ainda, o genótipo CCoV-II é dividido em dois subtipos,

CCoV-IIa e CCoV-IIb, os quais possuem recombinação genética com FCoV-II e o TGEV, respectivamente (DECARO et al., 2010).

O CCoV-II tem distribuição mundial, com destaque na Europa (DECARO et al., 2009; ERLES et al., 2009; DECARO et al., 2013) e Ásia (SOMA et al., 2010; WANG et al., 2016). O subtipo CCoV-IIa é altamente patogênico e responsável por causar doença sistêmica em infecções naturais e experimentais, sendo encontrado em diversos órgãos parenquimatosos, sendo considerado pantrópico (BUONAVOGLIA et al., 2006; DECARO et al., 2008). Buonavoglia et al. (2006), relataram um surto fatal de CCoV-IIa na Itália, no qual filhotes com menos de 60 dias vieram a óbito.

A transmissão ocorre pela via fecal-oral. Após a ingestão, o CCoV infecta e se replica no citoplasma das células epiteliais das vilosidades intestinais, levando ao encurtamento e distorção das mesmas, com diminuição da capacidade absorptiva do intestino delgado e consequente quadro de enterite (GREENE; DECARO, 2015). A infecção por CCoV-IIa, no entanto, resulta em doença multissistêmica, com altas taxas de morbidade e mortalidade e sinais clínicos semelhantes a parvovirose: febre, gastroenterite hemorrágica, alterações neurológicas e linfopenia (BUONAVOGLIA et al., 2006; DECARO et al., 2008; LICITRA; DUHAMEL; WHITTAKER, 2014). Leucopenia intensa tem se mostrado frequente nos animais que desenvolvem esta infecção (DECARO et al., 2008; MARINARO et al., 2010, DECARO et al., 2011).

A emergência de variantes de CCoV associadas à doença grave, mortalidade e infecção sistêmica, tem sido descrita em diversos países do mundo, inclusive no Brasil, entretanto a patogenia da infecção não é bem elucidada (MARINARO et al., 2010; LICITRA et al., 2014). O CCoV-II foi identificado em diferentes regiões brasileiras, e sua posterior caracterização e análise filogenética, revelou que os subtipos IIa e IIb são similares ao já descritos em outros países (COSTA et al., 2014; PINTO et al., 2014; VIEIRA, 2015).

O CCoV continua em constante processo de recombinação e novas variantes, denominadas por alguns autores como subtipo CCoV-IIc, vem sendo descritas em países como Estados Unidos e Suécia (LICITRA et al., 2014; WHITTAKER et al., 2018). A recombinação desempenha papel vital na evolução dos CCoV, permitindo o surgimento de novas variantes com diferentes virulência e patogenicidade (WHITTAKER et al., 2018). A análise filogenética da proteína S de um novo subtipo

descrito na China, causador de doença fatal em um filhote de seis semanas, denominado HLJ-073, revelou íntima relação com o FCoV-II, quando avaliado o domínio S1 (ligação ao receptor). Já o domínio S2 (fusão) mostrou relação com o CCoV-II, FCoV-II e TGEV, indicando que, provavelmente, esse subtipo é resultado de recombinação entre esses 3 agentes (CHEN et al., 2019).

Regiões do genoma viral denominadas ORF (*open reading frame*) são responsáveis por codificar proteínas estruturais e não estruturais (PEDERSEN et al., 2009). A região ORF3abc do (FCoV), tem sido identificada como responsável em determinar o tropismo viral e acredita-se que recombinações e deleções localizadas nessa região do genoma são responsáveis pelas variantes virulentas, as quais se replicam de maneira eficaz em macrófagos, diferentemente das que possuem essa região completa e ficam restritas ao trato intestinal (BÁLINT et al., 2012). Semelhante ao que ocorre com o FCoV, o CCoV-IIa pantrópico é associado a uma deleção no gene ORF3b (BUONAVAGLIA et al., 2006), enquanto o HLJ-073 apresenta deleção de nucleotídeos na região ORF3abc, com perda completa do ORF3b. A nova variante replica-se efetivamente em cultura de macrófagos, mostrando-se capaz de modificar o tropismo celular e causar doença sistêmica (CHEN et al., 2019).

A análise imunohistoquímica com anticorpo monoclonal anti-CCoV demonstrou a presença do antígeno em órgãos como pulmões, baço, rins, intestino, além de células de Kupfer e outras células mononucleares no fígado em cães que vieram à óbito após infecção por CCoV-IIa (BUONAVOGLIA et al., 2006; ZAPULLI et al., 2008). A imunomarcagem positiva em fagócitos mononucleares sugere, que algumas características da infecção sistêmica são semelhantes a SARS-CoV em humanos e a PIF em felinos, podendo ser observada lesões alveolares, exsudação fibrinosa e o envolvimento de macrófagos (ZAPULLI et al., 2008). Monócitos infectados migram pelo endotélio e são responsáveis pelo quadro de vasculite/perivasculite e lesões granulomatosas/fibrinosas associadas (ZAPULLI et al., 2008; DECARO et al., 2010; CHEN et al., 2019).

Ainda, sabe-se que a proteína S desempenha papel determinante para o tropismo dos coronavírus e é comprovado que a troca de domínios dessa proteína estrutural entre diferentes coronavírus está associada a mudança de tropismo observada nas variantes mais virulentas (BELOUZARD et al., 2012; HULSWIT et al.,

2016). A aminopeptidase (ANP) é o receptor celular específico para alguns coronavírus do gênero *Alphacoronavirus*, entre eles o FCoV e o CCoV (BELOUZARD et al., 2012; LICITRA; DUHAMEL; WHITTAKER, 2014). Variantes mais e menos virulentas de ambos os patógenos utilizam-se do mesmo receptor, no entanto, a determinação do tropismo pelo macrófago está relacionada ao domínio da proteína S proximal a membrana e não pela região de ligação ao receptor (ROTTIER et al., 2005; CHEN et al., 2019). Esse mesmo domínio parece associado a disseminação da infecção pelos macrófagos, bem demonstrado na infecção pelo Vírus da peritonite infecciosa dos felinos (VPIF) (ROTTIER et al., 2005).

1.1.2 Imunidade e coronavírus

Acredita-se que semelhante ao VPIF a variante hipervirulenta CCoV-IIa tem capacidade de realizar viremia, causando doença sistêmica e muitas vezes fatal (BUONAVOGLIA et al. 2006; DECARO et al.; 2008; MARINARO et al., 2010; DECARO et al, 2011; LICITRA et al., 2014; CHEN et al., 2019). Estudos anteriores demonstraram que a infecção de macrófagos e células dendríticas pelo VPIF leva a um padrão aberrante de expressão de citocinas/quimiocinas e depleção de linfócitos resultando em altos títulos virais, de modo que a habilidade em infectar e se replicar em tais fagócitos parece fator determinante para se estabelecer o curso da infecção viral (DE GROOT-MIJNES et al., 2005; ROTTIER et al., 2005; PERLMAN; NETLAND, 2009).

Ainda, é bem demonstrada a disseminação do CCoV-IIa para diversos órgãos linfoides como baço, timo, placas de Peyer e linfonodos mesentéricos causando intensa depleção linfóide (DECARO et al., 2008, 2010; DECARO; BUONAVOGLIA, 2008; LICITRA et al., 2014). Os linfócitos e seus subtipos são cruciais para a manutenção da função do sistema imunológico. Sabe-se que infecções virais, síndromes de imunodeficiência e outras doenças infecciosas determinam alterações anormais nos níveis de linfócitos e seus subtipos (DUNNE et al., 2002; VEAZEY et al., 2003; CUI et al., 2003), uma vez que para sobrevivência e persistência viral é necessário linfopenia. Coronavírus, Morbillivírus, Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV) e Influenzavírus demonstraram induzir linfopenia significativa, correlacionada à gravidade da doença, sendo muitas vezes fatal (OKADA et al., 2000; CUI et al.; 2003; VEAZEY et al., 2003; WONG et al., 2003).

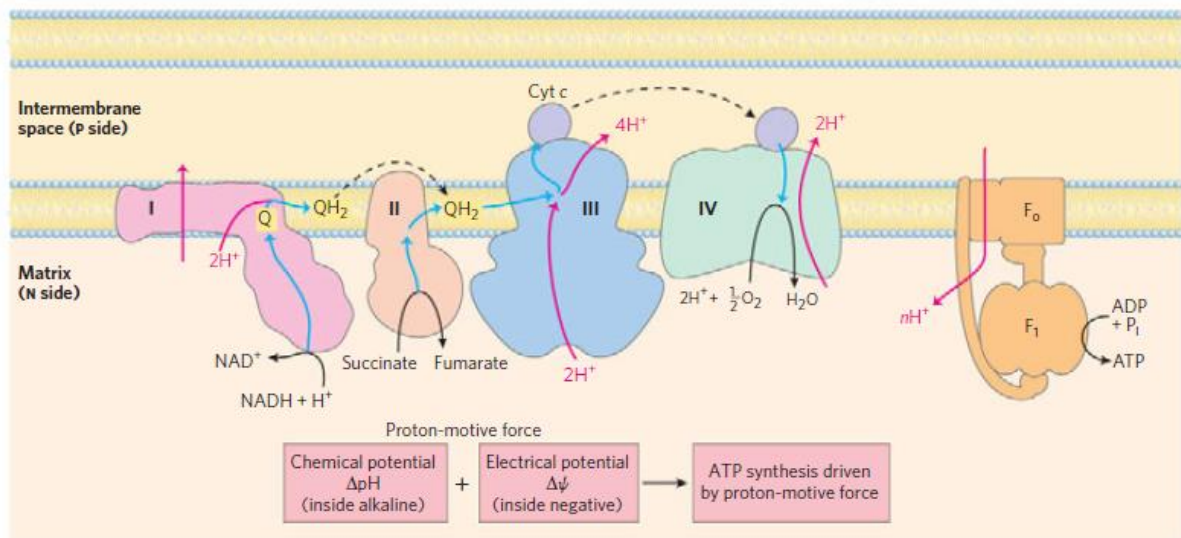
Embora os mecanismos causadores de linfopenia nas infecções pelo coronavírus pantrópico não estejam completamente elucidados, sabe-se que os linfócitos podem sofrer lise por ação viral direta ou indireta (MARINARO et al., 2010). Acredita-se que os eventos indiretos, secundários à infecção viral são os maiores responsáveis pela citólise observada, a qual é mediada pela produção de fatores solúveis como de interferon, citocinas e quimiocinas pelas células do hospedeiro (MARINARO et al., 2010; LICITRA et al., 2014). A ANP normalmente não está presente em linfócitos circulantes maduros e por esse motivo acredita-se que o efeito citolítico da variante pantrópica não seja direto, uma vez que o receptor determina o tropismo do vírus pelo tecido (MARINARO et al., 2010).

Assim, outros mecanismos estariam envolvidos na extensa linfocitólise observada após a infecção pelo CCoV-IIa (MARINARO et al., 2010; LICITRA et al., 2014). A diminuição da produção de linfócitos maduros por tecidos linfóides como o timo não pode ser excluída, visto que o RNA viral já foi encontrado neste tecido, o qual é órgão alvo em diversas doenças infecciosas, inclusive a coronavirose (DECARO et al., 2010). Uma vez que esses vírus infectam o timo, há interferência no processo de diferenciação dos linfócitos, podendo ocasionar linfopenia (SAVINO, 2006).

1.1.3 Respiração celular e a cadeia transportadora de elétrons

A respiração celular ocorre em três grandes estágios e as mitocôndrias são o sítio da fosforilação oxidativa em seres eucariontes (NELSON; COX, 2013). No primeiro estágio, carboidratos, lipídios e proteínas são degradadas a acetil-CoA. No segundo estágio os grupos acetil são consumidos durante o ciclo de Krebs, sendo oxidados a CO_2 associado da redução de grande quantidade de coenzimas oxidadas NAD^+ e FAD, gerando os transportadores de elétrons reduzidos NADH e FADH_2 . No terceiro estágio da respiração, a mitocôndria remove os elétrons provenientes das coenzimas reduzidas e os transfere para o oxigênio molecular reduzindo-o a H_2O , por meio de complexos especializados: I, II, III e IV localizados nas cristas da membrana mitocondrial interna. Durante esse processo de transferência de elétrons, uma grande quantidade de energia é liberada e conservada na forma de ATP, por meio do processo chamado de fosforilação oxidativa, que corre no complexo V, também chamado de ATP sintase (Figura 3).

Figura 3 – Cadeia transportadora de elétrons



Fonte: NELSON; COX, 2013

Além da produção de ATP, a mitocôndria está envolvida em uma variedade de processos do metabolismo celular como homeostase do cálcio, proliferação celular, morte celular programada e a síntese de aminoácidos, nucleotídeos e lipídios. A distribuição, formato e funções dessas organelas são reguladas por estímulos intrínsecos e extrínsecos, que em alguns casos são afetados por vírus (OHTA; NISHIYAMA, 2010), os quais são acelulares e se replicam apenas em células vivas utilizando os recursos energéticos e moleculares produzidos pela célula hospedeira (FLORES, 2012). Infecções virais induzem uma variedade de respostas celulares, dependendo do tipo celular, da partícula viral e das condições no momento da infecção. Indesejavelmente, as infecções virais interferem na produção bioenergética das mitocôndrias da célula hospedeira, por afetarem a função respiratória celular (SCOTT, 2010; WEST et al., 2011).

1.1.4 Apoptose e disfunção mitocondrial

Ao longo da infecção viral, é difícil, senão impossível, que os vírus infectem uma célula sem causar apoptose (POONIA; PAUZA; SALVATO, 2009). A apoptose é um dos mecanismos de morte celular na defesa contra infecções virais do hospedeiro, no qual a morte da célula previne a replicação e disseminação viral (JORGENSEN; RAYAMAJHI; MIAO, 2017). Este evento pode ocorrer em

decorrência da ativação de duas vias: via extrínseca/receptor da morte e via intrínseca ou mitocondrial (OHTA; NISHYIAMA, 2010).

A via extrínseca de apoptose depende de uma variedade de fatores externos como citocinas, toxinas ou ligantes que se unem aos receptores de morte na superfície celular. Quando isso ocorre há ativação de uma cascata de proteínas adaptadoras, que culminará na ativação de mecanismos que levarão a morte celular (JORGENSEN; RAYAMAJHI; MIAO, 2017). A via intrínseca, por sua vez, é desencadeada por estresse celular, podendo ser induzida pela presença de proteínas virais, danos ao DNA e estresse oxidativo, levando à ativação de moléculas presentes na membrana mitocondrial, que culminarão com alterações e morte celular (SCOTT, 2010; WEST et al., 2011).

Na via do receptor de morte, via extrínseca, muitas células exibem na sua superfície, moléculas receptoras chamadas de receptores de morte, que são da família do TNF. Existem dois tipos de receptores de morte, o receptor tipo 1 de TNF (TNF-R1) e a molécula CD95, também conhecida como FAS (XU et al., 2012; JORGENSEN; RAYAMAJHI; MIAO, 2017). No momento em que esses receptores de morte se ligam aos seus ligantes, como por exemplo, o FAS ao FAS-ligante, desencadeiam uma cascata de ativação intracelular de morte celular programada (OHTA; NISHYIAMA, 2010). Os receptores de morte possuem um domínio intracelular que se acopla a uma proteína adaptadora FADD, que por sua vez se acopla à pró-caspase 8, provocando a sua ativação em caspase 8, que causa a ativação de caspases efetoras, que desencadeiam o mecanismo de apoptose (KRZYZOWSKA et al., 2006; KRZYZOWSKA et al., 2011).

Entre as substâncias endógenas envolvidas no processo de morte celular programada, o TNF- α é uma das moléculas que induz apoptose em linfócitos não infectados no timo (SAVINO, 2006). Uma produção excessiva de TNF- α nos linfócitos ativados pelo VPIF é responsável por causar apoptose de linfócitos em gatos doentes. Há uma correlação positiva entre PIF e TNF- α com linfopenia nesses animais (DEAN et al., 2003). Outros coronavírus como o vírus da hepatite do rato induz atrofia tímica, não como consequência de infecção maciça de linfócitos T, mas sim de apoptose de células T imaturas, causada pela infecção de uma pequena

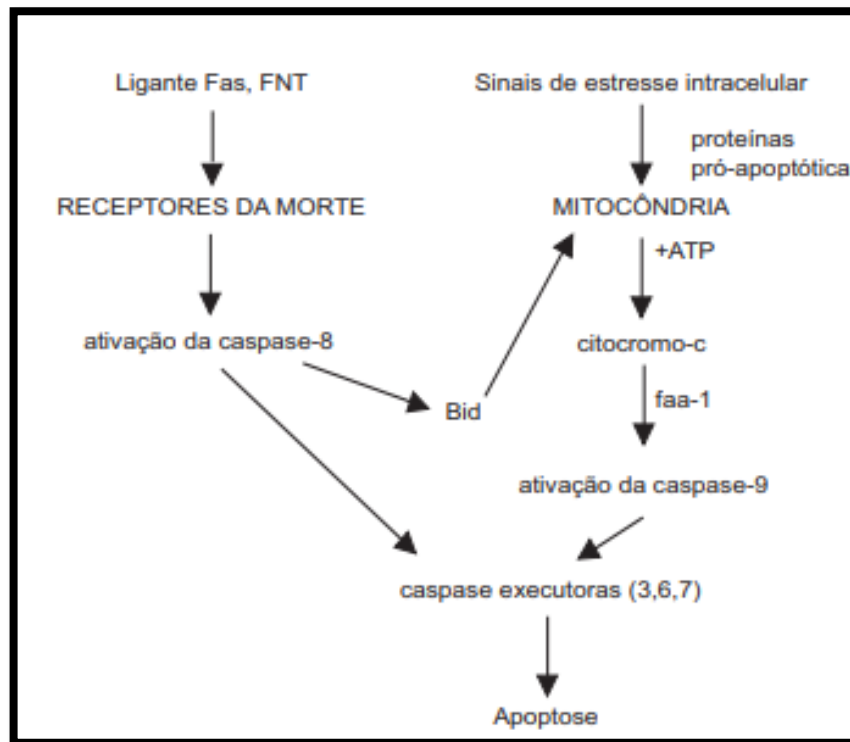
proporção de células epiteliais tímicas infectadas ou da secreção exacerbada de citocinas (GODFRAIND; HOLMES; COUTELIER, 1995).

Com relação à via intrínseca, dentro das mitocôndrias há enzimas pró-apoptóticas, as quais são responsáveis por bloquear proteínas inibidoras de apoptose, presentes no citoplasma, e a citocromo C, responsável por ativar a caspase 9 (OHTA; NISHIYAMA, 2010). Lesões no genoma nuclear e números inaceitáveis de proteínas mal dobradas no interior da célula ativam a via mitocondrial. (JORGENSEN; RAYAMAJHI; MIAO, 2017). Uma vez ativada, a alteração de permeabilidade da membrana mitocondrial leva ao extravasamento de proteínas para o citoplasma determinando a apoptose celular (POONIA; PAUZA; SALVATO, 2009; LIAO et al., 2010; XU et al., 2012).

A regulação da permeabilidade da mitocôndria é determinada por cerca de vinte tipos de proteínas da família BCL2, que são pró-apoptóticas, como por exemplo, a BAX e a BAK (SCOTT, 2010; OHTA; NISHIYAMA, 2010). Em situações de injúria, essas proteínas alteram a permeabilidade membranar, abrindo canais na membrana mitocondrial (OHTA; NISHIYAMA, 2010) e, ocorre então, o extravasamento de enzimas como a citocromo C e outras enzimas pró-apoptóticas para o citoplasma que culmina na ativação da caspase 9, a qual ativa as caspases efetoras, ocasionando a apoptose celular (KRZYZOWSKA et al., 2006; KRZYZOWSKA et al., 2011).

Em síntese, a via mitocondrial ativa a caspase 9, enquanto a via do receptor de morte ativa a caspase 8 e 10. Essas são caspases desencadeadoras, que ativam as caspases efetoras 3, 6 e 7, que participam do processo de apoptose em ambas as vias (Figura 4) (OHTA; NISHIYAMA, 2010; JORGENSEN; RAYAMAJHI; MIAO, 2017).

Figura 4 - Indução de apoptose pela via receptores da morte e por disfunção mitocondrial. FNT = fator de necrose tumoral; faa-1 = fator ativador de apoptose 1



Fonte: PAROLIN; REASON, 2001

Desse modo, acredita-se que ocorra associação entre infecção viral, disfunção mitocondrial e apoptose, uma vez que os diferentes caminhos de morte celular programada criam redes de sinalização complexas, que estão relacionadas à defesa do hospedeiro contra patógenos (OHTA; NISHYIAMA, 2010; SCOTT, 2010; WEST et al., 2011). A infecção de macrófagos e apoptose de linfócitos causada pela variante pantrópica, pode comprometer significativamente a reposta imunológica e a morte celular programada pode desempenhar papel importante no mecanismo imunossupressor relacionado aos coronavírus (MARINARO et al., 2010; LICITRA et al., 2014).

Um recente estudo demonstrou a capacidade de uma variante patogênica do CCoV em se replicar de maneira eficaz em macrófagos caninos *in vitro*, sugerindo a habilidade viral em alterar o tropismo tecidual e, ao invés de causar doença restrita ao trato intestinal, causar doença sistêmica (CHEN et al., 2019). Entretanto, as consequências da infecção pelo CCoV em células linforreticulares, bem como a patogenia da doença causada pelas variantes virulentas em cães, continuam não elucidadas.

2 CAPÍTULO 1 – CORONAVIRUS PANTRÓPICO PREJUDICA O COMPLEXO III MITOCONDRIAL EM MACRÓFAGOS CANINOS DERIVADOS DE CULTURA DE MONÓCITOS

Coronavirus Pantrópico prejudica o complexo III mitocondrial em macrófagos caninos derivados de cultura de monócitos

Flávia Volpato Vieira¹, Tereza Cristina Cardoso da Silva²

¹Vieira, F.V. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Manaus – AM, Brasil, E-mail: flavia.vieira@ifam.edu.br, ²Cardoso, T.C. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Araçatuba – SP, Brasil, E-mail: tereza.cardoso@unesp.br

2.1 RESUMO

O Coronavirus Canino (CCoV) é um importante enteropatógeno que apresenta variantes pantrópicas, altamente patogênicas em cães. Diferentemente de outros CCoV realiza viremia e assim, determina a disseminação do vírus para diversos órgãos, incluindo tecidos linfóides. Nesse sentido, o envolvimento da infecção de macrófagos correlacionada à gravidade da doença e linfopenia, vem sendo sugerido. A apoptose é um mecanismo de defesa celular nas infecções virais e, a via intrínseca (mitocondrial) é a responsável pela maior parte deste processo. Com a finalidade de se compreender a patogenia da infecção pelo CCoV-Ila promoveu-se a infecção de macrófagos caninos derivados de monócitos sanguíneos e a replicação viral, despolarização da membrana mitocondrial e os complexos da cadeia respiratória mitocondrial foram avaliados às 6, 12, 18 e 24 horas pós-infecção. A estatística descritiva incluiu a média $\pm$ desvio padrão (s.d.). As médias foram comparadas através da análise de variância, ANOVA. Foi possível observar que a infecção por CCoV induziu a liberação de novas partículas virais entre 18 e 24 horas pós-infecção. Ainda, a infecção viral esteve associada à despolarização e disfunção da membrana mitocondrial, afetando o complexo III da cadeia respiratória. Desse modo, acredita-se que o CCoV induz a uma falha bioenergética mitocondrial, atuando como um desacoplador da cadeia respiratória no complexo III dos macrófagos caninos infectados, sem comprometer a replicação viral.

Palavras-Chave: Enterite. Vírus. Fosforilação Oxidativa. Apoptose.

2.1 Pantropic canine coronavirus impairs mitochondria complex III in canine macrophages derived-monocytes culture

Flávia Volpato Vieira¹, Tereza Cristina Cardoso da Silva²

¹Vieira, F.V. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Manaus – AM, Brasil, E-mail: flavia.vieira@ifam.edu.br, ²Cardoso, T.C. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Araçatuba – SP, Brasil, E-mail: tereza.cardoso@unesp.br

2.2 ABSTRACT

Canine Coronavirus (CCoV) is an important enteropathogen that presents highly pathogenic pantropic variants in dogs. Unlike others, CCoV causes viremia and thus determines its spread to several organs, including tissues. The correlation of macrophage infection with disease severity and lymphopenia has been suggested. Apoptosis is a cellular defense mechanism in viral infections and the intrinsic (mitochondrial) pathway is responsible for most of this process. In order to comprehend the pathogenicity of CCoV-IIa infection, blood monocyte-derived canine macrophage infection was promoted and viral replication, mitochondrial membrane depolarization and mitochondrial respiratory chain protectors have been evaluated at 6, 12, 18 and 24 hours after infection. A descriptive was performed, including mean $\pm$ standard deviation (s.d.). Means were compared by analysis of variance, ANOVA. It was observed that CCoV infection induced a release of new viral particles between 18 and 24 hours after infection. Furthermore, viral infection was related to depolarization and mitochondrial membrane dysfunction, affecting respiratory chain complex III. Thus, CCoV is believed to induce mitochondrial bioenergetic failure by acting as a decoupler of the respiratory chain in the complex III of infected canine macrophages without compromising viral replication.

Keywords: Enteritis. Virus. Oxidative Phosphorylation. Apoptosis.

2.3 INTRODUÇÃO

O Coronavirus canino (CCoV) e outros coronavirus como o coronavirus felino (FCoV) e o vírus da gastroenterite transmissível dos suínos (TGEV) são patógenos estritamente relacionados, pertencentes a ordem Nidovirales, família *Coronaviridae*, subfamília *Coronavirinae* e gênero *Alphacoronavirus*. Caracterizam-se como vírions pleomórficos, RNA sentido positivo, envelopados [1,2].

Até o momento, são conhecidos dois genótipos do CCoV, denominados CCoV-I e CCoV-II e recombinações entre os coronavirus canino, felino e suíno já foram identificadas [3,4]. Além disso, o CCoV-II é subdividido em dois subtipos: CCoV-IIa (derivado da recombinação entre o FCoV-II e o CCoV) e o CCoV-IIb (derivado da recombinação com o TGEV), este último, todavia, sem associação com doença clínica em cães [5-7].

O CCoV é geralmente associado a infecções autolimitantes, que acometem o intestino delgado, podendo causar quadros brandos de gastroenterite, principalmente em filhotes. Entretanto, há alguns anos uma variante altamente virulenta (CCoV-IIa pantrópico), foi isolada durante um surto de doença sistêmica fatal em filhotes na Itália [3]. Desde a emergência das variantes pantrópicas do CCoV-IIa, estudos envolvendo sua patogenia e resposta imunológica do hospedeiro vem se mostrando necessários para uma maior compreensão de sua virulência [8–13]

A apoptose é um dos principais mecanismos de combate a infecções virais [14]. Ao induzir a morte celular, células infectadas são destruídas juntamente com os vírus em seu interior [15,16]. A apoptose pode ser desencadeada por duas diferentes vias: extrínseca e intrínseca [14]. A via extrínseca depende de uma variedade de fatores externos, como citocinas, toxinas e ligantes que se ligam aos receptores da morte, localizados na superfície celular. A via intrínseca é desencadeada pelo estresse celular, induzido por proteínas virais, danos ao DNA ou estresse oxidativo, levando à ativação de moléculas da membrana mitocondrial [17-19]. As mitocôndrias estão diretamente relacionadas em diversas respostas,

associadas ao hospedeiro e ao vírus [19, 20]. Essas organelas participam principalmente em respostas imunológicas antivirais precoces, através da alteração em seu metabolismo. A infecção viral, por sua vez, pode interferir na bioenergética mitocondrial, comprometendo a respiração celular. Ainda, proteínas virais inseridas nas membranas mitocondriais apresentam mecanismos anti e/ou pró-apoptóticos, afetando as vias de sobrevivência/morte celular [18,21].

Apesar dos diversos mecanismos de apoptose celular frente à infecção por CCoV terem sido descritos, as alterações que levam a esse processo continuam pouco elucidadas. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi investigar se macrófagos caninos infectados com CCoV-IIa apresentam disfunção mitocondrial pós-infecção. Para tanto, a replicação viral, despolarização da membrana mitocondrial e os complexos da cadeia respiratória foram investigados.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 Células A-72, isolamento de monócitos e geração de macrófagos derivados de monócitos

As células A-72 (ATCC, CRL 1542) foram cultivadas em meio mínimo essencial (MEM - Sigma-Aldrich®) suplementado com solução antimicótica/antibiótica, soro fetal bovino a 10% (Sigma-Aldrich®), L-glutamina 2 μ M (Sigma-Aldrich®) e aminoácidos não essenciais (100x, Invitrogen®, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). As culturas foram incubadas em estufa a 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de umidade. Os macrófagos caninos foram derivados de monócitos de sangue periférico (PBMCs) obtidos de cães saudáveis, cuja coleta foi previamente aprovada pelo conselho de ética e experimentação animal (CEEA 2016/09854-2). As PBMCs foram obtidas utilizando meio de separação de células mononucleares (ACCUSPIN™ System-Histopaque® -1077; Sigma-Aldrich St Louis, MO) e cultivadas em placas aderentes de cultivo celular de poliestireno de 24 poços revestidas com colágeno (SigmaScreen™). As células não aderentes foram removidas após 16 h em cultura e os monócitos aderentes foram cultivados durante sete dias com 10 ng/mL de fator estimulante de colônias de macrófagos de camundongos M-CSF (Sigma-Aldrich®) em meio DMEM (Sigma-Aldrich)

suplementado com 10% de SFB. A cada 24 horas o meio de crescimento era trocado e era acrescido de M-CSF fresco (10 ng/mL). Para caracterizar o fenótipo dos macrófagos derivados de monócitos, procedeu-se análise em citometria de fluxo seguindo o protocolo de estudo prévio [22], utilizando-se anticorpo de rato anti-MHC II canino marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (cat # MCA 1044F, Bio-Rad™ antibodies), anti-MHC I canino de rato conjugado à ficoeritrina (PE) (cat# MCA1043PE) e anti-CD32 humano de rato marcado com FITC (cat# MCA1075F).

2.4.2 Infecção por CCoV, detecção de antígeno e titulação viral

Utilizou-se a variante CCoV-IIa pantrópica, obtida a partir de isolado de campo, catalogado no *GenBank* como 06/2015 Brasil (número de acesso KR105604), mantida em cultura de células A-72 e armazenada a -196°C [23]. Para realizar a infecção, utilizou-se a multiplicidade de infecção (MOI). Após 30 min de adsorção, as monocamadas de células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS, 7,2) e foi adicionado meio fresco. As células infectadas e controle foram monitoradas em microscópio de contraste de fase (Olympus IX-70 - Olympus®, Tóquio, Japão) às 6h, 12h, 18h e 24h após a infecção (p.i.). As células A-72 (1×10^4 por poço) foram semeadas em placa de 96 poços 12 h antes da infecção pelo vírus. Para visualizar os antígenos de CCoV, a imunofluorescência foi realizada como descrito anteriormente [24]. O anticorpo policlonal anti-coronavirus canino produzido em cabra (MyBiosource, cat # MBS560796, San Diego, CA, EUA) foi aplicado a diluição de 1:50 em ambos os macrófagos infectados, 24h p.i. Utilizaram-se células A-72 infectadas com CCoV como controle positivo. O iodeto de propídio (1mg/mL) foi usado como contra-coloração para cada lâmina. A suspensão de vírus colhida de cada p.i. foi diluída 10 vezes em série e adicionado a cada poço com 100 µL em seis repetições para realizar a titulação do vírus nas monocamadas de células A-72. O título foi calculado pela dose de 50% de infecção da cultura (TCID₅₀) de acordo com o método de Reed e Muench.

Para todos os momentos do estudo, procedeu-se a extração de RNA das culturas de macrófagos infectadas e não infectadas, utilizando-se o protocolo do reagente TRIzol®, segundo instruções do fabricante (Invitrogen®, Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA). Para cada amostra, foi realizada a transcrição reversa

utilizando-se 2 ng de RNA com o Kit High-Capacity RNA-to-cDNA™ (Invitrogen®, Applied Biosystems™). Os primers e as probes utilizados para a qPCR foram os mesmos descritos em um estudo prévio [25].

2.4.3 Ensaio MTT de viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada usando o ensaio MTT. Os macrófagos infectados com CCoV em cada tempo p.i foram corados com MTT (5mg mL⁻¹) a 28°C por 4 h. O meio foi removido e foi adicionado DMSO (150µL) a cada poço para dissolver os cristais de formazan. A densidade óptica (DO) foi determinada a 570-600 nm utilizando o BioPhotometer™ (Eppendorf). A taxa de sobrevivência dos macrófagos infectados foi expressa como uma porcentagem do controle do veículo (DMSO).

2.4.4 Potencial de membrana mitocondrial, avaliação dos complexos I, II, III e IV

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) foi determinado com base nos corantes catiônicos lipofílicos fluorescentes JC-1 (5,5', 6,6''-tetracloro-1,1',3,3'-tetrathylbenzimidazolyl-carbocamina iodeto; Molecular Probes) a 10µg/mL por 10 min a 37°C e analisado por citometria de fluxo acústica no filtro BL-1 (excitação de 488 nm) realizada no escuro como descrito anteriormente [24]. O $\Delta\psi$ foi avaliado em células infectadas e não infectadas três vezes consecutivas. As mitocôndrias foram isoladas, a partir de células infectadas e não infectadas em todas os p.i., utilizando o Kit de Isolamento de Mitocôndrias para cultivo celular (MITOISO2, Sigma-Aldrich®) de acordo com as instruções do fabricante. Os ensaios de atividade dos complexos, I, II, III e IV foram avaliados nas células infectadas e não infectadas em todas os p.i. Primeiro, a atividade do complexo I foi determinada em lisados celulares infectados e não infectados em placas de 24 poços. Na presença de NADH, os elétrons são transferidos do complexo III para o citocromo C, resultando em um aumento na absorbância a 550 nm. Esta reação foi bloqueada pela rotenona, um inibidor específico da atividade do complexo I. A atividade do complexo I foi determinada pela comparação da inclinação da curva antes e depois da adição da rotenona. Com base na atividade da coenzima Q, a atividade do complexo II em células infectadas e não infectadas em todas os p.i. foi mensurado por aplicação do ensaio colorimétrico

da atividade da succinato desidrogenase de acordo com as instruções do fabricante (MAK197, Sigma-Aldrich®). Os resultados foram expressos como nmol/min/mg de proteína. Em seguida, o complexo III foi avaliado pela atividade da citocromo C oxidorreductase CoQ utilizando o kit de ensaio da citocromo C oxidase de acordo com as instruções do fabricante (CYTOCOX1, Sigma-Aldrich®).

2.4.5 Níveis de ATP e consumo de oxigênio

Finalmente, com base na capacidade do complexo IV oxidar o citocromo C reduzido resultando na transformação de ADP em ATP, foram determinados os níveis de ATP usando o sistema de ensaio luciferina-luciferase de acordo com o kit de determinação de ATP (Molecular Probes™) seguindo a recomendação do fabricante. A bioluminescência foi medida usando o Luminômetro Lucetta™ (Lonza Inc, Alpharetta, GA, EUA). Além disso, o consumo de oxigênio foi medido usando 5μM de succinato (+5nM de rotenona) ou 5μM de piruvato + 5μM malato como substrato respiratório na ausência (estado-4 respiração) ou presença (estado-3 respiração) de 400nmol de ADP. Como desacoplador foi usado 1μM CCCP (m-chlorophenyldrazone).

2.4.6 Análise Estatística

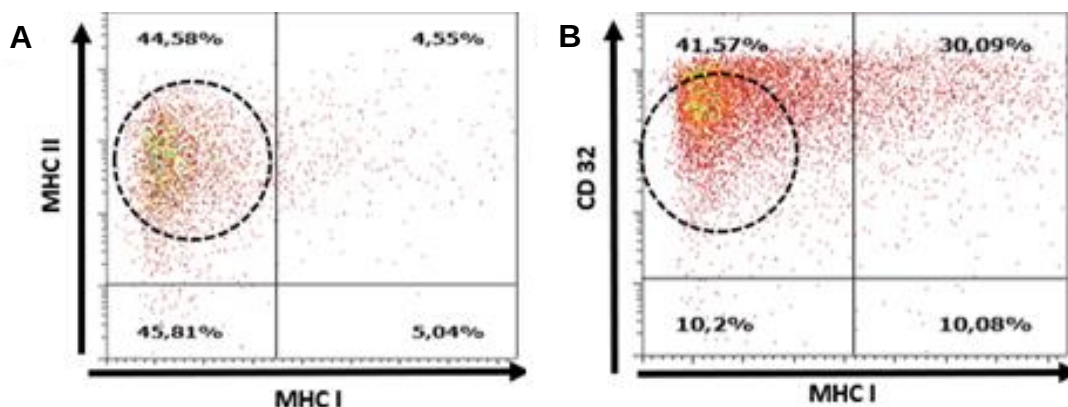
Os dados foram avaliados para as células infectadas e não infectadas em todas os p.i. Todos os experimentos foram executados em triplicata. A estatística descritiva incluiu a média ± desvio padrão (s.d.). As médias foram comparadas através da análise de variância, ANOVA. Um valor de $p < 0,005$ foi considerado significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software Prism (GraphPad® v 8.1).

2.5 RESULTADOS

A morfologia dos macrófagos derivados de cultura de monócitos observada em microscópio de contraste de fase revelou uma única camada de células redondas. De acordo com a caracterização fenotípica das células, obtida após análise em citômetro de fluxo, constatou-se 44,58% das células do cultivo apresentaram marcação positiva para o fenótipo MHC II e, 41,57% foram positivas

para o fenótipo CD32, comprovando que após os 7 dias de cultivo celular, obteve-se a diferenciação dos monócitos caninos oriundos de sangue periférico em macrófagos (Figuras 1 A e B).

Figura 1 – A) Citometria de fluxo para avaliação de MHC I/II, revelando que 44,58% das células isoladas são positivas para o fenótipo MHCII; B) Do total de células da cultura, 41,57% são positivas para o fenótipo CD32.

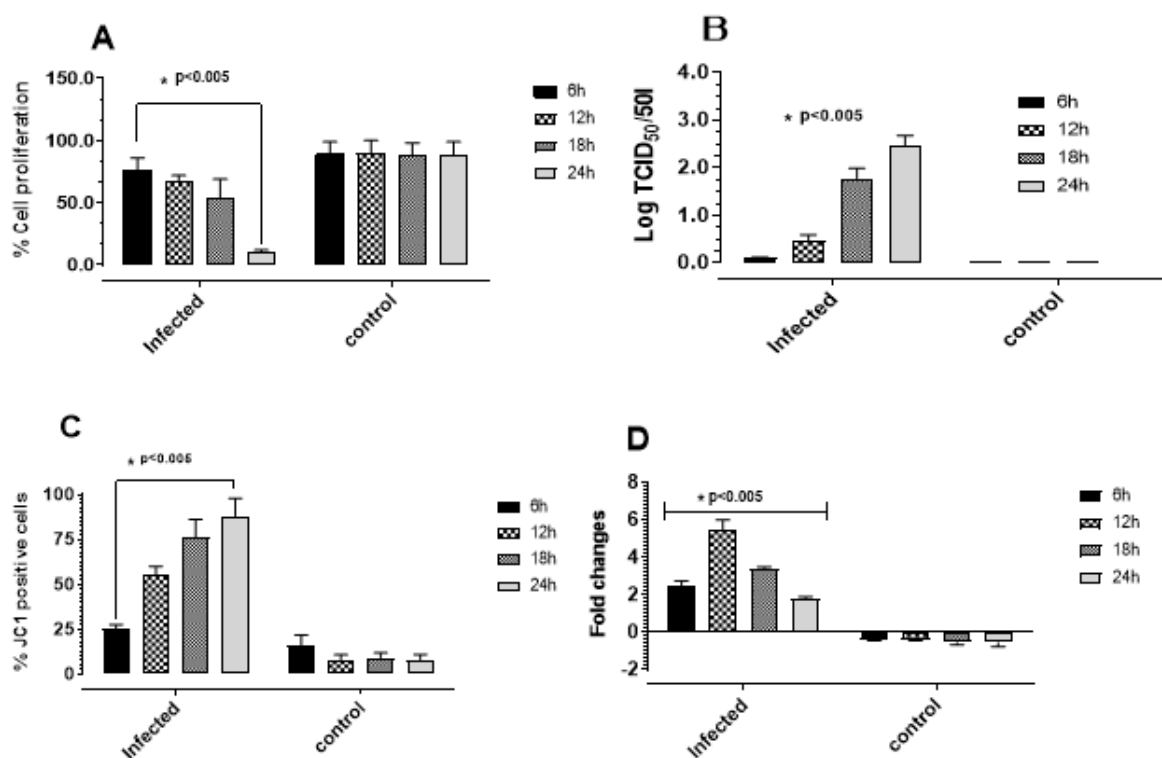


Fonte: Laboratório de Virologia FMVA/UNESP

Após a infecção das células, a imunocitoquímica foi realizada para detecção de antígenos de CCoV nas culturas de células infectadas e controle. Foi possível a identificação do antígeno CCoV nos macrófagos caninos infectados, através da observação de imunomarcacão fluorescente nas células da cultura, quando comparadas aos macrófagos controle. Ainda, promoveu-se a infecção das células A-72, sabidamente permissivas a infecção pelo CCoV a partir dos macrófagos infectados, como controle positivo. Nessas células também se observou imunomarcacão fluorescente como consequência da infecção pelo CCoV.

Com relação à proliferação celular, houve significativa diminuicão entre os momentos 6 e 24 horas pós-infecção ($p < 0,005$) (Figura 2 A). De modo contrário, os títulos virais aumentaram continuamente, havendo diferença significativa entre os quatro momentos avaliados (Figura 2 B). Ainda, a despolarizacão da membrana mitocondrial, avaliada pela sonda JC-1, mostrou um aumento contínuo nos momentos pós-infecção, com pico 24 horas após, apresentando diferença significativa entre os momentos 6 e 24 horas pós-infecção (Figura 2 C). A maior quantidade de RNA viral foi detectada às 12 horas pós-infecção, apresentando diferença significativa quando comparado aos demais momentos ($p < 0,005$) (Figura 2 D).

Figura 2 - A) A proliferação celular após a infecção com CCoV diminuiu significativamente às 24h p.i., em contraste com o contínuo aumento dos títulos de CCoV (B); A avaliação do JC-1 revelou aumento contínuo com pico às 24 p.i. (C); D) Maior concentração de RNA viral foi detectada 12h p.i. ($p<0,005$).

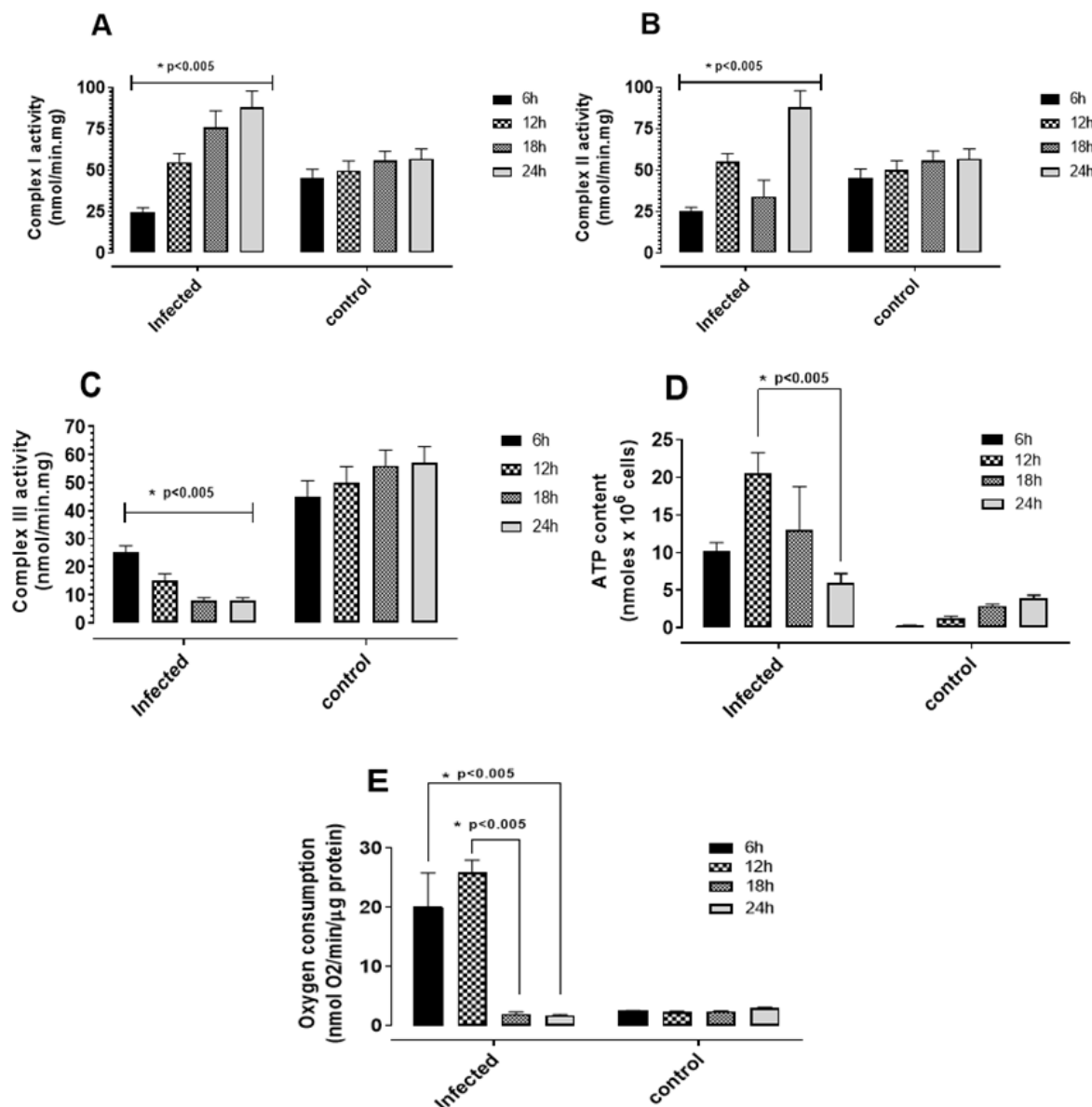


Fonte: Elaborado pelos autores

Após o isolamento mitocondrial, foram avaliados os complexos da cadeia respiratória em todos os momentos do estudo. A atividade do complexo I aumentou continuamente nos momentos pós-infecção, enquanto o complexo II demonstrou instabilidade metabólica, com diminuição significativa 18 horas pós-infecção. Para ambos os complexos houve diferença significativa ($p<0,005$) entre os momentos 6 e 24 horas pós infecção (Figura 3 A e B). O complexo III por sua vez, demonstrou menor atividade quando comparado aos demais, com significativa diminuição da atividade entre os momentos avaliados ($p<0,005$) (Figura 3 C).

O consumo de ATP obteve seu índice mais alto 12 horas pós-infecção, mesmo momento em que foi detectada maior quantidade de RNA viral, e houve falha no consumo de oxigênio às 18 horas pós-infecção, havendo diferença significativa entre os momentos iniciais e finais (Figura 3 D e E).

Figura 3 – Atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial após infecção por CCoV às 6, 12, 18 e 24h p.i. A) Atividade do complexo I aumentou conforme o tempo p.i.; B) Instabilidade metabólica do complexo II com significativa diminuição às 18h p.i.; C) Atividade menor do complexo III em comparação aos complexos I e II em todos os momentos p.i.; D) Concentração de ATP teve o maior nível às 12h p.i.; E) Falha no consumo de oxigênio às 18 e 24h p.i.



Fonte: Elaborado pelos autores

2.6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi possível promover a diferenciação *in vitro* de células mononucleares sanguíneas caninas em macrófagos, uma vez que foi observada imunomarcação positiva para MHC II e CD32, caracterizando a diferenciação dos monócitos em macrófagos clássicos, os quais estão associados à produção de citocinas pró-inflamatórias [26]. Ainda, o CCoV-IIa se mostrou eficaz em promover a infecção da cultura de macrófagos caninos, tendo em vista a imunomarcação positiva nas células do experimento, em associação ao aumento dos títulos virais constatado em todos os momentos pós-infecção. Isso demonstra a habilidade da variante pantrópica em causar infecção e originar novas partículas infectantes, fato comprovado pela posterior infecção das células A-72 com a cultura de macrófagos infectados.

As células A-72 são sabidamente permissivas à infecção pelo CCoV [27,28] e, por esse motivo, foram utilizadas como controle positivo no experimento. Um recente trabalho realizado na China, também constatou a capacidade de uma nova variante de CCoV, isolada a partir de um caso fatal, em causar infecção e se replicar em cultura de macrófagos [13]. Nesse sentido, a habilidade em alterar o tropismo celular e causar infecção em macrófagos, parece ser fator chave para a compreensão da patogenia relacionada a doença causada pelas variantes virulentas do CCoV.

O frequente surgimento de novas variantes de coronavírus, ocorre devido a diversos fatores como erros cometidos pela RNA polimerase e a alta frequência de recombinação genética entre diferentes coronavírus [29,30]. Essas alterações acarretam mudanças na proteína S, a qual é responsável pelo tropismo dos coronavírus [31,32]. Diferentemente da infecção tipicamente descrita para o CCoV, a variante pantrópica demonstra capacidade em se disseminar por diferentes órgãos, causando doença sistêmica grave e muitas vezes fatal, principalmente em cães jovens [3,4]. Acredita-se que a mutação observada no CCoV-IIa, provavelmente altera o tropismo celular, tornando-a capaz de infectar macrófagos caninos de maneira eficiente [13,32-34] como foi demonstrado neste trabalho.

Embora os estudos envolvendo a infecção de macrófagos pelo CCoV-IIa tenham sido realizados *in vitro*, outras doenças sistêmicas graves causadas por coronavírus como a síndrome da angústia respiratória grave (SARS-CoV) em humanos e a peritonite infecciosa felina (PIF), mostram que o envolvimento dos

macrófagos é determinante para o estabelecimento do curso da infecção viral [35]. A infecção de macrófagos e células dendríticas pelo vírus da peritonite infecciosa felina (VPIF) leva a um padrão aberrante de expressão de citocinas e quimiocinas, acarretando depleção linfóide e altos títulos virais [33]. Ademais, os macrófagos infectados são responsáveis pela disseminação viral pelo organismo do hospedeiro [7,13,36].

A associação entre CCoV-IIa e linfopenia já é bem descrita em cães [3,4,37] e acredita-se que de maneira semelhante ao que ocorre na PIF, os macrófagos podem estar indiretamente relacionados ao desenvolvimento da marcante linfopenia observada nas infecções pelo CCoV-IIa. Diferentemente dos macrófagos, linfócitos maduros não apresentam a aminopeptidase (ANP), receptor pelo qual o CCoV é capaz de entrar na célula, desse modo, a linfopenia observada na doença causada pela variante pantrópica provavelmente se dê por eventos indiretos, secundários a infecção viral, mediada pela produção de fatores solúveis como de interferon, citocinas e quimiocinas pelas células do hospedeiro, que ocasionarão a apoptose de linfócitos infectados ou não [37,38].

O TNF- α , produzido por macrófagos e linfócitos ativados, é uma das moléculas que induz a apoptose em linfócitos não infectados no timo [39] e, é sabido que outras infecções por coronavírus são conhecidas por causar linfopenia associada a produção do TNF- α [40]. O vírus da hepatite do rato induz atrofia tímica, não como consequência de infecção maciça de linfócitos T, mas sim de apoptose de células T imaturas, causada pela infecção de uma pequena proporção de células epiteliais tímicas infectadas ou da secreção exacerbada de citocinas [41]. Embora se acredite que, na infecção pelo CCoV-IIa, a linfopenia possa ocorrer por motivos semelhantes, tais mecanismos ainda não foram determinados.

Ainda, quando avaliada a proliferação celular das células da cultura, observou-se que houve diminuição significativa 24 horas pós infecção, quando comparada às células controle, mostrando que o CCoV-IIa afetou diretamente a viabilidade celular. Outro fator importante foi o contínuo aumento da despolarização mitocondrial, avaliada pela sonda JC-1. A combinação desses parâmetros avaliados demonstra que os mecanismos de apoptose pela via mitocondrial (intrínseca), provavelmente são ativados pela infecção viral, visto que a alteração de

permeabilidade da mitocôndria é determinante para que ocorra essa ativação [18,20].

O CCoV-IIa já se mostrou capaz de causar apoptose em outros tipos celulares [28], todavia os mecanismos que levavam a sua ocorrência eram, até o momento obscuros. A crescente despolarização da membrana mitocondrial observada nas células infectadas é um importante achado que permite associar a infecção viral com a ativação da via intrínseca. Alguns vírus tem a capacidade de causar danos potenciais nos complexos da cadeia respiratória mitocondrial. Esse trabalho provavelmente é o primeiro a demonstrar que a infecção de macrófagos pelo CCoV-IIa ativa a despolarização mitocondrial, aumentando a atividade do complexo I e a concentração de ATP. Uma das principais funções da mitocôndria é sintetizar ATP a partir de carboidratos oriundos da dieta através da ATPsintase na cadeia transportadora de elétrons. A produção suficiente de ATP é dependente da atividade de quatro proteínas-chave, denominadas complexo I, II, III e IV, localizadas na crista mitocondrial [42]. O potencial de membrana mitocondrial também é fundamental para a produção de ATP e a perda desse potencial leva a depleção de ATP que pode contribuir para a morte celular.

Os resultados obtidos utilizando mitocôndrias energizadas com piruvato (doadores de elétron ao complexo I), mostraram que o CCoV-IIa inibe o estado 3 da respiração, que envolve a mitocôndria, ADP e um substrato para a respiração. A velocidade da fosforilação do ADP é um fator limitante para esse processo [43]. A ativação observada no complexo I indica que a replicação do CCoV-IIa tem ação direta na cadeia de transporte de elétrons dos macrófagos infectados, no entanto, não se pode excluir que os eventos relacionados a replicação viral interagem com o sistema de fosforilação oxidativa (F_0F_1 ATPase e/ou ADP/ATP translocase). O complexo I (NADH ubiquinona oxirredutase) aceita elétrons da dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzida (NADH), enquanto o complexo II (succinato desidrogenase) aceita elétrons da dinucleotídeo de flavina e adenina reduzida ($FADH_2$). O complexo III (ubiquinona-citocromo C oxirredutase) é responsável pela transferência de elétrons entre a ubiquinona e o citocromo C. Finalmente, o complexo IV (citocromo oxidase) promove oxidação do citocromo C e a redução de oxigênio molecular para água. A energia derivada da transferência de elétrons está relacionada a esses complexos, que produzem energia celular [43]. Baseado nisso,

acredita-se que a infecção por CCoV-IIa prejudica a transferência de elétrons pela alta ativação do complexo I associada ao colapso do complexo III, como foi demonstrado nesse trabalho, provavelmente levando a uma alta produção de espécies reativas de oxigênio e ativando as vias de apoptose.

Desse modo, acredita-se que o CCoV-IIa atua como um desacoplador da cadeia respiratória. Os macrófagos infectados provavelmente são capazes de induzir a formação de altas quantidades de ERO em todos os períodos pós-infecção, fazendo de que a replicação viral leve a um aumento da condutância de prótons para o interior da membrana mitocondrial. Ainda, durante a infecção viral as funções dos macrófagos podem ser diretamente comprometidas, ocasionando disfunção imunológica. Este achado tem particular importância para cães filhotes, uma vez que a imunossupressão é responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade nessa fase da vida.

2.7 CONCLUSÃO

O CCoV-IIa parece induzir a uma falha bioenergética mitocondrial atuando como um desacoplador da cadeia respiratória no complexo III de macrófagos caninos infectados, sem comprometer a replicação viral.

REFERÊNCIAS

1. Gonzalez JM, Gomez-Puertas P, Cavanagh D, Gorbalenya AE, Enjuanes LA. comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae. Archives of Virology, 2003. DOI: 10.1007/s00705-003-0162-1
2. Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AM, Harrach B, Harrison RL, Knowles NJ, et al. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. Archives of Virology, 2016. DOI: 10.1007/s00705-016-2977-6
3. Buonavoglia C, Decaro N, Martella V, Elia G, Campolo M, Dasario C, et al. Canine coronavirus highly pathogenic for dogs. Emerging Infectious Diseases, 2006. DOI: 10.3201/eid1203.050839
4. Decaro N, Campolo M, Lorusso A, Desario C, Mari V, Colaianni ML, et al. Experimental infection of dogs with a novel strain of canine coronavirus causing systemic disease and lymphopenia. Veterinary Microbiology, 2008. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.10.008
5. Decaro N, Martella V, Elia G, Campolo M, Desario C, Cirone F, et al. Molecular characterisation of the virulent canine coronavirus CB/05 strain. Virus Research, 2007. DOI: 10.1016/j.virusres.2006.12.006

6. Decaro N, Buonavoglia C. An update on canine coronaviruses: viral evolution and pathobiology. *Veterinary Microbiology*, 2008. DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.06.007
7. Decaro N, Eliga G, Martella V, Campolo M, Mari V, Desario C, et al. Immunity after natural exposure to enteric canine coronavirus does not provide complete protection against infection with the new pantropic cb/05 strain. *Vaccine*, 2010. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.10.077
8. Erles K, Brownlie J. Sequence analysis of divergent canine coronavirus strains present in a UK dog population. *Virus Research*, 2009. DOI: 10.1016/j.virusres.2008.12.009
9. Ntafis V, Xylouri E, Mari V, Papanastassopoulou M, Papaioannou N, Thomas A. et al. Molecular characterization of a canine coronavirus NA/09 strain detected in a dog's organs. *Archives of Virology*, 2012. DOI: 10.1007/s00705-011-1141-6
10. Pinto LD, Barros IN, Budaszewski RF, Weber MN, Mata H, Antunes JR, et al. Characterization of pantropic canine coronavirus from Brazil. *The Veterinary Journal*, 2014. DOI: 10.1016/j.tvjl.2014.09.006
11. Costa EM, de Castro TX, de Oliveira Bottino F, Garcia RDCNC. Molecular characterization of canine coronavirus strains circulating in Brazil. *Veterinary Microbiology*, 2014. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.10.002

- 12.** Wang X, Li C, Guo D, Wei S, Geng Y, Wang E, et al. Co-circulation of canine coronavirus I and IIa/b with high prevalence and genetic diversity in Heilongjiang Province, Northeast China. *PloS One*, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0146975
- 13.** Chen S, Liu D, Tian J, Kang H, Guo D, Jiang Q, et. al. Molecular characterization of hlj-073, a recombinant canine coronavirus strain from china with an orf3abc deletion. *Archives of Virology*, 2019. DOI: 10.1007/s00705-019-04296-9
- 14.** Elmore S, Apoptosis. A review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 2007. DOI: 10.1080/01926230701320337
- 15.** Clarke P, Tyler KL. Apoptosis in animal models of virus-induced disease. *Nature reviews microbiology*, 2009. DOI: 10.1038/nrmicro2071
- 16.** Han X, Tian Y, Guan R, Gao W, Yang X, Zhou L, et al. Infectious bronchitis virus infection induces apoptosis during replication in chicken macrophage hd11 cells. *Viruses*, 2017. DOI: 10.3390/v9080198
- 17.** Liu C, Xu HY, Liu DX. Induction of caspase-dependent apoptosis in cultured cells by the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Journal of Virology*, 2001. DOI: 10.1128/JVI.75.14.6402-6409.2001

- 18.** Scott I. The role of mitochondria in the mammalian antiviral defense system. Mitochondrion, 2010. DOI: 10.1016/j.mito.2010.02.005
- 19.** Maier H, Britton P. Involvement of autophagy in coronavirus replication. Viruses, 2012. DOI: 10.3390/v4123440
- 20.** Ohta A, Nishiyama Y. Mitochondria and viruses. Mitochondrion, 2011. DOI: 10.1016/j.mito.2010.08.006
- 21.** Skommer J, Brittain T, Raychaudhuri S. Bcl-2 inhibits apoptosis by increasing the time-to-death and intrinsic cell-to-cell variations in the mitochondrial pathway of cell death. Apoptosis, 2010. DOI: 10.1007/s10495-010-0515-7
- 22.** Cardoso TC, Ferreira HL, Okamura LH, Oliveira BR, Rosa AC, Gameiro R, Flores EF. Comparative analysis of the replication of bovine herpesvirus 1 (BHV1) and BHV5 in bovine-derived neuron-like cells. Archives of Virology, 2015. DOI: 10.1007/s00705-015-2537-5
- 23.** Vieira FV, Vieira DS, Gameiro R, Ferreira HL, Cardoso TC. Digital pcr platform as a tool to determine the canine coronavirus (ccov) genome in clinical samples. Archives on Veterinary Science and Technology, 2018. DOI: 10.29011/ AVST-142. 100042

- 24.** Da Silva SEL, Ferreira HL, Garcia AF, Silva FES, Gameiro R, Fabri, CUF, Vieira DS, Cardoso TC. mitochondrial bioenergy alterations in avian hd11 macrophages infected with infectious bronchitis virus. *Archives of Virology*, 2018. DOI: 10.1007/s00705-018-3704-2
- 25.** Decaro N, Pratelli A, Campolo M, Elia G, Martella V, Tempesta M, et al. Quantitation of canine coronavirus RNA in the faeces of dogs by TaqMan RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 2004. DOI: 10.1016/j.jviromet.2004.03.012
- 26.** Tizard IR. Imunidade Inata: Macrófagos e Recuperação da Inflamação. In: Tizard IR. *Imunologia Veterinária*. 9. ed. Rio de Janeiro:Elsevier, 2014. p. 109-128.
- 27.** Pratelli A. Action of disinfectants on canine coronavirus replication in vitro. *Zoonoses and Public Health*, 2007. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2007.01079.x
- 28.** Ruggieri A, Di Trani L, Gatto I, Franco M, Vignolo E, et al. Canine coronavirus induces apoptosis in cultured cells. *Veterinary microbiology*, 2007. v. 121, n. 1-2, p. 64-72 DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.12.016
- 29.** Enjuanes L, Almazán F, Sola I, Zuñiga S. Biochemical aspects of coronavirus replication and virus-host interaction. *Annual Review of Microbiology*, 2006. DOI: 10.1146/annurev.micro.60.080805.142157

30. Brandão PE, Lovato LT, Shessarenko RD. coronaviridae. In: flores, e.f. virologia veterinária, santa maria, 2th.ed UFSM, 2012.
31. Lai MM, Cavanagh D. The molecular biology of coronaviruses. *Advances in Virus Research*, 1997. DOI: 10.1016/S0065-3527(08)60286-9
32. Hulswit RJG, De Haan CAM, Bosch BJ. Coronavirus spike protein and tropism changes. In: *advances in virus research*. Academic press, 2016. DOI: 10.1016/bs.aivir.2016.08.004
33. Rottier PJM, Nakamura K, Schellen P, Volders H, Haijema BJ. Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. *Journal of Virology*, 2005. DOI: 10.1128/JVI.79.22.14122-14130.2005
34. Belouzard S, Millet JK, Licitra BN, & Whittaker GR. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses*, 2012. DOI: 10.3390/v4061011
35. Perlman S, Netland J. Coronaviruses post-sars: update on replication and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 2009. DOI: 10.1038/nrmicro2147

- 36.** Zappulli V, Caliarì D, Cavicchioli L, Tinelli A, Castagnaro M. Systemic fatal type ii coronavirus infection in a dog: pathological findings and immunohistochemistry. *Research in Veterinary Science*, 2008. DOI: 10.1016/j.rvsc.2007.05.004
- 37.** Marinaro M, Mari V, Bellacicco AL, Tarsitano E, Elia G, Losurdo M, et al. Prolonged depletion of circulating CD4+ T lymphocytes and acute monocytosis after pantropic canine coronavirus infection in dogs. *Virus Research*, 2010. DOI: 10.1016/j.virusres.2010.06.006
- 38.** Licitra BN, Whittaker GR, Dubovi EJ, Duhamel GE. Genotypic characterization of canine coronaviruses associated with fatal canine neonatal enteritis in the united states. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014. DOI: 10.1128/JCM.02158-14
- 39.** Savino W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. *Plos Pathogens*, 2006. DOI: 10.1371/journal.ppat.0020062
- 40.** Dean GA, Olivry T, Stanton C, Pedersen NC. in vivo cytokine response to experimental feline infectious peritonitis virus infection. *Veterinary Microbiology*, 2003. DOI: 10.1016/j.vetmic.2003.08.010
- 41.** Godfraind C, Holmes KV, Coutelier J. Thymus involution induced by mouse hepatitis virus a59 in BALB/c mice. *Journal of Virology*, 1995;69;10: 6541-6547. PMCID: PMC189556

- 42.** El-Bacha T, Da Poian AT. Virus-induced changes in mitochondrial bioenergetics as potential targets for therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2013. DOI: 10.1016/j.biocel.2012.09.021
- 43.** Nelson DL, Cox MM. Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation. In: *Lehninger Principles of Biochemistry*. 6. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2013. p.731-798

APÊNDICE A – REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ADAMS, M. J., et al. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2016). **Archives of Virology**, v. 161, n. 10, p. 2921-2949, 2016.

BÁLINT, Á., et al. Molecular characterization of feline infectious peritonitis virus strain DF-2 and studies of the role of ORF3abc in viral cell tropism. **Journal of Virology**, v. 86, n. 11, p. 6258-6267, 2012.

BELOUZARD, S., et al. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. **Viruses**, v. 4, n. 6, p. 1011-1033, 2012.

BINN, L. N., et al. Recovery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhea. In: **Proceedings,... annual meeting of the United States Animal Health Association**. 1974.

BRANDÃO, P.E.; LOVATO, L.T.; SLHESSARENKO, R.D. Coronaviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**. 2.ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2012. p. 713-740.

BUONAVOGLIA, C., et al. Canine coronavirus highly pathogenic for dogs. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n.3, p. 492-494, 2006.

CHEN, S., et al. Molecular characterization of HLJ-073, a recombinant canine coronavirus strain from China with an ORF3abc deletion. **Archives of Virology**, p. 1-6, 2019.

COSTA, E. M., et al. Molecular characterization of canine coronavirus strains circulating in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 168, n. 1, p. 8-15, 2014.

CUI, W., et al. Expression of lymphocytes and lymphocyte subsets in patients with severe acute respiratory syndrome. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 6, p. 857-859, 2003.

DEAN, G. A., et al. In vivo cytokine response to experimental feline infectious peritonitis virus infection. **Veterinary Microbiology**, v. 97, n. 1-2, p. 1-12, 2003.

DECARO, N., et al. Molecular characterisation of the virulent canine coronavirus CB/05 strain. **Virus Research**, v. 125, n. 1, p. 54-60, 2007.

DECARO, N., et al. Experimental infection of dogs with a novel strain of canine coronavirus causing systemic disease and lymphopenia. **Veterinary Microbiology**, v. 128, n. 3-4, p. 253-260, 2008.

DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. An update on canine coronaviruses: viral evolution and pathobiology. **Veterinary Microbiology**, v. 132, n. 3-4, p. 221-234, 2008.

DECARO, N., et al. Recombinant canine coronavirus related to transmissible gastroenteritis virus of swine are circulating in dogs. **Journal of Virology**, v.83, p. 1532-1537, 2009.

DECARO, N., et al. Immunity after natural exposure to enteric canine coronavirus does not provide complete protection against infection with the new pantropic CB/05 strain. **Vaccine**, v. 28, n. 3, p. 724-729, 2010.

DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. Canine coronavirus: not only an enteric pathogen. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 41, n. 6, p. 1121-1132, 2011.

DECARO, N., et al. European surveillance for pantropic canine coronavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 83-88, 2013.

DE GROOT-MIJNES, J.D.F., et al. Natural history of a recurrent feline coronavirus infection and the role of cellular immunity in survival and disease. **Journal of Virology**, v. 79, n. 2, p. 1036-1044, 2005.

DROSTEN, C., et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 20, p. 1967-1976, 2003.

DUNNE, P. J., et al. Epstein-Barr virus-specific CD8⁺ T cells that re-express CD45RA are apoptosis-resistant memory cells that retain replicative potential. **Blood**, v. 100, n. 3, p. 933-940, 2002.

DUIJVESTIJN, M., et al. Enteropathogen infections in canine puppies:(co-) occurrence, clinical relevance and risk factors. **Veterinary Microbiology**, v. 195, p. 115-122, 2016.

ERLES, K.; BROWNLIE, J. Sequence analysis of divergent canine coronavirus strains present in a UK dog population. **Virus Research**, v. 141, n. 1, p. 21-25, 2009.

ENJUANES, L., et al. Biochemical aspects of coronavirus replication and virus-host interaction. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, p. 211-230, 2006.

FLORES, E. F. Estrutura e Composição dos Vírus. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**. 2.ed, Santa Maria: Editora UFSM, 2012. p. 13-28.

GODFRAIND, C.; HOLMES, K. V.; COUTELIER, J. Thymus involution induced by mouse hepatitis virus A59 in BALB/c mice. **Journal of Virology**, v. 69, n. 10, p. 6541-6547, 1995.

GONZÁLEZ, J.M., et al. A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the Family *Coronaviridae*. **Archives of Virology**, v.148, n.11, p.2207-2235, 2003.

GREENE, C. E.; DECARO, N. Canine viral enteritis. In: GREENE, C. E. **Doenças Infeciosas em Cães e Gatos**. 4ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2015. p.179-186.

HUDSON, C. B.; BEAUDETTE, F. R. Infection of the cloaca with the virus of infectious bronchitis. **Science**, v. 76, n. 1958, p. 34-34, 1932.

HULSWIT, R. J. G.; DE HAAN, C. A. M.; BOSCH, B.J. Coronavirus spike protein and tropism changes. In: **Advances in Virus Research**. Academic Press, 2016. p. 29-57.

JORGENSEN, I.; RAYAMAJHI, M.; MIAO, E. A. Programmed cell death as a defence against infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 3, p. 151, 2017.

KRZYŻOWSKA, M., et al. Involvement of Fas and FasL in Ectromelia virus-induced apoptosis in mouse brain. **Virus Research**, v. 115, n. 2, p. 141-149, 2006.

KRZYŻOWSKA, M., et al. Role of Fas/FasL in regulation of inflammation in vaginal tissue during HSV-2 infection. **Cell Death & Disease**, v. 2, n. 3, p. e132, 2011.

LAI, M.M.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 48, p. 1-100, 1997.

LIAO, H.; XU, J.; HUANG, J. FasL/Fas pathway is involved in dengue virus induced apoptosis of the vascular endothelial cells. **Journal of Medical Virology**, v. 82, n. 8, p. 1392-1399, 2010.

LICITRA, B.; DUHAMEL, G.; WHITTAKER, G. Canine enteric coronaviruses: emerging viral pathogens with distinct recombinant spike proteins. **Viruses**, v. 6, n. 8, p. 3363-3376, 2014.

LICITRA, B. N., et al. Genotypic characterization of canine coronaviruses associated with fatal canine neonatal enteritis in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 12, p. 4230-4238, 2014.

MARINARO, M., et al. Prolonged depletion of circulating CD4+ T lymphocytes and acute monocytosis after pantropic canine coronavirus infection in dogs. **Virus Research**, v. 152, n. 1-2, p. 73-78, 2010.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation. In: **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2013. p.731-798.

NTAFIS, V., et al. Molecular characterization of a canine coronavirus NA/09 strain detected in a dog's organs. **Archives of Virology**, v. 157, n. 1, p. 171-175, 2012.

OHTA, A.; NISHIYAMA, Y. Mitochondria and viruses. **Mitochondrion**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2011.

OKADA, H., et al. Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients. **Archives of Virology**, v. 145, n. 5, p. 905-920, 2000.

PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, n. 2, p. 138-144, 2001.

PEDERSEN, N., et al. Significance of coronavirus mutants in feces and diseased tissues of cats suffering from feline infectious peritonitis. **Viruses**, v. 1, n. 2, p. 166-184, 2009.

PINTO, L. D., et al. Characterization of pantropic canine coronavirus from Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 202, n. 3, p. 659-662, 2014.

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

POONIA, B.; PAUZA, C. D.; SALVATO, M. S. Role of the Fas/FasL pathway in HIV or SIV disease. **Retrovirology**, v. 6, n. 1, p. 91, 2009.

ROTTIER, P. J. M., et al. Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. **Journal of Virology**, v. 79, n. 22, p. 14122-14130, 2005.

SÁNCHEZ, C. M., et al. Genetic evolution and tropism of transmissible gastroenteritis coronaviruses. **Virology**, v. 190, n. 1, p. 92-105, 1992.

SAVINO, W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. **PLoS Pathogens**, v. 2, n. 6, p. e62, 2006.

SCOTT, I. The role of mitochondria in the mammalian antiviral defense system. **Mitochondrion**, v. 10, n. 4, p. 316-320, 2010.

SOMA, T., et al. Detection and genotyping of canine coronavirus RNA in diarrheic dogs in Japan. **Research in Veterinary Science**, v. 90, n. 2, p. 205-207, 2011.

VEAZEY, R., et al. Decreased CCR5 expression on CD4+ T cells of SIV-infected sooty mangabeys. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 19, n. 3, p. 227-233, 2003.

VIEIRA, F. V. **Coronavírus Canino (CCoV): isolamento e detecção molecular em amostras clínicas. 2015.** 62 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

ZAPPULLI, V., et al. Systemic fatal type II coronavirus infection in a dog: pathological findings and immunohistochemistry. **Research in Veterinary Science**, v. 84, n. 2, p. 278-282, 2008.

WANG, X., et al. Co-circulation of canine coronavirus I and IIa/b with high prevalence and genetic diversity in Heilongjiang Province, Northeast China. **PloS One**, v. 11, n. 1, p. e0146975, 2016.

WEISS, S. R.; NAVAS-MARTIN, S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 4, p. 635-664, 2005.

WEST, A. P.; SHADEL, G. S.; GHOSH, S. Mitochondria in innate immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 6, p. 389, 2011.

WHITTAKER, G. R.; ANDRÉ, N. M.; MILLET, J. K. Improving Virus Taxonomy by Recontextualizing Sequence-Based Classification with Biologically Relevant Data: the Case of the Alphacoronavirus 1 Species. **mSphere**, v. 3, n. 1, p. e00463-17, 2018.

WONG, R. S. M., et al. Haematological manifestations in patients with severe acute respiratory syndrome: retrospective analysis. **Bmj**, v. 326, n. 7403, p. 1358-1362, 2003.

WOO, P. C. Y., et al. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. **Viruses**, v. 2, n. 8, p. 1804-1820, 2010.

XU, X., et al. Bovine herpes virus type 1 induces apoptosis through Fas-dependent and mitochondria-controlled manner in Madin-Darby bovine kidney cells. **Virology Journal**, v. 9, n. 1, p. 202, 2012.

ANEXO A - Normas de publicação do periódico Plos One

Submission Guidelines

Related information for authors

- [Submission system](#)
- [Journal scope and publication criteria](#)
- [Getting started guide](#)
- [Guidelines for revisions](#)
- [Publication fees](#)

Style and Format

File format	Manuscript files can be in the following formats: DOC, DOCX, or RTF. Microsoft Word documents should not be locked or protected. LaTeX manuscripts must be submitted as PDFs. Read the LaTeX guidelines.
Length	Manuscripts can be any length. There are no restrictions on word count, number of figures, or amount of supporting information. We encourage you to present and discuss your findings concisely.
Font	Use a standard font size and any standard font, except for the font named "Symbol". To add symbols to the manuscript, use the Insert → Symbol function in your word processor or paste in the appropriate Unicode character.
Headings	Limit manuscript sections and sub-sections to 3 heading levels. Make sure heading levels are clearly indicated in the manuscript text.
Layout and spacing	Manuscript text should be double-spaced. Do not format text in multiple columns.
Page and line numbers	Include page numbers and line numbers in the manuscript file. Use continuous line numbers (do not restart the numbering on each page).

Footnotes	Footnotes are not permitted. If your manuscript contains footnotes, move the information into the main text or the reference list, depending on the content.						
Language	Manuscripts must be submitted in English. You may submit translations of the manuscript or abstract as supporting information. Read the supporting information guidelines.						
Abbreviations	Define abbreviations upon first appearance in the text. Do not use non-standard abbreviations unless they appear at least three times in the text. Keep abbreviations to a minimum.						
Reference style	PLOS uses “Vancouver” style, as outlined in the ICMJE sample references. See reference formatting examples and additional instructions below.						
Equations	We recommend using MathType for display and inline equations, as it will provide the most reliable outcome. If this is not possible, Equation Editor or Microsoft's Insert→Equation function is acceptable. Avoid using MathType, Equation Editor, or the Insert→Equation function to insert single variables (e.g., “$a^2 + b^2 = c^2$”), Greek or other symbols (e.g., β, Δ, or ' [prime]), or mathematical operators (e.g., $\times$, $\geq$, or $\pm$) in running text. Wherever possible, insert single symbols as normal text with the correct Unicode (hex) values. Do not use MathType, Equation Editor, or the Insert→Equation function for only a portion of an equation. Rather, ensure that the entire equation is included. Equations should not contain a mix of different equation tools. Avoid “hybrid” inline or display equations, in which part is text and part is MathType, or part is MathType and part is Equation Editor.						
Nomenclature	Use correct and established nomenclature wherever possible. <table border="1"> <tr> <td><i>Units of measurement</i></td><td>Use SI units. If you do not use these exclusively, provide the SI value in parentheses after each value. Read more about SI units.</td></tr> <tr> <td><i>Drugs</i></td><td>Provide the Recommended International Non-Proprietary Name (rINN).</td></tr> <tr> <td><i>Species names</i></td><td>Write in italics (e.g., <i>Homo sapiens</i>). Write out in full the genus and species, both in the title of the</td></tr> </table>	<i>Units of measurement</i>	Use SI units. If you do not use these exclusively, provide the SI value in parentheses after each value. Read more about SI units.	<i>Drugs</i>	Provide the Recommended International Non-Proprietary Name (rINN).	<i>Species names</i>	Write in italics (e.g., <i>Homo sapiens</i>). Write out in full the genus and species, both in the title of the
<i>Units of measurement</i>	Use SI units. If you do not use these exclusively, provide the SI value in parentheses after each value. Read more about SI units.						
<i>Drugs</i>	Provide the Recommended International Non-Proprietary Name (rINN).						
<i>Species names</i>	Write in italics (e.g., <i>Homo sapiens</i>). Write out in full the genus and species, both in the title of the						

*Genes,
mutations,
genotypes,
and alleles*

Allergens

manuscript and at the first mention of an organism in a paper. After first mention, the first letter of the genus name followed by the full species name may be used (e.g., *H. sapiens*).

Write in italics. Use the recommended name by consulting the appropriate genetic nomenclature database (e.g., [HGNC](#) for human genes; we strongly recommend using [this tool](#) to check against previously approved names). It is sometimes advisable to indicate the synonyms for the gene the first time it appears in the text. Gene prefixes such as those used for oncogenes or cellular localization should be shown in roman typeface (e.g., v-fes, c-MYC).

The systematic allergen nomenclature of the World Health Organization/International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS) Allergen Nomenclature Sub-committee should be used for manuscripts that include the description or use of allergenic proteins. For manuscripts describing new allergens, the systematic name of the allergen should be approved by the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee prior to manuscript publication. Examples of the systematic allergen nomenclature can be found at [the WHO/IUIS Allergen Nomenclature site](#).

Copyediting

manuscripts

Prior to submission, authors who believe their manuscripts would benefit from professional editing are encouraged to use language-editing and copyediting services. Obtaining this service is the responsibility of the author, and should be done before initial submission. These services can be found on the web using search terms like “scientific editing service” or “manuscript editing service.”

Submissions are not copyedited before publication.

Submissions that do not meet the [PLOS ONE publication criterion for language standards](#) may be rejected.

Manuscript Organization

Manuscripts should be organized as follows. Instructions for each element appear below the list.

Beginning section	<i>The following elements are required, in order:</i> • Title page: List title, authors, and affiliations as first page of manuscript • Abstract • Introduction
Middle section	<i>The following elements can be renamed as needed and presented in any order:</i> • Materials and Methods • Results • Discussion • Conclusions (optional)
Ending section	<i>The following elements are required, in order:</i> • Acknowledgments • References • Supporting information captions (if applicable)
Other elements	• Figure captions are inserted immediately after the first paragraph in which the figure is cited. Figure files are uploaded separately. • Tables are inserted immediately after the first paragraph in which they are cited. • Supporting information files are uploaded separately.



Please refer to our downloadable sample files to ensure that your submission meets our formatting requirements:

- [Download sample title, author list, and affiliations page \(PDF\)](#)
- [Download sample manuscript body \(PDF\)](#)

Viewing Figures and Supporting Information in the compiled submission PDF

The compiled submission PDF includes low-resolution preview images of the figures after the reference list. The function of these previews is to allow you to download the entire submission as quickly as possible. Click the link at the top of each preview page to download a high-resolution version of each figure. Links to download Supporting Information files are also available after the reference list.

Parts of a Submission

Title

Include a full title and a short title for the manuscript.

Title	Length	Guidelines	Examples
Full title	250 characters	Specific, descriptive, concise, and comprehensible to readers outside the field	Impact of cigarette smoke exposure on innate immunity: A <i>Caenorhabditis elegans</i> model Solar drinking water disinfection (SODIS) to reduce childhood diarrhoea in rural Bolivia: A cluster-randomized, controlled trial
Short title	100 characters	State the topic of the study	Cigarette smoke exposure and innate immunity SODIS and childhood diarrhoea

Titles should be written in sentence case (only the first word of the text, proper nouns, and genus names are capitalized). Avoid specialist abbreviations if possible. For clinical trials, systematic reviews, or meta-analyses, the subtitle should include the study design.

Author list

Authorship	requirements
All authors must meet the criteria for authorship as outlined in the authorship policy . Those who contributed to the work but do not meet the criteria for authorship can be mentioned in the Acknowledgments. Read more about Acknowledgments .	
The corresponding author must provide an ORCID iD at the time of submission by entering it in the user profile in the submission system. Read more about ORCID .	
Author names and affiliations	

Enter author names on the title page of the manuscript and in the online submission system.

On the title page, write author names in the following order:

- First name (or initials, if used)
- Middle name (or initials, if used)
- Last name (surname, family name)

Each author on the list must have an affiliation. The affiliation includes department, university, or organizational affiliation and its location, including city, state/province (if applicable), and country. Authors have the option to include a current address in addition to the address of their affiliation at the time of the study. The current address

should be listed in the byline and clearly labeled “current address.” At a minimum, the address must include the author’s current institution, city, and country.

If an author has multiple affiliations, enter all affiliations on the title page only. In the submission system, enter only the preferred or primary affiliation. Author affiliations will be listed in the typeset PDF article in the same order that authors are listed in the submission.

Author names will be published exactly as they appear in the manuscript file. Please double-check the information carefully to make sure it is correct.

Corresponding author

The submitting author is automatically designated as the corresponding author in the submission system. The corresponding author is the primary contact for the journal office and the only author able to view or change the manuscript while it is under editorial consideration.

The corresponding author role may be transferred to another coauthor. However, note that transferring the corresponding author role also transfers access to the manuscript. (To designate a new corresponding author while the manuscript is still under consideration, watch the video tutorial below.)

Only one corresponding author can be designated in the submission system, but this does not restrict the number of corresponding authors that may be listed on the article in the event of publication. Whoever is designated as a corresponding author on the title page of the manuscript file will be listed as such upon publication. Include an email address for each corresponding author listed on the title page of the manuscript.

How to select a new corresponding author in Editorial Manager

Consortia and group authorship

If a manuscript is submitted on behalf of a consortium or group, include its name in the manuscript byline. Do not add it to the author list in the submission system. You may include the full list of members in the Acknowledgments or in a supporting information file.

PubMed only indexes individual consortium or group author members listed in the article byline. If included, these individuals must qualify for authorship according to our [criteria](#).

[Read the group authorship policy.](#)

Author contributions

Provide at minimum one contribution for each author in the submission system. Use the CRediT taxonomy to describe each contribution. [Read the policy and the full list of roles.](#)

Contributions will be published with the final article, and they should accurately reflect contributions to the work. The submitting author is responsible for completing this information at submission, and we expect that all authors will have reviewed, discussed, and agreed to their individual contributions ahead of this time.

PLOS ONE will contact all authors by email at submission to ensure that they are aware of the submission.

Cover letter

Upload a cover letter as a separate file in the online system. The length limit is 1 page.

The cover letter should include the following information:

- Summarize the study's contribution to the scientific literature
- Relate the study to previously published work
- Specify the type of article (for example, research article, systematic review, meta-analysis, clinical trial)
- Describe any prior interactions with PLOS regarding the submitted manuscript
- Suggest appropriate Academic Editors to handle your manuscript ([see the full list of Academic Editors](#))
- List any opposed reviewers

IMPORTANT: Do not include requests to reduce or waive publication fees in the cover letter. This information will be entered separately in the online submission system.

[Read about publication fee assistance.](#)

Title page

The title, authors, and affiliations should all be included on a title page as the first page of the manuscript file.



[Download our sample title, author list, and affiliations page \(PDF\)](#)

Abstract

The Abstract comes after the title page in the manuscript file. The abstract text is also entered in a separate field in the submission system.

The Abstract should:

- Describe the main objective(s) of the study
- Explain how the study was done, including any model organisms used, without methodological detail
- Summarize the most important results and their significance
- Not exceed 300 words

Abstracts should not include:

- Citations
- Abbreviations, if possible

Introduction

The introduction should:

- Provide background that puts the manuscript into context and allows readers outside the field to understand the purpose and significance of the study
- Define the problem addressed and why it is important
- Include a brief review of the key literature
- Note any relevant controversies or disagreements in the field
- Conclude with a brief statement of the overall aim of the work and a comment about whether that aim was achieved

Materials and Methods

The Materials and Methods section should provide enough detail to allow suitably skilled investigators to fully replicate your study. Specific information and/or protocols for new methods should be included in detail. If materials, methods, and protocols are well established, authors may cite articles where those protocols are described in detail, but the submission should include sufficient information to be understood independent of these references.

Protocol documents for clinical trials, observational studies, and other **non-laboratory** investigations may be uploaded as supporting information. We recommend depositing **laboratory protocols** at protocols.io. Read detailed [instructions for depositing and sharing your laboratory protocols](#).

Human or animal subjects and/or tissue or field sampling

Methods sections describing research using human or animal subjects and/or tissue or field sampling must include required ethics statements. For details, consult the [reporting guidelines for specific study types](#).

Data

PLOS journals require authors to make all data underlying the findings described in their manuscript fully available without restriction, with rare exception.

Large data sets, including raw data, may be deposited in an appropriate public repository. [See our list of recommended repositories.](#)

For smaller data sets and certain data types, authors may provide their data within [supporting information files](#) accompanying the manuscript. Authors should take care to maximize the accessibility and reusability of the data by selecting a file format from which data can be efficiently extracted (for example, spreadsheets or flat files should be provided rather than PDFs when providing tabulated data).

For more information on how best to provide data, read our [policy on data availability](#). PLOS does not accept references to “data not shown.”

Cell lines

Methods sections describing research using cell lines must state the origin of the cell lines used. See the [reporting guidelines for cell line research](#).

Laboratory Protocols

To enhance the reproducibility of your results, we recommend and encourage you to deposit laboratory protocols in [protocols.io](#), where protocols can be assigned their own persistent digital object identifiers (DOIs).

To include a link to a protocol in your article:

1. Describe your step-by-step protocol on protocols.io
2. Select **Get DOI** to issue your protocol a persistent digital object identifier (DOI)
3. Include the DOI link in the Methods section of your manuscript using the following format provided by protocols.io:
http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.[PROTOCOL DOI]

At this stage, your protocol is only visible to those with the link. This allows editors and reviewers to consult your protocol when evaluating the manuscript. You can make your protocols public at any time by selecting **Publish** on the protocols.io site. Any referenced protocol(s) will automatically be made public when your article is published.

New taxon names

Methods sections of manuscripts adding new zoological, botanical, or fungal taxon names to the literature must follow the [guidelines for new taxon names](#).

Results, Discussion, Conclusions

These sections may all be separate, or may be combined to create a mixed Results/Discussion section (commonly labeled “Results and Discussion”) or a mixed Discussion/Conclusions section (commonly labeled “Discussion”). These sections may be further divided into subsections, each with a concise subheading, as appropriate. These sections have no word limit, but the language should be clear and concise.

Together, these sections should describe the results of the experiments, the interpretation of these results, and the conclusions that can be drawn.

Authors should explain how the results relate to the hypothesis presented as the basis of the study and provide a succinct explanation of the implications of the findings, particularly in relation to previous related studies and potential future directions for research.

PLOS ONE editorial decisions do not rely on perceived significance or impact, so authors should avoid overstating their conclusions. See the [PLOS ONE Criteria for Publication](#) for more information.

Acknowledgments

Those who contributed to the work but do not meet our authorship criteria should be listed in the Acknowledgments with a description of the contribution.

Authors are responsible for ensuring that anyone named in the Acknowledgments agrees to be named.

PLOS journals publicly acknowledge the indispensable efforts of our editors and reviewers on an annual basis. To ensure equitable recognition and avoid any appearance of partiality, do not include editors or peer reviewers—named or unnamed—in the Acknowledgments.

Do not include funding sources in the Acknowledgments or anywhere else in the manuscript file. Funding information should only be entered in the financial disclosure section of the submission system.

References

Any and all available works can be cited in the reference list. Acceptable sources include:

- Published or accepted manuscripts
- Manuscripts on preprint servers, providing the manuscript has a citable DOI or arXiv URL.

Do not cite the following sources in the reference list:

- Unavailable and unpublished work, including manuscripts that have been submitted but not yet accepted (e.g., “unpublished work,” “data not shown”). Instead,

include those data as supplementary material or deposit the data in a publicly available database.

- Personal communications (these should be supported by a letter from the relevant authors but not included in the reference list)

References are listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text. In the text, cite the reference number in square brackets (e.g., “We used the techniques developed by our colleagues [19] to analyze the data”). PLOS uses the numbered citation (citation-sequence) method and first six authors, et al.

Do not include citations in abstracts.

Make sure the parts of the manuscript are in the correct order *before* ordering the citations.

Formatting references

Because all references will be linked electronically as much as possible to the papers they cite, proper formatting of the references is crucial.

PLOS uses the reference style outlined by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), also referred to as the “Vancouver” style. Example formats are listed below. Additional examples are in the [ICMJE sample references](#).

A reference management tool, EndNote, offers a current [style file](#) that can assist you with the formatting of your references. If you have problems with any reference management program, please contact the source company's technical support.

Journal name abbreviations should be those found in the [National Center for Biotechnology Information \(NCBI\) databases](#).

Source	Format
Published articles	Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, Su XL, Sun B, et al. cDNA, genomic sequence cloning and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpL9) of the giant panda (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>). Genet Mol Res. 2011;10: 1576-1588.
	Devaraju P, Gulati R, Antony PT, Mithun CB, Negi VS. Susceptibility to SLE in South Indian Tamils may be influenced by genetic selection pressure on TLR2 and TLR9 genes. Mol Immunol. 2014 Nov 22. pii: S0161-5890(14)00313-7. doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.005.
<i>Note: A DOI number for the full-text article is acceptable as an alternative to or in addition to traditional volume and page numbers. When providing a DOI, adhere to the format in the example above with both the label and full DOI included at the end of the reference (doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.005). Do not</i>	

Source	Format
	<i>provide a shortened DOI or the URL.</i>
Accepted, unpublished articles	Same as published articles, but substitute “Forthcoming” for page numbers or DOI.
Online articles	Huynen MMTE, Martens P, Hilderlink HBM. The health impacts of globalisation: a conceptual framework. <i>Global Health</i> . 2005;1: 14. Available from: http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14
Books	Bates B. <i>Bargaining for life: A social history of tuberculosis</i> . 1st ed. Philadelphia: University of Pennsylvania Press; 1992.
Book chapters	Hansen B. New York City epidemics and history for the public. In: Harden VA, Risse GB, editors. <i>AIDS and the historian</i> . Bethesda: National Institutes of Health; 1991. pp. 21-28.
Deposited articles (preprints, e-prints, or arXiv)	Krick T, Shub DA, Verstraete N, Ferreiro DU, Alonso LG, Shub M, et al. Amino acid metabolism conflicts with protein diversity; 1991. Preprint. Available from: arXiv:1403.3301v1. Cited 17 March 2014.
Published media (print or online newspapers and magazine articles)	Fountain H. For Already Vulnerable Penguins, Study Finds Climate Change Is Another Danger. <i>The New York Times</i> . 29 Jan 2014. Available from: http://www.nytimes.com/2014/01/30/science/earth/climate-change-taking-toll-on-penguins-study-finds.html Cited 17 March 2014.
New media (blogs, sites, or other written works)	Allen L. Announcing PLOS Blogs. 2010 Sep 1 [cited 17 March 2014]. In: PLOS Blogs [Internet]. San Francisco: PLOS 2006 - . [about 2 screens]. Available from: http://blogs.plos.org/plos/2010/09/announcing-plos-blogs/ .
Masters' theses or dissertations	Wells A. <i>Exploring the development of the independent, electronic, scholarly journal</i> . M.Sc. Thesis, The University of Sheffield. 1999. Available from: http://cumincad.scix.net/cgi-bin/works/Show?2e09
Databases and repositories (Figshare, arXiv)	Roberts SB. QPX Genome Browser Feature Tracks; 2013 [cited 2013 Oct 5]. Database: figshare [Internet]. Available from: http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214
Multimedia (videos, movies, or TV shows)	Hitchcock A, producer and director. <i>Rear Window</i> [Film]; 1954. Los Angeles: MGM.
Supporting Information	

Authors can submit essential supporting files and multimedia files along with their manuscripts. All supporting information will be subject to peer review. All file types can be submitted, but files must be smaller than 20 MB in size.

Authors may use almost any description as the item name for a supporting information file as long as it contains an “S” and number. For example, “S1 Appendix” and “S2 Appendix,” “S1 Table” and “S2 Table,” and so forth.

Supporting information files are published exactly as provided, and are not copyedited.

Supporting information captions

List supporting information captions at the end of the manuscript file. Do not submit captions in a separate file.

The file number and name are required in a caption, and we highly recommend including a one-line title as well. You may also include a legend in your caption, but it is not required.

Example caption

S1 Text. Title is strongly recommended. Legend is optional.

In-text citations

We recommend that you cite supporting information in the manuscript text, but this is not a requirement. If you cite supporting information in the text, citations do not need to be in numerical order.

Read the [supporting information guidelines](#) for more details about submitting supporting information and multimedia files.

Figures and Tables

Figures

Do not include figures in the main manuscript file. Each figure must be prepared and submitted as an individual file.

Cite figures in ascending numeric order at first appearance in the manuscript file.

[Read the guidelines for figures](#) and [requirements for reporting blot and gel results](#).

Figure captions

Figure captions must be inserted in the text of the manuscript, immediately following the paragraph in which the figure is first cited (read order). Do not include captions as part of the figure files themselves or submit them in a separate document.

At a minimum, include the following in your figure captions:

- A figure label with Arabic numerals, and “Figure” abbreviated to “Fig” (e.g. Fig 1, Fig 2, Fig 3, etc). Match the label of your figure with the name of the file uploaded at submission (e.g. a figure citation of “Fig 1” must refer to a figure file named “Fig1.tif”).

- A concise, descriptive title

The caption may also include a legend as needed.

[Read more about figure captions.](#)

Tables

Cite tables in ascending numeric order upon first appearance in the manuscript file.

Place each table in your manuscript file directly after the paragraph in which it is first cited (read order). Do not submit your tables in separate files.

Tables require a label (e.g., “Table 1”) and brief descriptive title to be placed above the table. Place legends, footnotes, and other text below the table.

[Read the guidelines for tables.](#)

Data reporting

All data and related metadata underlying the findings reported in a submitted manuscript should be deposited in an appropriate public repository, unless already provided as part of the submitted article.

See [here](#) for instructions on providing underlying data to support blot and gel results.

[Read our policy on data availability.](#)

Repositories may be either subject-specific (where these exist) and accept specific types of structured data, or generalist repositories that accept multiple data types. We recommend that authors select repositories appropriate to their field. Repositories may be subject-specific (e.g., GenBank for sequences and PDB for structures), general, or institutional, as long as DOIs or accession numbers are provided and the data are at least as open as CC BY. Authors are encouraged to select repositories that meet accepted criteria as trustworthy digital repositories, such as criteria of the Centre for Research Libraries or Data Seal of Approval. Large, international databases are more likely to persist than small, local ones.

[See our list of recommended repositories.](#)

To support data sharing and author compliance of the PLOS data policy, we have integrated our submission process with a select set of data repositories. The list is neither representative nor exhaustive of the suitable repositories available to authors. Current repository integration partners include [Dryad](#) and [FlowRepository](#). Please contact data@plos.org to make recommendations for further partnerships.

Instructions for PLOS submissions with data deposited in an integration partner repository:

- Deposit data in the integrated repository of choice.
- Once deposition is final and complete, the repository will provide you with a dataset DOI (provisional) and private URL for reviewers to gain access to the data.

- Enter the given data DOI into the full Data Availability Statement, which is requested in the Additional Information section of the PLOS submission form. Then provide the URL passcode in the Attach Files section.

If you have any questions, please [email us](#).

Accession numbers

All appropriate data sets, images, and information should be deposited in an appropriate public repository. [See our list of recommended repositories](#).

Accession numbers (and version numbers, if appropriate) should be provided in the Data Availability Statement. Accession numbers or a citation to the DOI should also be provided when the data set is mentioned within the manuscript.

In some cases authors may not be able to obtain accession numbers of DOIs until the manuscript is accepted; in these cases, the authors must provide these numbers at acceptance. In all other cases, these numbers must be provided at submission.

Identifiers

As much as possible, please provide accession numbers or identifiers for all entities such as genes, proteins, mutants, diseases, etc., for which there is an entry in a public database, for example:

- [Ensembl](#)
- [Entrez Gene](#)
- [FlyBase](#)
- [InterPro](#)
- [Mouse Genome Database \(MGD\)](#)
- [Online Mendelian Inheritance in Man \(OMIM\)](#)
- [PubChem](#)

Identifiers should be provided in parentheses after the entity on first use.

Striking image

You can choose to upload a “Striking Image” that we may use to represent your article online in places like the journal homepage or in search results.

The striking image must be derived from a figure or supporting information file from the submission, i.e., a cropped portion of an image or the entire image. Striking images should ideally be high resolution, eye-catching, single panel images, and should ideally avoid containing added details such as text, scale bars, and arrows.

If no striking image is uploaded, we will designate a figure from the submission as the striking image.

Striking images should not contain potentially identifying images of people. [Read our policy on identifying information.](#)

[The PLOS licenses and copyright policy](#) also applies to striking images.

Additional Information Requested at Submission

Financial Disclosure Statement

This information should describe sources of funding that have supported the work. It is important to gather these details prior to submission because your financial disclosure statement cannot be changed after initial submission without journal approval. If your manuscript is published, your statement will appear in the Funding section of the article.

Enter this statement in the Financial Disclosure section of the submission form. Do not include it in your manuscript file.

The statement should include:

- Specific grant numbers
- Initials of authors who received each award
- Full names of commercial companies that funded the study or authors
- Initials of authors who received salary or other funding from commercial companies
- URLs to sponsors' websites

Also state whether any sponsors or funders (other than the named authors) played any role in:

- Study design
- Data collection and analysis
- Decision to publish
- Preparation of the manuscript

If they had no role in the research, include this sentence: "The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript."

If the study was unfunded, include this sentence as the Financial Disclosure statement: "The author(s) received no specific funding for this work."

[Read our policy on disclosure of funding sources.](#)

Competing Interests

This information should not be in your manuscript file; you will provide it via our submission system.

All potential competing interests must be declared in full. If the submission is related to any patents, patent applications, or products in development or for market, these details, including patent numbers and titles, must be disclosed in full.

[Read our policy on competing interests.](#)

Manuscripts disputing published work

For manuscripts disputing previously published work, it is *PLOS ONE* policy to invite a signed review by the disputed author during the peer review process. This procedure is aimed at ensuring a thorough, transparent, and productive review process.

If the disputed author chooses to submit a review, it must be returned in a timely fashion and contain a full declaration of all competing interests. The Academic Editor will consider any such reviews in light of the competing interest.

Authors submitting manuscripts disputing previous work should explain the relationship between the manuscripts in their cover letter, and will be required to confirm that they accept the conditions of this review policy before the manuscript is considered further.

Related manuscripts

Upon submission, authors must confirm that the manuscript, or any related manuscript, is not currently under consideration or accepted elsewhere. If related work has been submitted to *PLOS ONE* or elsewhere, authors must include a copy with the submitted article. Reviewers will be asked to comment on the overlap between related submissions.

We strongly discourage the unnecessary division of related work into separate manuscripts, and we will not consider manuscripts that are divided into “parts.” Each submission to *PLOS ONE* must be written as an independent unit and should not rely on any work that has not already been accepted for publication. If related manuscripts are submitted to *PLOS ONE*, the authors may be advised to combine them into a single manuscript at the editor's discretion.

Read our policies on [related manuscripts](#).

Preprints

PLOS encourages authors to post preprints as a way to accelerate the dissemination of research and supports authors who wish to share their work early and receive feedback before formal peer review. Deposition of manuscripts with preprint servers does not impact consideration of the manuscript at any PLOS journal.

Authors posting on bioRxiv may concurrently submit directly to PLOS journals through [bioRxiv's direct transfer to journal service](#).

Authors submitting manuscripts in the life sciences to *PLOS ONE* may opt-in to post their work on bioRxiv during the *PLOS ONE* initial submission process.

[Read](#) [more](#) [about](#) [preprints](#).

[Learn how to post a preprint to bioRxiv during PLOS ONE initial submission](#).

Guidelines for Specific Study Types

Human subjects research

All research involving human participants must have been approved by the authors' Institutional Review Board (IRB) or by equivalent ethics committee(s), and must have been conducted according to the principles expressed in the [Declaration of Helsinki](#). Authors should be able to submit, upon request, a statement from the IRB or ethics committee indicating approval of the research. We reserve the right to reject work that we believe has not been conducted to a high ethical standard, even when formal approval has been obtained.

Subjects must have been properly instructed and have indicated that they consent to participate by signing the appropriate informed consent paperwork. Authors may be asked to submit a blank, sample copy of a subject consent form. If consent was verbal instead of written, or if consent could not be obtained, the authors must explain the reason in the manuscript, and the use of verbal consent or the lack of consent must have been approved by the IRB or ethics committee.

All efforts should be made to protect patient privacy and anonymity. Identifying information, including photos, should not be included in the manuscript unless the information is crucial and the individual has provided written consent by completing the [Consent Form for Publication in a PLOS Journal \(PDF\)](#). Download additional translations of the form from the [Downloads and Translations page](#). More information about patient privacy, anonymity, and informed consent can be found in the [International Committee of Medical Journal Editors \(ICMJE\) Privacy and Confidentiality guidelines](#).

Manuscripts should conform to the following reporting guidelines:

- Studies of diagnostic accuracy: [STARD](#)
- Observational studies: [STROBE](#)
- Microarray experiments: [MIAME](#)
- Other types of health-related research: Consult the [EQUATOR](#) web site for appropriate reporting guidelines

Methods sections of papers on research using human subjects or samples must include ethics statements that specify:

- **The name of the approving institutional review board or equivalent committee(s).** If approval was not obtained, the authors must provide a detailed statement explaining why it was not needed
- **Whether informed consent was written or oral.** If informed consent was oral, it must be stated in the manuscript:
 - Why written consent could not be obtained
 - That the Institutional Review Board (IRB) approved use of oral consent
 - How oral consent was documented

For studies involving humans categorized by race/ethnicity, age, disease/disabilities, religion, sex/gender, sexual orientation, or other socially constructed groupings, authors should:

- Explicitly describe their methods of categorizing human populations
- Define categories in as much detail as the study protocol allows
- Justify their choices of definitions and categories, including for example whether any rules of human categorization were required by their funding agency
- Explain whether (and if so, how) they controlled for confounding variables such as socioeconomic status, nutrition, environmental exposures, or similar factors in their analysis

In addition, outmoded terms and potentially stigmatizing labels should be changed to more current, acceptable terminology. Examples: “Caucasian” should be changed to “white” or “of [Western] European descent” (as appropriate); “cancer victims” should be changed to “patients with cancer.”

For papers that include identifying, or potentially identifying, information, authors must [download the Consent Form for Publication in a PLOS Journal](#), which the individual, parent, or guardian must sign once they have read the paper and been informed about the terms of PLOS open-access license. The signed consent form should not be submitted with the manuscript, but authors should securely file it in the individual's case notes and the methods section of the manuscript should explicitly state that consent authorization for publication is on file, using wording like:

The individual in this manuscript has given written informed consent (as outlined in PLOS consent form) to publish these case details.

For more information about *PLOS ONE* policies regarding human subjects research, see the [Publication Criteria](#) and [Editorial Policies](#).

Clinical trials

Clinical trials are subject to all [policies regarding human research](#). *PLOS ONE* follows the [World Health Organization's \(WHO\) definition of a clinical trial](#):

A clinical trial is any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes [...] Interventions include but are not restricted to drugs, cells and other biological products, surgical procedures, radiologic procedures, devices, behavioural treatments, process-of-care changes, preventive care, etc.

All clinical trials must be registered in one of the publicly-accessible registries approved by the [WHO](#) or [ICMJE](#) (International Committee of Medical Journal Editors). Authors must provide the trial registration number. Prior disclosure of results on a clinical trial registry site will not affect consideration for publication. We reserve the right to inform authors' institutions or ethics committees, and to reject the manuscript, if we become aware of unregistered trials.

PLOS ONE supports prospective trial registration (i.e. before participant recruitment has begun) as recommended by the ICMJE's [clinical trial registration policy](#). **Where trials were not publicly registered before participant recruitment began**, authors must:

- Register all related clinical trials and confirm they have done so in the Methods section
- Explain in the Methods the reason for failing to register before participant recruitment

Clinical trials must be reported according to the relevant reporting guidelines, i.e. [CONSORT](#) for randomized controlled trials, [TREND](#) for non-randomized trials, and [other specialized guidelines](#) as appropriate. The intervention should be described according to the requirements of the [TIDieR checklist and guide](#). Submissions must also include the study protocol as supporting information, which will be published with the manuscript if accepted.

Authors of manuscripts describing the results of clinical trials must adhere to the [CONSORT](#) reporting guidelines appropriate to their trial design, available on the [CONSORT Statement web site](#). Before the paper can enter peer review, authors must:

- Provide the registry name and number in the methods section of the manuscript
- Provide a copy of the trial protocol as approved by the ethics committee and a completed [CONSORT checklist](#) as supporting information (which will be published alongside the paper, if accepted). This should be named S1 CONSORT Checklist.
- Include the [CONSORT flow diagram](#) as the manuscript's "Fig 1"

Any deviation from the trial protocol must be explained in the paper. Authors must explicitly discuss informed consent in their paper, and we reserve the right to ask for a copy of the patient consent form.

The methods section must include the name of the registry, the registry number, and the URL of your trial in the registry database for each location in which the trial is registered.

Animal research

All research involving vertebrates or cephalopods must have approval from the authors' Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) or equivalent ethics committee(s), and must have been conducted according to applicable national and international guidelines. Approval must be received prior to beginning research.

Manuscripts reporting animal research must state in the Methods section:

- The full name of the relevant ethics committee that approved the work, and the associated permit number(s).
- Where ethical approval is not required, the manuscript should include a clear statement of this and the reason why. Provide any relevant regulations under which the study is exempt from the requirement for approval.
- Relevant details of steps taken to ameliorate animal suffering.

Example ethics statement

This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Minnesota (Protocol Number: 27-2956). All surgery was performed under sodium pentobarbital anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

Authors should always state the organism(s) studied in the Abstract. Where the study may be confused as pertaining to clinical research, authors should also state the animal model in the title.

To maximize reproducibility and potential for re-use of data, we encourage authors to follow the [Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments \(ARRIVE\) guidelines](#) for all submissions describing laboratory-based animal research and to upload a completed [ARRIVE Guidelines Checklist](#) to be published as supporting information.

Non-human primates

Manuscripts describing research involving non-human primates must report details of husbandry and animal welfare in accordance with the recommendations of the Weatherall report, [The use of non-human primates in research](#), including:

- Information about housing, feeding, and environmental enrichment.
- Steps taken to minimize suffering, including use of anesthesia and method of sacrifice, if appropriate.

Random source animals

Manuscripts describing studies that use random source (e.g. Class B dealer-sourced in the USA), shelter, or stray animals will be subject to additional scrutiny and may be rejected if sufficient ethical and scientific justification for the study design is lacking.

Unacceptable euthanasia methods and anesthetic agents

Manuscripts reporting use of a euthanasia method(s) classified as unacceptable by the [American Veterinary Medical Association](#) or use of an anesthesia method(s) that is widely prohibited (e.g., chloral hydrate, ether, chloroform) must include at the time of initial submission, scientific justification for use in the specific study design, as well as confirmation of approval for specific use from their animal research ethics committee. These manuscripts may be subject to additional ethics considerations prior to publication.

Humane endpoints

Manuscripts reporting studies in which death of a regulated animal (vertebrate, cephalopod) is a likely outcome or a planned experimental endpoint, must comprehensively report details of study design, rationale for the approach, and methodology, including consideration of humane endpoints. This applies to research that involves, for instance, assessment of survival, toxicity, longevity, terminal disease, or high rates of incidental mortality.

Definition of a humane endpoint

A humane endpoint is a predefined experimental endpoint at which animals are euthanized when they display early markers associated with death or poor prognosis of quality of life, or specific signs of severe suffering or distress. Humane endpoints are used as an alternative to allowing such conditions to continue or progress to death following the experimental intervention (“death as an endpoint”), or only euthanizing animals at the end of an experiment. Before a study begins, researchers define the practical observations or measurements that will be used during the study to recognize a humane endpoint, based on anticipated clinical, physiological, and behavioral signs. [Please see the NC3Rs guidelines for more information.](#) Additional discussion of humane endpoints can be found in this article: Nuno H. Franco, Margarida Correia-Neves, I. Anna S. Olsson (2012) How “Humane” Is Your Endpoint? — Refining the Science-Driven Approach for Termination of Animal Studies of Chronic Infection. PLoS Pathog 8(1): e1002399 doi.org/10.1371/journal.ppat.1002399.

Full details of humane endpoints use must be reported for a study to be reproducible and for the results to be accurately interpreted.

For studies in which death of an animal is an outcome or a planned experimental endpoint, authors should include the following information in the Methods section of the manuscript:

- The specific criteria (i.e. humane endpoints) used to determine when animals should be euthanized.

- The duration of the experiment.
- The numbers of animals used, euthanized, and found dead (if any); the cause of death for all animals.
- How frequently animal health and behavior were monitored.
- All animal welfare considerations taken, including efforts to minimize suffering and distress, use of analgesics or anaesthetics, or special housing conditions.

If humane endpoints were not used, the manuscript should report:

- A scientific justification for the study design, including the reasons why humane endpoints could not be used, and discussion of alternatives that were considered.
- Whether the institutional animal ethics committee specifically reviewed and approved the anticipated mortality in the study design.

Observational and field studies

Methods sections for submissions reporting on any type of field study must include ethics statements that specify:

- Permits and approvals obtained for the work, including the full name of the authority that approved the study; if none were required, authors should explain why
- Whether the land accessed is privately owned or protected
- Whether any protected species were sampled
- Full details of animal husbandry, experimentation, and care/welfare, where relevant

Paleontology and archaeology research

Manuscripts reporting paleontology and archaeology research must include descriptions of methods and specimens in sufficient detail to allow the work to be reproduced. Data sets supporting statistical and phylogenetic analyses should be provided, preferably in a format that allows easy re-use. [Read the policy.](#)

Specimen numbers and complete repository information, including museum name and geographic location, are required for publication. Locality information should be provided in the manuscript as legally allowable, or a statement should be included giving details of the availability of such information to qualified researchers.

If permits were required for any aspect of the work, details should be given of all permits that were obtained, including the full name of the issuing authority. This should be accompanied by the following statement:

All necessary permits were obtained for the described study, which complied with all relevant regulations.

If no permits were required, please include the following statement:

No permits were required for the described study, which complied with all relevant regulations.

Manuscripts describing paleontology and archaeology research are subject to the following policies:

- **Sharing of data and materials.** Any specimen that is erected as a new species, described, or figured must be deposited in an accessible, permanent repository (i.e., public museum or similar institution). If study conclusions depend on specimens that do not fit these criteria, the article will be rejected under *PLOS ONE*'s [data availability criterion](#).
- **Ethics.** *PLOS ONE* will not publish research on specimens that were obtained without necessary permission or were illegally exported.

Systematic reviews and meta-analyses

A systematic review paper, as defined by [The Cochrane Collaboration](#), is a review of a clearly formulated question that uses explicit, systematic methods to identify, select, and critically appraise relevant research, and to collect and analyze data from the studies that are included in the review. These reviews differ substantially from narrative-based reviews or synthesis articles. Statistical methods (meta-analysis) may or may not be used to analyze and summarize the results of the included studies.

Reports of systematic reviews and meta-analyses must include a completed [PRISMA \(Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses\)](#) checklist and flow diagram to accompany the main text. Blank templates are available here:

- Checklist: [PDF](#) or [Word document](#)
- Flow diagram: [PDF](#) or [Word document](#)

Authors must also state in their “Methods” section whether a protocol exists for their systematic review, and if so, provide a copy of the protocol as supporting information and provide the registry number in the abstract.

If your article is a systematic review or a meta-analysis you should:

- State this in your cover letter
- Select “Research Article” as your article type when submitting
- Include the PRISMA flow diagram as Fig 1 (required where applicable)
- Include the PRISMA checklist as supporting information

Meta-analysis of genetic association studies

Manuscripts reporting a meta-analysis of genetic association studies must report results of value to the field and should be reported according to the guidelines presented in [Systematic Reviews of Genetic Association Studies](#) by Sagoo *et al.*

On submission, authors will be asked to justify the rationale for the meta-analysis and how it contributes to the base of scientific knowledge in the light of previously published results. Authors will also be asked to complete a [checklist \(DOCX\)](#) outlining information about the justification for the study and the methodology employed. Meta-analyses that replicate published studies will be rejected if the authors do not provide adequate justification.

Personal data from third-party sources

For all studies using personal data from internet-based and other third-party sources (e.g., social media, blogs, other internet sources, mobile phone companies), data must be collected and used according to company/website Terms and Conditions, with appropriate permissions. All data sources must be acknowledged clearly in the [Materials and Methods section](#).

[Read our policy on data availability.](#)

In the Ethics Statement, authors should declare any potential risks to individuals or individual privacy, or affirm that in their assessment, the study posed no such risks. In addition, the following Ethics and Data Protection requirements must be met.

For interventional studies, which impact participants' experiences or data, the study design must have been prospectively approved by an Ethics Committee, and informed consent is required. The Ethics Committee may waive the requirement for approval and/or consent.

For observational studies in which personal experiences and accounts are not manipulated, consultation with an Ethics or Data Protection Committee is recommended. Additional requirements apply in the following circumstances:

- If information used could threaten personal privacy or damage the reputation of individuals whose data are used, an Ethics Committee should be consulted and informed consent obtained or specifically addressed.
- If authors accessed any personal identifying information, an Ethics or Data Protection Committee should oversee data anonymization. If data were anonymized and/or aggregated before access and analysis, informed consent is generally not required.

Note that Terms of Use contracts do not qualify as informed consent, even if they address the use of personal data for research.

[See our reporting guidelines for human subjects research.](#)

Cell lines

Authors reporting research using cell lines should state when and where they obtained the cells, giving the date and the name of the researcher, cell line repository, or commercial source (company) who provided the cells, as appropriate.

Authors must also include the following information for each cell line:

For *de novo* (new) cell lines, including those given to the researchers as a gift, authors must follow our policies for [human subjects research](#) or [animal research](#), as appropriate. The ethics statement must include:

- Details of institutional review board or ethics committee approval; AND
- For human cells, confirmation of written informed consent from the donor, guardian, or next of kin

For established cell lines, the Methods section should include:

- A reference to the published article that first described the cell line; AND/OR
- The cell line repository or company the cell line was obtained from, the catalogue number, and whether the cell line was obtained directly from the repository/company or from another laboratory

Authors should check established cell lines using the [ICLAC Database of Cross-contaminated or Misidentified Cell Lines](#) to confirm they are not misidentified or contaminated. Cell line authentication is recommended – e.g., by karyotyping, isozyme analysis, or short tandem repeats (STR) analysis – and may be required during peer review or after publication.

Blots and gels

Please review *PLOS ONE*'s requirements for [reporting blot and gel results and providing the underlying raw images](#).

Antibodies

Manuscripts reporting experiments using antibodies should include the following information:

- The name of each antibody, a description of whether it is monoclonal or polyclonal, and the host species.
- The commercial supplier or source laboratory.
- The catalogue or clone number and, if known, the batch number.
- The antigen(s) used to raise the antibody.
- For established antibodies, a stable public identifier from the [Antibody Registry](#).

The manuscript should also report the following experimental details:

- The final antibody concentration or dilution.
- A reference to the validation study if the antibody was previously validated. If not, provide details of how the authors validated the antibody for the applications and species used.

We encourage authors to consider adding information on new validations to a publicly available database such as [Antibodypedia](#) or [CiteAb](#).

Small and macromolecule crystal data

Manuscripts reporting new and unpublished three-dimensional structures must include sufficient supporting data and detailed descriptions of the methodologies used to allow the reproduction and validation of the structures. All novel structures must have been deposited in a community endorsed database prior to submission (please see our list of [recommended repositories](#)).

Small molecule single crystal data

Authors reporting X-Ray crystallographic structures of small organic, metal-organic, and inorganic molecules must deposit their data with the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC), the Inorganic Crystal Structure Database (ICSD), or similar community databases providing a recognized validation functionality. Authors are also required to include the relevant structure reference numbers within the main text (e.g. the CCDC ID number), as well as the crystallographic information files (.cif format) as Supplementary Information, along with the checkCIF validation reports that can be obtained via the International Union of Crystallography (IUCr).

Macromolecular structures

Authors reporting novel macromolecular structures must have deposited their data prior to submission with the Worldwide Protein Data Bank (wwPDB), the Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB), the Electron Microscopy Data Bank (EMDB), or other community databases providing a recognized validation functionality. Authors must include the structure reference numbers within the main text and submit as Supplementary Information the official validation reports from these databases.

Methods, software, databases, and tools

PLOS ONE will consider submissions that present new methods, software, databases, or tools as the primary focus of the manuscript if they meet the following criteria:

Utility

The tool must be of use to the community and must present a proven advantage over existing alternatives, where applicable. Recapitulation of existing methods, software, or databases is not useful and will not be considered for publication. Combining data and/or functionalities from other sources may be acceptable, but simpler instances (i.e. presenting a subset of an already existing database) may not be considered. For software, databases, and online tools, the long-term utility should also be discussed, as relevant. This discussion may include maintenance, the potential for future growth, and the stability of the hosting, as applicable.

Validation

Submissions presenting methods, software, databases, or tools must demonstrate

that the new tool achieves its intended purpose. If similar options already exist, the submitted manuscript must demonstrate that the new tool is an improvement over existing options in some way. This requirement may be met by including a proof-of-principle experiment or analysis; if this is not possible, a discussion of the possible applications and some preliminary analysis may be sufficient.

Availability

If the manuscript's primary purpose is the description of new software or a new software package, this software must be open source, deposited in an appropriate archive, and conform to the [Open Source Definition](#). If the manuscript mainly describes a database, this database must be open-access and hosted somewhere publicly accessible, and any software used to generate a database should also be open source. If relevant, databases should be open for appropriate deposition of additional data. Dependency on commercial software such as Mathematica and MATLAB does not preclude a paper from consideration, although complete open source solutions are preferred. In these cases, authors should provide a direct link to the deposited software or the database hosting site from within the paper. If the primary focus of a manuscript is the presentation of a new tool, such as a newly developed or modified questionnaire or scale, it should be openly available under a license no more restrictive than CC BY.

Software submissions

Manuscripts whose primary purpose is the description of new software must provide full details of the algorithms designed. Describe any dependencies on commercial products or operating system. Include details of the supplied test data and explain how to install and run the software. A brief description of enhancements made in the major releases of the software may also be given. Authors should provide a direct link to the deposited software from within the paper.

Database submissions

For descriptions of databases, provide details about how the data were curated, as well as plans for long-term database maintenance, growth, and stability. Authors should provide a direct link to the database hosting site from within the paper.

[Read the PLOS policy on sharing materials and software.](#)

New taxon names

Zoological names

When publishing papers that describe a new zoological taxon name, PLOS aims to comply with the requirements of the [International Commission on Zoological Nomenclature \(ICZN\)](#). Effective 1 January 2012, the ICZN considers an online-only publication to be legitimate if it meets the criteria of archiving and is registered in ZooBank, the ICZN's official registry.

For proper registration of a new zoological taxon, we require two specific statements to be included in your manuscript.

In the **Results** section, the globally unique identifier (GUID), currently in the form of a Life Science Identifier (LSID), should be listed under the new species name, for example:

***Anochetus boltoni* Fisher sp. nov.** urn:lsid:zoobank.org:act:B6C072CF-1CA6-40C7-8396-534E91EF7FBB

You will need to contact [Zoobank](#) to obtain a GUID (LSID). Please do this as early as possible to avoid delay of publication upon acceptance of your manuscript. It is your responsibility to provide us with this information so we can include it in the final published paper.

Please also insert the following text into the **Methods** section, in a sub-section to be called “Nomenclatural Acts”:

The electronic edition of this article conforms to the requirements of the amended International Code of Zoological Nomenclature, and hence the new names contained herein are available under that Code from the electronic edition of this article. This published work and the nomenclatural acts it contains have been registered in ZooBank, the online registration system for the ICZN. The ZooBank LSIDs (Life Science Identifiers) can be resolved and the associated information viewed through any standard web browser by appending the LSID to the prefix “http://zoobank.org/”. The LSID for this publication is: urn:lsid:zoobank.org:pub: XXXXXXXX. The electronic edition of this work was published in a journal with an ISSN, and has been archived and is available from the following digital repositories: PubMed Central, LOCKSS [author to insert any additional repositories].

All PLOS articles are deposited in [PubMed Central](#) and [LOCKSS](#). If your institute, or those of your co-authors, has its own repository, we recommend that you also deposit the published online article there and include the name in your article.

Botanical names

When publishing papers that describe a new botanical taxon, PLOS aims to comply with the requirements of the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (ICN). The following guidelines for publication in an online-only journal have been agreed such that any scientific botanical name published by us is considered effectively published under the rules of the Code. Please note that these guidelines differ from those for zoological nomenclature, and apply only to seed plants, ferns, and lycophytes.

Effective January 2012, the description or diagnosis of a new taxon can be in either Latin or English. This does not affect the requirements for scientific names, which are still to be Latin.

Also effective January 2012, the electronic PDF represents a published work according to the ICN for algae, fungi, and plants. Therefore the new names contained in the electronic publication of PLOS article are effectively published under that Code from the electronic edition alone, so there is no longer any need to provide printed copies.

Additional information describing recent changes to the Code can be found [here](#).

For proper registration of the new taxon, we require two specific statements to be included in your manuscript.

In the **Results** section, the globally unique identifier (GUID), currently in the form of a Life Science Identifier (LSID), should be listed under the new species name, for example:

Solanum aspersum S.Knapp, sp. nov. [urn:lsid:ipni.org:names:77103633-1] Type: Colombia. Putumayo: vertiente oriental de la Cordillera, entre Sachamates y San Francisco de Sibundoy, 1600-1750 m, 30 Dec 1940, J. Cuatrecasas 11471 (holotype, COL; isotypes, F [F-1335119], US [US-1799731]).

Journal staff will contact IPNI to obtain the GUID (LSID) after your manuscript is accepted for publication, and this information will then be added to the manuscript during the production phase

In the **Methods** section, include a sub-section called “Nomenclature” using the following wording:

The electronic version of this article in Portable Document Format (PDF) in a work with an ISSN or ISBN will represent a published work according to the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants, and hence the new names contained in the electronic publication of a PLOS article are effectively published under that Code from the electronic edition alone, so there is no longer any need to provide printed copies.

In addition, new names contained in this work have been submitted to IPNI, from where they will be made available to the Global Names Index. The IPNI LSIDs can be resolved and the associated information viewed through any standard web browser by appending the LSID contained in this publication to the prefix <http://ipni.org/>. The online version of this work is archived and available from the following digital repositories: [INSERT NAMES OF DIGITAL REPOSITORIES WHERE ACCEPTED MANUSCRIPT WILL BE SUBMITTED (PubMed Central, LOCKSS etc)].

All PLOS articles are deposited in [PubMed Central](#) and [LOCKSS](#). If your institute, or those of your co-authors, has its own repository, we recommend that you also deposit the published online article there and include the name in your article.

Fungal names

When publishing papers that describe a new botanical taxon, PLOS aims to comply with the requirements of the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (ICN). The following guidelines for publication in an online-only journal have been agreed such that any scientific botanical name published by us is considered effectively published under the rules of the Code. Please note that these guidelines differ from those for zoological nomenclature.

Effective January 2012, the description or diagnosis of a new taxon can be in either Latin or English. This does not affect the requirements for scientific names, which are still to be Latin.

Also effective January 2012, the electronic PDF represents a published work according to the ICN for algae, fungi, and plants. Therefore the new names contained in the electronic publication of PLOS article are effectively published under that Code from the electronic edition alone, so there is no longer any need to provide printed copies.

Additional information describing recent changes to the Code can be found [here](#).

For proper registration of the new taxon, we require two specific statements to be included in your manuscript.

In the **Results** section, the globally unique identifier (GUID), currently in the form of a Life Science Identifier (LSID), should be listed under the new species name, for example:

Hymenogaster huthii. Stielow et al. 2010, sp. nov.
[urn:lsid:indexfungorum.org:names:518624]

You will need to contact either [Mycobank](#) or [Index Fungorum](#) to obtain the GUID (LSID). Please do this as early as possible to avoid delay of publication upon acceptance of your manuscript. It is your responsibility to provide us with this information so we can include it in the final published paper. Effective January 2013, all papers describing new fungal species must reference the identifier issued by a recognized repository in the protologue in order to be considered effectively published.

In the **Methods** section, include a sub-section called “Nomenclature” using the following wording (this example is for taxon names submitted to MycoBank; please substitute appropriately if you have submitted to Index Fungorum):

The electronic version of this article in Portable Document Format (PDF) in a work with an ISSN or ISBN will represent a published work according to the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants, and hence the new names contained in the electronic publication of a PLOS article are effectively published under that Code from the electronic edition alone, so there is no longer any need to provide printed copies.

In addition, new names contained in this work have been submitted to MycoBank from where they will be made available to the Global Names Index. The unique MycoBank number can be resolved and the associated information viewed through any standard web browser by appending the MycoBank number contained in this publication to the prefix <http://www.mycobank.org/MB/>. The online version of this work is archived and available from the following digital repositories: [INSERT NAMES OF DIGITAL REPOSITORIES WHERE ACCEPTED MANUSCRIPT WILL BE SUBMITTED (PubMed Central, LOCKSS etc)].

All PLOS articles are deposited in [PubMed Central](#) and [LOCKSS](#). If your institute, or those of your co-authors, has its own repository, we recommend that you also deposit the published online article there and include the name in your article.

Qualitative research

Qualitative research studies use non-quantitative methods to address a defined research question that may not be accessible by quantitative methods, such as people's interpretations, experiences, and perspectives. The analysis methods are explicit, systematic, and reproducible, but the results do not involve numerical values or use statistics. Examples of qualitative data sources include, but are not limited to, interviews, text documents, audio/video recordings, and free-form answers to questionnaires and surveys.

Qualitative research studies should be reported in accordance to the [Consolidated criteria for reporting qualitative research \(COREQ\) checklist](#). Further reporting guidelines can be found in the Equator Network's [Guidelines for reporting qualitative research](#).