

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE DO NASCIMENTO FERREIRA

ANÁLISE FILOGENÉTICA, DESENHO E AVALIAÇÃO *IN SILICO*
DE *PRIMERS* PARA DETECÇÃO DE *CYCLOVIRUS*

PALOTINA

2022

CAROLINE DO NASCIMENTO FERREIRA

ANÁLISE FILOGENÉTICA, DESENHO E AVALIAÇÃO *IN SILICO*
DE *PRIMERS* PARA DETECÇÃO DE *CYCLOVIRUS*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Engenharia de Bioprocessos e
Biotecnologia da Universidade Federal do
Paraná como requisito à obtenção do título de
Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e
Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Elisabete Takiuchi
Coorientador: Prof. Dr. Marco Antônio Bacellar
Barreiros

PALOTINA

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ATA DE REUNIÃO

Aos vinte e nove dias do mês de abril do ano de dois mil e vinte e dois, às dezesseis horas, na Sala 12 do Bloco Didático III, Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, realizou-se a Defesa Pública e Oral do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Análise filogenética, desenho e avaliação *in silico* de primers para detecção de *Cyclovirus*" apresentado pela discente Caroline do Nascimento Ferreira, orientada pela Profa. Dra. Elisabete Takiuchi, como um dos requisitos obrigatórios para conclusão do curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Iniciados os trabalhos, a orientadora e Presidente da Banca concedeu a palavra à discente, para exposição do seu trabalho. A seguir, foi concedida a palavra em ordem sucessiva aos membros da Banca de Exame, os quais passaram a arguir a discente. Ultimada a defesa, que se desenvolveu nos termos normativos, a Banca de Exame, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído à discente as seguintes notas: Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado, nota: 100 (cem), Profa. Dra. Luciana Grange, nota: 100 (cem), e Profa. Dra. Elisabete Takiuchi, nota: 100 (cem). A nota final da discente, após a média aritmética dos três membros da banca de exame, foi 100 (cem). As considerações e sugestões feitas pela Banca de Exame deverão ser atendidas pela discente sob acompanhamento de sua orientadora. Nada mais havendo a tratar foi lavrada a presente ata, que, lida e aprovada, vai por todos assinada eletronicamente.



Documento assinado eletronicamente por **ELISABETE TAKIUCHI, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 30/04/2022, às 09:26, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **LUCIANA GRANGE, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 30/04/2022, às 10:04, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **ADRIANA FIORINI ROSADO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 30/04/2022, às 10:17, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **4465845** e o código CRC **B503E74B**.

*À minha mãe, Adélia, e ao meu pai, José,
pelo cuidado dedicado a mim durante toda a minha existência e
por todo o apoio e incentivo, especialmente nos momentos de angústia*

AGRADECIMENTOS

À orientadora Dra. Elisabete Takiuchi, por todos os ensinamentos, conversas, correções e incentivos, pelos cafés e bolos de cenoura, pelo profundo acolhimento e por me apresentar a virologia, bem como por aceitar orientar este e outros trabalhos; ao coorientador Dr. Marco Antônio Bacellar Barreiros, pela referência profissional, por me apresentar a bioinformática, pela paciência, por todas as suas orientações e por aceitar contribuir com este trabalho;

À Ma. Jéssica Gallego, pelo acolhimento, pelas recomendações, pela disponibilidade em esclarecer, explicar e ajudar, e por aceitar participar da Banca Examinadora desse trabalho; às Dras. Adriana Fiorini Rosado e Luciana Grange, pela profunda contribuição à formação acadêmica e profissional, por aceitarem o convite e por todas as suas correções e considerações;

Ao meu pai, José Domingos Lopes Ferreira, por todos os conselhos e incentivos, pelas caronas, por toda a compreensão e por todos os jogos do Corinthians e corridas de Fórmula 1 que assistiu comigo quando eu precisava descansar; à minha mãe, Adélia Martins do Nascimento, por toda a preocupação e zelo, pelos chazinhos e cafezinhos, pela parceria e compreensão, por todas as novelas que assistimos juntas e chamadas de vídeo que fizemos para desabafar;

À Laura Sisti, pela amizade, pelo incentivo, por todas as discussões profundas sobre os problemas do mundo e conversas bobas sobre séries ruins, por suportar todas as minhas reclamações e por confiar em mim para compartilhar as suas; à Ma. Daniela Lorencena, pelo acolhimento acadêmico e pessoal, pela paciência, pelo incentivo e por ter me ensinado tanto e confiado em mim quando eu duvidava; à Nathalia Scherpinski, ao Igor Mattiuzzi, ao Renan Borges, à Fernanda Neukamp, à Bianca Backes, ao Gabriel Luca e à Bruna Irmem pela amizade e por toda a ajuda durante o desenvolvimento do curso;

Ao Patrick Knabben, pela amizade, pelos projetos e parceria no laboratório e à equipe do Laboratório de Virologia Animal, do LABIOTEC e do Bloco X; aos professores do curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, pela formação e pela referência profissional, e em especial à Dra. Vânia Desoti, à Dra. Ivonete Bautitz, ao Dr. Luis Fernando Gomes, ao Me. Pedro Gusmão e ao Dr. Jamal Awadallak, pelas orientações; aos funcionários do Setor Palotina; à Universidade Federal do Paraná, pela estrutura que me proporcionou intenso crescimento acadêmico, profissional e pessoal;

E a todos aqueles com quem convivi ao longo dos quase seis anos de graduação e que impactaram minhas formações acadêmica e humana de alguma maneira, muito obrigada.

*Em minha opinião, o que é necessário para ter fé é a crença
de que fazendo o melhor possível chegaremos mais próximo
do sucesso e de que vale a pena buscar o sucesso em nossos
objetivos (o melhoramento, presente e futuro, da humanidade)*

- Rosalind Elsie Franklin

RESUMO

Os cyclovírus são um grupo de vírus com genoma de DNA fita simples circular de organização ambisenso descobertos em 2010 e desde então detectados em diferentes tipos de amostras de aves, mamíferos, insetos, aracnídeos e peixes dos seis continentes. No entanto, apesar da ampla gama de hospedeiros, os aspectos epidemiológicos e patogênicos da infecção viral permanecem pouco esclarecidos. Este trabalho foi realizado com o objetivo principal de desenhar e avaliar *in silico* conjunto(s) de *primers* para a detecção molecular, através de reação em cadeia da polimerase (PCR), de cyclovírus associados às aves, de maneira a ampliar as opções de detecção e contribuir com o esclarecimento da biologia dos cyclovírus. As 27 sequências de genoma completo de cyclovírus associadas a aves disponíveis em banco de dados foram submetidas à análise filogenética com *Maximum Likelihood* como método de inferência e o *Generalized Time-Reversible* (GTR) como modelo evolucionário de substituição, utilizando 1000 réplicas de *bootstrap* como medida de confiança. Não se observou padrão de clados formados por hospedeiro, tipo de amostra, ano ou localização geográfica de coleta, mas sim um agrupamento irregular das sequências associadas, distribuído por todos os clados da árvore. Com a alta variabilidade genômica entre as sequências, foi selecionado, em função do percentual de identidade e da topografia filogenética, determinado conjunto de sequências para ser usado como *template* para o desenho e a avaliação *in silico* dos *primers*, realizados através do software *Primer Blast*. 15 pares de *primers* desenhados através da plataforma foram então avaliados *in silico* em função da região de anelamento, tamanho do *amplicon*, auto-complementaridade, auto-complementaridade na extremidade 3', porcentagem de GC, bases próximas à extremidade 3', temperatura de *melting*, e repetições de nucleotídeos de mesma base e o par CATCCCACCACTTGCCTCTC e TGGAGTCGTCAAACCCAGAG foi avaliado como o mais adequado.

Palavras-chave: Sequências. Filogenia. *Circoviridae*.

ABSTRACT

Cycloviruses are a group of viruses with circular single-stranded DNA genome of ambisense organization, discovered in 2010 and since detected in different samples of birds, mammals, insects, arachnids and fish from all six continents. Despite the wide range of hosts, the epidemiological and pathogenic aspects of their viral infection remain unclear. This work was carried out with the main objective of designing and *in silico* evaluating primer set(s) for the molecular detection of birds associated cycloviruses by conventional polymerase chain reaction (PCR), in order to expand molecular detection options and to contribute to with the enlightening of cycloviruses' biology. The 27 complete genome sequences of birds associated cycloviruses available were subjected to phylogenetic analysis with Maximum Likelihood as the inference method and the Generalized Time-Reversible (GTR) as the evolutionary model, using 1000 bootstraps as a reliability measure. No pattern formed by host, type of sample, year or geographic location of sample collection was observed, but instead, an irregular grouping of associated sequences distributed across all clades of the tree. Due to the high genomic variability between the sequences, and based on the percentage of identity and phylogenetic topography, a set of sequences was selected to be used as a template for the design and in silico evaluation of primers, which were performed using the Primer Blast software. 15 primer pairs designed were evaluated in silico as a function of annealing region, amplicon size, self-complementarity, self-complementarity at the 3' end, GC percentage, bases composing the 3' end, melting temperature, and same-base nucleotide repeats. The pair with CATCCCACCACTTGCCTCTC and TGGAGTCGTCAAACCCAGAG primers was evaluated as the most suitable.

Keywords: Sequences. Phylogeny. *Circoviridae*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENOMA DA ESPÉCIE Human Associated Cyclovirus 8 (HuACyV8). O GENOMA DNA FITA SIMPLES CIRCULAR DE ORGANIZAÇÃO AMBISENÇO CODIFICA DUAS PROTEÍNAS: A DE REPLICAÇÃO (Rep) E A DO CAPSÍDEO (Cp). AS DUAS ORFs SÃO SEPARADAS POR UMA REGIÃO INTERGÊNICA E A rep POSSUI UM ÍNTRON. 18
- FIGURA 2 - PCR INVERSA: OS PRIMERS SÃO DESENHADOS PARA SE ANELAREM-SE ÀS EXTREMIDADES DA REGIÃO CONHECIDA. A PCR ENTÃO AMPLIFICA O DNA DESCONHECIDO E O AMPLICON POSSUI PEQUENOS SEGMENTOS DE SEQUÊNCIA CONHECIDA NAS EXTREMIDADES. 20
- FIGURA 3 - CYCLOVÍRUS ASSOCIADOS A AVES: PAÍSES DE ORIGEM DAS AMOSTRAS 33
- FIGURA 4 - ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS SEQUÊNCIAS COMPLETAS DE CYCLOVÍRUS: ÁRVORE RECONSTRUÍDA ATRAVÉS DO MÓDULO IQ-TREE NO PHYLOSUITE, UTILIZANDO MAXIMUM LIKELIHOOD COMO MÉTODO DE INFERÊNCIA E 1000 RÉPLICAS DE BOOTSTRAP COMO MEDIDA DE CONFIANÇA. COMO OUTGROUP, FORAM INCLUÍDAS SEQUÊNCIAS DE CIRCOVÍRUS TAMBÉM ASSOCIADAS A AVES APÓS REVERSO COMPLEMENTO..... 35
- FIGURA 5 – COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQUÊNCIAS SUBMETIDAS COMO TEMPLATE PARA DESENHO DOS PRIMERS (GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA DE REPLICAÇÃO). BARRAS VERTICAIS REPRESENTAM AS MUTAÇÕES/INSERÇÕES/DELEÇÕES..... 37

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO GÊNERO Cyclovirus	17
QUADRO 2 – MÉTODOS DE DETECÇÃO MOLECULAR DE CYCLOVÍRUS ASSOCIADOS A AVES RELATADOS NA LITERATURA	21
QUADRO 3 – ALGUNS DOS PRINCIPAIS BANCOS DE DADOS DE BIOLOGIA MOLECULAR ASSOCIADOS AO ESTUDO DOS VÍRUS.....	23
QUADRO 4 - MÉTODOS DE ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS E RESPECTIVOS PROGRAMAS	24
QUADRO 5 – ANÁLISE FILOGENÉTICA: MÉTODOS DE RECONSTRUÇÃO E DE INFERÊNCIA	25
QUADRO 6 - INFORMAÇÕES OBTIDAS DE CADA SEQUÊNCIA DISPONIBILIZADAS PELA PLATAFORMA NCBI Virus.....	30
QUADRO 7 – PARÂMETROS DE BUSCA DO PRIMER-BLAST.....	32
QUADRO 8 – CYCLOVÍRUS ASSOCIADOS A AVES: HOSPEDEIROS E TIPO DE SEQUÊNCIAS	33
QUADRO 9 – SEQUÊNCIAS 5’->3’ E CARACTERÍSTICAS DOS PARES DE PRIMERS AVALIADOS.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

AIC - Critério de Informação de Akaike

AICc - Critério de Informação de Akaike corrigido

AFLP – Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

BLAST – Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico (*Basic Local Alignment Search Tool*)

cDNA – DNA complementar

Cp – proteína do capsídeo

CRESS – circular de fita simples codificador de proteína Rep (*Circular rep-encoding single stranded genome*)

DDBJ - Banco de Dados de DNA do Japão (*DNA Data Bank of Japan*)

DNA – ácido desoxirribonucleico

EMBL – Laboratório Europeu de Biologia Molecular (*European Molecular Biology Laboratory*)

ENA – Arquivo Europeu de Nucleotídeos (*European Nucleotide Archive*)

GTR – Modelo Geral Reversível no Tempo (*Generalized Time-Reversible*)

HUH – proteína com sequência HUH (histidina-aminoácido hidrofóbico-histidina)

ICTV - Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*)

INSDC – Colaboração Internacional de Banco de Dados de Sequências de Nucleotídeos (*International Nucleotide Sequence Database Collaboration*)

K-L - distância de Kullback-Laiber

MAFFT – Alinhamento múltiplo usando Transformada Rápida de Fourier (*Multiple Alignment using Fast Fourier Transform*)

ML – máxima verossimilhança (*maximum likelihood*)

NCBI – Centro Nacional de Informação Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*)

nM – nanomolar

ORFs – fases de leitura aberta (*open reading frames*)

PCR – reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

pH – potencial hidrogeniônico

RCA – amplificação em círculo rolante (*rolling circle amplification*)

RCR – replicação em círculo rolante (*rolling circle replication*)

RefSeq – sequência de referência

Pep – proteína iniciadora de replicação

SNPs – polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms*)

ssDNA – DNA de fita simples

Ta – temperatura de anelamento

Tm – temperatura de *melting*

VIDISCA - *virus discovery* cDNA-AFLP

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1 CYCLOVÍRUS.....	17
3.1.1 <i>Cyclovírus associados a aves</i>	20
3.2 FILOGENIA	21
3.2.1 <i>Sequências genômicas</i>	22
3.2.1.1 NCBI Virus.....	22
3.2.2 <i>Alinhamento</i>	23
3.2.2.1 MAFFT	24
3.2.3 <i>Análise filogenética</i>	24
3.2.3.1 Modelos de substituição	24
3.2.3.2 Métodos de reconstrução filogenética	25
3.2.3.3 Máxima verossimilhança ou <i>maximum likelihood</i> (ML).....	25
3.3 DESENHO E AVALIAÇÃO <i>IN SILICO</i> DE <i>PRIMERS</i>	26
3.3.1 <i>Primers e softwares de desenho e avaliação</i>	26
3.3.2 <i>Critérios para avaliação in silico dos primers</i>	27
3.3.2.1 Especificidade.....	27
3.3.2.2 Eficiência	28
3.3.2.3 Temperatura de <i>melting</i>	28
3.3.2.4 Porcentagem de GC	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 SEQUÊNCIAS	30

4.2 ALINHAMENTO, IDENTIDADE E ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	31
4.3 DESENHO E ANÁLISE DOS <i>PRIMERS</i>	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 SEQUÊNCIAS, IDENTIDADE E ANÁLISE FILOGENÉTICA	33
5.2 DESENHO E AVALIAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i>	36
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
REFERÊNCIAS	41
ANEXO 1 – ESPÉCIES DE CYCLOVÍRUS RECONHECIDAS PELO ICTV E SEUS ISOLADOS REPRESENTATIVOS	49
ANEXO 2 – SEQUÊNCIAS DE CYCLOVÍRUS ASSOCIADOS A AVES.....	50

1 INTRODUÇÃO

Os cyclovírus são vírus de genoma DNA fita simples circular de organização ambisenso com aproximadamente 1800 nt descritos pela primeira vez em 2010 (GAINOR et al., 2021a). Desde então, foram identificados nos seis continentes – África, Antártica, América, Ásia, Europa e Oceania – em diferentes tipos de amostras de aves, mamíferos, insetos, aracnídeos e peixes, embora seus hospedeiros definitivos e seus possíveis efeitos patogênicos ainda não estejam estabelecidos (ROSARIO et al., 2017). Em aves, já foram detectados associados a quadros de proventriculite (YAN et al., 2020).

A detecção molecular dos cyclovírus associados a aves tem sido realizada através de PCR convencional com *primers* degenerados genéricos para a família *Circoviridae*, *virus discovery* cDNA-AFLP (VIDISCA), amplificação randômica, amplificação por círculo rolante (RCA) ou análises de metagenômica. Embora os cyclovírus associados a aves possuam genomas bastante diversos, não sendo facilmente agrupáveis ou classificáveis a partir do animal hospedeiro ou tecido de origem da amostra, ampliar as opções de técnicas moleculares para sua detecção é importante para que sua epidemiologia, sua biologia, sua patogenia e suas características sejam melhor conhecidas (ROSARIO et al., 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenhar e avaliar *in silico* conjunto(s) de *primers* para a detecção molecular de cyclovírus associados às aves pela reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Explorar a literatura disponível sobre os cyclovírus;

Explorar ferramentas de bioinformática relacionadas a disponibilização de sequências, análises filogenéticas, e desenho e análise de *primers*;

Explorar os principais elementos que influenciam na qualidade de *primers*;

Comparar e analisar filogeneticamente sequências genômicas de cyclovírus;

Desenhar pares de *primers* e avaliar *in silico* suas características.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CYCLOVÍRUS

Em 2010, um grupo de vírus relacionado aos circovírus foram detectados por Li e colaboradores em amostras de produtos de origem animal e fezes de humanos e chimpanzés. Os autores propuseram a nomenclatura *Cyclovirus*, gênero estabelecido definitivamente pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) em 2016 e pertencente à família *Circoviridae* (ADAMS et al., 2016) (Quadro 1).

QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO GÊNERO *Cyclovirus*

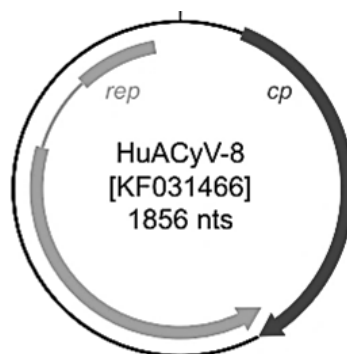
Classificação taxonômica		Características
Domínio	<i>Monodnaviria</i>	Genoma de DNA fita simples (ssDNA) que codifica endonuclease de replicação em círculo rolante (RCR) da superfamília HUH
Reino	<i>Shotokuvirae</i>	Proteína Rep característica com domínio endonuclease N-terminal e domínio helicase da superfamília 3 C-terminal
Filo	<i>Cressnaviricota</i>	Genoma circular ssDNA codificador de proteína Rep
Classe	<i>Arfiviricetes</i>	“Arginine finger” conservado no domínio helicase da proteína Rep
Ordem	<i>Cirlivirales</i>	Vírus “circo-like” – simetria do capsídeo, tamanho e arquitetura do genoma
Família	<i>Circoviridae</i>	Vírus de eucariotos e associados a animais e genoma pequeno
Gênero	<i>Cyclovirus</i>	Região intergênica entre as extremidades 5’ das duas ORFs e íntron no gene que codifica a proteína Rep

FONTE: Adaptado de WALKER et al. (2020)

Os vírus pertencentes ao gênero *Cyclovirus* possuem genoma de ácido desoxirribonucleico (DNA) de fita simples circular de organização ambisenso (transcrições em direções opostas) com aproximadamente 1800 nucleotídeos (nt) (GAINOR et al., 2021a), que codifica uma proteína do capsídeo (Cp) e uma proteína iniciadora de replicação (Pep) (LIU et al., 2020) e possui uma região intergênica entre as extremidades 5’ das duas fases de leitura aberta (ORFs) (DAYARAM et al., 2013), bem como um íntron no gene que codifica a Pep (WALKER et al., 2020) (Figura 1).

Os cyclovírus fazem parte dos vírus comumente denominados “CRESS-DNA” - vírus com genoma DNA “circular de fita simples codificador de proteína Rep” - do inglês, *circular rep-encoding single stranded genome* (CRESS) (LIU et al., 2020). A Rep, considerada a proteína mais conservada, é codificada pela ORF1 e atua ligando um *hairpin* específico à sequência conservada 5'-AGTATTAC-3' na região intergênica do genoma (origem de replicação), iniciando a replicação por círculo rolante (RCR) (GAINOR et al., 2021a).

FIGURA 1 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENOMA DA ESPÉCIE *Human Associated Cyclovirus 8* (HuACyV8). O GENOMA DNA FITA SIMPLES CIRCULAR DE ORGANIZAÇÃO AMBISENTO CODIFICA DUAS PROTEÍNAS: A DE REPLICAÇÃO (Rep) E A DO CAPSÍDEO (Cp). AS DUAS ORFs SÃO SEPARADAS POR UMA REGIÃO INTERGÊNICA E A rep POSSUI UM ÍNTRON.



FONTE: Adaptado de ROSARIO et al. (2017)

Os cyclovírus já foram identificados nos seis continentes – África (GARIGLIANY et al., 2014; GEORGE et al., 2020), Antártica (PATTERSON et al., 2021), América (PADILLA-RODRIGUEZ; ROSARIO; BREITBART, 2013; GAINOR et al., 2021b), Ásia (WU et al., 2016; ISLAM et al., 2018), Europa (ROSARIO et al., 2012; FÉHER et al. 2017) e Oceania (MALE et al., 2016; CUSTER et al., 2022) – e em diferentes tipos de amostras biológicas, tais como fezes (MALE et al., 2016), secreções respiratórias (PHAN et al., 2014), líquido cefalorraquidiano (SMITS et al., 2013), proventrículo (YAN et al., 2020) e plasma sanguíneo (SAUVAGE et al., 2018).

Os hospedeiros definitivos dos cyclovírus ainda não são conhecidos (ROSARIO et al., 2017), mas o genoma desses já foi amplamente detectado em amostras de aves (FEHÉR et al. 2017); mamíferos como focas (PATTERSON et al., 2021), morcegos (WU et al., 2016) e suínos (GARIGLIANY et al., 2014); insetos (ROSARIO et al., 2012); aracnídeos (ROSARIO et al., 2018) e peixes (GADOIN et al., 2021). O ICTV reconhece oficialmente 52 espécies associadas a diferentes animais (Anexo 1).

Embora o potencial patogênico envolvendo os cyclovírus não esteja esclarecido, esses já foram identificados em amostras de humanos com infecções respiratórias (PHAN et al., 2014), líquido cefalorraquidiano de humanos com infecções agudas do sistema nervoso central (VAN TAN et al., 2013), de cachorros com gastroenterite hemorrágica (GAINOR et al., 2021b) e galinhas acometidas por um surto de proventriculite (YAN et al., 2020).

Apesar da ampla distribuição mundial dos cyclovirus, as análises filogenéticas não têm revelado *clusters* definitivos relacionados às localizações geográficas ou espécies de origem das amostras (ROSARIO et al., 2017). Além disso, ainda são amplamente

desconhecidos seus hospedeiros definitivos (CHRZASTEK et al., 2021), bem como suas informações estruturais (BREITBART et al., 2017); e pouco se sabe sobre sua biologia (DENNIS et al., 2018) ou importância patológica (GARIGLIANY et al., 2014).

Desde que foram identificados pela primeira vez por Li et al. (2010), os cyclovírus têm sido majoritariamente detectados por meio de reações de PCR com *primers* degenerados (cuja sequência tem posições com duas ou mais bases nitrogenadas possíveis e que muitas vezes não são gênero-específicos) ou randômicos, exigindo a posterior realização de sequenciamento; ou ainda por análises metagenômicas (ROSARIO et al., 2017).

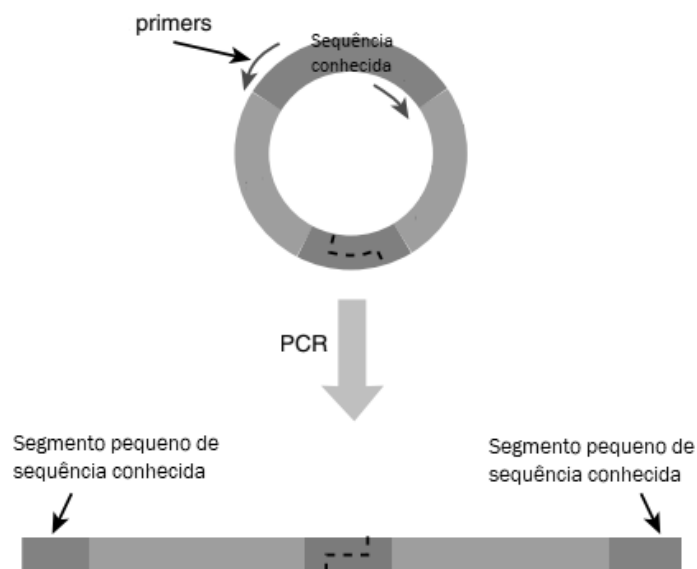
A metagenômica é o *screening* de DNA em amostras através de hibridização com sondas marcadas ou reações de PCR, produzindo sequências curtas (com dezenas ou centenas de pares de bases e sem identificação do organismo de origem) denominadas *reads*, que, através de algoritmos computacionais baseados em sobreposições, são unidas em sequências maiores e contínuas chamadas *contigs*, que podem subsequentemente ser combinadas em genomas completos (PEREIRA, 2014; PEREIRA, 2019).

A sequência do genoma completo dos cyclovírus pode ainda ser determinada através da técnica de PCR inversa (YAN et al., 2020). Na PCR inversa, após sequenciamento de fragmento amplificado, *primers* são desenhados para anelarem-se às extremidades da região conhecida direcionados para a região cuja sequência é desconhecida; e a PCR então produz *amplicon* (produto) com pequenos segmentos de região conhecida nas extremidades e um novo sequenciamento pode ser realizado (CLARK; PAZDERNIK, 2015) (Figura 2).

Na literatura, também há relatos de amplificação do genoma de cyclovírus por círculo rolante (RCA) (CUSTER et al., 2022), um processo enzimático isotérmico, que pode ser realizado em temperatura ambiente, em que um *primer* curto é amplificado para formar uma fita simples longa utilizando um *template* de DNA circular e polimerases especiais; sendo o produto um concatêmero contando dezenas ou centenas de repetições em tandem complementares ao *template* circular (ALI et al., 2014).

A dependência da realização de sequenciamentos para confirmação da detecção molecular existente em muitos casos pode representar uma limitação no avanço dos estudos sobre características e a epidemiologia dos cyclovírus. A técnica tem custo relativamente alto e os recursos computacionais e humanos podem ser limitados, especialmente em países em desenvolvimento (PRIFTI; ZUCKER, 2015; HELMY; AWAD; MOSA, 2016).

FIGURA 2 - PCR INVERSA: OS *PRIMERS* SÃO DESENHADOS PARA SE ANELAREM-SE ÀS EXTREMIDADES DA REGIÃO CONHECIDA. A PCR ENTÃO AMPLIFICA O DNA DESCONHECIDO E O *AMPLICON* POSSUI PEQUENOS SEGMENTOS DE SEQUÊNCIA CONHECIDA NAS EXTREMIDADES.



FONTE: adaptado de CLACK; PAZDERNIK (2016)

3.1.1 Cyclovírus associados a aves

Em galinhas, os cyclovírus foram identificados em amostras de proventrículo (YAN et al., 2020), fezes/excretas (VAN TAN et al., 2013; LIMA et al., 2019) e suabes orais (CHRZASTEK et al., 2021), bem como em amostras de carne de frango (LI et al., 2010). Genoma de cyclovírus também foi identificado em suabes cloacais de patos e gansos (FEHÉR et al., 2017; KASZAB et al., 2020) e em fezes/excretas de pássaros (CUSTER et al., 2022). A detecção de cyclovírus associados a aves já foi realizada por diferentes métodos moleculares (Quadro 2).

Yan et al. (2020) detectaram genoma de cyclovirus em amostras de 80% das galinhas acometidas por um surto de proventriculite em 2018 na China, enquanto o vírus não foi detectado em nenhum animal saudável. Simultaneamente, os autores obtiveram resultados negativos para possíveis causas conhecidas, como bactérias patogênicas, reovírus aviário, gyrovirus 3, circovírus aviário e para os vírus da anemia infecciosa das galinhas, da bronquite infecciosa das galinhas, da proventriculite necrosante das aves, da leucose aviária, da doença de Marek, da reticuloendoteliose aviária e da doença infecciosa da bursa.

QUADRO 2 – MÉTODOS DE DETECÇÃO MOLECULAR DE CYCLOVÍRUS ASSOCIADOS A AVES RELATADOS NA LITERATURA

Referência	Método de detecção	Estratégia de obtenção da sequência do genoma completo
Li et al. (2010) / Li et al. (2011)	PCR convencional com <i>primers</i> degenerados genéricos para a família <i>Circoviridae</i>	PCR inversa com <i>primers</i> específicos para as sequências de cada amostra positiva
Van Tan et al. (2013)	VIDISCA (<i>Virus discovery cDNA-AFLP</i>)	PCR inversa com <i>primers</i> específicos para as sequências de cada amostra positiva
Féher et al. (2017)	PCR convencional com <i>primers</i> degenerados genéricos para a família <i>Circoviridae</i>	<i>Back-to-back</i> PCR com <i>primers</i> específicos para a sequência da amostra positiva
Lima et al. (2019)	Sequenciamento de nova geração (NGS)	Análise de metagenomas – Plataforma Illumina
Kaszab et al. (2020)	PCR convencional com <i>primers</i> degenerados genéricos para a família <i>Circoviridae</i>	<i>Back-to-back</i> PCR com <i>primers</i> específicos para as sequências de cada amostra positiva
Yan et al. (2020)	Amplificação randômica	PCR inversa com <i>primers</i> específicos para as sequências de cada amostra positiva
Chrzastek et al. (2021)	Sequenciamento de nova geração (NGS)	Análise de metagenomas – Plataforma Illumina
Custer et al. (2022)	Amplificação por círculo rolante (RCA)	<i>Back-to-back</i> PCR com <i>primers</i> específicos para as sequências de cada amostra positiva

FONTE: a autora (2022)

A proventriculite é uma doença emergente de etiopatologia pouco conhecida caracterizada pelo aumento da espessura do proventrículo (LEÃO, 2019). Embora o cyclovirus detectado possa estar associado ao quadro de proventriculite, a possível relação dos cyclovírus com os sinais clínicos e/ou a doença não está clara e outros estudos são necessários para esclarecer a patogenicidade, a epidemiologia e os efeitos para a saúde pública (YAN et al., 2020).

Lima et al. (2019) avaliaram a associação dos vírus entéricos com quadros de síndrome da má-absorção em galinhas determinando o viroma de excretas de animais saudáveis e com sintomatologia (atraso no crescimento, fezes/excretas diarreicas e desenvolvimento prejudicado das penas). Os autores detectaram genoma de cyclovírus, mas sem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de animais.

3.2 FILOGENIA

A análise filogenética estima a relação entre genes ou fragmentos de genes inferindo sua história comum (CALDART et al., 2016). O *pipeline* (sequência de etapas)

filogenético (obtenção e alinhamento das sequências, seleção dos métodos de substituição e de reconstrução e inferência, reconstrução e anotação da árvore filogenética) tem início com a disponibilidade das sequências genômicas dos organismos de interesse e tem como objetivo principal produzir árvores (KAPLI; YANG; TELFORD, 2020) que representam hipóteses de relações evolucionárias, sendo estruturadas com as sequências conectadas aos ancestrais pelos ramos, que por sua vez são originados em nós; árvores enraizadas incluem um *outgroup*, grupo de sequências que polariza a árvore mostrando quais as sequências mais ancestrais (CALDART et al., 2016).

3.2.1 Sequências genômicas

As sequências genômicas são obtidas a partir do sequenciamento, técnica de biologia molecular usada para determinar a sequência exata de nucleotídeos e suas respectivas bases nitrogenadas (adenina, citosina, guanina e timina) em uma molécula de DNA (GREEN, 2022). O desenvolvimento de novas tecnologias de sequenciamento resulta em aumento na magnitude de sequências disponíveis (KAPLI; YANG; TELFORD, 2020).

O formato de arquivo (*layout* ou arranjo da sequência e sua descrição) mais utilizado para a anotação/registro e para a análise de sequências é o .fasta (CHOUDHURI, 2014). Os arquivos contendo as sequências podem ser submetidos por seus autores a bancos de dados de biologia molecular - coleções organizadas e acessíveis que permitam que as sequências sejam encontradas e obtidas (McLEOD e UPTON, 2017). Ao todo, são mais de 1600 os bancos de dados de biologia molecular disponíveis (RIGDEN; FERNÁNDEZ, 2021), incluindo bancos de dados especificamente relacionados à virologia (Quadro 3).

3.2.1.1 NCBI Virus

O *NCBI Virus* (do *National Center for Biotechnology Information*) é um banco de dados integrativo de sequências virais que utiliza curadoria humana e automatizada para padronizar as sequências e seus atributos/informações (hospedeiro, natureza da amostra, etc.) e disponibiliza uma interface de pesquisa através da qual é possível filtrar facilmente os dados através de termos simples (HATCHER et al., 2017). A plataforma pode ser usada

tanto para encontrar sequências quanto para gerar e exportar relatórios e conjuntos de informações.

QUADRO 3 – ALGUNS DOS PRINCIPAIS BANCOS DE DADOS DE BIOLOGIA MOLECULAR ASSOCIADOS AO ESTUDO DOS VÍRUS

Banco de dados/ferramenta	Dados disponíveis
<i>Cenote-Taker 2</i>	Sequências virais
<i>Database of bat-associated viruses (DBatVir)</i>	Vírus associados a morcegos
<i>Database of Plant Viruses (DPV)</i>	Vírus associados a plantas, fungos e protozoários
<i>Genome Detective Virus Tool (Genome Detective)</i>	Taxonomia
<i>NCBI Virus</i>	Sequências virais
<i>Phage Genomes</i>	Genomas de bacteriófagos
<i>Phylogenetic Exploration of Viruses' Evolutionary Relationships (PhEVER)</i>	Relações evolucionárias entre vírus
<i>Reference Viral Database (RVDB)</i>	Sequências virais
<i>Virus Pathogen Resource (ViPR)</i>	Sequências de vírus patogênicos
<i>The Global Virome, in One Network (VIRION)</i>	Viroma de vertebrados
<i>Viral Informatics Resource for Metagenome Exploration (VIROME)</i>	Sequências virais coletadas por metagenômica
<i>Virus Variation</i>	Variantes virais

FONTE: a autora (2022)

O *NCBI Virus* reúne dados de toda a *International Nucleotide Sequence Database Collaboration* (INSDC), iniciativa colaborativa de troca diária de informações relacionadas a sequências, que inclui os principais bancos de dados: o *European Molecular Biology Laboratory Nucleotide Sequence Database* (EMBL-Bank), que é parte do *European Nucleotide Archive* (ENA), o *DNA Data Bank of Japan* (DDBJ) e o *GenBank* (BENSON et al., 2013). Até 14 de abril de 2022 estavam disponíveis 8.447.940 sequências virais na plataforma.

3.2.2 Alinhamento

A etapa de alinhamento das sequências é realizada para garantir que a comparação seja realizada entre resíduos homólogos, ou seja, que cada coluna do alinhamento descenda do mesmo resíduo ancestral: devido a *gaps*, inserções e deleções, genes podem ter tamanhos diferentes em variadas sequências (KAPLI; YANG; TELFORD, 2020). Os métodos de alinhamento podem ser classificados em três principais categorias: abordagem progressiva (mais amplamente utilizadas), baseada em consistência; e evolução diferencial (Quadro 4).

QUADRO 4 - MÉTODOS DE ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS E RESPECTIVOS PROGRAMAS

Método de alinhamento	Princípio do método	Programas
Abordagem progressiva	Estimam a similaridade entre pares de sequências e produzem uma árvore inicial; depois, constroem o alinhamento a partir do par mais semelhante, adicionando progressivamente as sequências mais distantes	Muscle, Clustal e algumas versões do MAFFT
Baseada em consistência	Estimam os alinhamentos entre todos os pares, mantendo registro das alternativas; depois, identificam o alinhamento que maximiza a consistência entre todos os pares	T-Coffee, ProbCons e outras versões do MAFFT
Evolução diferencial	Usam um modelo evolucionário de inserções e deleções e inferem ambos o alinhamento e a árvore que relaciona as sequências	Bali-Phy e StatAlign

FONTE: adaptado de KAPLI; YANG; TELFORD (2020)

3.2.2.1 MAFFT

O *Multiple Alignment using Fast Fourier Transform* (MAFFT) é um servidor de alinhamento de múltiplas sequências baseado na transformação de Fourier, usada no *software* para permitir a rápida detecção de segmentos homólogos. O programa também funciona com base em um sistema de pontuação simplificado desenvolvido com o objetivo de reduzir o tempo de processamento e ampliar a acurácia dos alinhamentos, mesmo quando as sequências comparadas são distantes e/ou possuem grandes inserções (KATO et al., 2002).

3.2.3 Análise filogenética

3.2.3.1 Modelos de substituição

Os modelos de substituição descrevem as taxas de mudanças de mutações fixas entre sequências e constituem a base da análise filogenética a nível molecular, embasando os métodos de reconstrução (GATTO; CATANZARO; MILINKOVITCH, 2006; ARENAS, 2015). Embora mais de 1600 modelos já tenham sido descritos, o modelo *Generalized Time-Reversible* (GTR) +G +I, o mais complexo, que incorpora diferentes taxas para cada mudança e diferentes frequências de nucleotídeo, e adiciona uma proporção de sítios invariáveis (+I) e uma taxa de variação através dos sítios (+G), normalmente é o que melhor acomoda dados reais (ARENAS, 2015).

A seleção do modelo de substituição mais adequado para a análise de cada conjunto de dados pode ser automatizada com o uso do *ModelFinder*, um método de

seleção rápida de modelo que melhora a acurácia das estimativas filogenéticas, incorporando e avaliando 22 e 36 diferentes modelos de substituição para análises de conjuntos de dados de DNA e proteínas, respectivamente (KALYAANAMOORTHY et al., 2017).

Um dos critérios de seleção que podem utilizados na seleção do modelo de substituição é o Critério de Informação de Akaike (AIC), desenvolvido com base na distância de Kullback-Laiber (K-L), uma medida da distância entre o modelo verdadeiro, que geralmente é uma abstração, e o modelo candidato. O AIC é usado para escolher, dentre o grupo de modelos avaliados, aquele que minimiza a K-L. Para a seleção a partir de pequeno número de amostras, usa-se o Critério de Informação de Akaike corrigido (AICc) (DAL BELLO, 2010).

3.2.3.2 Métodos de reconstrução filogenética

A partir de um conjunto de sequências alinhadas, é possível inferir árvores filogenéticas a partir de dois métodos principais de reconstrução (matrizes de distância ou de características) e vários métodos de inferência, como o *neighbor joining*; máxima parsimônia, *maximum likelihood* e a inferência bayesiana (KAPLI; YANG; TELFORD, 2020) (Quadro 5).

QUADRO 5 – ANÁLISE FILOGENÉTICA: MÉTODOS DE RECONSTRUÇÃO E DE INFERÊNCIA

Método de reconstrução filogenética	Princípio do método	Algoritmo para inferência	Programas
Matriz de distância	A distância entre cada par de sequências é calculada e a reconstrução da árvore é baseada na matriz de distância	<i>Neighbor joining</i>	MEGA, Mesquite, PAUP, PHYLIP
Matriz de características	Todas as sequências são comparadas simultaneamente considerando uma posição do alinhamento por vez	Máxima parsimônia	MEGA, Mesquite, NONA, PAUP, PHYLIP, TNT
		Máxima verossimilhança ou <i>maximum likelihood</i>	GARLI, HYPHY, IQ-TREE, Mesquite, MEGA, PAML PAUP, PHYLIP, PhyML,
		Inferência Bayesiana	BEAST, MrBayes

FONTE: adaptado de YANG; RANALLA (2012)

3.2.3.3 Máxima verossimilhança ou *maximum likelihood* (ML)

A estimativa por *maximum likelihood* (ML) é uma abordagem estatística amplamente utilizada para estimar um ou mais parâmetros desconhecidos de um modelo probabilístico baseado em dados observados (VELLA; ALONSO, 2020). Na filogenia, o *likelihood* é o produto da probabilidade de observar os dados como função dos parâmetros de substituição e do comprimento dos ramos da árvore; ou seja, o parâmetro que faz com que os dados observados sejam mais prováveis no modelo é considerado mais próximo da realidade (KAPLI; YANG; TELFORD, 2020).

Embora exija grande esforço computacional, a ML permite a inferência de árvores filogenéticas utilizando modelos complexos e busca a árvore mais verossímil de acordo com as sequências fornecidas, calculando estimativas de menor variância, ou seja, menos erros de amostragem (CALDART et al., 2016). A confiança de uma árvore filogenética formada através de estimativa por ML é comumente medida pelos *bootstraps*, pseudo-conjuntos de dados de mesmo tamanho e formados a partir de sorteios (com possibilidade de repetição) das colunas alinhamento original formando árvores-réplicas (KAPLI; YANG; TELFORD, 2020); ao final, todos os pseudo-conjuntos de dados ou árvores-réplicas são comparados à árvore original e o valor mostrado corresponde ao percentual de vezes em que o clado foi recuperado nos pseudo-conjuntos (CALDART et al., 2016).

3.3 DESENHO E AVALIAÇÃO *IN SILICO* DE PRIMERS

3.3.1 *Primers e softwares* de desenho e avaliação

A PCR é uma técnica de amplificação de sequências específicas de DNA, capaz de gerar milhões de cópias a partir de uma quantidade pequena de ácido nucleico (alvo ou *template*) (LORENZ, 2012). A PCR ocorre em ciclos com três etapas principais: desnaturação (separação das fitas), anelamento ou hibridização (dos *primers* à sequência alvo) e extensão (síntese das novas fitas) (JOSHI; DESHPANDE, 2010).

A amplificação pela PCR depende da presença e eficiência de *primers* – pequenos fragmentos de DNA (também chamados oligonucleotídeos) que delimitam a região-alvo de amplificação e são complementares à fita de DNA que servirá de molde (JOSHI; DESHPANDE, 2010). A polimerização da nova fita ocorre em função da ação nucleofílica da hidroxila da pentose (3'-OH) fornecida pelo *primer* sobre o fosfato α ligado ao carbono 5' da pentose (5'-PO₄) do nucleotídeo que será incorporado (OLIVEIRA et al., 2007).

Embora a eficiência da PCR possa ser influenciada por diversos fatores, o desenho dos *primers* é considerado um fator crítico (YE et al., 2012). *Primers* são desenhados em *softwares* de bioinformática, como o *Primer-BLAST*, a partir do alinhamento de sequências disponíveis em bancos de dados para que sejam complementares apenas às sequências alvo: as comparações *in silico* visam garantir a especificidade dos *primers* (FREELAND, 2016).

O acrônimo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) se refere à suíte de programas utilizada para gerar alinhamentos entre sequências de nucleotídeos ou proteínas (WHEELER; BHAGWAT, 2007). O *template* submetido ou selecionado pelo usuário é submetido ao BLAST para que as regiões similares a sequências indesejadas no banco de dados sejam identificadas; posteriormente, o algoritmo do *software* é instruído a desenhar pelo menos um dos *primers* fora de tais regiões. Se o *template* possui um número de acesso RefSeq, o *software* é capaz de identificar SNPs (*single nucleotide polymorphisms* ou polimorfismos de nucleotídeo único), éxons e íntrons associados à sequência (YE et al., 2012).

3.3.2 Critérios para avaliação *in silico* dos *primers*

Para o desenho e a análise dos *primers* são elencadas quatro características principais: especificidade, eficiência, temperatura de *melting*, e porcentagem de G/C (HUNG; WENG, 2016).

3.3.2.1 Especificidade

Uma das propriedades críticas do *primer* é a especificidade com o DNA alvo (YE et al., 2012). Os *primers* devem ser longos o suficiente para que sejam especificamente complementares ao DNA alvo, já que para a amplificação, ambos precisam se anelar à extremidade 3' das fitas do *template* (HUNG; WENG, 2016). No entanto, a amplificação pode ocorrer mesmo sem complementariedade em algumas bases, especialmente na extremidade 5', já que a falta de complementariedade de duas bases na extremidade 3' tende ser suficiente para inibir a amplificação (YE et al., 2012).

A auto-complementaridade do *primer*, que deve ser evitada, pode levar à formação de grampo, também chamado *hairpin* (estrutura secundária estável do próprio *primer*), ou de homodímero, estrutura derivada do anelamento de duas cópias do mesmo

primer. Existem também os heterodímeros, formados com a interação entre *primers* diferentes. Todas essas estruturas inibem a amplificação (YE et al., 2012; HUNG; WENG, 2016).

3.3.2.2 Eficiência

De maneira geral, *primers* mais curtos tem maior eficiência de anelamento que os mais longos, embora os *primers* muito curtos também percam eficiência (HUNG; WENG, 2016). Pares com *primers* de 16 a 28 nucleotídeos (nt), sem que a diferença de comprimento entre um e outro seja maior que 3 nt, são considerados ideais (CHUANG; CHENG; YANG, 2013).

3.3.2.3 Temperatura de *melting*

A temperatura de *melting* (T_m) pode ser definida como a temperatura em que 50% dos pares de bases de uma molécula de DNA dupla fita estão desnaturados em fita simples - o valor depende do comprimento da sequência, da porcentagem de G/C e da concentração da solução (GOMES; MENDES; LIMA, 2012). De maneira geral, um bom par de *primers* deve possuir T_m próximas (YE et al., 2012).

O cálculo da T_m é importante para a determinação das condições ideais de reação. A temperatura da etapa de anelamento (T_a) é normalmente de 3 a 5 °C menor que a T_m calculada (GOMES; MENDES; LIMA, 2012). O valor de T_m pode ser manualmente calculado por fórmulas básicas, dependentes da concentração de sal ou baseadas na termodinâmica (ARRUDA JÚNIOR, 2010).

As fórmulas básicas consideram apenas a composição do *primer*, assumindo que o pareamento ocorre em condições padrão: 50 nM de concentração de *primers* e de sais e pH próximo de 7,0, enquanto a formulação dependente de sal considera a concentração desse no mix de PCR, requerendo um termo logarítmico de ajuste (ARRUDA JÚNIOR, 2010).

Já as metodologias baseadas na termodinâmica são construídas a partir do “método do vizinho mais próximo” ou, no inglês, *nearest neighbor* (HUNG et al., 2016) e “consideram a composição da sequência do *primer* em termos das interações entre os pares de bases vizinhos definidas pelos valores de variação de entalpia e entropia” (ARRUDA JÚNIOR, p. 25, 2010).

3.3.2.4 Porcentagem de GC

A porcentagem de GC é um valor que indica a proporção das bases nitrogenadas guanina (G) e citosina (C) na sequência do *primer* (CHUANG; CHENG; YANG, 2013). A porcentagem ideal varia entre 40% e 60%; valores acima de 60%, devido à estabilidade da ligação G-C, poderão implicar em temperaturas de anelamento mais altas, dificultando ou até mesmo inviabilizando a padronização da reação. Do contrário, uma porcentagem pequena de GC pode levar a um anelamento instável (HUNG; WENG, 2016).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SEQUÊNCIAS

Inicialmente, foi realizada uma busca por sequências e respectivas informações na plataforma *NCBI Virus: Sequences for discovery*. Na guia “*Search by virus*”, o termo “*cyclovirus*” foi utilizado como palavra-chave, resultando em 458 sequências genômicas completas e parciais submetidas à plataforma até março de 2022.

Em seguida, a partir da mesma plataforma, realizou-se *download*, na forma de planilha .xls, dos atributos como *Accession Number*, *Submitters*, *Release date*, *Length*, *Sequence Type*, *Nuc Completeness*, *Publications*, *Geo location*, *Host*, *Isolation Source* e *Collection Date* de cada uma das sequências (Quadro 6).

QUADRO 6 - INFORMAÇÕES OBTIDAS DE CADA SEQUÊNCIA DISPONIBILIZADAS PELA PLATAFORMA NCBI Virus

<i>Accession number</i>	Número de acesso à sequência no GenBank
<i>Submitters</i>	Autores indicados na submissão da sequência
<i>Release Date</i>	Data de submissão da sequência na plataforma
<i>Length</i>	Tamanho da sequência, em nucleotídeos
<i>Sequence Type</i>	Genbank ou refseq (sequência de referência)
<i>Nuc Completeness</i>	Sequência completa ou parcial
<i>Publications</i>	Número de publicações listadas no PubMed associadas à sequência
<i>Geo Location</i>	Localização geográfica de realização de coleta da amostra biológica
<i>Host</i>	Hospedeiro a partir do qual foi realizada a coleta da amostra biológica
<i>Isolation Source</i>	Tipo de amostra biológica coletada
<i>Collection Date</i>	Data de coleta da amostra biológica

FONTE: a autora (2022)

Posteriormente, a partir da análise da planilha, todas as sequências de cyclovírus associadas a aves disponíveis no banco de dados foram filtradas e selecionadas e, através de consultas individuais dos números de acesso, foram baixadas no formato .fasta. Dessas, as sequências de genoma completo foram ainda individualmente submetidas à ferramenta BLAST para verificação de similaridade com outras sequências.

Por fim, observando-se os percentuais de cobertura, que indica quanto da sequência em questão é coberta pela sequência alvo, e identidade (sendo o ponto de corte = 90%), que descreve a similaridade da sequência em questão com a sequência alvo, foi realizado o *download* de sequências de cyclovirus .fasta homólogas associadas a outros

hospedeiros. Cada sequência foi devidamente identificada com nome do hospedeiro, país de coleta, ano de coleta e tipo de amostra biológica.

4.2 ALINHAMENTO, IDENTIDADE E ANÁLISE FILOGENÉTICA

A análise filogenética foi realizada no *software PhyloSuite* (suíte que reúne diversos *softwares* relacionados a análises filogenéticas em uma interface única) versão 1.2.2. Inicialmente, as sequências em formato .fasta foram submetidas ao módulo de alinhamento MAFFT. Em seguida, através do módulo *ModelFinder*, a partir do critério de seleção AICc, selecionou-se o modelo evolucionário de substituição *Generalized Time-Reversible* (GTR) como o mais adequado para a análise dos dados.

A reconstrução da árvore filogenética foi realizada através do IQ-TREE (módulo de inferência filogenética disponível também no *PhyloSuite*), utilizando *maximum likelihood* como método de inferência e 1000 réplicas de *bootstrap* como medida de confiança. Como *outgroup*, foram incluídas sequências de circovírus também associadas a aves – após reverso complemento, já que a orientação das ORFs dos genomas dos vírus pertencentes a esse gênero é espelhada quando comparada aos cyclovírus. A árvore reconstruída foi então submetida ao *software FigTree* versão 1.4.4 para formatação.

Já a análise de identidade entre os pares de sequências, quando aplicável, foi realizada utilizando o *software Bioedit Sequence Alignment Editor* versão 7.2.5. O arquivo da matriz gerada pelo *software* foi então convertido para o formato .xls e as células correspondentes foram submetidas, no *Microsoft Excel*, à formatação condicional de cor com base nos valores de identidade entre os pares de sequências, para facilitar a visualização.

4.3 DESENHO E ANÁLISE DOS PRIMERS

O desenho dos *primers* foi realizado através do *software Primer Blast*, utilizando as configurações padrão (Quadro 7). Na aba “*Primers common for a group of sequences*”, foram adicionados como *templates* os arquivos .fasta das sequências selecionadas a partir da análise filogenética realizada neste trabalho. A especificidade dos *primers* foi checada no banco de dados *Nucleotide collection* contra todas as sequências de cyclovírus disponíveis.

Para selecionar o par mais adequado aos objetivos do trabalho, 15 pares de *primers* sugeridos pela plataforma foram então avaliados *in silico* em função da região de anelamento, tamanho do *amplicon*, auto-complementaridade, auto-complementaridade na extremidade 3', porcentagem de GC, bases próximas à extremidade 3', temperatura de *melting*, e repetições de nucleotídeos de mesma base.

QUADRO 7 – PARÂMETROS DE BUSCA DO PRIMER-BLAST

Parâmetro de busca	Valor do parâmetro
Mínimo de nucleotídeos incompatíveis	2
Mínimo de nucleotídeos incompatíveis na extremidade 3'	2
Tamanho máximo do <i>amplicon</i>	1000
Tamanho mínimo do <i>amplicon</i>	70
Tamanho máximo dos <i>primers</i>	25
Tamanho mínimo dos <i>primers</i>	15
Tamanho ótimo dos <i>primers</i>	20
T _m máxima	63
T _m mínima	57
T _m ótima	60

FONTE: Primer-BLAST (2022)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SEQUÊNCIAS, IDENTIDADE E ANÁLISE FILOGENÉTICA

A busca no banco de dados *NCBI Virus* resultou em 55 diferentes sequências (Anexo 2) parciais ou completas do genoma de cyclovirus identificadas a partir de amostras respiratórias, de fezes/excreta, de músculo e de proventrículo de aves em cinco continentes diferentes, indicando ampla distribuição - América (Brasil e Estados Unidos da América), Europa (Hungria), Ásia (China e Vietnã), Oceania (Nova Zelândia) e África (Nigéria) (Figura 3) – os resultados estão resumidos no Quadro 8.

QUADRO 8 – CYCLOVÍRUS ASSOCIADOS A AVES: HOSPEDEIROS E TIPO DE SEQUÊNCIAS

Origem da amostra (hospedeiro)		Sequências	
Nome científico	Nome popular	Completas	Parciais
<i>Anas platyrhynchos</i>	Pato-real	2	0
<i>Anatidae</i> (família)	Patos, cisnes e gansos	0	4
<i>Anser erythropus</i>	Ganso-de-frente-branca	1	0
<i>Gallus gallus</i>	Galinha	12	24
<i>Petroica australis</i>	Robin	10	0
<i>Podiceps cristatus</i>	Mergulhão-de-crista	2	0
Total		27	28

FONTE: a autora (2022)

FIGURA 3 - CYCLOVÍRUS ASSOCIADOS A AVES: PAÍSES DE ORIGEM DAS AMOSTRAS



FONTE: a autora (2022)

Entre as aves, há relatos de detecção tanto em amostras isoladas de aves domésticas quanto de selvagens, bem como, em outra classificação, anseriformes (patos, gansos), galiformes (galinhas) e passeriformes (pássaros). Indicar o(s) hospedeiro(s)

definitivo(s) dos cyclovírus, entretanto, não é simples: devido à ausência de estudos de inoculação experimentais *in vivo* ou *in vitro*, e como muitos dos cyclovírus foram detectados em amostras associadas ao sistema digestório (como fezes, por exemplo), não se descarta que pelo menos parte deles tenha origem da dieta animal (ROSARIO et al., 2017).

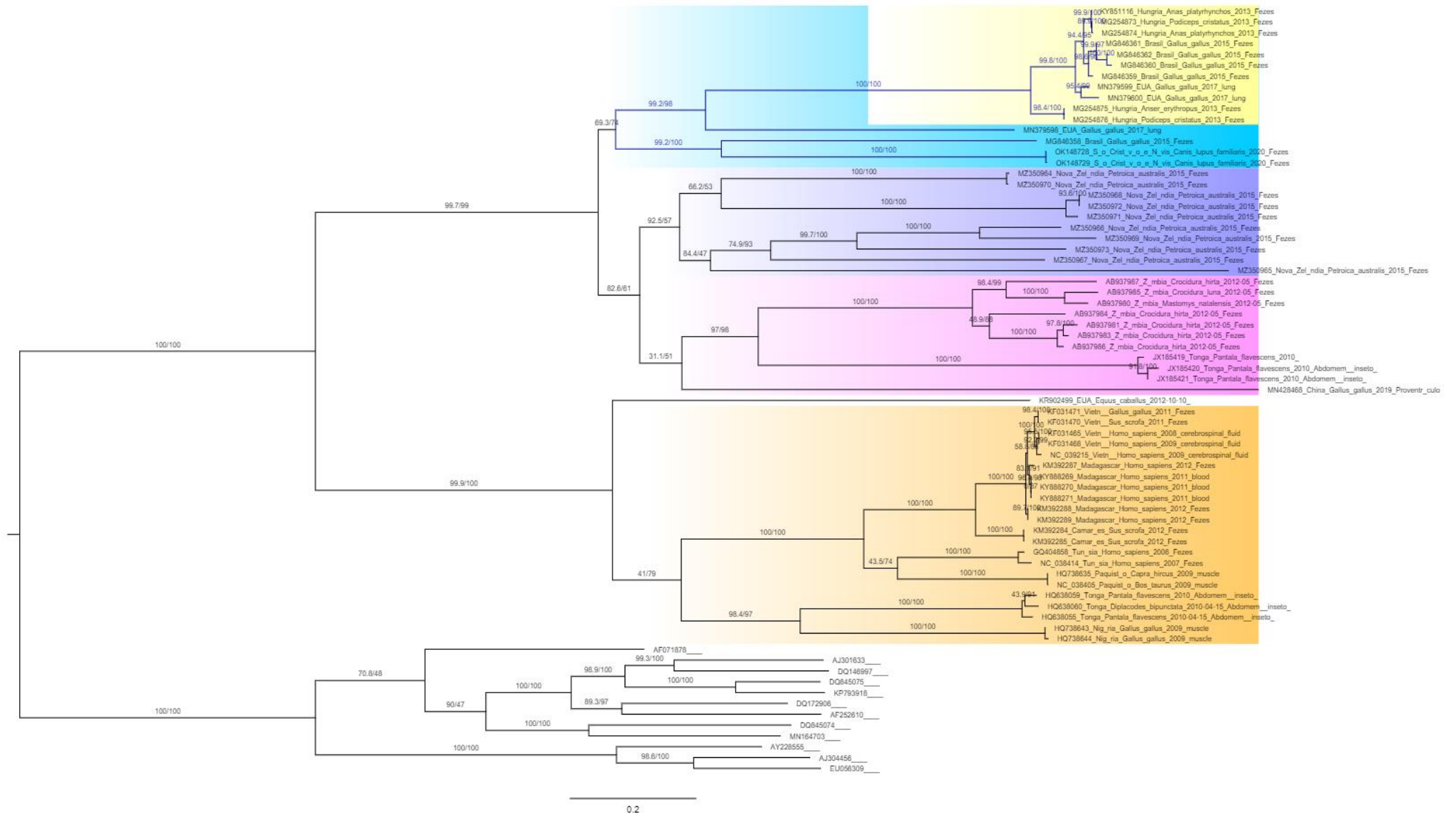
Dentre as sequências completas de cyclovírus associados a aves, o tamanho do genoma varia entre 1760 e 1939 nucleotídeos. Duas sequências, MG254875 e MG254876, apesar de idênticas, foram isoladas a partir de hospedeiros diferentes (*Anser erythropus* e *Podiceps cristatus*). A média de identidade entre os pares de sequências, no entanto, é bem inferior: 44,5%. Os pares de cyclovírus associados a aves mais distantes possuem apenas cerca de 20% de identidade entre seus genomas. Apesar da variabilidade genômica, a classificação taxonômica dos cyclovírus é justificada principalmente pela arquitetura do genoma e perfil de transcrição (ROSARIO et al., 2017).

As identidades discrepantes entre os cyclovírus associados a aves são observáveis nos resultados da análise filogenética desenvolvida neste trabalho (Figura 4). Não se observa um padrão claro de clados formados por hospedeiro, tipo de amostra, ano ou localização geográfica de coleta. As sequências HQ738643 e HQ738644, de isolados de músculo de galinhas na Nigéria, por exemplo, agrupam com isolados em abdome de libélulas de Tonga (localizada na Oceania).

De maneira geral, as sequências de cyclovírus associadas a aves estão distribuídas pelos quatro grandes clados observáveis na árvore, o que, mais uma vez, demonstra a variabilidade entre as sequências. O clado inferior (em laranja), inclui os isolados de galinha da Nigéria anteriormente mencionados e um isolado de fezes/excretas de galinha do Vietnã (KF031471), que por sua vez está agrupado com outras sequências do Vietnã (isolados de humanos e suíno) e algumas de Madagascar (humanos). O clado inclui ainda isolados de Camarões, Tunísia e Paquistão (suínos, humanos, cabra e boi) (Figura 4).

Já o segundo clado (em rosa) reúne, além de isolado de galinha da China (MN428468), única sequência derivada de amostra de proventrículo, isolados de roedores da Zâmbia e outras sequências derivadas de libélulas de Tonga. Já o terceiro clado (em roxo) reúne todos os isolados do chamado robin, um pássaro neozelandês (MZ350964-MZ350973). O quarto (em azul), por sua vez, agrupa isolados de galinha brasileiros (MG846358-MG846362) e estadunidenses (MN379598- MN379600); isolados de pato, ganso e mergulhão da Hungria (KY851116, MG254873- MG254876) e isolados de cachorro (OK148728 e OK148729).

FIGURA 4 - ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS SEQUÊNCIAS COMPLETAS DE CYCLOVÍRUS: ÁRVORE RECONSTRUÍDA ATRAVÉS DO MÓDULO IQ-TREE NO PHYLUSUITE, UTILIZANDO *MAXIMUM LIKELIHOOD* COMO MÉTODO DE INFERÊNCIA E 1000 RÉPLICAS DE *BOOTSTRAP* COMO MEDIDA DE CONFIANÇA. COMO *OUTGROUP*, SEQUÊNCIAS DE CIRCOVÍRUS ASSOCIADOS A AVES APÓS REVERSO COMPLEMENTO.



A partir da análise das sequências que compõe cada clado, observou-se que, dentre as sequências associadas a aves, somente o conjunto de sequências identificado em amarelo (MN379599, MN379600, MG254876, MG254875, MG254874, MG254873, KY851116, MG846360, MG846359, MG846362 e MG846361) possuía percentual de identidade entre pares suficiente (>79%) para ser usado como *template*. O desenho e a análise dos *primers* seguiram então a partir das onze sequências. Nem mesmo entre as sequências neozelandesas, advindas todas de um mesmo tipo de amostras, coletadas em um mesmo trabalho, foi possível encontrar uma região consenso que pudesse servir como molde para o desenho dos *primers* sem um alto índice de degeneração.

Embora possa parecer um recorte pequeno de sequências, o conjunto selecionado inclui a maioria dos isolados no continente americano e no Brasil, além disso, em um conjunto tão diverso de vírus, restringir as sequências *template* se mostra necessário para que se possam ampliar as opções de detecção molecular dos cyclovírus e assim melhor conhecer sua epidemiologia, sua biologia, sua patogenia e suas características.

Ademais, o desenho de *primers* para detecção molecular de cyclovírus por PCR convencional tem sido relatado como eficaz e importante: Prades et al. (2021) desenharam *primers* apenas para a espécie *Human associated cyclovirus 10* (apenas uma das dez associadas a humanos) e observaram prevalência de 19,05% em adultos com pneumonia e de apenas 0,96% em assintomáticos, sugerindo possível papel patogênico dos cyclovírus em infecções respiratórias.

Entre as sequências de isolados associados a outros hospedeiros, um conjunto de sequências associadas a humanos também seria passível de uso como *template* para o desenho e a avaliação de *primers* para detecção molecular por reação de PCR. No entanto, os cyclovírus associados a humanos fogem do escopo/interesse deste trabalho.

5.2 DESENHO E AVALIAÇÃO DOS PRIMERS

As sequências e as características dos pares de *primers* avaliados neste trabalho estão resumidas no Quadro 9. Embora Prades et al. (2021) – em testes de detecção molecular de *Human associated cyclovirus 10* – não tenham observado diferença significativa na sensibilidade entre *primers* desenhados para anelarem-se aos genes que codificam proteínas do capsídeo ou de replicação, quase todos (14/15) os *primers* avaliados neste trabalho anelam-se ao gene que codifica a Rep, região mais conservada do genoma (GAINOR et al., 2021a). Entre as sequências comparadas neste trabalho, as

mutações/inserções/deleções pontuais do gene rep estão concentradas principalmente na região do íntron (Figura 5).

FIGURA 5 – COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQUÊNCIAS SUBMETIDAS COMO *TEMPLATE* PARA DESENHO DOS *PRIMERS* (GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA DE REPLICAÇÃO). BARRAS VERTICAIS REPRESENTAM AS MUTAÇÕES/INSERÇÕES/DELEÇÕES



FONTE: *Primer BLAST*, 2022

Os valores de auto-complementariedade e auto-complementaridade na extremidade 3' são indicadores numéricos da tendência de formação de dímeros entre um par de *primers* e devem ser minimizados sempre que possível (AGGARWAL, 2009). A complementaridade entre as extremidades 3' é especialmente importante por que a formação dos dímeros se inicia pelo anelamento entre essas regiões (CHOU et al., 1992).

A plataforma *primer-BLAST*, portanto, sugere (e sugeriu neste trabalho) apenas *primers* cujos valores de auto-complementaridade são inferiores a 8,00 e que tendem a ser suficientemente baixos, já que a temperatura de *melting* dos dímeros costuma ser significativamente menor que a menor temperatura (de anelamento) empregada em uma reação de PCR (ROCHE, 1999).

A porcentagem de GC entre todos os *primers* avaliados variou entre 50 e 60%, valores que atendem às recomendações da literatura (VIEIRA, 2021). Já as temperaturas de *melting* dos *primers* avaliados variaram entre 58,76 e 61,18°C, com diferenças entre as T_m de um mesmo par entre 0,0 e 1,29°C; também dentro do intervalo recomendado na literatura, que é de 50-62 °C com diferença que não exceda 5°C no par, tendo em vista que quanto mais próximas forem as temperaturas, maior será a eficiência da reação (CHUANG; CHENG; YANG, 2013).

Já o tamanho dos produtos esperados a partir dos oligonucleotídeos sugeridos pela plataforma variou entre 74 e 592 pares de base (pb). Em reações de PCR convencional, o tamanho do *amplicon* costuma variar entre 200 e 1000 pb, sendo que, para produtos maiores, a duração dos ciclos de extensão também deve ser maior; embora o tamanho ideal dependa dos objetivos e especificidades de cada desenho (IDT, 2022). Para este

trabalho, cujo objetivo é o desenho de *primers* que facilitem e simplifiquem a detecção molecular de cyclovírus associados a aves, dentre os desenhados, foram pré-selecionados os pares 1, 6, 7, 9, 11 e 13, com produtos esperados de 322, 374, 310, 253, 380 e 225 pb, respectivamente.

Submetidos à verificação de especificidade em busca no BLAST, os seis pares pré-selecionados apresentaram resultados muito semelhantes e de acordo com o esperado: anelamento às sequências utilizadas como *template* com 100% de cobertura e identidade, sem que houvesse anelamento dos *primers* que compõe determinado par às mesmas sequências inespecíficas. Na avaliação *in silico*, o anelamento inespecífico indica problema no desenho apenas quando ocorre entre uma mesma sequência inespecífica em ambos os *primers* que formam um par, já que a amplificação do fragmento de determinado tamanho depende do anelamento dos dois *primers* (JOSHI; DESHPANDE, 2010).

Continuando a avaliação *in silico*, observou-se que *primers* dos pares 1 e 7 (entre os pré-selecionados) possuem as repetições CCCC e GGGG, respectivamente. *Primers* com repetições de 4 ou mais nucleotídeos de mesma base aumentam o risco de anelamentos inespecíficos e, por isso, devem ser evitados (MUBARAK et al., 2020). Os demais quatro pares foram classificados considerando as bases mais próximas da extremidade 3' de cada *primer*: resíduos das bases nitrogenadas guanina e citosina promovem um anelamento mais forte do *primer* à fita *template*, já que, na estrutura do DNA, são conectados por três ligações de hidrogênio – e não duas, como as bases adenina e timina (WAIN-HOBSON, 2006; MUBARAK et al., 2020).

Assim, finalmente, dentre os pares de *primers* avaliados, opções desenhadas a partir das sequências selecionadas através de análise filogenética, e considerados os parâmetros aplicados, o par 9 (*primers* 5'-CATCCCACCACTTGCCTCTC-3' e 5'-TGGAGTCGTCAAACCCAGAG-3') foi avaliado como o mais adequado. O par 11 também aparece como opção, já que apesar de possuir uma base T na extremidade 3', tanto a fita *forward* como a *reverse* possuem bases C e G próximas a essa extremidade.

Espera-se que os *primers* desenhados neste trabalho possam ser utilizados na detecção molecular de cyclovírus em amostras biológicas de aves da região do estado do Paraná e de outras localidades, de maneira a contribuir com a elucidação de sua epidemiologia e patogenia.

QUADRO 9 – SEQUÊNCIAS 5'→3' E CARACTERÍSTICAS DOS PARES DE *PRIMERS* AVALIADOS

Par	Sequência 5'→3'	4+ bases iguais em sequência	Região de anelamento	Produto (pb)	Start	Stop	Tm	GC%	Auto-complementaridade	Auto-complementaridade na extremidade 3'
1	TAACCATCCCACCACTTGCC	0	rep	322	1179	1198	59,96	55,00	2,00	1,00
	GCAGCCGATTACCCCTCAAT	1			1500	1481	60,18	55,00	3,00	2,00
2	GTCGAAGCTGAGCCATCCAT	0	rep	86	1124	1143	60,18	55,00	5,00	2,00
	ATAAGCCGAGAGGCAAGTGG	0			1209	1190	59,82	55,00	3,00	1,00
3	CCACTTGCCTCTCGGCTTAT	0	rep	592	1190	1209	59,82	55,00	3,00	2,00
	TCGACTACGCTATCTGGGGT	1			1781	1762	59,82	55,00	4,00	2,00
4	CAGGAACTCGTCGAAGCTGA	0	rep	81	1115	1134	59,76	55,00	5,00	1,00
	AAGTGGTGGGATGGTTACGC	0			1195	1176	60,32	55,00	3,00	2,00
5	TAGTATTACCCGTGAGCCGC	0	cp	189	1	20	59,33	55,00	5,00	3,00
	GGGGTTATATAGCCGCACCC	0			189	170	60,04	60,00	8,00	2,00
6	GCGTAACCATCCCACCACTT	0	rep	374	1176	1195	60,32	55,00	3,00	0,00
	TGAACTGGTGTGCCAAATGC	0			1549	1530	59,61	50,00	3,00	2,00
7	ATTGAGGGGTAATCGGCTGC	1	rep	310	1481	1500	60,18	55,00	3,00	3,00
	AACACCTGTTGCGACTACGCT	0			1790	1771	59,33	50,00	6,00	0,00
8	GGCGCTTGGTTACTGGTGAT	0	rep	124	1020	1039	60,68	55,00	4,00	2,00
	ATGGATGGCTCAGCTTCGAC	0			1143	1124	60,18	55,00	5,00	2,00
9	CATCCCACCACTTGCCCTCTC	0	rep	253	1183	1202	60,39	60,00	2,00	0,00
	TGGAGTCGTCAAACCCAGAG	0			1435	1416	59,32	55,00	3,00	1,00
10	CTTTGACTTCCACACGGCAG	0	rep	170	1075	1094	59,41	55,00	3,00	2,00
	CGCGGCAGAGTTATGTGGAT	0			1244	1225	60,53	55,00	4,00	2,00
11	TTGGTTGGCGTAACCATCCC	0	rep	380	1169	1188	60,61	55,00	6,00	2,00
	GAACTGGTGTGCCAAATGCT	0			1548	1529	59,32	50,00	3,00	0,00
12	GGTGAACCTCAGCAAACCCCC	1	rep	74	1055	1074	61,18	60,00	4,00	0,00
	TCGACGAGTTCCTGCGAATC	0			1128	1109	60,18	55,00	5,00	3,00
13	GCATTTGGCACACCAAGTTCA	0	rep	225	1530	1549	59,61	50,00	3,00	1,00
	TCGCTCCTGAAACTGGAAGTC	0			1754	1734	60,00	52,38	3,00	2,00
14	GATGCGCTTTGAGGTGAACT	0	rep	92	1043	1062	58,84	50,00	4,00	3,00
	TCAGCTTCGACGAGTTCCTG	0			1134	1115	59,76	55,00	5,00	1,00
15	GAGGTGAACTCAGCAAACCC	0	rep	77	1053	1072	58,76	55,00	5,00	1,00
	TTCGACGAGTTCCTGCGAAT	0			1129	1110	59,76	50,00	6,00	2,00

FONTE: a autora (2022)

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação *in silico* é importante porque concede autonomia aos pesquisadores, que, com pleno acesso a bancos de sequências e ferramentas de bioinformática, podem desenhar e avaliar *primers* sob diferentes critérios para o objetivo proposto; além de permitir antecipar a eficácia e a eficiência de *primers* em reações em cadeia da polimerase, representando melhor aproveitamento de tempo e recursos laboratoriais e humanos.

Para o estudo dos cyclovírus, tão diversos genomicamente e não agrupáveis diretamente por organismo de origem, tipo ou localização geográfica de coleta de amostra biológica, o desenho e a avaliação *in silico* de *primers* é ainda mais importante, já que o desenvolvimento de reações de PCR deve facilitar a detecção molecular dos cyclovírus e ser essencial para que sua epidemiologia e aspectos patogênicos sejam esclarecidos.

Embora não tenha sido possível desenhar um único par de *primers* passível de ser utilizado com eficácia na detecção molecular de todos os cyclovírus associados a aves, a análise filogenética desenvolvida neste trabalho foi importante para que a identificação de clados formados baseasse o desenho de *primers* funcionais que serão úteis na ampliação das opções de detecção molecular dos cyclovírus associados a aves, especificamente em frangos de corte.

REFERÊNCIAS

ADAMS, M. J.; LEFKOWITZ, E. J.; KING, A. M. Q.; HARRACH, B.; HARRISON, R. L.; KNOWLES, N. J.; KROPINSKI, A. M.; KRUPOVIC, M.; KUHN, J. H.; MUSHEGIAN, A. R.; NIBERT, M.; SABANADZOIC, S. SANFAÇON, H.; SIDDELL, S. G.; SIMMONDS, P.; VARSANI, A.; ZERBINI, F. M.; GORBALENYA, A. E.; DAVISON, A. J. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2016), **Archives Of Virology**, [S.L.], v. 161, n. 10, p. 2921-2949, 16 jul 2016, Springer Science and Business Media LLC, <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-016-2977-6>.

AGGARWAL, P. **Tool to design and validate specific PCR primer pairs for phylogenetic analysis**. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Master Of Science, Marquette University, Milwaukee, 2009.

ALI, M.; LI, F.; ZHANG, Z.; ZHANG, K.; KANG, D.; ANKRUM, J. A.; LE, X. C.; ZHAO, W. Rolling circle amplification: a versatile tool for chemical biology, materials science and medicine, **Chemical Society Reviews**, [S.L.], v. 43, n. 10, p. 3324-3342, 2014. <http://dx.doi.org/10.1039/c3cs60439j>.

ARENAS, M. Trends in substitution models of molecular evolution. **Frontiers In Genetics**, [S.L.], v. 6, p. 1-9, 26 out. 2015. <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2015.00319>.

ARRUDA JÚNIOR, R. G. de. **Temperatura de Melting: um estudo comparativo**, 2010, 55 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciência da Computação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2010.

BENSON, D. A.; CAVANAUGH, M.; CLARK, K.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; SAYERS, E. W. GenBank. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 36-42, 26 nov. 2012. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks1195>.

BREITBART, M.; DELWART, E.; ROSARIO, K.; SEGALÉS, J.; VARSANI, A. ICTV Virus Taxonomy Profile: circoviridae, **Journal of General Virology**, [S.L.], v. 98, n. 8, p. 1997-1998, 1 ago, 2017. <http://dx.doi.org/10.1099/jgv.0.000871>.

CALDART, E. T.; MATA, H.; CANAL, C. W.; RAVAZZOLO, A. P. Análise filogenética: conceitos básicos e suas utilizações como ferramenta para virologia e epidemiologia molecular. **Acta Scientiae Veterinariae, Londrina**, v. 44, n. 1392, p. 1-20, 2016.

CHOU, Q.; RUSSELL, M.; BIRCH, D. E.; RAYMOND, J.; BLOCH, W. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 1717-1723, 1992.

CHOUDHURI, S. **Bioinformatics for Beginners: genes, genomes, molecular evolution, databases and analytical tools**. Maryland: Academic Press, 2014. 225 p.

CHYZASTEK, K.; KRABERGER, S.; SCHMIDLIN, K.; FONTENELE, R. S.; KULKARNI, A.; CHAPPELL, L.; DUFOUR-ZAVALA, L.; KAPCZYNSKI, D. R.;

VARSANI, A. Diverse Single Stranded DNA Viruses Identified in Chicken Buccal Swabs, **Microorganisms**, [S.L.], v. 9, n. 12, p. 2602, 16 dez. 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9122602>.

CHUANG, L.; CHENG, Y.; YANG, C. Specific primer design for the polymerase chain reaction, **Biotechnology Letters**, [S.L.], v. 35, n. 10, p. 1541-1549, 21 jun. 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-013-1249-8>.

CLARK, D. P.; PAZDERNIK, N. J. **Biotechnology: applying the genetic revolution**. 2. ed. Saint Louis: Academic Cell, 2015. 833 p.

CUSTER, J. M.; WHITE, R.; TAYLOR, H.; SCHMIDLIN, K.; FONTENELE, R. S.; STANTON, D.; KRABERGER, S.; BRISKIE, J. V.; VARSANI, A. Diverse single-stranded DNA viruses identified in New Zealand (Aotearoa) South Island robin (*Petroica australis*) fecal samples, **Virology**, [S.L.], v. 565, p. 38-51, jan. 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2021.10.004>.

DAL BELLO, L. H. A. **Modelagem em Experimentos Mistura-Processo para Otimização de Processos Industriais**. 2010. 155 f. Tese (Doutorado) – Engenharia Industrial, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

DAYARAM, A.; POTTER, K. A.; MOLINE, A. B.; ROSENSTEIN, D. D.; MARINOV, M.; THOMAS, J. E.; BREITBART, M.; ROSARIO, K.; ARGÜELLO-ASTORGA, G. R.; VARSANI, A. High global diversity of cycloviruses amongst dragonflies, **Journal Of General Virology**, [S.L.], v. 94, n. 8, p. 1827-1840, 1 ago, 2013. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.052654-0>.

DENNIS, T. P. W.; FLYNN, P. J.; SOUZA, W. M. de; SINGER, J. B.; MOREAU, C. S.; WILSON, S. J.; GIFFORD, R. J. Insights into Circovirus Host Range from the Genomic Fossil Record, **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 92, n. 16, p. 1-9, 15 ago, 2018. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00145-18>.

FEHÉR, E.; KASZAB, E.; FORRÓ, B.; BALI, K.; MARTON, S.; LENGYEL, G.; BÁNYAI, K. Genome sequence of a mallard duck origin cyclovirus, DuACyV-1, **Archives Of Virology**, [S.L.], v. 162, n. 12, p. 3925-3929, 22 set, 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-017-3566-z>.

FREELAND, J. R. The importance of molecular markers and primer design when characterizing biodiversity from environmental DNA, **Genome**, [S.L.], v. 60, n. 4, p. 358-374, abr, 2017. <http://dx.doi.org/10.1139/gen-2016-0100>.

GADOIN E.; DESNUES, C.; MONTEIL-BOUCHARD, S.; BOUVIER, T.; AUGUET, J.; D'ORBCASTEL, E. R.; BETTAREL, Y. Fishing for the Virome of Tropical Tuna. **Viruses**, [S.L.], v. 13, n. 7, p. 1291, 2 jul. 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/v13071291>.

GAINOR, K.; BECKER, A. A. M. J.; MALIK, Y. S.; GHOSH, S. Detection and Complete Genome Analysis of Circoviruses and Cycloviruses in the Small Indian Mongoose (*Urva auropunctata*): identification of novel species, **Viruses**, [S.L.], v. 13, n. 9, p. 1700-1720, 2021a. <http://dx.doi.org/10.3390/v13091700>.

GAINOR, K; MALIK, Y, S; GHOSH, S, Novel Cyclovirus Species in Dogs with Hemorrhagic Gastroenteritis, **Viruses**, [S.L.], v. 13, n, 11, p. 2155, 2021b. <http://dx.doi.org/10.3390/v13112155>

GARIGLIANY, M.; HAGEN, R. M.; FRICKMANN, H.; MAY, J.; SCHWARZ, N. G.; PERSE, A.; JÖST, H.; BÖRSTLER, J.; SHAHHOSSEINI, N.; DESMECHT, D.; MBUNKAH, H. A.; DANIEL, A. M.; KINGSLEY, M. T.; CAMPOS, R. de M.; PAULA, V. S. de; RANDRIAMAMPIONA, N.; POPPERT, S.; TANNICH, E.; RAKOTOZANDRINDRAINY, R.; CADAR, D.; SCHIMIDTCHANASIT, J. Cyclovirus CyCV-VN species distribution is not limited to Vietnam and extends to Africa, **Scientific Reports**, [S.L.], v. 4, n, 1, p. 1-7, 18 dez. 2014. <http://dx.doi.org/10.1038/srep07552>.

GATTO, L.; CATANZARO, D.; MILINKOVITCH, M. C. Assessing the Applicability of the GTR Nucleotide Substitution Model Through Simulations. **Evolutionary Bioinformatics Online**, [s. l], n. 2, p. 145-155, 2006.

GEORGE, U.; SIMSEK, C.; FALEYE, T. O. C.; AROWOLO, O.; ORAGWA, A.; ADEWUMI, O. M.; MATTHIJNSSENS, J.; ADENIJI, J. A. Genome Sequences of Novel Members of Previously Described DNA and RNA Virus Families, Isolated from Feces of a Drill Monkey in Nigeria. **Microbiology Resource Announcements**, [S.L.], v. 9, n. 17, p. 1-3, 23 abr. 2020. <http://dx.doi.org/10.1128/mra.00092-20>.

GOMES, S. O.; MENDES, R. F. de M.; LIMA, P. S. da C. DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA DE ANELAMENTO COM MARCADORES ISSR EM ACESSOS DE PINHÃO-MANSO, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2, 2012, Belém, **Anais** [,,,], Belém: [S,E,], 2012, p. 1-5,

GREEN, E. **DNA Sequencing**. 2022. Disponível em: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/DNA-Sequencing>. Acesso em: 10 abr. 2022.

HATCHER, E. L.; ZHDANOV. S. A.; BAO, Y.; O. BLINKOVA; NAWROCKI, E. P.; OSTAPCHUCK, Y.; SCHÄFFER, A. A.; BRISTER, J. Rodney. Virus Variation Resource – improved response to emergent viral outbreaks. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 45, n. 1, p. 482-490, 28 nov. 2016.

HELMY, M.; AWAD, M.; MOSA, K. A. Limited resources of genome sequencing in developing countries: challenges and solutions, **Applied & Translational Genomics**, [S.L.], v. 9, n, 1, p. 15- 19, jun, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atg.2016.03.003>.

HUNG, J.; WENG, Z. Designing Polymerase Chain Reaction Primers Using Primer3Plus, **Cold Spring Harbor Protocols**, [S.L.], 2016, n, 9, p. 821-826, 29 ago, 2016. <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot093096>.

IDT (Coralville). **What are the criteria for choosing PCR amplicon length?** 2022. Disponível em: <https://www.idtdna.com/pages/support/faqs/what-are-the-criteria-for-choosing-pcr-amplicon-length-#:~:text=Ideal%20amplicon%20length%2Fsize%20depends,amplicon%20will%20be%20too%20short>. Acesso em: 8 abr. 2022.

ISLAM, S. U.; LIN, W.; WU, R.; LIN, C.; ISLAM, W.; ARIF, M.; DU, Z.; WU, Z. Complete genome sequences of three novel cycloviruses identified in a dragonfly (Odonata: anisoptera) from china. **Archives Of Virology**, [S.L.], v. 163, n. 9, p. 2569-2573, 17 maio 2018. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-018-3876-9>.

JOSHI, M.; DESHPANDE, J. D. POLYMERASE CHAIN REACTION: methods, principles and application, **International Journal Of Biomedical Research**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 81-97, 11 out, 2011. <http://dx.doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83>.

KALYAANAMOORTHY, S.; MINH, B. Q.; WONG, T. K. F.; VON HAESELER, A.; JERMIIN, L. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. **Nature Methods**, [S.L.], v. 14, n. 6, p. 587-589, 8 maio 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.4285>.

KAPLI, P.; YANG, Z.; TELFORD, M. J. Phylogenetic tree building in the genomic age. **Nature Reviews Genetics**, [S.L.], v. 21, n. 7, p. 428-444, 18 maio 2020. <http://dx.doi.org/10.1038/s41576-020-0233-0>.

KASZAB, E.; LENGYEL, G.; MARTON, S.; DÁN, Á.; BÁNYAI, K.; FEHÉR, E. Occurrence and genetic diversity of CRESS DNA viruses in wild birds: a hungarian study, **Scientific Reports**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-10, 27 abr, 2020. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-63795-x>.

KATOH, K.; MISAWA, K.; KUMA, K.; MIYATA, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast fourier transform. **Nucleic Acids Research**, [s. l], v. 30, n. 14, p. 3059-3066, 2002.

LEÃO, P. A. **PROVENTRICULITE VIRAL TRANSMISSÍVEL EM FRANGOS DE CORTE NATURALMENTE INFECTADOS**. 2019. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

LI, L.; KAPOOR, A.; SLIKAS, B.; BAMIDELE, O. S.; WANG, C.; SHAUKAT, S.; MASROOR, M. A.; WILSON, M. L.; NDJANGO, J. N.; PEETERS, M.; GROSS-CAMP, N. D.; MULLER, M. N.; HAHN, B. H.; WOLFE, N. D.; TRIKI, H.; BARTKUS, J.; ZAIDI, S. Z.; DELWART, E. Multiple Diverse Circoviruses Infect Farm Animals and Are Commonly Found in Human and Chimpanzee Feces, **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 84, n. 4, p. 1674-1682, 15 fev. 2010. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.02109-09>.

LI, L.; SHAN, T.; SOJI, O. B.; ALAM, M. M.; KUNZ, T. H.; ZAIDI, S. Z.; DELWART, E. Possible cross-species transmission of circoviruses and cycloviruses among farm animals. **Journal Of General Virology**, [S.L.], v. 92, n. 4, p. 768-772, 22 dez. 2010. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.028704-0>.

LIMA, D. A.; CIBULSKI, S. P.; TOCHETTO, C.; VARELA, A. P. M.; FINKLER, F.; TEIXEIRA, T. F.; LOIKO, M. R.; CERVA, C.; JUNQUEIRA, D. M.; MAYER, F. Q.; ROEHE, P. M. The intestinal virome of malabsorption syndrome-affected and

unaffected broilers through shotgun metagenomics, **Virus Research**, [S.L.], v. 261, p. 9-20, fev. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2018.12.005>.

LIU, Q.; WANG, H.; LING, Y.; YANG, S.; WANG, X.; ZHOU, R.; XIAO, Y.; CHEN, X.; YANG, J.; FU, W.; ZHANG, W.; QI, G. Viral metagenomics revealed diverse CRESS-DNA virus genomes in faeces of forest musk deer, **Virology Journal**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 1-9, 25 abr, 2020. <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-020-01332-y>.

LORENZ, T. C. Polymerase Chain Reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies, **Journal Of Visualized Experiments**, [S.L.], n. 63, p. 1-14, 22 maio 2012. <http://dx.doi.org/10.3791/3998>.

MALE, M. F.; KRABERGER, S.; STANTON, D.; KAMI, V.; VARSANI, A. Cycloviruses, gemycircularviruses and other novel replication-associated protein encoding circular viruses in Pacific flying fox (*Pteropus tonganus*) faeces, **Infection, Genetics And Evolution**, [S.L.], v. 39, p. 279-292, abr, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.02.009>.

MCLEOD, K.; UPTON, C. Virus Databases. **Reference Module In Biomedical Sciences**, [S.L.], p. 348-364, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.95728-3>.

MUBARAK, S. M. H.; AL-KOOFEE, D. A. F.; RADHI, O. A.; ISMAEL, J. M.; AL-ZUBAIDI, Z. F. An Optimization and Common Troubleshooting Solving in Polymerase Chain Reaction Technique. **Systematic Reviews In Pharmacy**, [s. l.], v. 2, n. 11, p. 427-436, nov. 2019.

OLIVEIRA, M. C. de S.; REGITANO, L. C. de A.; ROESE, A. D.; ANTHONISEN, D. G.; PATROCÍNIO, E. do; PARMA, M. M.; SCAGLIUSI, S. M. M.; TIMÓTEO, W. H. B.; JARDIM, S. N. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase**, São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007, 43 p.

PADILLA-RODRIGUEZ, M.; ROSARIO, K.; BREITBART, M. Novel cyclovirus discovered in the Florida woods cockroach *Eurycotis floridana* (Walker), **Archives Of Virology**, [S.L.], v. 158, n. 6, p. 1389-1392, 29 jan, 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-013-1606-x>.

PATTERSON, Q. M.; KRABERGER, S.; MARTIN, D. P.; SHERO, M. R.; BELTRAN, R. S.; KIRKHAM, A. L.; ALEAMOTU'A, M.; AINLEY, D. G.; KIM, S.; BURNS, J. M.; VARSANI, A. Circoviruses and cycloviruses identified in Weddell seal fecal samples from McMurdo Sound, Antarctica. **Infection, Genetics And Evolution**, [S.L.], v. 95, p. 105070, nov. 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105070>.

PEREIRA, F. Metagenomics: a gateway to drug discovery. In: MEENA, S. N.; NAIK, M. M. **Advances in Biological Science Research: a practical approach**. Nova Iorque: Academic Press, 2019. Cap. 28. p. 453-468.

PEREIRA, V. M. Y. **Montagem e análise de genomas a partir de metagenomas**. 2014. 28 f. TCC (Graduação) - Curso de Sistemas de Informação, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

PHAN, T. G.; LUCHSINGER, V.; AVENDAÑO, L. F.; DENG, X.; DELWART, E. Cyclovirus in nasopharyngeal aspirates of Chilean children with respiratory infections, **Journal Of General Virology**, [S.L.], v. 95, n. 4, p. 922-927, 1 abr, 2014. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.061143-0>.

PRADES, Y.; PIZARRO, R.; RUIZ, M.; MORENO, C.; AVENDAÑO, L. F.; LUCHSINGER, V. Cyclovirus detection in Chilean adults with and without community-acquired pneumonia. **Journal Of Medical Virology**, [S.L.], v. 93, n. 8, p. 4786-4793, 2 jun. 2021. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.27080>.

PRIFTI, E.; ZUCKER, J. The New Science of Metagenomics and the Challenges of Its Use in Both Developed and Developing Countries, In: MORAND, S.; DUJARDIN, J.; LEFAIT-ROBIN, R.; APIWATHNASORN, C, **Socio-Ecological Dimensions of Infectious Diseases in Southeast Asia, Singapura**: Springer, 2015, Cap. 12, p. 191-216, <https://doi.org/10.1007/978-981-287-527-3>.

RIGDEN, D. J.; FERNÁNDEZ, X. M. The 2021 Nucleic Acids Research database issue and the online molecular biology database collection, **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 1-9, 23 dez, 2020. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkaa1216>.

ROCHE. **Optimization of Reactions to Reduce Formation of Primer Dimers**. Alemanha: Roche, 1999. 4 p.

ROSARIO, K.; BREITBART, M.; HARRACH, B.; SEGALÉS, J.; DELWART, E.; BIAGINI, P.; VARSANI, A. Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus cyclovirus and removal of the genus gyrovirus, **Archives Of Virology**, [S.L.], v. 162, n. 5, p. 1447-1463, 2 fev. 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-017-3247-y>.

ROSARIO, K.; MARINOV, M.; STANTON, D.; KRABERGER, S.; WILTSHIRE, E. J.; COLLINGS, D. A.; WALTERS, M.; MARTIN, D. P.; BREITBART, M.; VARSANI, A. Dragonfly cyclovirus, a novel single-stranded DNA virus discovered in dragonflies (Odonata: anisoptera), **Journal Of General Virology**, [S.L.], v. 92, n. 6, p. 1302-1308, 1 jun, 2011. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.030338-0>.

ROSARIO, K.; METTEL, K. A.; BENNER, B. E.; JOHNSON, R.; SCOTT, C.; YUSSEFF-VANEGAS, S. Z.; BAKER, C. C. M.; CASSILL, D. L.; STORER, C.; VARSANI, A.; BREITBART, M. Virus discovery in all three major lineages of terrestrial arthropods highlights the diversity of single-stranded DNA viruses associated with invertebrates. **Peerj**, [S.L.], v. 6, p. 5761, 11 out. 2018. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.5761>.

SAUVAGE, V.; GOMEZ, J.; BARRAY, A.; VANDENBOGAERT, M.; BOIZEAU, L.; TAGNY, C. T.; RAKOTO, O.; BIZIMANA, P.; GUITTEYE, H.; CIRÉ, B. B.; SOUMANA, H.; TCHOMBA, B. S.; CARO, V.; LAPERCHE, S. High prevalence of cyclovirus Vietnam (CyCV-VN) in plasma samples from Madagascan healthy blood

donors, **Infection, Genetics And Evolution**, [S.L.], v. 66, p. 9-12, dez, 2018.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2018.09.002>.

SMITS, S. L.; ZIJLSTRA, E.; VAN HELLEMOND, J. J.; SCHAPENDONK, C. M.; BODEWES, R.; SCHÜRCH, A. C.; HAAGMANS, B. L.; OSTERHAUS, A. D. M. Novel Cyclovirus in Human Cerebrospinal Fluid, Malawi, 2010–2011. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 19, n. 9, p. 1511-1513, set, 2013.
<http://dx.doi.org/10.3201/eid1909.130404>.

VAN TAN, L.; VAN DOORN, H. R.; NGHIA, H. D. T.; CHAU, T. T. H.; TU, L. T. P.; VRIES, M. de; CANUTI, M.; DEIJS, M.; JEBBINK, M. F.; BAKER, S.; BRYANT, J. E.; THAM, N. T.; BKTRONG, N. T. T. C.; BONI, M. F.; LOI, T. Q.; PHUONG, L.T.; VERHOEVEN, J. T. P.; CRUSAT, M.; JEENINGA, R. E.; SCHULTSZ, C.; CHAU, N. V. V.; HIEN, T. T.; VAN DER HOEK, L.; FARRAR, J.; DEJONG, M. D. Identification of a New Cyclovirus in Cerebrospinal Fluid of Patients with Acute Central Nervous System Infections. **Mbio**, [S,L.], v. 4, n. 3, p. 1-10, jul, 2013.
<http://dx.doi.org/10.1128/mbio.00231-13>.

VELLA, A.; ALONSO, M A. Maximum likelihood estimation in the context of an optical measurement. **Progress In Optics**, [S.L.], p. 231-311, 2020.
<http://dx.doi.org/10.1016/bs.po.2019.11.007>.

VIEIRA, D. P. **Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações**. 2021. Disponível em: <https://www.imt.usp.br/wp-content/uploads/proto/protocolos/aula4.pdf>. Acesso em: 8 abr. 2022.

WAIN-HOBSON, S. The third Bond. **Nature**, [S.L.], v. 439, n. 7076, p. 539-539, fev. 2006. <http://dx.doi.org/10.1038/439539a>.

WALKER, P. J.; SIDDELL, S. G.; LEFKOWITZ, E. J.; MUSHEGIAN, A. R.; ADRIAENSSENS, E. M.; DEMPSEY, D. M.; DUTILH, B. E.; HARRACH, B.; HARRISON, R. L.; HENDRICKSON, R. C.; JUNGLEN, S.; KNOWLES, N. J.; KROPINSKI, A. M.; KRUPOVIC, M.; KUHN, J. H.; NIBERT, M.; ORTON, R. J.; RUBINO, L.; SABANADZOVIC, S.; SIMMONDS, P.; SMITH, D. B.; VARSANI, A. ZERBINI, F. M.; DAVISON, A. J. Changes to virus taxonomy and the Statutes ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2020), **Archives Of Virology**, [S,L.], v. 165, n. 11, p. 2737-2748, 20 ago, 2020.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00705-020-04752-x>.

WHEELER, D.; BHAGWAT, M. BLAST QuickStart: example-driven web-based blast tutorial, In: BERGAMN, N, H. **Comparative Genomics**, Totowa: Humana Press, 2007, Cap. 9, p. 1-27.

WU, Z.; YANG, L.; REN, X.; HE, G.; ZHANG, J.; YANG, J.; QIAN, Z.; DONG, J.; SUN, L.; ZHU, Y.; DU, J.; YANG, F.; ZHANG, S.; JIN, Q. Deciphering the bat virome catalog to better understand the ecological diversity of bat viruses and the bat origin of emerging infectious diseases. **The Isme Journal**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 609-620, 11 ago. 2015. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2015.138>.

YAN, T.; LI, G.; ZHOU, D.; YANG, X.; HU, L.; CHENG, Z, Novel Cyclovirus Identified in Broiler Chickens With Transmissible Viral Proventriculitis in China, **Frontiers In Veterinary Science**, [S.L.], v. 7, p. 1-6, 29 set, 2020. <http://dx.doi.org/10.3389/fvets.2020.569098>.

YANG, Z.; RANNALA, B. Molecular phylogenetics: principles and practice. **Nature Reviews Genetics**, [S.L.], v. 13, n. 5, p. 303-314, 28 mar, 2012. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3186>.

YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.; MADDEN, T. L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **Bmc Bioinformatics**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-11, 18 jun, 2012. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.

**ANEXO 1 – ESPÉCIES DE CYCLOVÍRUS RECONHECIDAS PELO ICTV E
SEUS ISOLADOS REPRESENTATIVOS**

Espécie	Abreviação	Número de acesso	Refseq
<i>Ant associated cyclovirus 1</i>	AntACyV1	MH545511	NC_040325
<i>Bat associated cyclovirus 1</i>	BatACyV1	HM228874	NC_034547
<i>Bat associated cyclovirus 2</i>	BatACyV2	JF938079	NC_038393
<i>Bat associated cyclovirus 3</i>	BatACyV3	JF938081	NC_038394
<i>Bat associated cyclovirus 4</i>	BatACyV4	JF938082	NC_038395
<i>Bat associated cyclovirus 5</i>	BatACyV5	HQ738637	NC_014929
<i>Bat associated cyclovirus 6</i>	BatACyV6	KJ641712	NC_038396
<i>Bat associated cyclovirus 7</i>	BatACyV7	KJ641740	NC_038397
<i>Bat associated cyclovirus 8</i>	BatACyV8	KJ641715	NC_038398
<i>Bat associated cyclovirus 9</i>	BatACyV9	KJ641720	NC_038399
<i>Bat associated cyclovirus 10</i>	BatACyV10	KM382270	NC_025792
<i>Bat associated cyclovirus 11</i>	BatACyV11	KJ641717	NC_038400
<i>Bat associated cyclovirus 12</i>	BatACyV12	KM382269	NC_025791
<i>Bat associated cyclovirus 13</i>	BatACyV13	KJ641728	NC_038401
<i>Bat associated cyclovirus 14</i>	BatACyV14	KT732785	NC_038402
<i>Bat associated cyclovirus 15</i>	BatACyV15	KT732786	NC_038403
<i>Bat associated cyclovirus 16</i>	BatACyV16	KT732787	NC_038404
<i>Bovine associated cyclovirus 1</i>	BoACyV1	HQ738634	NC_038405
<i>Capybara associated cyclovirus</i>	CapCyV	MK947371	-
<i>Chicken associated cyclovirus 1</i>	ChickACyV1	HQ738643	NC_038406
<i>Chicken associated cyclovirus 2</i>	ChickACyV2	MG846358	NC_040639
<i>Chimpanzee associated cyclovirus 1</i>	ChimpACyV1	GQ404849	NC_038407
<i>Cockroach associated cyclovirus 1</i>	CroACyV1	JX569794	NC_020206
<i>Dragonfly associated cyclovirus 1</i>	DfACyV1	JX185419	-
<i>Dragonfly associated cyclovirus 2</i>	DfACyV2	JX185422	NC_023869
<i>Dragonfly associated cyclovirus 3</i>	DfACyV3	JX185424	NC_023868
<i>Dragonfly associated cyclovirus 4</i>	DfACyV4	KC512916	NC_039214
<i>Dragonfly associated cyclovirus 5</i>	DfACyV5	JX185426	NC_023866
<i>Dragonfly associated cyclovirus 6</i>	DfACyV6	KC512918	NC_038408
<i>Dragonfly associated cyclovirus 7</i>	DfACyV7	KC512919	NC_038409
<i>Dragonfly associated cyclovirus 8</i>	DfACyV8	KC512920	NC_038410
<i>Duck associated cyclovirus 1</i>	DuACyV1	KY851116	NC_034977
<i>Feline associated cyclovirus 1</i>	FeACyV1	KM017740	NC_024700
<i>Goat associated cyclovirus 1</i>	GoACyV1	HQ738636	NC_014928
<i>Horse associated cyclovirus 1</i>	HoACyV1	KR902499	NC_038411
<i>Human associated cyclovirus 1</i>	HuACyV1	GQ404847	NC_038412
<i>Human associated cyclovirus 2</i>	HuACyV2	GQ404844	NC_036877
<i>Human associated cyclovirus 3</i>	HuACyV3	GQ404846	NC_038413
<i>Human associated cyclovirus 4</i>	HuACyV4	GQ404857	NC_038414
<i>Human associated cyclovirus 5</i>	HuACyV5	GQ404845	NC_038415
<i>Human associated cyclovirus 6</i>	HuACyV6	GQ404854	NC_038416
<i>Human associated cyclovirus 7</i>	HuACyV7	GQ404855	NC_038417
<i>Human associated cyclovirus 8</i>	HuACyV8	KF031466	NC_039215
<i>Human associated cyclovirus 9</i>	HuACyV9	KC771281	NC_021568
<i>Human associated cyclovirus 10</i>	HuACyV10	KF726984	NC_023874
<i>Human associated cyclovirus 11</i>	HuACyV11	KJ831064	NC_038418
<i>Human associated cyclovirus 12</i>	HuACyV12	KU053483	NC_032682
<i>Mouse associated cyclovirus 1</i>	MoACyV1	KT878836	NC_031755
<i>Rodent associated cyclovirus 1</i>	RoACyV1	KY370028	NC_055150
<i>Rodent associated cyclovirus 2</i>	RoACyV2	KY370026	NC_055148
<i>Spider associated cyclovirus 1</i>	SpACyV1	MH545516	NC_040324
<i>Squirrel associated cyclovirus 1</i>	SqACyV1	LC018134	NC_027530

ANEXO 2 – SEQUÊNCIAS DE CYCLOVÍRUS ASSOCIADOS A AVES

	Acesso (NCBI)	Nt	Referência (RefSeq)	Espécie de referência	País de coleta da amostra	Espécie de origem da amostra	Ano de coleta
1	MZ350965,1	1939	Não	-	Nova Zelândia	<i>Petroica australis</i>	2015
2	MN428468,1	1936	Não	-	China	<i>Gallus gallus</i>	2019
3	MZ350972,1	1933	Não	-	Nova Zelândia	<i>Petroica australis</i>	2015
4	MZ350968,1	1930	Não	-	Nova Zelândia	<i>Petroica australis</i>	2015
5	MZ350971,1	1929	Não	-	Nova Zelândia	<i>Petroica australis</i>	2015
6	MZ350964,1	1916	Não	-	Nova Zelândia	<i>Petroica australis</i>	2015
7	MZ350970,1	1914	Não	-	Nova Zelândia	<i>Petroica australis</i>	2015
8	MN379600,1	1910	Não	-	EUA	<i>Gallus gallus</i>	2017
9	MG846361,1	1905	Não	-	Brasil	<i>Gallus gallus</i>	2015
10	MG846362,1	1905	Não	-	Brasil	<i>Gallus gallus</i>	2015
11	MN379599,1	1902	Não	-	EUA	<i>Gallus gallus</i>	2017
12	MG254873,1	1902	Não	-	Hungria	<i>Podiceps cristatus</i>	2013
13	MG254874,1	1902	Não	-	Hungria	<i>Anas platyrhynchos</i>	2013
14	MG846359,1	1902	Não	-	Brasil	<i>Gallus gallus</i>	2015
15	MG846360,1	1902	Não	-	Brasil	<i>Gallus gallus</i>	2015
16	KY851116,1	1902	Sim (NC_034977,1)	<i>Duck associated cyclovirus 1 (DuACyV1)</i>	Hungria	<i>Anas platyrhynchos</i>	2013
17	MG254875,1	1899	Não	-	Hungria	<i>Anser erythropus</i>	2013
18	MG254876,1	1899	Não	-	Hungria	<i>Podiceps cristatus</i>	2013
19	MZ350967,1	1882	Não	-	Nova Zelândia	<i>Petroica australis</i>	2015
20	KF031471,1	1856	Não	-	Vietnã	<i>Gallus gallus</i>	2011
21	MN379598,1	1847	Não	-	EUA	<i>Gallus gallus</i>	2017
22	MZ350973,1	1846	Não	-	Nova Zelândia	<i>Petroica australis</i>	2015
23	MZ350969,1	1829	Não	-	Nova Zelândia	<i>Petroica australis</i>	2015
24	MZ350966,1	1806	Não	-	Nova Zelândia	<i>Petroica australis</i>	2015
25	MG846358,1	1778	Sim (NC_040639,1)	<i>Chicken associated cyclovirus 2 (ChickACyV2)</i>	Brasil	<i>Gallus gallus</i>	2015
26	HQ738643,1	1760	Sim (NC_038406,1)	<i>Chicken associated cyclovirus 1 (ChickACyV1)</i>	Nigéria	<i>Gallus gallus</i>	2009
27	HQ738644,1	1760	Não	-	Nigéria	<i>Gallus gallus</i>	2009
28	KF031491,1	669	Não	-	Vietnã	<i>Anatidae</i>	2011
29	KF031489,1	494	Não	-	Vietnã	<i>Gallus gallus</i>	2011
30	KF031490,1	494	Não	-	Vietnã	<i>Gallus gallus</i>	2011

31	KF031487,1	494	Não	-	Vietnã	<i>Anatidae</i>	2011
32	KF031488,1	494	Não	-	Vietnã	<i>Anatidae</i>	2011
33	KF031492,1	438	Não	-	Vietnã	<i>Anatidae</i>	2011
34	GQ404977,1	400	Não	-	Nigéria	<i>Gallus gallus</i>	2009
35	GQ404951,1	390	Não	-	Nigéria	<i>Gallus gallus</i>	2009
36	GQ404963,1	389	Não	-	Nigéria	<i>Gallus gallus</i>	2009
37	GQ404957,1	388	Não	-	Nigéria	<i>Gallus gallus</i>	2009
38	GQ404970,1	388	Não	-	Nigéria	<i>Gallus gallus</i>	2009
39	GQ404950,1	387	Não	-	Nigéria	<i>Gallus gallus</i>	2009
40	GQ404953,1	387	Não	-	Nigéria	<i>Gallus gallus</i>	2009
41	GQ404966,1	387	Não	-	Nigéria	<i>Gallus gallus</i>	2009
42	GQ404954,1	386	Não	-	Nigéria	<i>Gallus gallus</i>	2009
43	GQ404968,1	386	Não	-	Nigéria	<i>Gallus gallus</i>	2009
44	GQ404949,1	385	Não	-	Nigéria	<i>Gallus gallus</i>	2009
45	GQ404956,1	385	Não	-	Nigéria	<i>Gallus gallus</i>	2009
46	GQ404961,1	379	Não	-	Nigéria	<i>Gallus gallus</i>	2009
47	GQ404952,1	378	Não	-	Nigéria	<i>Gallus gallus</i>	2009
48	GQ404962,1	378	Não	-	Nigéria	<i>Gallus gallus</i>	2009
49	GQ404965,1	370	Não	-	Nigéria	<i>Gallus gallus</i>	2009
50	GQ404971,1	362	Não	-	Nigéria	<i>Gallus gallus</i>	2009
51	GQ404958,1	356	Não	-	Nigéria	<i>Gallus gallus</i>	2009
52	GQ404967,1	348	Não	-	Nigéria	<i>Gallus gallus</i>	2009
53	GQ404978,1	342	Não	-	Nigéria	<i>Gallus gallus</i>	2009
54	GQ404976,1	336	Não	-	Nigéria	<i>Gallus gallus</i>	2009
55	GQ404975,1	318	Não	-	Nigéria	<i>Gallus gallus</i>	2009