



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

LIGIA PINHO CUCCATO

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE HERPESVÍRUS
OBTIDOS DE MORCEGOS**

CAMPINAS

2018

LIGIA PINHO CUCCATO

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE HERPESVÍRUS
OBTIDOS DE MORCEGOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências, na área de Clínica Médica

ORIENTADOR: Prof^a Dr^a Clarice Weis Arns

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA LIGIA PINHO CUCCATO, E ORIENTADO
PELA PROF^a. DR^a. CLARICE WEIS ARNS.

CAMPINAS
2018

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

LIGIA PINHO CUCCATO

ORIENTADOR: Profª Dra. Clarice Weis Arns

MEMBROS:

- 1. PROF. DR. CLARICE WEIS ARNS**
- 2. PROF. DR. SANDRA CECILIA BOTELHO COSTA**
- 3. PROF. DR. MARIA ANGELA ORSI**

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 23/11/2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 4570/2018

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

C892i Cuccato, Ligia Pinho, 1990-
Identificação e caracterização molecular de Herpesvirus obtidos de morcegos / Ligia Pinho Cuccato. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Clarice Weis Arns.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Chiroptera*. 2. Saúde Única. 3. *Herpesviridae*. I. Arns, Clarice Weis, 1956-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Identification and molecular characterization of Herpesvirus obtained of bats

Palavras-chave em inglês:

Chiroptera

One Health

Herpesviridae

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Clarice Weis Arns [Orientador]

Sandra Cecilia Botelho Costa

Maria Angela Orsi

Data de defesa: 23-11-2018

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais e ao meu irmão, pelo constante incentivo, apoio e por todo amor, carinho e dedicação que me permitiram esta realização.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus por sempre me permitir ir mais longe. Sou muito grata.

Agradeço muito aos meus pais Francisco e Guaciara e ao meu irmão Renato, pelo amor incondicional, por estarem sempre presentes e dispostos a me auxiliar, por me encorajarem a ir em busca dos meus sonhos e objetivos. Obrigada pelo incessante incentivo, pela dedicação, pela união e, por nunca medirem esforços para proporcionar o melhor para nossa família.

Quero agradecer à Professora Clarice, pela orientação, pelo acolhimento, pela confiança e incentivo que me permitiram desenvolver esta pesquisa. Obrigada pela oportunidade.

Gostaria de agradecer também a todos do Laboratório de Virologia Animal ou que por lá passaram enquanto eu desenvolvia este trabalho. Ao Paulo Simas e Leonardo, pelos ensinamentos técnicos, pelo auxílio no desenvolvimento e, contribuições para esta dissertação. A Ana Paula, Gabriela, Ana Caroline, por terem me ajudado em várias etapas, pelas correções do texto e por tudo que me ensinaram. Ao Matheus, Raíssa, Karina, Débora, Ana Lúcia por me auxiliarem durante o período em que desenvolvia este projeto. Obrigada a todos do LVA pelos momentos de aprendizado e de descontração, pela ajuda durante os experimentos, pelo companheirismo e pelos conselhos. Obrigada aos funcionários e professores do Instituto de Biologia e da Faculdade de Ciências Médicas pelo acolhimento, ensino e auxílio nos mais variados momentos durante a pós-graduação.

Obrigada ao Prof^o Dr. Paulo Anselmo Nunes Felipe e ao Fábio André Facco Jacomassa, pela coleta e identificação das amostras.

Agradeço à equipe de genômica do Lactad - Laboratório Central de Tecnologia de Alto Desempenho – UNICAMP, pelas contribuições na etapa de sequenciamento desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) – UNICAMP pela possibilidade de concluir esta dissertação e o curso de pós-graduação.

Obrigada à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES) pela bolsa de Mestrado e à Fundação de Desenvolvimento da UNICAMP (FUNCAMP), pelo apoio.

Agradeço a todos os meus familiares e amigos, pelo apoio, carinho, palavras de incentivo e pela torcida. Sou muito grata por tê-los em minha vida! Gratidão também à Professora Dra. Anna Monteiro Correia Lima por ter me incentivado a cursar o mestrado na UNICAMP.

Muito Obrigada!

RESUMO

Os morcegos destacam-se como importantes agentes transmissores de patógenos infecciosos. Características destes animais, como capacidade de voar, elevada difusão geográfica, diversidade de espécies, além de boa mobilidade espacial e interação com outras populações animais, aproximam o contato entre humanos e morcegos e podem promover a transmissão de patógenos, incluindo vírus. Neste contexto, os herpesvírus são amplamente disseminados em humanos e outros animais. Os vírus desta família podem causar desde lesões em mucosas até quadros mais graves, como encefalites, meningites ou infecções disseminadas. Informações relacionadas à distribuição dos vírus da família *Herpesviridae* em morcegos ainda são pouco caracterizadas. O objetivo deste estudo foi identificar herpesvírus em amostras de suabe oral e anal de morcegos de várias espécies, de dois municípios diferentes e fazer a caracterização molecular destas amostras, buscando-se identificar relações com estirpes circulantes na natureza. Foram analisadas 320 amostras de populações de morcegos dos municípios de Campinas e Rio Claro no estado de São Paulo, por Pan-herpesvírus PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Foram utilizados *primers* degenerados direcionados para amplificar uma região conservada do gene da DNA Polimerase de herpesvírus. Foi utilizado um formato de *nested-PCR* capaz de amplificar fragmentos de 21 espécies de herpesvírus (13 vírus animais e oito vírus humanos), das subfamílias *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*. As amostras identificadas como positivas na PCR foram submetidas à técnica de sequenciamento *Sanger*, seguido de análise filogenética pelos métodos de *Maximum Likelihood* e *Neighbor-Joining*. No total, 69 sequências foram compatíveis com herpesvírus, após o sequenciamento. A maioria das amostras positivas eram provenientes de suabes orais. Algumas amostras apresentaram relação filogenética com herpesvírus da subfamília *Gammaherpesvirinae*.

Palavras Chave: *Chiroptera*; Ecoepidemiologia; *Herpesviridae*; Saúde Única

ABSTRACT

Bats stand out as important agents transmitting pathogens. Characteristics of these animals, such as high geographical diffusion, species diversity, good spatial mobility and interaction with other populations, become closer the contact between humans and bats, and can promote the transmission of infectious pathogens, including viruses. Herpesviruses are widely disseminated in humans and other animals. The viruses of this family can cause from mucosal lesions to more serious conditions, such as encephalitis, meningitis or disseminated infections. Information related to the distribution of *Herpesviridae* viruses in bats is still poorly characterized. This study aims to identify herpesvirus in oral and anal swab samples of various species of bats from two different municipalities and to characterize these samples in order to identify relationships with circulating strains in nature. A total of 320 samples from bat populations of the municipalities of Campinas and Rio Claro in the São Paulo state were analyzed by Pan-herpesvirus PCR (Polymerase Chain Reaction). Degenerate primers targeted to amplify a conserved region of the DNA Polymerase herpesvirus gene were used. A nested-PCR format capable of amplifying fragments of 21 herpesvirus species (13 animal and eight human viruses), from the subfamilies *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* and *Gammaherpesvirinae* was used. Samples identified as positive in the PCR were submitted to the Sanger sequencing technique, followed by phylogenetic analysis by the Maximum Likelihood and Neighbor-Joining methods. In total, 69 sequences were compatible with herpesvirus after sequencing. Most of the positive samples came from oral swabs. Some samples showed a phylogenetic relationship with herpesvirus of the subfamily *Gammaherpesvirinae*.

Keywords: *Chiroptera*; Ecoepidemiology; *Herpesviridae*; One Health

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1: Distribuição geográfica e hábito alimentar de morcegos em relação à família.....	17
Figura 1: Vírions da família <i>Herpesviridae</i>	23
Quadro 2: Visão geral dos morcegos envolvidos no estudo.....	29
Figura 2: Fotografia digital do gel de eletroforese para análise dos <i>amplicons</i>	31
Figura 3: Árvore filogenética molecular pelo método de <i>Maximum Likelihood</i>	38
Figura 4: Árvore filogenética molecular pelo método de <i>Neighbor Joining</i>	39
Figura 5: Árvore filogenética molecular pelo método de <i>Maximum Likelihood</i>	40
Figura 6: Árvore filogenética molecular pelo método de <i>Maximum Likelihood</i>	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: <i>Primers</i> utilizados nas duas etapas da nPCR.....	30
Tabela 2: Visão geral das espécies de morcegos envolvidas no estudo em relação ao número de amostras positivas e o total de amostras.....	34
Tabela 3: Número de amostras positivas em relação aos anos de coleta das amostras.....	35
Tabela 4: Número de amostras positivas em relação aos locais de coleta.....	35
Tabela 5: Número de amostras positivas em relação as espécies de morcegos e os locais em que foram coletados.....	36
Tabela 6: Número de amostras positivas em relação ao hábito alimentar dos morcegos do estudo.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BoHV-1 - Herpesvirus Bovino tipo 1

bp – pares de base (do inglês *base pair*)

DNA - Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*)

dNTP – Desoxinucleotídeo Trifosfato

EBV - Vírus Epstein-Barr

FeHV-1 - Herpesvírus felino tipo 1

GaHV-1 - Herpesvírus galídeo tipo 1

GaHV-2 - Herpesvírus galídeo tipo 2

HHV-1 - Herpesvírus humano 1

HHV-2 - Herpesvírus humano 2

HHV-5 - Herpesvírus humano 5

KSHV - Vírus associado ao Sarcoma de Kaposi

mA – miliampere

MEM - Meio Mínimo Essencial

MERS - Síndrome Respiratória do Oriente Médio (do inglês *Middle East Respiratory Syndrome*)

mM – milimolar

ng – nanograma

nPCR - *Nested* PCR

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)

pMol – picomol

RNA - Ácido Ribonucleico (do inglês, *Ribonucleic Acid*)

SARS - Síndrome Respiratória Aguda Severa (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome*)

SuHV-1 - Herpesvírus suíno tipo 1

U – unidade

V – volt

VZV - Vírus Varicela-Zoster

μL – microlitro

μM – micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Importância Epidemiológica dos Morcegos nas Doenças Virais	15
1.2 Herpesvirus	20
1.3 Pan-Herpesvírus PCR	26
1.4 Sequenciamento de Nucleotídeos	27
1.5 Análise Filogenética	27
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivos Gerais	28
2.2 Objetivos Específicos	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Origem e características das amostras	28
3.2 Processamento das Amostras	29
3.3 Extração do DNA	29
3.4 Pan-herpesvírus PCR para detecção do gene da DNA Polimerase de herpesvírus	30
3.5 Sequenciamento	32
3.6 Estudos de Evolução Molecular	32
3.7 Análises filogenéticas	33
4 RESULTADOS	34
5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÃO	49
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXO	57

1 INTRODUÇÃO

A intervenção humana em ambientes naturais promove a modificação dos ecossistemas, alterando a distribuição ambiental dos microrganismos patogênicos (1). O relevante crescimento populacional, juntamente com as alterações climáticas e a intensificação das práticas agrícolas, estreitou o contato entre humanos e animais, facilitando a dispersão de patógenos e propagação de doenças infecciosas zoonóticas (2). As doenças infecciosas apresentam grande relevância para a saúde humana e para a economia. Mais de 75% das doenças infecciosas emergentes são ocasionadas por patógenos zoonóticos (3,4), e, entre 60% a 80% destas infecções originaram-se de animais selvagens (5). As zoonoses que tem etiologia viral representam um importante risco tanto à saúde pública quanto à segurança mundial (4).

O conceito *One Health* consiste da integração entre os campos da medicina humana, medicina veterinária e ciências ambientais. O objetivo desta iniciativa é obter condições adequadas de saúde para humanos, animais e a preservação do meio ambiente, através de ações para reduzir ameaças de doenças infecciosas, garantir alimentos e bebidas seguros, além da gestão eficaz e responsável dos recursos naturais (3).

Os microrganismos infecciosos se restringem a um número limitado de espécies hospedeiras, devido à barreira de espécies. A introdução, acidental ou intencional, de uma espécie animal no nicho ecológico de outra pode romper essa barreira, possibilitando a transmissão de patógenos para outras espécies. A ausência de adaptações genéticas a este novo agente pode provocar doença grave no novo hospedeiro (6).

A transmissão de microrganismos infecciosos e a incidência de doenças podem ser influenciadas pela redução da biodiversidade nos ecossistemas. Atualmente, percebe-se uma correlação entre a perda de biodiversidade, o aumento da transmissão de patógenos e a incidência de doenças, principalmente devido a mudanças comportamentais ou com relação à abundância de hospedeiros, vetores e parasitas (2).

Agentes virais podem saltar de uma espécie para outra em razão de diferenças entre a riqueza de vírus disponíveis, oportunidade de contato com

humanos, tendência a exibir sinais clínicos que exacerbam transmissão viral, fatores ecológicos, comportamentais e de história de vida (2,4). Uma das hipóteses é que a transmissão de microrganismos ocorra entre espécies filogeneticamente próximas. Todavia, ressalta-se a importância de animais com relação filogenética distante, mas com atributos que permitem abrigar e transmitir novos agentes (6). Patógenos podem persistir por períodos prolongados em hospedeiros sub-ótimos, circulando entre diferentes espécies (7).

1.1 Importância Epidemiológica dos Morcegos nas Doenças Virais

Diversas espécies animais podem abrigar uma grande variedade de vírus. Os morcegos destacam-se como reservatórios potenciais para vários vírus zoonóticos (4,8,9). Desse modo, são animais importantes para estudos relacionados à saúde pública, uma vez que podem atuar como sentinelas para várias doenças (10). Os morcegos pertencem à classe *Mammalia*, ordem *Chiroptera* (*cheir*: mão e *pteron*: asa), palavra grega que significa mãos em formato de asas (11,12). Esta é uma das ordens mais abundante e diversificada, representando aproximadamente 25% das 5500 espécies de mamíferos (9,11), sendo o segundo grupo mais populoso em espécies, atrás apenas dos roedores (11,12).

Os quirópteros são um grupo amplamente distribuído geograficamente, não sendo encontrados apenas nas regiões polares Norte e Sul (6,13). Há aproximadamente 1300 espécies de morcegos difundidos pelo mundo, distribuídas em 175 gêneros e 20 famílias (12,14). Os morcegos são a segunda ordem de mamíferos com maior difusão pelo mundo, ficam atrás apenas dos primatas (13). No Brasil encontram-se nove famílias, 68 gêneros e 178 espécies (15).

Os morcegos participam da dinâmica dos ecossistemas naturais, ao voarem longas distâncias em busca de alimento, as espécies frugívoras atuam como dispersores de sementes e as espécies nectarívoras como polinizadoras de plantas. Além disso, as espécies carnívoras, insetívoras e pscívoras atuam na regulação de populações animais. O guano excretado pelos morcegos pode ter ação como fertilizante, matéria-prima na fabricação de medicamentos, sabão e combustível (10,16).

Anteriormente, a ordem *Chiroptera* dividia-se em duas subordens: *Microchiroptera* e *Megachiroptera* (6,8,12). Contudo, uma nova proposta taxonômica

baseada em estudos moleculares propõe a divisão nas subordens: *Yinpterochiroptera* e *Yangochiroptera* (11,12). Os *Yinpterochiroptera* são morcegos frugívoros e não apresentam ecolocalização. Constituem essa subordem cinco famílias de morcegos da antiga subordem *Microchiroptera* (*Craseonycteridae*, *Hipposideridae*, *Rhinolophidae*, *Rhinopomatidae* e *Megadermatidae*) e a subordem *Megachiroptera* (família *Pteropodidae*). Os *Yangochiroptera* alimentam-se de insetos, pequenos mamíferos, peixes ou sangue, são menores, possuem habilidade de ecolocalização e, compreendem 12 famílias da antiga subordem *Microchiroptera* (9,11). O hábito alimentar dos morcegos em relação à distribuição geográfica e as famílias estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1: Distribuição geográfica e hábito alimentar de morcegos em relação à família

Subordem	Família (número de espécies)	Distribuição	Hábito alimentar
<i>Yangochiroptera</i>	<i>Cistugidae</i> (2)	África do Sul	Insetos
	<i>Emballonuridae</i> (54)	Regiões tropicais Ásia, África e Américas	Insetos, raro frutas
	<i>Furipteridae</i> (2)	Região neotropical	Insetos
	<i>Miniopteridae</i> (29)	Região tropical e subtropical do velho mundo	insetos
	<i>Molossidae</i> (113)	Regiões tropicais Ásia, África e Américas	insetos
	<i>Mormoopidae</i> (10)	Região neotropical	Insetos
	<i>Mystacinidae</i> (2)	Nova Zelândia	Insetos, outros artrópodes; néctar e frutas
	<i>Myzopodidae</i> (2)	Madagascar	Insetos
	<i>Natalidae</i> (12)	Região neotropical	Insetos
	<i>Noctilionidae</i> (2)	Região neotropical	Insetos e peixes
	<i>Nycteridae</i> (16)	Região tropical do velho mundo	Insetos, aranhas, escorpiões e pequenos vertebrados
	<i>Phyllostomidae</i> (204)	Região neotropical	Animais, plantas
	<i>Vespertilionidae</i> (455)	Cosmopolita	Insetos, outros artrópodes, pequenos pássaros e peixes
	<i>Thyropteridae</i> (5)	Região neotropical	Insetos
<i>Yinpterochiroptera</i>	<i>Craseonycteridae</i> (1)	Tailândia, Birmânia	Insetos, aranhas
	<i>Hipposideridae</i> (9)	Região tropical e subtropical do velho mundo	Insetos
	<i>Megadermatidae</i> (5)	Região tropical do velho mundo	Artrópodes, pequenos vertebrados
	<i>Pteropodidae</i> (198)	Região tropical e subtropical do velho mundo	Frutas, néctar e pólen
	<i>Rhinolophidae</i> (97)	Região tropical e subtropical do velho mundo	Insetos
	<i>Rhinopomatidae</i> (97)	Região tropical do velho mundo	Insetos

Adaptado de (12).

Os morcegos habitam diversos nichos ecológicos, em razão de suas adaptações morfológicas e hábitos alimentares variados, podendo ser encontrados em ambientes distintos, como cavernas, minas, árvores, fendas ou em edificações

como túneis, forros de telhados e casas tanto urbanas quanto rurais, em complexa relação de interdependência com o meio (11,12). Os hábitos peridomésticos destes animais aproximam o contato de humanos e animais domésticos com suas excretas (10,17). Além disso, fatores como a invasão de habitats e o uso de morcegos como alimento tem estreitado o contato entre humanos e morcegos (10).

A capacidade de voo ativo é uma particularidade dos morcegos que os diferem de outros mamíferos. Esta importante característica permite a ampla distribuição geográfica destes animais (12), além de favorecer a mobilidade entre tipos diferentes de ambientes e contribuir para sua persistência em locais, que a ocorrência de mamíferos é limitada (16). A evolução do voo também pode estar relacionada com algumas peculiaridades do sistema imunológico dos morcegos. Esses animais apresentam ossos ocos e, por essa razão, não apresentam medula óssea para a produção de células B do sistema imune, como outros mamíferos (11). Esse pode ser um dos aspectos que permitem que os morcegos abriguem inúmeros vírus sem apresentar doença clínica evidente (18). A habilidade de voo também possibilita que os morcegos transportem vírus ou outros patógenos para locais distantes (10,11).

Os morcegos são animais notívagos, a maioria das espécies permanece durante o dia em poleiros e, saem ao anoitecer para buscar alimento. Os animais que residem em regiões tropicais permanecem ativos durante todo o ano. No entanto, os morcegos de regiões temperadas podem migrar ou tem capacidade de manter um estado de torpor diário ou hibernação sazonal, quando as condições ambientais estão desfavoráveis (10–12,17). Durante a hibernação, os morcegos reduzem a temperatura corporal e a taxa metabólica para conservar energia, suprimindo a resposta imune e replicação viral (6,11,19), o que permite que estes animais transportem e disseminem uma grande quantidade de vírus sem sinal de doença clínica evidente (19,20).

Os morcegos são animais com característica social gregária, que podem viver em grupos de centenas a milhares de indivíduos (6,10,21). Essa grande densidade populacional de algumas colônias facilita a rápida disseminação de patógenos entre os morcegos (10,17). Os quirópteros apresentam hábito alimentar diversificado, podendo ser classificados em insetívoros, frugívoros, nectarívoros, carnívoros, onívoros e hematófagos (6).

Geralmente, a expectativa de vida em mamíferos é proporcional ao tamanho corporal, isto é, animais maiores são mais longevos, enquanto animais menores vivem menos tempo. Contudo, os morcegos diferem a esta regra, podendo viver aproximadamente três vezes mais, em média, do que outros mamíferos com tamanho corporal equivalente. A longevidade dos morcegos é variável entre as espécies. A maioria das espécies pode viver entre 10 e 20 anos, porém algumas espécies podem chegar até os 30 anos de idade (11,12). O longo período de vida destes mamíferos também pode contribuir para a dispersão viral (11).

Os morcegos têm sido identificados como reservatório natural de patógenos emergentes e reemergentes (10,21,22), sendo importantes hospedeiros de vírus zoonóticos do gênero *Lyssavirus*, da família *Paramyxoviridae* - gênero *Henipavirus* - espécies *Hendra* e *Nipah*. Assim como, *Ebolavirus*, *Marburgvirus*, Coronavírus - Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS, do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome*) e Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS, do inglês *Middle East Respiratory Syndrome*) (5,9,18,23), *Hepadnaviridae* – vírus da hepatite B e *Hepacivirus* – vírus da hepatite C (18).

Aproximadamente 130 tipos de vírus já foram detectados em morcegos, incluindo mais de 60 espécies de vírus zoonóticos, entre os quais estão vírus muito patogênicos aos humanos (24). Foram isolados vírus das famílias *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Coronaviridae*, *Caliciviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Arenaviridae*, *Herpesviridae*, *Picornaviridae*, *Adenoviridae*, *Filoviridae*, *Poxviridae*, *Bornaviridae*, *Astroviridae*, *Parvoviridae* entre outras, a partir de diferentes espécies de morcegos em todo o mundo (9,12,20,25,26).

Os morcegos abrigam mais vírus zoonóticos por espécie em comparação com os roedores (10) e, a maior parte destas zoonoses apresenta alta patogenicidade para os humanos (18). A grande diversidade de espécies de morcegos pode ser propícia para abrigar uma gama de vírus emergentes (6,11). Na escala evolutiva, os morcegos são considerados mamíferos antigos, com evidências de que tenham surgido há cerca de 80 milhões de anos e sofreram especiação antes do desenvolvimento da maioria dos mamíferos modernos (14,27). Possivelmente, essa longa história evolutiva possibilitou que uma variedade de espécies virais tenha coevoluído com os morcegos e, tornando-os seus reservatórios naturais (11). Por esse motivo, podem usar receptores celulares

altamente conservados, o que elevaria a capacidade de transmissão viral para outros animais (5,10).

Soma-se a estas características, a capacidade dos morcegos de voarem longas distâncias e o fato de ocuparem grandes faixas geográficas. Diversas espécies podem ter hábitos migratórios ou nômades em decorrência da disponibilidade de alimentos em determinada região (28). Algumas espécies de morcegos podem detectar a posição e distância de animais ou objetos no ambiente através da capacidade de ecolocalização que desenvolveram. No entanto, a vibração da laringe para emitir as ondas ultrassônicas pode gerar aerossóis o que pode facilitar a transmissão de patógenos entre morcegos e outros animais (11).

Ao longo da história evolutiva, diversos vírus coevoluíram com as espécies de morcegos (6). Para estabelecer uma relação de reservatório no hospedeiro, os vírus precisam estabelecer uma interação de equilíbrio entre a resposta do hospedeiro e a replicação viral. Pode ser possível que os morcegos e alguns vírus tenham se adaptado, e estabelecido um relacionamento que limita a doença, mas também diminui as respostas antivirais (17).

1.2 Herpesvírus

A ordem *Herpesvirales* abriga várias espécies de vírus, os quais podem infectar diversas espécies animais, como humanos, mamíferos, aves, répteis, insetos, peixes e moluscos (29). Estes vírus são responsáveis por um amplo espectro de doenças (29–31). Os herpesvírus diferem-se morfolologicamente de todos os outros vírus (29). São vírus antigos que demonstram afinidade por hospedeiros específicos. Contudo, compartilham potencial para romper a barreira de espécies e infectar novos hospedeiros, devido à origem evolutiva similar (30,31). Além disso, a capacidade de causar infecções latentes duradouras e o potencial oncogênico os torna únicos entre outros vírus (30). Uma característica marcante dos herpesvírus é a capacidade de produzir infecções latentes no hospedeiro e de se reativar sob determinadas circunstâncias (32).

Os herpesvírus apresentam elevado nível de adaptação aos seus hospedeiros naturais por provavelmente terem coevoluído com eles. Diferentes herpesvírus compartilham algumas características e estruturas proteicas, sugerindo que estes vírus se originaram de um ancestral comum e podem ter evoluído através

de suas espécies hospedeiras (31,33,34). Como exemplo, o herpesvírus suíno tipo 1 possui determinadas regiões do genoma muito similares ao genoma do herpesvírus humano tipo 1 (31,33).

Os herpesvírus são amplamente distribuídos geograficamente e podem provocar doença na maioria dos animais domésticos (31,34). São vírus infecciosos que possuem características potenciais para promover epizootias entre espécies distantes. Os herpesvírus apresentam um amplo espectro de doenças e, podem provocar complicações graves, principalmente em indivíduos imunocomprometidos como portadores de vírus da Imunodeficiência Humana (HIV, do inglês *Human Immunodeficiency virus*), receptores de transplantes de órgãos ou medula óssea (32). Nos humanos, os Herpesvírus humano 1 e 2 (HHV1 e HHV2), vírus Varicela Zoster (VZV), vírus Epstein-Barr (EBV), herpesvírus associado ao Sarcoma de Kaposi (KSHV), Citomegalovírus (HHV-5), Herpesvírus humano 6A, 6B, 7 e 8 estão relacionados a doenças (30).

O Herpesvírus humano 1 e 2 e o vírus Varicela-Zoster provocam um quadro clínico de úlceras mucocutâneas, encefalite, ceratite e, em recém-nascidos podem causar doença grave. A primeira infecção pelo vírus Varicela-Zoster causa a doença conhecida como varicela. A reativação viral leva ao quadro de herpes zoster. Em pacientes imunocomprometidos, podem causar doença grave e generalizada. O Citomegalovírus geralmente tem curso assintomático na primeira infecção, contudo, é o vírus mais frequente em casos de infecções congênitas, além de provocar graves complicações em pacientes imunocomprometidos. O Herpesvírus humano 6 é responsável por causar um quadro de exantema ou roséola em crianças. Em pacientes pós-transplantados, os Herpesvírus humano 6 e 7 podem reativar causando sérias complicações como, encefalites e pneumonite intersticial. O vírus Epstein-Barr causa a mononucleose além de neoplasias, sendo preocupante em indivíduos pós-transplantados por levar a quadros de síndrome linfoproliferativa. O herpesvírus associado ao Sarcoma de Kaposi causa o Sarcoma de Kaposi, linfoma e síndrome linfoproliferativas, sobretudo em pacientes portadores de HIV (35)

As doenças mais importantes causadas por herpesvírus em animais incluem Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (BoHV-1), Rinotraqueíte Infecciosa Felina (FeHV-1), Doença de Marek nas aves (GaHV-2), Laringotraqueíte Infecciosa aviária (GaHV-1), Doença de Aujeszky ou Pseudo-Raiva em Suínos (SuHV-1). O herpesvírus suíno infecta além de suínos, ovinos, bovinos, cães, gatos e guaxinins (30,31).

A ordem *Herpesvirales* é distribuída taxonomicamente em três famílias: família *Herpesviridae*, que contém herpesvírus de mamíferos, aves e répteis; família *Alloherpesviridae*, que inclui herpesvírus de peixes ósseos e anfíbios; e a família *Malacoherpesviridae*, que abriga herpesvírus encontrados em animais invertebrados (29,31,34,36).

A família *Herpesviridae* é dividida em três subfamílias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammapherpesvirinae*. Os vírus dessa família são agrupados em gênero, de acordo com homologia das sequências de DNA, similaridades na estrutura e organização genômica e relação antigênica (31). Mesmo apresentando variações genéticas, compartilham propriedades semelhantes, como a capacidade de produzir infecções latentes duradouras, sem causar doença grave ou mortalidade nos hospedeiros naturais, o que permite que esses vírus sejam facilmente transmitidos entre os hospedeiros (31,34,37).

Os alfa herpesvírus apresentam gama variável de hospedeiros, o ciclo replicativo é curto, sendo menor que 24 horas, destroem rapidamente as células de cultivo. Estes vírus primariamente estabelecem infecção latente em neurônios dos gânglios sensoriais e autonômicos. O ciclo replicativo dos vírus da subfamília *Betaherpesvirinae* é longo, portanto a infecção progride lentamente em cultivos celulares e, na maioria das vezes, as células apresentam citomegalia. Os vírus desta subfamília produzem latência em tecidos glandulares, células linforreticulares, rins e outros tecidos. Os gama herpesvírus assim como os beta herpesvírus infectam número restrito de hospedeiros, estabelecem infecções latentes frequentemente em células linfoblastóides, mas podem produzir infecções líticas em células epitelióides e fibroblásticas. Possuem como característica importante o potencial oncogênico e podem ser adaptados especificamente a linfócitos B ou T (31,34).

Os herpesvírus são vírus grandes, variam de 120 a 260 nanômetros de diâmetro. São constituídos de DNA linear de fita dupla, com 120 a 250 mil pares de base, dependendo da espécie viral. Com relação à composição de bases nitrogenadas, 35% a 75% são guanina e citosina. O genoma é envolto por um capsídeo icosaedro, de aproximadamente 125 nanômetros de diâmetro, contendo 162 capsômeros. Ao redor do capsídeo há uma camada proteica, sem estrutura definida, assimétrica, denominada tegumento. Circundando o tegumento há o envelope lipoproteico, que contém projeções ou espículas formadas por glicoproteínas (29,31,34).

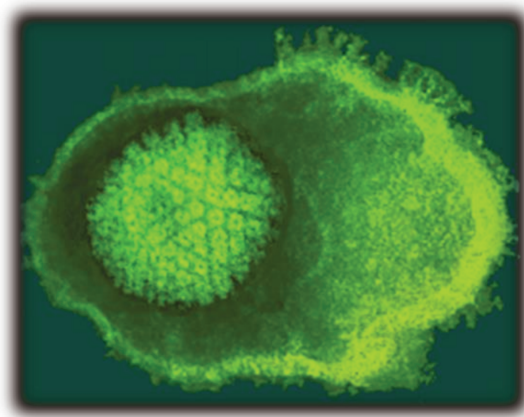


Figura 1: Microscopia eletrônica de vírion da família *Herpesviridae* (38).

O genoma viral codifica proteínas estruturais e não estruturais localizadas no envelope e no capsídeo. Os lipídeos virais são derivados da membrana nuclear e celular da célula hospedeira (31,34). Os herpesvírus codificam entre 70 a 200 genes, sendo que a maioria codifica apenas uma proteína. Estes genes estão distribuídos nas duas cadeias de DNA, em orientações opostas. Portanto, a expressão gênica depende da transcrição das duas cadeias. Os genomas dos herpesvírus são distribuídos em seis classes devido à organização do genoma quanto a presença, número e localização de regiões repetidas e terminais. A transcrição dos genes envolve a maquinaria de transcrição da célula hospedeira, além de fatores de transcrição do vírus (31,32,34).

A replicação dos herpesvírus apresenta dois ciclos distintos. Utilizando o ciclo replicativo dos alfa herpesvírus como modelo, na infecção aguda ocorre o ciclo lítico ou produtivo, no local de penetração do vírus no hospedeiro, isto é, no epitélio e tecido adjacente. Além disso, o ciclo lítico também pode ocorrer em neurônios antes de estabelecerem infecção latente e quando ocorre a reativação viral. Durante este ciclo replicativo há a expressão de todos os genes virais, replicação do genoma e produção de progênie viral infecciosa. Após este ciclo, os nucleocapsídeos são transportados através dos axônios ou dendritos para os gânglios sensoriais ou autonômicos, onde estabelecem infecção latente. A latência é caracterizada pela presença do genoma viral sem expressão gênica significativa, neste período não há replicação do genoma ou produção de progênie viral. O genoma viral permanece inativo no núcleo dos neurônios durante toda a vida do indivíduo. Contudo, em

situações de estresse, por exemplo, pode haver a reativação viral com replicação do genoma e expressão gênica, reiniciando o ciclo lítico (31,34).

Os herpesvírus adsorvem e penetram a célula do hospedeiro através das glicoproteínas conservadas entre eles e, presentes no envelope, como as glicoproteínas B, H e L. A seguir ocorre a fusão do envelope viral com a membrana plasmática e dissociação de algumas proteínas do tegumento, que permanecem no citoplasma. A replicação dos herpesvírus ocorre no núcleo da célula hospedeira. Os nucleocapsídeos são transportados até próximo aos poros do núcleo pelos microtúbulos celulares e com auxílio de algumas proteínas do tegumento. Os nucleocapsídeos se associam com os complexos dos poros nucleares, se desintegram e liberam o genoma viral para dentro do núcleo. Imediatamente após a penetração, o genoma se circulariza e a transcrição é iniciada. O DNA do vírus é transcrito pela enzima RNA Polimerase II da célula, com auxílio de fatores celulares e virais. A síntese das proteínas virais é regulada minuciosamente, uma vez que a transcrição gênica ocorre de modo sequencial (31,34).

Os genes dos herpesvírus podem ser classificados em três classes cinéticas: genes alfa ou de transcrição imediata, genes beta ou de transcrição inicial e genes gama ou tardios. Os genes alfa são expressos logo após a liberação do genoma viral no núcleo e, são transcritos com a presença de uma proteína viral do tegumento, denominada VP16. Essa proteína conjuga-se com um fator celular e estimula a transcrição de cinco genes, que apresentam como produtos as proteínas ICPO, ICP4, ICP22, ICP27 e ICP47, as quais têm como principais funções a modulação do ciclo celular, remodelamento da estrutura da cromatina, transporte e *splicing* de RNA, além de ativar a transcrição dos genes beta (31,32,34).

Os genes alfa e beta são expressos antes da replicação do genoma. Os genes beta subdividem-se em beta-1 e beta-2 e, também são expressos em cascata (32). Os produtos dos genes beta são proteínas e enzimas relacionadas à replicação do genoma, proteínas de ligação ao DNA como a helicase (UL9) e a DNA polimerase viral. Com o início da replicação genômica a expressão dos genes beta é reduzida ou finalizada e, os genes gama passam a ser expressos em quantidade abundante. Os produtos dos genes gama são proteínas estruturais do núcleo, capsídeo e envelope. Diversas proteínas virais são modificadas após a síntese dos genes gama devido a ações de enzimas celulares e virais. Entre estas modificações

estão a clivagem, fosforilação e glicosilação. Assim como os genes beta, os genes gama também subdividem-se em gama-1 e gama-2 (31,32,34).

Na replicação do genoma viral são necessárias tanto proteínas virais quanto fatores da célula hospedeira. Quando os genes beta estão sendo expressos, a proteína viral UL9 se liga à origem de replicação no genoma viral e, juntamente com a proteína ICP8 promovem a separação das cadeias de DNA nesse sítio. As proteínas UL5, UL8 e UL52, também conhecidas como complexo helicase-primase, se dirigem ao núcleo e associam-se ao DNA viral formando os sítios pré-replicativos, onde se iniciará a síntese de DNA. A DNA Polimerase viral compõe-se das proteínas UL30 e UL42 que iniciam a polimerização das novas cadeias (31).

A replicação ocorre de modo bidirecional tipo Theta, que a seguir muda para o mecanismo de círculo rolante por razões ainda desconhecidas. São formados concatâmeros, isto é, são produzidas macromoléculas constituídas de cópias genômicas múltiplas que se acumulam no núcleo celular (31,32). Os nucleocapsídeos são montados em várias etapas e dependem da expressão de proteínas (UL15, UL28 e UL33) que formam o complexo terminase. Este complexo promove a clivagem do concatâmero de DNA em moléculas monoméricas em locais específicos, que são denominados como pac 1 e pac 2 (sinais de empacotamento do DNA). Estes sinais de empacotamento são conservados entre herpesvírus e estão relacionados com a maturação do DNA viral e formação dos pré-capsídeos. A maturação dos capsídeos ainda não está bem compreendida (32).

Os nucleocapsídeos podem adquirir o envelope por brotamento através da membrana nuclear interna. Os vírions podem perder este envelope quando fusionam com a membrana nuclear externa, liberando os nucleocapsídeos sem envelope no citoplasma e, que podem ser reenvelopados por brotamento no complexo de Golgi. Os vírions envelopados são transportados em vesículas do complexo de Golgi até a superfície celular, sendo liberados por exocitose (31).

A enzima DNA Polimerase viral desempenha um papel importante na fase lítica da infecção por herpesvírus. Essa enzima tem atividade multifuncional, atua como polimerase, promovendo a extensão das cadeias de *primer* do DNA e, como exonuclease intrínseca, que remove nucleotídeos incompatíveis da cadeia de *pimer* DNA. Apresenta também atividade de Ribonuclease e, a interação da subunidade catalítica UL30/UL54 com a proteína acessória UL42/UL44 promove aumento da processabilidade da replicação do DNA (32).

Em 1996, foi relatado pela primeira vez um herpesvírus do gênero *Cytomegalovirus*, em amostra da glândula submandibular de morcego (39). Desde então, outros autores encontraram diferentes herpesvírus em morcegos de diversas espécies (23,37,40–50). Informações relacionadas à identificação dos vírus da família *Herpesviridae* em morcegos, no Brasil, ainda são pouco conhecidas. Desse modo, foi proposto conhecer os herpesvírus circulantes nos morcegos.

1.3 Pan-Herpesvírus PCR

O método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica para amplificação de ácidos nucleicos, que possibilita a identificação de pequenas quantidades de material genético do microrganismo suspeito (31,51). A técnica pode ser aplicada para diversos vírus, sendo necessário apenas dispor de suas sequências nucleotídicas. A reação pode ser específica para determinado agente ou dirigida para um grupo, família ou gênero, dependendo da sequência alvo que será utilizada (31). Ao utilizar *primers* de regiões conservadas, como os *primers* consenso é possível amplificar diferentes DNA virais em apenas uma reação (52). A PCR tem como vantagens a sensibilidade, a especificidade, a rapidez e a universalidade. Pode ser utilizada para detectar vírus de difícil isolamento em cultivo celular e no início do quadro infeccioso (31).

Em alguns vírus de DNA, como os herpesvírus e em eucariotos, a enzima DNA polimerase apresenta os domínios funcionais altamente conservados. Este nível de conservação possibilita desenhar *primers* consenso voltados aos domínios de aminoácidos conservados e amplificar parcialmente regiões do gene da DNA Polimerase, a partir de uma gama de organismos. A técnica possibilita identificar, por exemplo, sequências de DNA herpesviral conhecidas, além de novas sequências presentes em amostras de tecidos ou células cultivadas (53).

A técnica de *Nested* PCR tem por objetivo reduzir amplificações inespecíficas do DNA molde, para isso, são realizadas duas reações de PCR. Na primeira reação são utilizados *primers* capazes de cobrir a sequência alvo e sequências adicionais flanqueando ambas as extremidades desta sequência. A segunda reação utiliza os produtos da primeira reação e *primers* que se ligam à sequência alvo, que está compreendida na sequência amplificada da primeira reação de PCR. Dessa forma, a quantidade de ligações não específicas é reduzida,

uma vez que serão utilizados na segunda reação os *amplicons* da primeira, que contém apenas a sequência alvo e suas sequências circundantes (51). Portanto, a padronização do ensaio em formato *nested* PCR (53) aumenta a sensibilidade e especificidade da reação (31,33).

1.4 Sequenciamento de Nucleotídeos

A técnica de sequenciamento do fragmento amplificado no ensaio de PCR é útil para identificar e diferenciar vírus. Quando se faz uso de *primers* direcionados para a detecção de genes conservados entre espécies, gêneros ou famílias é possível diferenciá-los através do sequenciamento do segmento genômico amplificado. Assim, pode-se identificar a sequência de nucleotídeos deste segmento e, comparar e avaliar a identidade destes nucleotídeos com outras sequências encontradas em bancos de dados genômicos. Portanto, o sequenciamento é eficaz para identificar de modo específico o agente viral (31).

O Sequenciamento *Sanger* é um método que faz uso de *primers* para procurar regiões específicas do DNA. Esta técnica permite determinar polimorfismos genéticos devido a uma mutação pontual, uma pequena deleção ou duplicação em determinada sequência genômica (54).

1.5 Análise Filogenética

Após o sequenciamento genômico é possível construir árvores filogenéticas baseadas em nucleotídeos ou aminoácidos, permitindo inferir a similaridade, o ancestral comum e até o parentesco evolutivo entre as amostras (31). Uma árvore filogenética é a representação gráfica de uma hipótese de relação evolutiva entre organismos ou sequências genéticas. A qualidade da inferência filogenética depende da qualidade das amostras e de suas sequências (55).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Os objetivos deste trabalho foram investigar a presença de vírus da família *Herpesviridae* circulantes e/ou ainda não identificados em amostras de suabes orais e anais de morcegos de dois municípios diferentes, utilizando técnica de Pan-herpesvírus PCR.

2.2 Objetivos Específicos

Propõe-se realizar um estudo de caracterização molecular das amostras, buscando identificar relações filogenéticas com cepas circulantes na natureza. E, por fim, contribuir para o entendimento da ecoepidemiologia e biodiversidade dos herpesvírus encontrados em morcegos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem e características das amostras

As amostras que foram utilizadas na pesquisa estão inseridas no banco de amostras do Laboratório de Virologia Animal - Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Para constituição deste banco, foram coletados suabes orais e anais de morcegos de diversas espécies, nos anos de 2011, 2014 e 2015.

As amostras são provenientes do Parque Bosque dos Jequitibás (22° 55' S, 47° 03' W), localizado no município de Campinas – SP, do *Campus* da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) (22°23'S e 47°32'W) e do Horto Florestal Edmundo Navarro de Andrade (22°25'S e 47°33'W), ambos em Rio Claro – SP. A captura e manejo dos animais silvestres para a coleta das amostras biológicas ocorreu em respeito às normas do Sistema de Autorização e Informação de Biodiversidade (SISBIO).

Os suabes utilizados nas coletas foram armazenados em microtubos livres de RNase e DNase, identificados, refrigerados a 4°C e transportados ao Laboratório de Virologia Animal, Instituto de Biologia da UNICAMP. No total, foram utilizadas 320 amostras de material biológico (suabe oral e/ou anal) de 12 espécies de morcegos, pertencentes a três famílias, conforme apresentado no Quadro 2.

Quadro 2: Visão geral dos morcegos envolvidos no estudo

Família	Espécie	Hábito alimentar
<i>Molossidae</i>	<i>Molossus molossus</i>	Exclusivamente insetívora
	<i>Tadarida brasiliensis</i>	insetívora
	<i>Cynomops sp.</i>	Exclusivamente insetívora
	<i>Eumops glaucinus</i>	insetívora
<i>Phyllostomidae</i>	<i>Anoura caudifer</i>	Nectarívora
	<i>Artibeus lituratus</i>	Frugívora
	<i>Carollia perspicillata</i>	Frugívora
	<i>Glossophaga soricina</i>	Nectarívora
	<i>Micronycteris megalotis</i>	Exclusivamente insetívora
	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	Frugívora
	<i>Sturnira lilium</i>	Frugívora
<i>Vespertilionidae</i>	<i>Myotis nigricans</i>	Exclusivamente insetívora

3.2 Processamento das Amostras

No Laboratório de Virologia Animal, as amostras foram transferidas para criotubos contendo 500µl (microlitros) de meio mínimo essencial (MEM, Vitrocell®) e mantidas congeladas a -80°C até extração do DNA.

3.3 Extração do DNA

A partir dos suabes coletados foi realizada a extração do DNA total com o *kit* QIAamp DNA® (QIAGEN, Hilden, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante. A extração foi feita de modo automatizado, pelo equipamento QIAcube® (QIAGEN, Hilden, Alemanha). O DNA extraído foi identificado e armazenado em biofreezer a -80°C.

3.4 Pan-herpesvírus PCR para detecção do gene da DNA Polimerase de herpesvírus

Os vírus da família *Herpesviridae* possuem o gene DNA Polimerase altamente conservado em seu genoma. Sendo assim, foi feito um ensaio de Pan-herpesvírus PCR utilizando *primers* capazes de amplificar uma região do gene DNA Polimerase de 21 espécies de herpesvírus (13 vírus animais e 8 vírus humanos), das subfamílias *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae* (53).

O ensaio foi realizado em formato *nested*-PCR (nPCR) e, utilizou os *primers* degenerados: DFA, ILK, KG1, TGV e IYG, conforme mostra a tabela 1. O fragmento amplificado tem aproximadamente 215-315 pares de base. Os *primers* são capazes de detectar herpesvírus já conhecidos, além de possivelmente encontrar herpesvírus ainda desconhecidos ou não caracterizados.

Na primeira etapa da nPCR foram utilizados os *primers* DFA e ILK (senso) e o *primer* KG1 (anti-senso). Na segunda etapa se utilizou os *primers* TGV (senso) e IYG (anti-senso) (47,53). Os *primers*, suas sequências e tamanho de fragmento estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Descrição dos *Primers* utilizados nas duas etapas da nPCR

<i>Primers</i>	Sequência	Tamanho (bp)
DFA	5'-GAYT TYGCNAGYYTNTAYCC-3'	800
ILK	5'-TCCTGGACAAGCAGCARNYS GCNMTNAA-3'	800
KG1	5'-GTCTTGCTCACC AGNTCNACNCCYTT-3'	800
TGV	5'-TGTAAC TCGGTGTAYGGNTTYACNGGNGT-3'	215 – 315
ITYG	5'-CACAGAGTCCGTRTCNCCRTADAT-3'	215 – 315

*bp: pares de base, do inglês, *base pair*.

Para ambas as reações foi padronizado um protocolo utilizando-se o *kit Taq DNA Polymerase Recombinant®* (Invitrogen Life Technologies, Califórnia, EUA) com concentrações finais de 1pmol de cada um dos *primers*, 200µM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP), 0,625U de *Taq* DNA Polimerase, 1X PCR *buffer*, 2mM de MgCl₂, água livre de DNase e RNase e 1µl de DNA. Para uma reação com volume final de 25µl foram colocados 2,5µl de PCR Buffer 10X, 1µl de

MgCl₂ 50mM, 0,5µl de mix desoxirribonucleotídeo trifosfato a 10mM, 2,5µl de cada *primer* a 10mM, 0,125µl de enzima Taq DNA Polimerase, 1µl de DNA e 12,375µl de água livre de DNase e RNase (53). Foi utilizado como controle positivo da reação DNA de herpesvírus humano simplex 1 (HHV-1).

A amplificação foi realizada em termociclador Aeris - BG096 (Esco, Pensilvânia, EUA) com desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido por 45 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 46°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e, um estágio de extensão final a 72°C por 7 minutos. Na segunda etapa, foi utilizado 1µl do produto da primeira reação, sob as mesmas condições descritas anteriormente (53).

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE 0,5X. Aplicou-se no gel 7µl de DNA amplificado homogeneizados com 1µl de Gel Red 1:100 (Uniscience®, São Paulo, Brasil) e 1µl de Gel Loading Buffer com azul de bromofenol a 0,25%. A corrida foi realizada em cuba horizontal a 90V, 400 mA por 1 hora e 20 minutos. Os fragmentos foram visualizados por exposição à luz ultravioleta em transluminador (Vilber Lourmat®, ECX-20.M, FR). Utilizou-se como padrão de peso molecular *Ladder* 100 bp DNA (Tiangen Biotech®, Pequim - China). O gel foi documentado através de fotografias digitais (53).

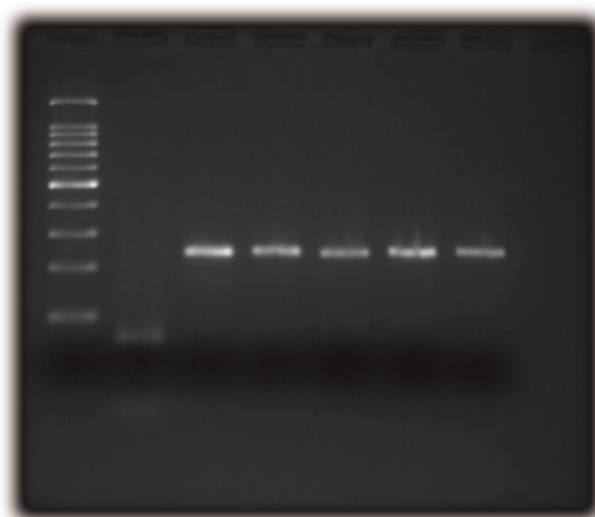


Figura 2: Fotografia digital do gel de eletroforese para análise dos *amplicons*. Fonte: Arquivo pessoal.

Para verificar a sensibilidade do ensaio de Pan-herpesvírus PCR e padronizar as reações foram realizadas diluições seriadas do DNA de herpesvírus humano 1 (HHV-1), herpesvírus felino 1 (FeHV-1) e herpesvírus galídeo 1 (GaHV-1),

com fator de diluição igual a 10. Foram utilizados sete pontos para a curva de diluição (10^{-1} até 10^{-7}). As reações foram realizadas sob as mesmas condições, o DNA puro dos herpesvírus testados foram utilizados como controle positivo das reações. Água ultrapura Milli-Q foi usada como controle negativo.

3.5 Sequenciamento

As amostras positivas no ensaio Pan-herpesvírus PCR foram submetidas à reação de Sequenciamento Sanger, realizado pelo método de eletroforese capilar em Sequenciador 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems®, Califória, EUA), no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD/ UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil).

As reações de PCR que resultaram em fragmentos únicos na eletroforese foram purificadas a partir do produto pelo kit MinElute® PCR Purification (QIAgen, Hilden, Alemanha). Em ensaios inespecíficos, que produziram fragmentos múltiplos, a banda desejada foi extraída do gel e a purificação foi realizada pelo kit MinElute® Gel Extraction (QIAgen, Hilden, Alemanha).

Para o sequenciamento das amostras, a massa mínima necessária de produto de PCR purificado deve ser maior ou igual a 30ng. Desse modo, para determinar a concentração dos produtos da PCR purificados foi utilizado o método fluorimétrico através do equipamento Qubit® 2.0 (Invitrogen Life Technologies, Califórnia, EUA). Para os produtos que não alcançaram a massa mínima necessária para a reação de sequenciamento foi feita uma nova reação com volume final de 50µl, para aumentar a quantidade de DNA.

As amostras foram enviadas ao LaCTAD em placas de 96 poços, fundo em 'V', com capacidade para 200µl. Foram enviados 4µl de DNA purificado eluído em 11µl de água ultrapura Milli-Q. Em seguida, foram acrescentados 3µl de cada *primer* (senso ou anti-senso) em concentração de 3,2pmol/µl em cada poço da placa. O volume final enviado em cada poço foi de 18µl.

3.6 Estudos de Evolução Molecular

Os cromatogramas obtidos para cada uma das sequências senso e anti-senso, de cada amostra foram visualizados pelo *software* MEGA 7 - *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (Disponível em: <https://www.megasoftware.net/>)(56) para avaliar a qualidade das sequências. O mesmo *software* foi utilizado para editar e corrigir bases degeneradas e discrepâncias entre as fitas sequenciadas. As sequências editadas foram verificadas pelo programa *Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide – BLASTn* (disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para confirmar identidade com sequências de herpesvírus já descritas e depositadas na plataforma de dados *GenBank*-NCBI.

As amostras sequenciadas foram alinhadas no *software* MEGA 7 (56), através da ferramenta *Clustal W*, com outras sequências relacionadas ao gene da DNA Polimerase ou genoma completo de herpesvírus identificadas a partir de diversas espécies animais e que já se encontram depositadas no *GenBank*.

3.7 Análises filogenéticas

As análises filogenéticas também foram geradas pelo *software* Mega 7 (56), a partir de uma matriz de dados, utilizando as sequências de herpesvírus obtidas nesta pesquisa e inclusão de sequências das três subfamílias (*Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*) disponíveis na plataforma de Dados *GenBank*. Para determinar o melhor modelo de substituição nucleotídica foi utilizada a ferramenta *Find Best DNA Model*.

As árvores filogenéticas foram reconstruídas utilizando os métodos de *Maximum Likelihood* (modelo de substituição nucleotídica pelo método de Kimura 2-Parâmetros em distribuição gamma com cinco categorias e teste de filogenia pelo método *Bootstrap* com 1000 replicatas) (57) e *Neighbor Joining* (modelo de substituição nucleotídica pelo método de *p-distance* e teste de filogenia pelo método *Bootstrap* com 1000 replicatas)(58).

4 RESULTADOS

Neste trabalho foram testadas 320 amostras, 157 suabes orais e 163 suabes anais, de 12 espécies de morcegos para detecção parcial do gene da DNA polimerase. No total, 80 amostras apresentaram banda no gel de eletroforese, com o tamanho esperado do fragmento após reação de Pan-herpesvírus PCR. Destas, após o sequenciamento, 69 apresentaram similaridade com alguma sequência de herpesvírus no *Blast*. Assim, foram consideradas positivas para herpesvírus estas 69 sequências. Onze sequências, não foram consideradas positivas para herpesvírus após o sequenciamento, por não terem apresentado similaridade com outras sequências de herpesvírus no *Blast*. Na tabela 2 estão descritos o número de amostras positivas e o total de amostras por espécie de morcego do estudo. As espécies de morcegos foram agrupadas por hábito alimentar.

Tabela 2: Espécies de morcegos envolvidas no estudo em relação ao número de amostras positivas e o total de amostras

Hábito alimentar	Espécie	Amostras (N)	Positivos	(%)
Néctar	<i>Anoura caudifer</i>	16	4	25
	<i>Glossophaga soricina</i>	14	6	42,85
	Total	30	10	
Frutas	<i>Artibeus lituratus</i>	48	15	31,25
	<i>Carollia perspicillata</i>	104	10	9,6
	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	4	1	25
	<i>Sturnira lilium</i>	55	11	20
	Total	211	37	
Insetos	<i>Cynomops p</i>	10	2	20
	<i>Eumops glaucinus</i>	8	2	25
	<i>Micronycteris megalotis</i>	8	3	37,5
	<i>Molossus molossus</i>	32	13	40,62
	<i>Myotis nigricans</i>	1	0	0
	<i>Tadarida brasiliensis</i>	20	2	10
	Total	79	22	
Total Geral		320	69	21,56

Das amostras consideradas positivas para herpesvírus, 17 (24,63%) eram provenientes de suabe anal e 52 (75,37%) de suabe oral. Sete morcegos exibiram resultado positivo tanto em amostra de suabe oral quanto de suabe anal. O número total de amostras utilizadas de cada ano de coleta e o número de amostras positivas estão descritos na tabela 3.

Tabela 3: Relação dos anos de coleta e positividade das amostras

Ano	Amostras (N)	Positivos	(%)
2011	20	2	10
2014	180	39	21,66
2015	120	28	23,33
Total	320	69	21,56

A relação do total de amostras provenientes de morcegos de cada local de coleta e o número de amostras positivas para herpesvírus estão descritos na tabela 4.

Tabela 4: Relação dos locais de coleta e positividade das amostras

Local	Amostras (N)	Positivos	(%)
1	52	16	30,76
2	224	42	18,75
3	44	11	25
Total	320	69	21,56

1. Parque Bosque dos Jequitibás – Campinas, SP
2. Horto Florestal Edmundo Navarro de Andrade – Rio Claro, SP
3. UNESP, campus Rio Claro, - Rio Claro, SP

No Parque Bosque dos Jequitibás, em Campinas foram coletados morcegos das espécies: *Cynomops* sp., *Molossus molossus* e *Tadarida brasiliensis*. Na UNESP de Rio Claro foram coletadas amostras de morcegos das espécies: *Artibeus lituratus*, *Anoura caudifer*, *Carollia perspicillata*, *Eumops glaucinus* e *Molossus molossus*. Enquanto que do Horto Florestal, em Rio Claro as amostras eram de morcegos das espécies *Glossophaga soricina*, *Micronycteris megalotis*, *Molossus molossus*, *Myotis nigricans*, *Platyrrhinus lineatus* e *Sturnira lilium*. Na

tabela 5 estão descritos os locais em que foram feitas as coletas em relação ao número de amostras positivas e o total de amostras de cada espécie de morcego.

Tabela 5: Relação das espécies de morcegos, os locais em que foram coletados e positividade da amostra

Local	Espécie	Amostras (N)	Positivos	(%)
1	<i>Cynomops sp.</i>	10	2	20
	<i>Molossus molossus</i>	22	12	54,54
	<i>Tadarida brasiliensis</i>	20	2	10
	Total	52	16	
2	<i>Anoura caudifer</i>	16	4	25
	<i>Artibeus lituratus</i>	24	8	33,3
	<i>Carollia perspicillata</i>	102	9	8,82
	<i>Glossophaga soricina</i>	14	6	42,85
	<i>Micronycteris megalotis</i>	8	3	37,5
	<i>Myotis nigricans</i>	1	0	0
	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	4	1	25
	<i>Sturnira lilium</i>	55	11	20
	Total	224	42	
3	<i>Artibeus lituratus</i>	24	7	29,16
	<i>Carollia perspicillata</i>	2	1	50
	<i>Eumops glaucinus</i>	8	2	25
	<i>Molossus molossus</i>	10	1	10
	Total	44	11	
Total Geral		320	69	21,56

1. Parque Bosque dos Jequitibás – Campinas, SP

2. Horto Florestal Edmundo Navarro de Andrade – Rio Claro, SP

3. UNESP, campus Rio Claro, - Rio Claro, SP

Na tabela 6 estão descritos as amostras positivas e o total de amostras em relação ao hábito alimentar dos morcegos do estudo.

Tabela 6: Número de amostras positivas em relação ao hábito alimentar dos morcegos

Hábito alimentar	Amostras (N)	Positivos	(%)
Nectarívoros	30	10	33,33
Frugívoros	211	37	17,53
Insetívoros	79	22	27,84
Total	320	69	21,56

Para testar a sensibilidade do ensaio de Pan-herpesvírus PCR foram feitas diluições seriadas do DNA de cepas de herpesvírus humano 1, herpesvírus felino 1 e herpesvírus galídeo 1. Estas cepas fazem parte do banco de amostras do Laboratório de Virologia Animal – UNICAMP. Em todas as diluições verificou-se a amplificação parcial do gene DNA Polimerase, mesmo quando o DNA estava mais diluído.

A partir das sequências obtidas pelo sequenciamento *Sanger* foi realizado o alinhamento e foram reconstruídas árvores filogenéticas por dois métodos de filogenia molecular: *Maximum Likelihood* (ML) e *Neighbor Joining* (NJ), conforme apresentado pelas figuras 3, 4, 5 e 6. Foram reconstruídas quatro árvores filogenéticas. Na primeira foi utilizado o método de *Maximum Likelihood* e acrescentadas ao alinhamento sequências referência de herpesvírus humanos e animais, das três subfamílias de herpesvírus. Na segunda e terceira árvores foram inseridas sequências referência de herpesvírus humanos e foi utilizado o método de *Neighbor Joining* e *Maximum Likelihood*, respectivamente. A última árvore também foi reconstruída com o método de *Maximum Likelihood* e foram utilizadas sequências referência de gamaherpesvírus identificados em morcegos e sequência de gamaherpesvírus humanos.

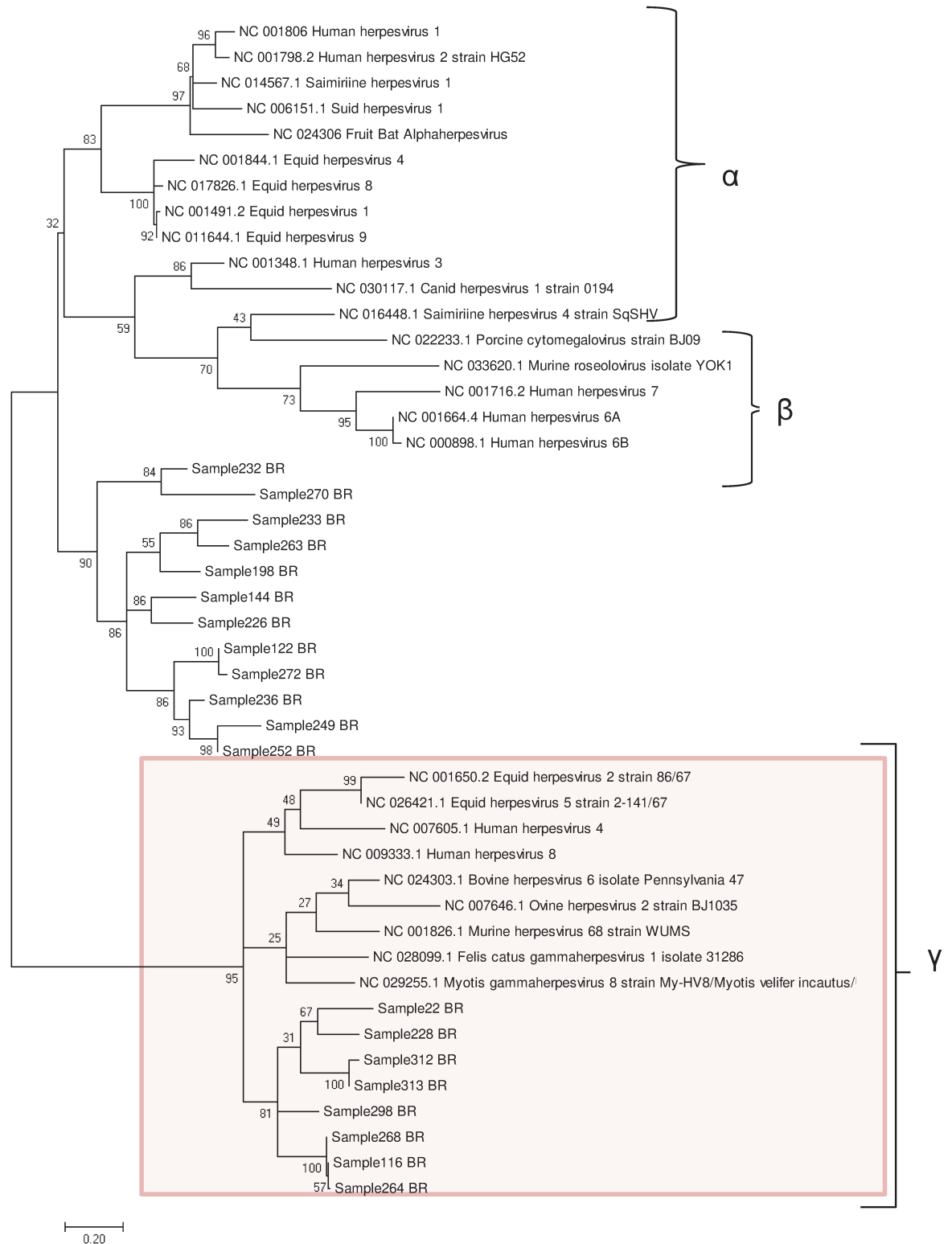


Figura 3: Árvore filogenética inferida pelo método de *Maximum Likelihood* baseado no modelo Kimura 2- Parâmetros (57). A porcentagem de replicatas da árvore está próxima às ramificações. Foi usada uma distribuição Gamma discreta com cinco categorias. A árvore foi desenhada em escala, com comprimentos de ramificações medidas por número de substituições por sítio. As análises evolutivas foram realizadas no software Mega 7. Foram utilizadas sequências referência de herpesvírus humanos e animais.

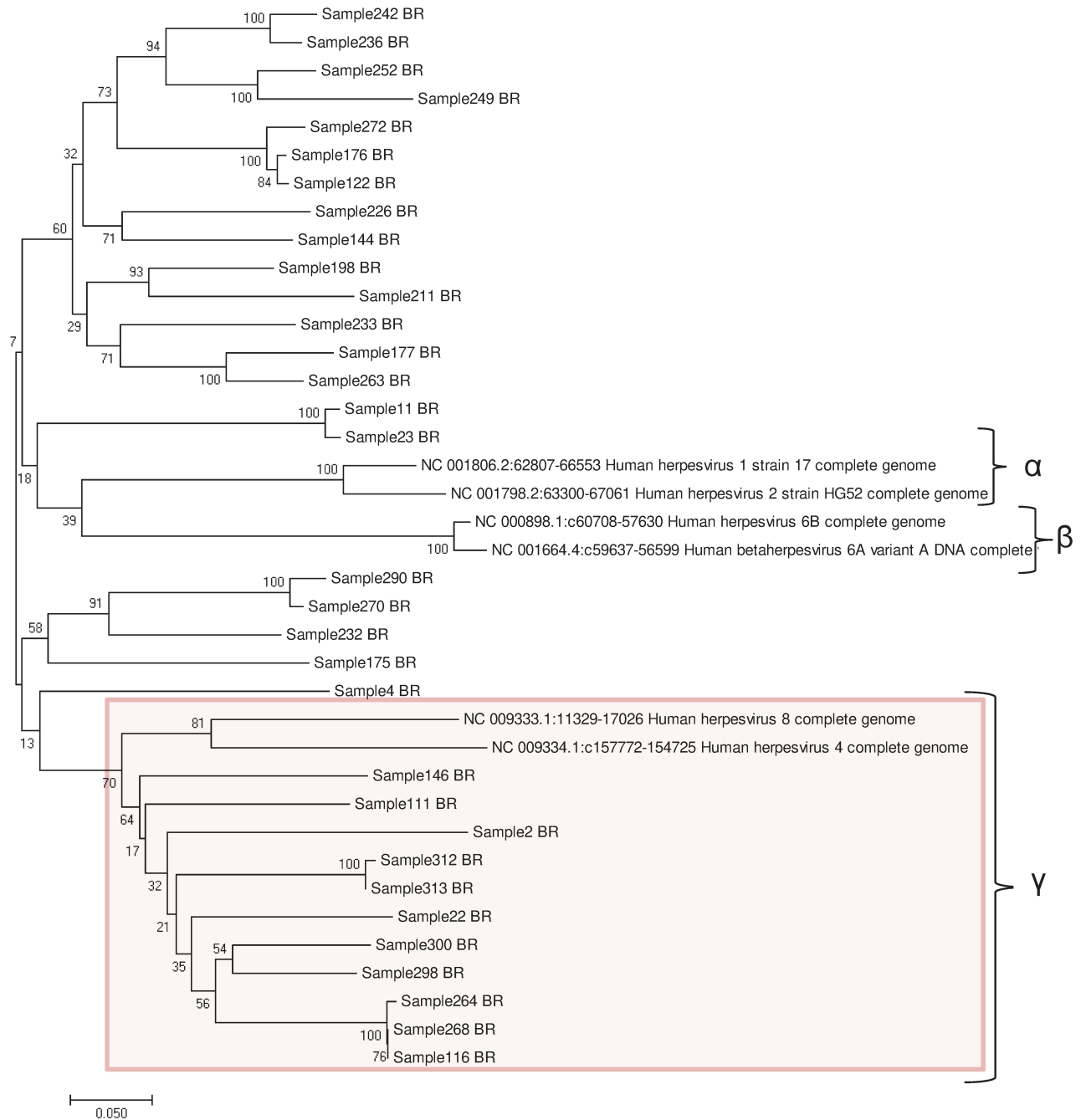


Figura 4: Árvore filogenética reconstruída usando o método *Neighbor-Joining*. A porcentagem de replicatas da árvore está próxima às ramificações. A árvore foi desenhada em escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método p-distance, e são as unidades do número de bases por sítio. As análises evolutivas foram realizadas no software Mega 7. Nesta árvore foram utilizadas sequências referência de herpesvírus humanos.

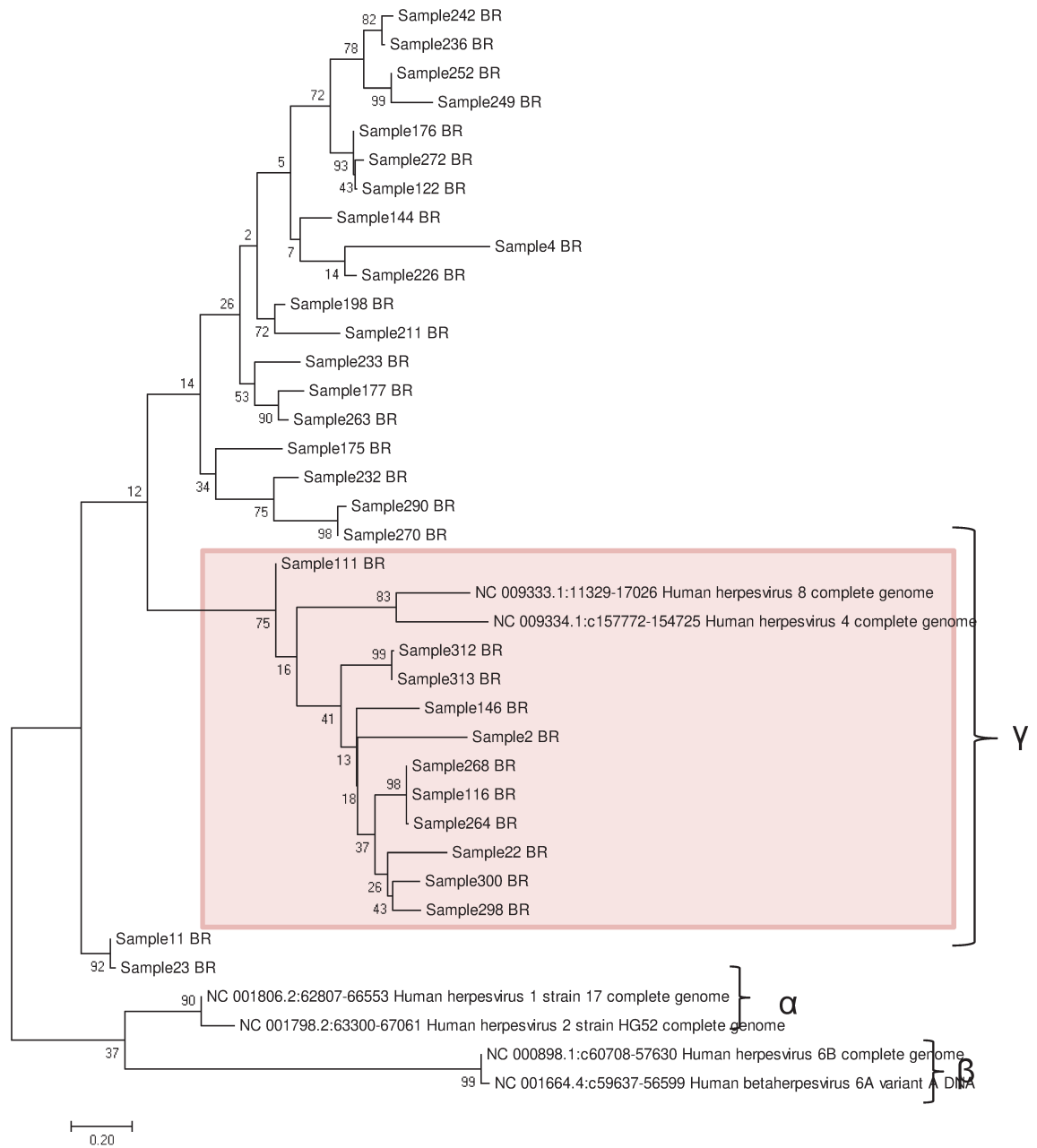


Figura 5: Árvore filogenética reconstruída pelo método de *Maximum Likelihood* baseado no modelo Kimura 2- Parâmetros (57). A porcentagem de replicatas da árvore está próxima às ramificações. Foi usada uma distribuição Gama discreta com cinco categorias. A árvore foi desenhada em escala, com comprimentos de ramificações medidas por número de substituições por sítio. As análises evolutivas foram realizadas no software Mega 7. Foram utilizadas sequências referência de herpesvírus humanos.

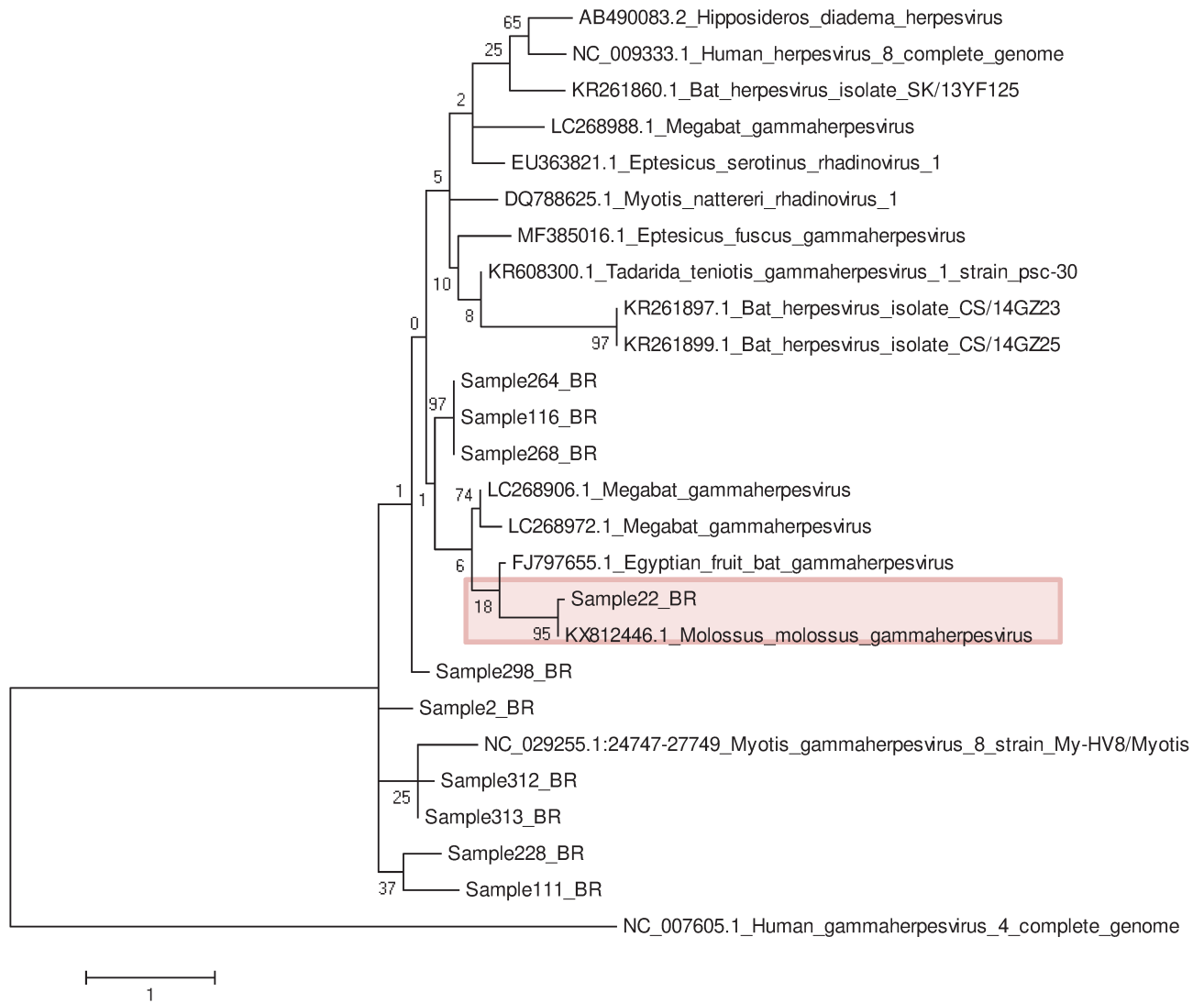


Figura 6: Árvore Filogenética reconstruída pelo método de *Maximum Likelihood* baseado no modelo Kimura 2- Parâmetros (57). A porcentagem de replicatas da árvore estão próximas as ramificações. Foi usada uma distribuição Gama discreta com cinco categorias. A árvore foi desenhada em escala, com comprimentos de ramificações medidas por número de substituições por sítio. As análises evolutivas foram realizadas no software Mega 7. Foram utilizadas sequências referência de gamaherpesvírus humanos e gamaherpesvírus identificados em morcegos.

5 DISCUSSÃO

A emergência de vírus zoonóticos, que tem os morcegos como principais reservatórios, como os coronavírus relacionados a síndromes respiratórias (SARS-CoV e MERS-CoV), Hendra, Nipah, além do Ebola e Marbug, despertou o interesse da comunidade científica em investigar a diversidade viral destes animais (40,48).

Os morcegos são mamíferos voadores que apresentam ampla distribuição geográfica, diversidade de espécies, hábitos gregários e podem conviver com humanos e outros animais (59). Considerando que a ordem *Chiroptera* abriga 25% da diversidade de mamíferos de todo o mundo (9,11,48), os herpesvírus de morcegos estão sub-representados (41). Assim, este trabalho buscou compreender a relação entre herpesvírus e morcegos.

Neste estudo, das 320 amostras de morcegos que foram testadas para herpesvírus, foram obtidas 69 (21,56%) sequências apresentando identidade com herpesvírus no *Blast*, sendo, portanto consideradas positivas. Em outros trabalhos que também utilizaram ensaios de Pan-herpesvírus PCR e sequenciamento *Sanger* encontraram as seguintes prevalências, no sul da China, foram testadas 520 amostras de fezes de oito espécies de morcegos, sendo que 73 (14%) apresentaram-se positivas para herpesvírus (23). Na península Ibérica, entre 2002 e 2008 foram testados suabes orofaríngeos de 368 morcegos de 26 espécies, sendo encontrados 42 (11,4%) herpesvírus provavelmente novos (41).

A prevalência de herpesvírus em amostras de morcegos descritas na literatura é bastante variável, uma das razões pode ser os diferentes tipos de amostras utilizados nos trabalhos. Um estudo realizado nas Filipinas, em 2015, encontrou prevalência de 30% de herpesvírus (21 positivos de 71 morcegos pesquisados) em intestinos, pulmão e sangue (42). Outro trabalho realizado em 2018 na Indonésia obteve prevalência de 71 (38,8%) sequências positivas para herpesvírus, das 183 amostras obtidas do baço dos morcegos testados (50). Este resultado foi similar ao encontrado em outro estudo, realizado na Alemanha em 2007, com fragmentos de tecido pulmonar, em que oito (32%) dos 25 morcegos pesquisados apresentaram novas sequências de herpesvírus (47). Uma pesquisa com morcegos originários da Hungria, em 2011, encontrou duas (3,5%) novas sequências de herpesvírus dentre as 57 amostras utilizadas (44).

Pouco se conhece sob o modo de transmissão de herpesvírus em morcegos. Contudo, diversas pesquisas anteriores apontaram que estes vírus podem manter-se no trato digestivo e ser detectado em amostras de suabe anal, fezes e amostras de saliva e trato digestivo destes animais (23,40,42,45,48). Neste estudo, também foram encontradas sequências de herpesvírus em amostras de suabe oral e suabe anal. Além disso, em sete morcegos pesquisados, foram encontradas amostras positivas tanto em suabe anal quanto em suabe oral. Portanto, a via oral-fecal pode ser importante para a transmissão de herpesvírus em quirópteros.

No presente trabalho, 75,36% das amostras positivas para herpesvírus foram provenientes de suabe oral. Em outro estudo, utilizando análise metagenômica de amostras de fezes e saliva de morcegos das espécies *Molossus molossus* e *Desmodus rotundus*, que foram capturados em abrigos na floresta amazônica, na região da Guiana Francesa apontou que a maioria dos *contigs* relacionados a herpesvírus também foram encontradas em amostra de saliva, de morcegos *Molossus molossus* de habitats florestais (40).

A análise filogenética busca relacionar genes para deduzir sua ancestralidade. Os métodos de filogenia molecular consistem em suposições de como ocorreu a evolução. Os métodos podem ser baseados em matrizes de distâncias como o método de *Neighbor-Joining* ou em análise de caracteres como o método de *Maximum-Likelihood* (55).

O método de *Neighbor-Joining* é considerado rápido e eficiente quando há baixa divergência entre as sequências. Por este algoritmo, a árvore é determinada através do comprimento dos ramos, tendo por base as distâncias evolutivas (55). O método de *Maximum-Likelihood* busca entre as árvores a mais provável em relação às sequências do alinhamento e o modelo evolutivo. Este método calcula estimativas com menos erros de amostragem (55). Assim, neste trabalho foram utilizados estes dois métodos para a reconstrução filogenética como realizado em outro estudo (47), para avaliar a filogenia por duas abordagens diferentes, permitindo a comparação dos resultados.

Ainda, para determinar a filogenia a partir de sequências nucleotídicas é necessária a construção de uma matriz de dados baseada em um modelo de substituição nucleotídica. Através da ferramenta *Find Best DNA Model* do software Mega 7 foi possível determinar qual o modelo de substituição nucleotídica mais

adequado de acordo com as sequências obtidas nesta pesquisa. Nas árvores reconstruídas pelo método de *Maximum-Likelihood* foi utilizado o modelo de substituição nucleotídica Kimura 2-Parâmetros, enquanto a árvore em que foi usado o método *Neighbor-Joining* usou o modelo de *p-distance*. O modelo Kimura 2-Parâmetros considera substituições múltiplas e a desigualdade de ocorrência entre transições e transversões, devido, sobretudo as diferenças no tamanho entre purinas e pirimidinas. O modelo de *p-distance* é o que apresenta menor variância, é mais simples, adequado para ser utilizado quando a taxa evolutiva entre as sequências for constante. Este modelo consiste na proporção de posições em que duas sequências diferem (55).

Para avaliar a força de uma história evolutiva, o teste estatístico de *Bootstrap* é o mais utilizado. Através da repetição da análise filogenética, este teste avalia a confiança de cada nó da árvore, assim, quanto maior a proporção, maior a credibilidade (55). Neste estudo, para garantir a qualidade do alinhamento e construir uma análise filogenética fidedigna, amostras com sequência nucleotídica pequena foram excluídas do alinhamento.

As amostras 22, 116, 228, 264, 268, 298, 312 e 313 apresentaram relação filogenética com vírus da subfamília *Gammaherpesvirinae*, pelo método de *Maximum Likelihood*, quando foram utilizadas sequências referência de herpesvírus humanos e animais. As amostras 2, 22, 111, 116, 146, 264, 268, 298, 300, 312 e 313 apresentaram relação filogenética com gamaherpesvírus, tanto na árvore reconstruída pelo método de *Neighbor-Joining* quanto pelo método de *Maximum Likelihood* em que foram utilizadas como sequências referência de herpesvírus humanos. Ambos os métodos de análise filogenética apontaram as mesmas sequências relacionadas filogeneticamente com gamaherpesvírus.

A comparação das sequências nucleotídicas das amostras que apresentaram filogenia com gamaherpesvírus e das sequências depositadas no *GenBank* pela ferramenta *BLAST*, apontou que elas apresentaram identidade com herpesvírus identificados a partir de amostras de morcegos, já inclusos na base de dados *GenBank*. Foi então reconstruída uma árvore filogenética, pelo método de *Maximum Likelihood* utilizando sequências de gamaherpesvírus identificados em morcegos em estudos anteriores. As sequências obtidas nesta pesquisa apresentaram relação filogenética com outros gamaherpesvírus identificados em morcegos. A sequência referente à amostra 22 de morcego da espécie *Molossus*

molossus formou um *cluster* com a sequência originária em morcegos da mesma espécie, na floresta amazônica da Guiana Francesa (40).

Neste estudo, em ambos os métodos utilizados para reconstrução das árvores filogenéticas as amostras de morcegos formaram um grupo que não apresentou relação filogenética com nenhuma das três subfamílias de herpesvírus. Foi apontado por um estudo anterior, utilizando as mesmas técnicas moleculares, que árvores geradas com o algoritmo *Neighbor-Joining* podem não agrupar com precisão sequências de herpesvírus nas três subfamílias estabelecidas (53).

As amostras 116 (suabe oral), 264 (suabe anal) e 268 (suabe anal) são de morcegos da espécie *Artibeus lituratus*, da região do Horto Florestal, de Rio Claro. As amostras 312 e 313 são de suabe oral, de morcegos da espécie *Tadarida brasiliensis* e, foram coletadas no Parque Bosque dos Jequitibás, no município de Campinas, assim como as amostras 2 e 22, que são de suabe oral de morcegos da espécie *Molossus molossus*. As amostras 146 (suabe oral) e 298 (suabe anal) foram obtidas de morcegos da espécie *Carollia perspicillata*, no Horto Florestal de Rio Claro. Do mesmo local são as amostras 111 (suabe oral) de morcego *Glossophaga soricina* e a amostra 300, de suabe oral da espécie *Micronycteris megalotis*. A amostra 228, de suabe anal de morcego *Eumops glaucinus* foi oriunda da Unesp – campus Rio Claro. Estes dados apontam que tanto amostras de suabe oral quanto de suabe anal de morcegos capturados nos três locais do estudo apresentaram relação filogenética com gamaherpesvírus.

Sequências de herpesvírus pertencente à subfamília *Gammaherpesvirinae* foram identificadas em diferentes espécies de morcegos na África, Ásia, Europa, América do Norte, América do Sul e Oceania (9,22,40,42,44–46,49,60). Esta diversidade de gamaherpesvírus identificados em morcegos aponta que provavelmente estes vírus estão circulando entre espécies de quirópteros (23). A subfamília *Gammaherpesvirinae* compreende patógenos importantes para a saúde humana, por incluir vírus linfotrópicos com potencial oncogênico, como o herpesvírus humano 4 (vírus Epstein-Barr) e o herpesvírus humano 8 (herpesvírus associado ao Sarcoma de Kaposi) (50). Os gamaherpesvírus estabelecem infecções latentes e, em humanos comumente causam doença em imunossuprimidos (7). O vírus Epstein-Barr está associado à mononucleose infecciosa, carcinoma nasofaríngeo, linfoma de Burkitt, linfomas não-Hodgkin de células B e doenças linfoproliferativas após transplante de órgãos (32,35). O linfoma de Burkitt é o tipo de neoplasia mais

comum em crianças africanas e em pacientes portadores de HIV (62). O herpesvírus humano-8 pode causar o sarcoma de Kaposi, uma das neoplasias mais frequentes em pacientes portadores de HIV (vírus da Imunodeficiência humana) (32,35).

Até o momento, nenhum herpesvírus encontrado em morcegos foi relacionado a infecções zoonóticas, contudo, foi identificado um gamaherpesvírus obtido a partir de uma linhagem celular tumoral estabelecida, originalmente derivada de um tumor escapular de morcego da espécie *Myotis velifer incautus* capaz de se replicar e produzir efeito citopático em linhagens celulares de primatas humanos (A549 – pulmão e Huh7 – fígado) e não humanos (Vero). Análises moleculares e filogenéticas demonstraram que este vírus tem algumas semelhanças com o herpesvírus humano associado ao Sarcoma de Kaposi (8,63). Apesar dos gamaherpesvírus infectarem uma faixa restrita de hospedeiros, eventos de transmissão para outras espécies, cursando com sintomatologia clínica grave já foram relatados. Ressalta-se, assim, a importância em conhecer os vírus circulantes em morcegos (40,42,64,65).

É provável que os gamaherpesvírus sejam muito antigos, tendo surgido há aproximadamente 60 milhões de anos, após a especiação dos quirópteros (7). Tanto primatas quanto morcegos apresentam a maior diversidade de gamaherpesvírus e podem ter desempenhado um importante papel na transmissão destes vírus para outros hospedeiros, atuando como fonte de diversidade genética (66). Algumas características próprias dos morcegos, como a habilidade de voo, ocupação de ampla faixa demográfica e grande tamanho populacional podem ter facilitado a transmissão de vírus da subfamília *Gammaherpesvirinae* para outras espécies animais (7).

Um estudo realizado na China apontou evidências de que os herpesvírus podem ter coevoluído com os morcegos em razão de fatores como a alta prevalência encontrada em diferentes espécies destes animais em várias regiões geográficas, significativa diversidade genética entre herpesvírus e morcegos de espécies diferentes e, ausência de sinais clínicos em morcegos portadores de herpesvírus (23).

Houve maior prevalência de amostras positivas para herpesvírus na espécie de morcego *Glossophaga soricina*. Esta é uma espécie nectarívora, que pode ser encontrada em todos os biomas brasileiros (16). Em outro trabalho realizado em zona urbana, na cidade de Maringá, estado do Paraná, entre 2015 e

2016, a espécie de morcego com mais indivíduos positivos para herpesvírus foi a espécie *Artibeus lituratus* (67). No presente estudo, esta espécie de morcego também apresentou prevalência alta para herpesvírus.

Quanto aos locais de coleta, a espécie *Molossus molossus* foi a que apresentou maior prevalência no Parque Bosque dos Jequitibás, em Campinas. No Horto Florestal Edmundo Navarro de Andrade, em Rio Claro, a espécie de morcego *Glossophaga soricina* foi a mais prevalente para herpesvírus. E, na UNESP – campus de Rio Claro, a espécie com maior prevalência para herpesvírus foi a *Carollia perspicillata*. A espécie *Artibeus lituratus* apresentou prevalências semelhantes 29,16% na UNESP – campus de Rio Claro e 33,3% no Horto Florestal Edmundo Navarro de Andrade, no mesmo município.

A história de vida, a filogenia, a fisiologia, o habitat e a dieta influenciam no microbioma dos morcegos. Uma análise metagenômica realizada em 2017, na região Neotropical da Guiana Francesa, indicou que grande parte dos vírus identificados nos morcegos era compatível com o hábito alimentar da espécie (40). Neste trabalho, os morcegos nectarívoros apresentaram maior prevalência para herpesvírus em relação aos morcegos frugívoros e insetívoros. A busca por alimento pode aproximar o contato de morcegos com humanos e outros animais, propiciando a transmissão de patógenos (6).

Os morcegos que apresentaram amostras filogeneticamente próximas a gamaherpesvírus pertencem às famílias *Molossidae* e *Phyllostomidae*. A família *Molossidae* compreende morcegos exclusivamente insetívoros (16). No Brasil, esta família é representada por uma subfamília, oito gêneros e 29 espécies (15). Os morcegos molossídeos são frequentemente encontrados em ambientes urbanos, por serem tolerantes às modificações ambientais e por utilizarem edificações como abrigo (16,68), contribui para esta afirmação o fato das amostras oriundas do Parque Bosque dos Jequitibás, em Campinas serem de espécies de morcegos desta família, uma vez que o parque localiza-se na região central do município.

A família *Phyllostomidae* é a mais diversificada do ponto de vista ecológico dentro da ordem *Chiroptera*. Os morcegos desta família apresentam ampla diversidade dietética, podem ser insetívoros devido a uma característica ancestral e, até utilizar outras fontes alimentares, como néctar, frutas, sangue, carne de pequenos vertebrados ou misturas onívoras (69). No Brasil, há dez subfamílias, 43 gêneros e 92 espécies representando a família *Phyllostomidae* (15). Em Rio

Claro, tanto no Horto Florestal, quanto na UNESP foram encontrados morcegos das famílias *Molossidae* e *Phyllostomidae*. No Horto Florestal também foi coletada amostras de um morcego da família *Vespertilionidae*.

O Parque Bosque dos Jequitibás foi o local de coleta que apresentou maior prevalência para herpesvírus. O parque está localizado em área urbana, na região central do município de Campinas. Apresenta área total de 10 hectares, sendo formado por 2,33 hectares de floresta estacional semidecidual nativa, além de áreas de vegetação exótica. O local possui edificações como museus, teatro, lanchonetes, pista de corrida, aquário e até um pequeno zoológico (70). Durante o ano, são recebidos aproximadamente um milhão de visitantes no Bosque, sendo uma das áreas públicas mais visitadas de Campinas. Além disso, vivem soltos pelo parque animais como bugios, preguiças e cutias e, inclusive felinos domésticos (71).

Os morcegos foram capturados no *campus* da UNESP, uma área de aproximadamente 1.155.147,79 m² cercada por imensa área verde e grande número de edificações, em Rio Claro (72). No mesmo município foram realizadas coletas no Horto Florestal Edmundo Navarro de Andrade, composto por 2230,53 hectares. Seu bioma é composto de diversas espécies de reflorestamento do gênero *Eucalyptus*, com áreas de sub-bosques bem desenvolvidos. Atravessando o horto há o Ribeirão Claro, principal curso d'água, além dos seus afluentes, os córregos Ibitinga e Santo Antônio (73). A floresta é aberta ao público e, por isso, possui alguns prédios, como museu, lanchonete, centro de visitantes e biblioteca (74).

Em Rio Claro, o *campus* da UNESP foi o local de coleta que apresentou prevalência mais alta para herpesvírus. O local com menor prevalência para herpesvírus foi o Horto Florestal. Os locais onde os morcegos foram capturados para a coleta das amostras apresentam grande circulação de pessoas e de outros animais. Por isso, é importante conhecer quais os patógenos podem estar circulantes entre estes morcegos.

A transmissão e a persistência de microrganismos em morcegos são influenciadas pela diversidade de habitats. Além disso, as alterações ambientais, em regiões neotropicais, como o desmatamento, a urbanização e a intensificação da agricultura podem modificar tanto a composição quanto a dinâmica das comunidades de quirópteros. Por alterar o ecossistema dos hospedeiros reservatórios, podem elevar o risco de transmissão de microrganismos para diferentes espécies e a ocorrência de surtos de doenças (40).

Recentemente, foi apontado que o desmatamento e a antropização, ou seja, a alteração das paisagens naturais pelos humanos pode levar a um aumento da diversidade de morcegos. Como os ambientes modificados apresentam maior complexidade, conseqüentemente oferecem maiores oportunidades para grupos de espécies de morcegos já adaptados a ambientes urbanos. Em contrapartida, as áreas naturais podem ser mais seletivas e adequadas para espécies mais exigentes quanto aos recursos ecológicos (25).

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram que herpesvírus estão presentes em morcegos, já que foram identificados herpesvírus nas amostras de suabe oral e suabe anal em diferentes espécies de morcegos nos distintos locais de coleta. Os herpesvírus identificados pela técnica molecular de Pan-herpesvírus PCR e sequenciamento *Sanger* utilizadas neste estudo apresentaram relação filogenética com herpesvírus da subfamília *Gammaherpesvirinae*. Conhecer os vírus que diferentes espécies de mamíferos hospedam pode auxiliar a prevenção de possíveis surtos de doenças e direcionar ações de medidas preventivas. Assim, as pesquisas envolvendo virologia e ecologia de mamíferos são importantes e se complementam.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Karesh WB, Dobson A, Lloyd-Smith JO, Lubroth J, Dixon MA, Bennett M, et al. Ecology of zoonoses: Natural and unnatural histories. *Lancet*. 2012;380(9857):1936–45.
2. Keesing F, Belden LK, Daszak P, Dobson A, Harvell CD, Holt RD, et al. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature*. 2010;468(7324):647–52.
3. Chattu VK, Kumar R, Kumary S, Kajal F, David JK. Nipah virus epidemic in southern India and emphasizing “One Health” approach to ensure global health security. *J Fam Med Prim care*. 2018;7(2):275–83.
4. Olival KJ, Hosseini PR, Zambrana-Torrel C, Ross N, Bogich TL, Daszak P. Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. *Nature*. 2017;546(7660):646–50.
5. Yinda CK, Ghogomu SM, Conceição-Neto N, Beller L, Deboutte W, Vanhulle E, et al. Cameroonian fruit bats harbor divergent viruses, including rotavirus H, bastroviruses, and picobirnaviruses using an alternative genetic code. *Virus Evol*. 2018;4(1):1–15.
6. Wong S, Lau S, Woo P, Yuen KY. Bats as a continuing source of emerging infections in humans. *Rev Med Virol*. 2007;17(2):67–91.
7. Escalera-Zamudio M, Rojas-Anaya E, Kolokotronis SO, Taboada B, Loza-Rubio E, Méndez-Ojeda ML, et al. Bats, primates, and the evolutionary origins and diversification of mammalian gammaherpesviruses. *MBio*. 2016;7(6):1–9.
8. Shabman RS, Shrivastava S, Tsibane T, Attie O, Jayaprakash A, Mire CE, et al. Isolation and Characterization of a Novel Gammaherpesvirus from a Microbat Cell Line. *mSphere*. 2016;1(1):e00070-15.
9. Dacheux L, Cervantes-Gonzalez M, Guigon G, Thiberge JM, Vandenbogaert M, Maufrais C, et al. A preliminary study of viral metagenomics of french bat species in contact with humans: Identification of new mammalian viruses. *PLoS One*. 2014;9(1).
10. Luis AD, Hayman DTS, O’Shea TJ, Cryan PM, Gilbert AT, Pulliam JRC, et al. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proc R Soc B Biol Sci*. 2013;280(1756):20122753–20122753.
11. Han HJ, Wen H ling, Zhou CM, Chen FF, Luo LM, Liu J wei, et al. Bats as

- reservoirs of severe emerging infectious diseases. *Virus Res.* 2015;205:1–6.
12. Moratelli R, Calisher CH. Bats and zoonotic viruses: Can we confidently link bats with emerging deadly viruses? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(1):1–22.
 13. Omatsu T, Watanabe S. Biological characters of bats in relation to natural reservoir of emerging viruses. 2007;30:357–74.
 14. Schountz T, Baker ML, Butler J, Munster V. Immunological control of viral infections in bats and the emergence of viruses highly pathogenic to humans. *Front Immunol.* 2017;8(SEP).
 15. Nogueira MR, de Lima IP, Moratelli R, Tavares V da C, Gregorin R, Peracchi AL. Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. *Check List.* 2014;10(4):808–21.
 16. Reis NR Dos, Peracchi AL, Pedro W a, Lima IP De. *Morcegos do Brasil. Ecologia.* 2007. 253 p.
 17. Schountz T. Immunology of bats and their viruses: Challenges and opportunities. *Viruses.* 2014;6(12):4880–901.
 18. Brook CE, Dobson AP. Bats as “special” reservoirs for emerging zoonotic pathogens. *Trends Microbiol.* 2015;23(3):172–80.
 19. Plowright RK, Foley P, Field HE, Dobson AP, Foley JE, Eby P, et al. Urban habituation, ecological connectivity and epidemic dampening: the emergence of Hendra virus from flying foxes (*Pteropus* spp.). *Proc R Soc B Biol Sci.* 2011;278(1725):3703–12.
 20. Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes K V., Schountz T. Bats: Important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(3):531–45.
 21. Shi Z. Bat and virus. *Protein Cell.* 2010;1(2):109–14.
 22. Luis AD, O’Shea TJ, Hayman DTS, Wood JLN, Cunningham AA, Gilbert AT, et al. Network analysis of host-virus communities in bats and rodents reveals determinants of cross-species transmission. *Ecol Lett.* 2015;
 23. Zheng X yan, Qiu M, Chen S wei, Xiao J peng, Ma L zhen, Liu S, et al. High prevalence and diversity of viruses of the subfamily Gammaherpesvirinae, family Herpesviridae, in fecal specimens from bats of different species in southern China. *Arch Virol.* 2016;161(1):135–40.
 24. Hu D, Zhu C, Wang Y, Ai L, Yang L, Ye F, et al. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bats from Southeast China. *Sci*

- Rep. 2017;1–12.
25. Afelt A, Lacroix A, Zawadzka-Pawlewska U, Pokojski W, Buchy P, Frutos R. Distribution of bat-borne viruses and environment patterns. *Infect Genet Evol.* 2018;58(September 2017):181–91.
 26. Voigt CC, Kingston T. Bats in the anthropocene: Conservation of bats in a changing world. *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World.* 2015.
 27. Smith I, Wang LF. Bats and their virome: An important source of emerging viruses capable of infecting humans. *Curr Opin Virol.* 2013;3(1):84–91.
 28. Breed AC, Field HE, Smith CS, Edmonston J, Meers J. Bats Without Borders : Long-Distance Movements and Implications for Disease Risk Management. 2010;204–12.
 29. Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, et al. The order Herpesvirales. *Arch Virol.* 2009;154(1):171–7.
 30. Woźniakowski G, Samorek-Salamonowicz E. Animal herpesviruses and their zoonotic potential for cross-species infection. *Ann Agric Environ Med.* 2015;22(2):191–4.
 31. Franco AC, Varela APM, Roehe PM, Cargnelutti JF. Herpesviridae. In: Flores EF, editor. *Virologia Veterinária.* 3^a ed. Santa Maria, RS: Editora da Universidade Federal de Santa Maria; 2017. p. 517–84.
 32. Zarrouk K, Piret J, Boivin G. Herpesvirus DNA polymerases: Structures, functions and inhibitors. *Virus Res.* 2017;234:177–92.
 33. Vandevanter DR, Warren P, Bennett L, Schultz ER, Coulter S, Garber RL, et al. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR . These include : Detection and Analysis of Diverse Herpesviral Species by Consensus Primer PCR. *J Clin Microbiol.* 1996;34(7):1666–71.
 34. Pellett PE, Roizman B. The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. In: Griffin DE, Howley PM, Knipe DM, Lamb RA, Martin MA, editors. *Fields Virology.* 5th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2006. p. 2479–97.
 35. Poole CL, James SH. Antiviral Therapies for Herpesviruses : Current Agents and New Directions. *Clin Ther.* 2018;40(8):1282–98.
 36. Davison AJ. Herpesvirus systematics. *Vet Microbiol.* 2010;143(1):52–69.
 37. Razafindratsimandresy R, Jeanmaire EM, Counor D, Vasconcelos PF, Sall AA, Reynes JM. Partial molecular characterization of alphaherpesviruses isolated

- from tropical bats. *J Gen Virol.* 2009;90(1):44–7.
38. Stannard LM. Viral ultrastructure: Herpesvirus [Internet]. University of Cape Town. 1995 [cited 2018 Oct 20]. Available from: <http://www.virology.uct.ac.za/vir/teaching/linda-stannard/herpesvirus>
 39. Tandler B. Cytomegalovirus in the principal submandibular gland of the little brown bat, *Myotis lucifugus*. *J Comp Pathol.* 1996;114(1):1–9.
 40. Salmier A, Tirera S, De Thoisy B, Franc A, Darcissac E, Donato D, et al. Virome analysis of two sympatric bat species (*Desmodus rotundus* and *Molossus molossus*) in French Guiana. *PLoS One.* 2017;12(11):1–25.
 41. Pozo F, Juste J, Vázquez-Morón S, Aznar-López C, Ibáñez C, Garin I, et al. Identification of novel betaherpesviruses in iberian bats reveals parallel evolution. *PLoS One.* 2016;11(12):1–17.
 42. Sano K, Okazaki S, Taniguchi S, Masangkay JS, Puentespina R, Eres E, et al. Detection of a novel herpesvirus from bats in the Philippines. *Virus Genes.* 2015;51(1):136–9.
 43. Donaldson EF, Haskew AN, Gates JE, Huynh J, Moore CJ, Frieman MB. Metagenomic Analysis of the Viromes of Three North American Bat Species: Viral Diversity among Different Bat Species That Share a Common Habitat. *J Virol.* 2010;84(24):13004–18.
 44. Jánoska M, Vidovszky M, Molnár V, Liptovszky M, Harrach B, Benko M. Novel adenoviruses and herpesviruses detected in bats. *Vet J.* 2011;189(1):118–21.
 45. Molnár V, Jánoska M, Harrach B, Glávits R, Pálmai N, Rigó D, et al. Detection of a novel bat gammaherpesvirus in Hungary. *Acta Vet Hung.* 2008;56(4):529–38.
 46. Watanabe S, Ueda N, Iha K, Masangkay JS, Fujii H, Alviola P, et al. Detection of a new bat gammaherpesvirus in the Philippines. *Virus Genes.* 2009;39(1):90–3.
 47. Wibbelt G, Kurth A, Yasmum N, Bannert M, Nagel S, Nitsche A, et al. Discovery of herpesviruses in bats. *J Gen Virol.* 2007;88(10):2651–5.
 48. Wu Z, Ren X, Yang L, Hu Y, Yang J, He G, et al. Virome Analysis for Identification of Novel Mammalian Viruses in Bat Species from Chinese Provinces. *J Virol.* 2012;86(20):10999–1012.
 49. Sasaki M, Setiyono A, Handharyani E, Kobayashi S, Rahmadani I, Taha S, et al. Isolation and Characterization of a Novel Alpha herpesvirus in Fruit Bats. *J*

- Viol. 2014;88(17):9819–29.
50. Wada Y, Sasaki M, Setiyono A, Handharyani E, Rahmadani I, Taha S, et al. Detection of novel gammaherpesviruses from fruit bats in Indonesia. *J Med Microbiol.* 2018;67(3):415–22.
 51. Wanger A, Chavez V, Huang RSP, Wahed A, Actor JK, Dasgupta A. Overview of Molecular Diagnostics Principles. *Microbiol Mol Diagnosis Pathol.* 2017;233–57.
 52. Aono T, Murakami S, Yanagihara N, Yamanishi K. Detection of human alpha-herpesvirus DNA using consensus primers and specific probes. *Acta Otolaryngol.* 1994;114(S514):132–4.
 53. Vandevanter DR, Warrener P, Bennett L, Schultz ER, Coulter S, Garber RL, et al. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *J Clin Microbiol.* 1996;34(7):1666–71.
 54. Gomes A, Korf MSB. Genetic Testing Techniques. *Pediatric Cancer Genetics.* Elsevier Inc.; 47-64 p.
 55. Caldart ET, Mata H, Canal CW, Ravazzolo AP. Análise filogenética: conceitos básicos e suas utilizações como ferramenta para virologia e epidemiologia molecular Phylogenetic Analysis: Basic Concepts and Its Use as a Tool for Virology and Molecular Epidemiology. *Acta Sci Vet.* 2016;44(September):1–20.
 56. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 2016;33(7):1870–4.
 57. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980;16(2):111–20.
 58. Saitou N, Nei M. The Neighbor-joining Method : A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees '. 1987;4(4):406–25.
 59. Wu Z, Yang L, Ren X, He G, Zhang J, Yang J, et al. Deciphering the bat virome catalog to better understand the ecological diversity of bat viruses and the bat origin of emerging infectious diseases. *ISME J.* 2016;10(3):609–20.
 60. Pagamjav O, Sakata T, Ibrahim E-SM, Sugimoto C, Takai S, Paweska JT, et al. Detection of Novel Gammaherpesviruses in Wild Animals of South Africa. *J Vet Med Sci.* 2005;67(11):1185–8.
 61. Brock AP, Cortés-Hinojosa G, Plummer CE, Conway JA, Roff SR, Childress AL, et al. A novel gammaherpesvirus in a large flying fox (*Pteropus vampyrus*)

- with blepharitis. *J Vet diagnostic Investig.* 2013;25(3):433–7.
62. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Doenças Microbianas do Sistema Cardiovascular e Linfático. In: *Microbiologia*. 10 ed. Porto Alegre: Artmed; 2012. p. 634–73.
 63. Host KM, Damania B. Discovery of a Novel Bat Gammaherpesvirus: TABLE 1. *mSphere*. 2016;1(1):e00016-16.
 64. Abdelgawad A, Azab W, Damiani AM, Baumgartner K, Will H, Osterrieder N, et al. Zebra-borne equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infection in non-African captive mammals. *Vet Microbiol.* 2014;169(1–2):102–6.
 65. Schrenzel MD, Osborn KG, Shima A, Klieforth RB, Maalouf GA. Naturally occurring fatal herpes simplex virus 1 infection in a family of white-faced saki monkeys (*Pithecia pithecia pithecia*). *J Med Primatol.* 2003;32(1):7–14.
 66. Geldenhuys M, Mortlock M, Weyer J, Bezuidt O, Seamark ECJ, Kearney T, et al. A metagenomic viral discovery approach identifies potential zoonotic and novel mammalian viruses in *Neoromicia* bats within South Africa. *PLoS One.* 2018;13(3):1–27.
 67. Santos DD, Ortêncio Filho H, Batista HB de CR, Sandoli DM. IV Simpósio de Ecologia e Conservação de Mamíferos Silvestres. In: *Hepesvírus em morcegos (Mammalia Chiroptera) de Maringá: Resultados iniciais*. Maringá; 2016. p. 9.
 68. Lima IP De. Espécies de morcegos (Mammalia , Chiroptera) registradas em parques nas áreas urbanas do Brasil e suas implicações no uso deste ambiente. 2008;71–85.
 69. Carrillo-araujo M, Ta N. Phyllostomid bat microbiome composition is associated to host phylogeny and feeding strategies. 2015;6(May):1–9.
 70. Gomes JAM, Torres RBT, Bernacci LC. Dinâmica da vegetação nativa de um fragmento urbano (Bosque dos Jequitibás, Campinas - SP). p. 34–47.
 71. Barioni EC, Amorim ACR de. A Biologia e as significações de natural no Bosque dos Jequitibás, Campinas, SP. 1888. p. 1–16.
 72. Conheça o Câmpus da UNESP de Rio Claro [Internet]. [cited 2018 Sep 29]. Available from: <http://www.rc.unesp.br>
 73. Sampaio FH, Christofoletti SR, Zanchetta D. Espacialização das pesquisas científicas realizadas na FlorestamEstadual “Edmundo Navarro de Andrade”, Rio Claro - SP. p. 1–15.

74. Andrade NDE, Rio EM, Sp C, Zampin IC. Revista Gestão em Foco - Edição nº 9 – Ano: 2017. 2017;193–210.

ANEXO



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

DECLARAÇÃO

Em observância ao §4º artigo 1º da informação CCPG-UNICAMP/002/13, de 14/08/2013 referente à Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada "*Identificação e Caracterização de Herpesvirus em amostras de Morcegos*", desenvolvida no Programa de Pós Graduação em Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Ligia Pinho Cuccato
Nome do (a) Aluno(a): Ligia Pinho Cuccato

Assinatura: [Signature]
Nome do (a) Orientador(a): Clarice Weis Arns

Profª Drª Clarice Weis Arns
Laboratório de Virologia
Depto. Genética, Evolução e Bioagentes
Instituto de Biologia - UNICAMP
13083-970 - Campinas - SP

Campinas, 18 de Julho de 2018