

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**OCORRÊNCIA DE VÍRUS ENTÉRICOS EM *Podocnemis expansa*
(SCHWEIGGER, 1812) E SUA IMPORTÂNCIA NA SAÚDE AMBIENTAL NOS
RIOS ARAGUAIA E CRIXÁS-AÇU (CENTRO OESTE, BRASIL).**

AMANDA TOLEDO LOURENÇO

VILA VELHA
MAIO/ 2019

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

OCORRÊNCIA DE VÍRUS ENTÉRICOS EM *Podocnemis expansa*
(SCHWEIGGER, 1812) E SUA IMPORTÂNCIA NA SAÚDE AMBIENTAL NOS
RIOS ARAGUAIA E CRIXÁS-AÇU (CENTRO OESTE, BRASIL).

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do grau de Mestre em Ecologia.

AMANDA TOLEDO LOURENÇO

VILA VELHA
MAIO/ 2019

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

L892o Lourenço, Amanda Toledo.
Ocorrência de vírus entéricos em *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) e sua importância na saúde ambiental nos rios Araguaia e Crixás-açu (centro oeste, Brasil) / Amanda Toledo Lourenço. – 2019.
63 f. : il.

Orientador: João Luiz Rossi Junior.
Coorientador: Fernando Vicentini.
Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) -
Universidade Vila Velha, 2019.
Inclui bibliografias.

1. Medicina veterinária. 2. Zoonose. 3. Tartaruga.
4. Amazonia. I. Rossi, Junior, João Luiz. II. Vicentini, Fernando.
III. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 636.89

AMANDA TOLEDO LOURENÇO

**OCORRÊNCIA DE VÍRUS ENTÉRICOS EM *Podocnemis expansa*
(SCHWEIGGER, 1812) E SUA IMPORTÂNCIA NA SAÚDE AMBIENTAL NOS
RIOS ARAGUAIA E CRIXÁS-AÇU (CENTRO OESTE, BRASIL).**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do grau de Mestre em Ecologia.

Aprovada em 08 de maio de 2019,

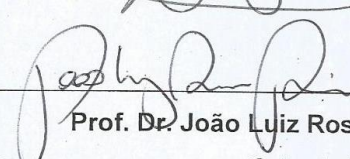
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Luiz Antônio Favero Filho – (UFES)



Prof. Dr. Marcelo Renan Deus Santos – (UVV)



Prof. Dr. João Luiz Rossi Junior – (UVV)

Orientador

AGRADECIMENTOS

À FAPES, que possibilitou a realização desse trabalho.

Agradeço a Universidade Vila Velha e ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecossistemas que me recebeu de braços abertos e viabilizou este trabalho.

Ao Dr. João Luiz Rossi Jr. pela orientação, que me abriu portas e compartilhou comigo seu conhecimento e, principalmente a oportunidade de conhecer o “mundo novo” das tartarugas de água doce.

Ao Dr. Fernando Vicentini pela disponibilidade e por apesar das minhas dificuldades e limitações, não medi esforços para me ajudar, compartilhando seu saber.

A Msc. Ana Paula Jejesky Oliveira que ultrapassou os limites do companheirismo, e sempre me impulsionou para frente, me puxou as orelhas e me manteve seguindo, muitas vezes abrindo mão dos seus próprios interesses em função dos meus deveres.

A Msc. Alexandra Frossard e Dra. Adriana Regina Chippari-Gomes pela parceria e por nos ter convidado a participar deste projeto incrível.

Ao Projeto Quelônio da Amazônia pela grande parceria que possibilitou a realização do trabalho.

À Universidade Federal do Espírito Santo campus de São Mateus pela recepção e assistência indispensável.

Ao Dr. Balazs Harrach da Academia de Ciências da Hungria, bem como o Dr. Gyozo Viktor Kajan, Dra. Maria Benko, Dr. Andor Doszpoly, pela parceria indispensável à elaboração desta pesquisa.

Agradeço a todos os meus professores que participaram e contribuíram para a minha formação.

À minha família, principalmente meus pais pelo incentivo e contribuições quando mais precisei.

Agradeço também a banca examinadora pelas valiosas contribuições.

SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT	02
1-INTRODUÇÃO GERAL	03
2-FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	
2.1- <i>Podocnemis expansa</i>	06
2.2- Caracterização Dos Patógenos Virais Entéricos	09
2.2.1- Adenovirus	09
2.2.2- Rotavírus	10
2.2.3- Picobirnavírus	11
2.2.4- Herpesvírus	12
REFERENCIAS	15
3- ARTIGO CIENTIFICO	
3.1- Investigação de vírus entéricos em amostras de intestino de <i>Podocnemis expansa</i> (SCHWEIGGER, 1812) do Cerrado, centro-oeste do Brasil.	24
3.2- Primeiro Relato De Vírus Simio em <i>Podocnemis expansa</i> (SCHWEIGGER, 1812) no Cerrado, Centro-Oeste do Brasil.	51
4-ANEXOS	58

RESUMO

LOURENÇO, AMANDA TOLEDO, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, Maio de 2019 **Ocorrência de vírus entéricos em *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) e sua importância na saúde ambiental nos rios Araguaia e Crixás-açu (centro oeste, Brasil)**. Orientador: Dr. João Luiz Rossi Junior e Coorientador: Dr. Fernando Vicentini.

Conhecer as doenças infecciosas que acometem espécies selvagens é importante não só para sua saúde e conservação, mas também para a saúde pública e animal. *Podocnemis expansa* representa um importante papel para a ecologia dos ecossistemas onde ocorre. O declínio de muitas populações é motivo de alarme para aqueles que se preocupam com a saúde dos rios, sendo um hospedeiro em potencial e infecções por vírus nesta espécie foram pouco relatadas. Neste contexto, o principal objetivo deste estudo foi investigar a presença de Rotavírus, Picobirnavírus, Adenovírus e Herpesvírus em filhotes de *Podocnemis expansa* em amostras de intestino coletados no rio Araguaia e Crixás-açu. Foi utilizada a técnica de Eletroforese em gel de poliacrilamida para a detecção dos Rotavírus e Picobirnavírus. Para detecção dos Adenovírus e Herpesvírus as amostras foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e as positivas foram encaminhadas para o sequenciamento. Na temporada 2016/2017 no rio Araguaia foram coletados 23 filhotes recém-eclodidos e na temporada de 2017/2018 no rio Crixás-açu 20 filhotes recém-eclodidos. No total de 43 amostras avaliadas nenhuma apresentou perfil eletroforético para os vírus de RNA testados. Nos testes de PCR, em uma das amostras apresentou bandas específicas para adenovírus símios. Sendo provavelmente uma contaminação ambiental, o vírus possivelmente foi transmitido da mãe para o filhote, assim há possibilidade destes animais selvagens estarem vulneráveis a estes vírus. Considerando que não há descrição prévia destes vírus em *P. expansa*, há possibilidade de se estar diante da primeira descrição, evidenciando a similaridade com vírus de outros hospedeiros.

Palavras chaves: Saúde única, vírus, zoonose, tartaruga-da-amazônia.

ABSTRACT

LOURENÇO, AMANDA TOLEDO, M.Sc, Universidade Vila Velha - ES, May de 2019. **Occurrence of enteric virus in *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) and its importance in environmental health in the Araguaia and Crixás-açu rivers (west-central Brazil)**. Advisor: Dr. João Luiz Rossi Junior and Co- advisor: Dr. Fernando Vicentini.

Knowing the infectious diseases that affect wild species is important not only for their health and conservation, but also for public and animal health. *Podocnemis expansa* plays an important role in the ecology of the ecosystems where it occurs. The decline of many populations is cause for alarm for those concerned with river health, being a potential host and virus infections in this species have been poorly reported. In this context, the main objective of this study was to investigate the presence of Rotavirus, Picobirnavirus, Adenovirus and Herpesvirus in *Podocnemis expansa* pups in intestinal samples collected in the Araguaia and Crixás-açu rivers. Polyacrylamide gel electrophoresis was used for the detection of Rotavirus and Picobirnavirus. For the detection of Adenovirus and Herpesvirus the samples were submitted to the Polymerase Chain Reaction (PCR) and the positive samples were sent for sequencing. In the 2016/2017 season on the Araguaia river, 23 newly hatched puppies were collected and in the 2017/2018 season on the Crixás-açu river, 20 newly hatched pups were collected. In the total of 43 samples evaluated no electrophoretic perfil for the tested RNA viruses. In the PCR tests, in one of the samples presented specific bands for simian adenovirus. Probably an environmental contamination, the virus may have been transmitted from the mother to the baby, so there is a possibility that these wild animals are vulnerable to these viruses. Considering that there is no previous description of these viruses in *P. expansa*, it is possible to be in front of the first description, evidencing the similarity with viruses of other hosts.

Keywords: Amazonian turtle, one health, virus, zoonosis.

1- INTRODUÇÃO GERAL

No ambiente natural, os patógenos fazem parte do conjunto de elementos que compõem um ecossistema, e a inter-relação entre hospedeiros e parasitas contribui para a dinâmica das populações. Deste modo, fatores ambientais, disponibilidade de alimentos, abrigo, temperatura, predadores e a integridade do habitat atuam sobre as populações mantendo o equilíbrio (Barbosa, Martins e Magalhães 2011). Nas espécies que sofrem com a degradação do habitat, proximidades com áreas urbanas e com animais domésticos, muitas dessas inter-relações podem ser comprometidas tornando-as mais predispostos a agentes infecciosos, favorecendo a transmissão de doenças (Hoberg 2010).

As modificações ambientais em todos os níveis afetam consideravelmente a distribuição das doenças (Grisotti 2010 e Barbosa, Martins e Magalhães 2011). Essas mudanças podem permitir o aumento do contato entre espécies de patógenos e novas populações de hospedeiros, onde a seleção natural pressiona para dominância de patógenos que se adaptam a essas novas condições ambientais (Daszak et al. 2001 e Heard 2013).

Os ecossistemas aquáticos estão sob severos estresses antrópicos, assim como os rios onde há um avanço constante das atividades humanas (Castro et al. 2011 e Hoberg 2010). No Centro-Oeste brasileiro, as atividades agropecuárias se intensificaram promovendo um aumento constante do desmatamento da vegetação nativa (Ribeiro, Ferreira e Ferreira 2016). Na bacia Tocantins/ Araguaia o uso do solo no entorno é para agricultura, pastagens e áreas urbanas, tendo um impacto sobre a qualidade da água. É uma das áreas prioritárias para conservação da biodiversidade

aquática do Cerrado e tem sido alvo de debates políticos e ambientais na região Centro-Oeste devido à intensa e indiscriminada expansão de atividades agropecuárias, com uma maior degradação do ambiente natural durante as últimas quatro décadas (Magalhães Filho 2013).

Os testudines de água doce da Amazônia são répteis que apresentam uma ampla distribuição na bacia hidrográfica do rio Amazonas e do rio Araguaia. Dentre eles destacam-se as espécies do gênero *Podocnemis* (Pritchard e Trebbau 1984 e Alho e Pádua 1982). A *P. expansa* possui alto potencial para exploração zootécnica, pelo alto valor econômico agregado a sua carne e seus subprodutos (Malvasio 2001 e Godoy et al. 2010). O uso como fonte de proteína animal para a alimentação humana é antigo e originou-se com índios e ribeirinhos, tornando-se hábito alimentar e cultural (Daszak et al. 2001, Alves 2009 e Mogollones et al. 2010). Essa exploração relacionada com atividades antrópicas propicia o aumento do contato entre essas populações favorecendo a transmissão de doenças. Assim, espécies podem atuar como reservatório desempenhando um importante papel na manutenção dos agentes patogênicos nas comunidades e na sua transmissão a pequenas populações, causando declínios populacionais (Daszak et al. 2001), como podem também facilitar a disseminação entre as cepas virais, envolvendo cepas humanas e animais (Komoto et al. 2016).

Como todas as espécies de tartarugas que vivem em ambientes límnicos, *P. expansa* representa um importante papel para a ecologia dos ecossistemas onde ocorre. É um dos maiores componentes das redes tróficas dos rios, desempenhando importantes papéis nas funções vitais, como fluxo de energia, ciclagem de nutrientes, dispersão da vegetação ripária e manutenção da qualidade da água

(Hahn 2005). O declínio de muitas populações é motivo de alarme para aqueles que se preocupam com a saúde dos rios.

A relevância de pesquisas sobre vírus em testudines se fundamenta em aspectos como a necessidade de maiores conhecimentos sobre a ocorrência de agentes potencialmente causadores de doenças em animais de vida livre, ou a capacidade de infectar múltiplas espécies, ou ainda a possibilidade de emergência de novos agentes causadores de doenças no próprio meio aquático. É importante ressaltar que tais aspectos podem ser favorecidos por amplo desequilíbrio ambiental, em que atividades humanas geram mudanças ecológicas e climáticas que favoreçam a insurgência e ressurgência de vírus e outros patógenos que podem afetar os testudines (Daszak et al. 2001; Grisotti 2010 e Barbosa, Martins e Magalhães 2011).

Com o acréscimo de fontes poluidoras, há um aumento da população de micro-organismos patogênicos (Silva et al. 2011) como os vírus entéricos, presentes no trato gastrointestinal de indivíduos infectados (Komoto et al. 2016). Neste estudo investigamos a presença de Rotavírus, Picobirnavirus, Herpesvírus e Adenovírus em filhotes de *Podocnemis expansa*, em amostras de intestino coletados no rio Araguaia e Crixás-açu. O trabalho foi desenvolvido sob a hipótese de que há ocorrência de sequências do genoma de vírus entéricos em *Podocnemis expansa*.

2- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1- *Podocnemis expansa*

Os ecossistemas amazônicos possuem uma grande biodiversidade, abrigando um expressivo número de espécies animais e vegetais, dentre eles destacam-se as espécies do gênero *Podocnemis*, a tartaruga-da-amazônia (*P. expansa*) e o tracajá (*P. unifilis*) (Pritchard e Trebbau 1984 e Alho e Pádua 1982). A *P. expansa* (Schweigger 1812) (Figura 1) é considerado o maior testudine de água doce da América do Sul, atingindo até 107,0 cm de comprimento (Oliveira et al. 2011), tendo ampla distribuição geográfica, sendo encontrada na Bolívia, Colômbia, Equador, Guianas, Peru, Venezuela e Brasil (Siqueira 2014 e Vogt 2008).



Figura 1: *Podocnemis expansa* em uma praia do rio Crixás-açu, Estado do Goiás- Brasil. Autor: Alexandra Frossard.

Há uma sincronização entre a vazante e o desencadeamento do comportamento de nidificação da tartaruga-da-amazônia. Este comportamento só começa quando a água se estabiliza em seu nível mais baixo (Rueda-Almonacid et al.2007). A imprevisibilidade dos níveis de água é um fator seletivo importante que influencia o período e a escolha do local da postura de *P. expansa* (Alho e Pádua 1982), sendo sua época reprodutiva entre os meses de setembro e março. Esta espécie faz postura em média, de 60 a 100 ovos em covas de aproximadamente 60 cm de profundidade, espalhando areia para cobri-los e camuflar o local (Almeida 2007). A eclosão ocorre dentro de 45 a 60 dias (Salera Junior, Portelinha e Malvasio 2009) (Figura 2) e depois da temporada reprodutiva, os adultos migram para o rio em busca dos lugares habituais de alimentação (Rueda-Almonacid et al.2007).

A tartaruga-da-amazônia consome uma grande variedade de frutos, sementes, flores, folhas e esponjas de água doce. Os indivíduos adultos podem ser importantes dispersores de sementes das florestas tropicais. Os filhotes aspiram partículas alimentícias sólidas em suspensão na superfície da água por meio de um mecanismo conhecido como neustofagia (Rueda-Almonacid et al.2007 e Vogt 2008).

A *P. expansa* representa um importante papel para a ecologia dos ecossistemas onde ocorre. São os maiores componentes das redes tróficas dos rios, desempenhando importantes papéis nas funções vitais, como fluxo de energia, ciclagem de nutrientes, dispersão da vegetação ripária e manutenção da qualidade da água (Hahn 2005). Ela está presente na dieta de inúmeros grupos de animais vertebrados, dentre os quais, anuros, lagartos, jacarés, aves, peixes e mamíferos. A maior ameaça natural sobre as populações de *P. expansa* é a predação de filhotes

por aves e peixes carnívoros, que se alimentam desses filhotes no percurso entre a cova de eclosão e o rio (Garcia 2006). Em algumas regiões da Amazônia, a onça-pintada (*Panthera onca*) é o único predador das fêmeas adultas, sendo esta predação predominantemente noturna, quando sobem às praias para nidificar (Salera Junior, Portelinha e Malvasio 2009).

Esta espécie possui alto potencial para exploração zootécnica, pelo alto valor econômico agregado a sua carne e seus subprodutos (Malvasio 2001 e Godoy et al. 2010). O uso como fonte de proteína animal para a alimentação humana é antiga e originou-se com índios e ribeirinhos, tornando-se hábito alimentar e cultural (Alves 2009 e Mogollones et al. 2010).

2.2- Caracterização dos patógenos virais entéricos

2.2.1- Adenovirus

Os adenovírus (Advs) são vírus de DNA fita dupla sem envelope com um diâmetro de 80-110 nm, estão presentes em várias espécies selvagens de vertebrados, incluindo mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes (Davison, Wright e Harrach 2000; Wellehan et al. 2004; Schrenzel et al. 2005 e Benko et al. 2005). Eles pertencem à família Adenoviridae, a qual é composta por cinco gêneros oficiais e um gênero proposto na família. Quatro gêneros (*Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Ichtadenovirus* e *Testadenovirus*) compreendem AdVs que provavelmente co-evoluíram com mamíferos, aves, peixes e tartarugas, respectivamente. Os outros dois gêneros (*Atadenovirus* e *Siadenovirus*) têm uma ampla gama de hospedeiros. Somente o gênero *Mastadenovirus* possui importância clínica, podendo infectar diversos mamíferos como morcegos, bovinos, equinos, caninos, murinos, ovinos, porcinos, e primatas, incluindo os humanos (*International Committee on Taxonomy of Viruses –ICTV 2015*).

Os adenovírus são altamente prevalentes em populações humanas e o fato de serem eliminados em grandes quantidades nas fezes e urina de indivíduos infectados, levou a realização de estudos que demonstraram a alta prevalência desses vírus em diferentes ambientes aquáticos, como efluentes, rios e mares (Tavares, Cardoso e Brito 2005). Isso poderia representar uma fonte potencial de infecção para *P. expansa*.

O vírus infecta e replica-se no epitélio das vias respiratórias superiores, na conjuntiva e também no epitélio intestinal (Walker e Ison 2014). As partículas virais

já foram isoladas de pelo menos 40 espécies de vertebrados (Davison, Wright e Harrach 2000; Benko e Harrach 2003; Wellehan et al. 2004 e Schrenzel et al. 2005). Essas infecções têm sido diagnosticadas em muitas espécies de répteis como, crocodilos, serpentes, lagartos e testudines (Rivera et al. 2009 e Ariel 2011). Os Advs encontrados em serpentes e lagartos pertencem ao gênero *Atadenovirus* (Benko et al. 2002; Farkas et al. 2002; Benko e Harrach 2003 e Farkas e Gál 2009). Em testudines, diferentes tipos de infecções têm sido descrito, sendo relatado em *Indotestudo forsteniie* e *Manouria impresso* o vírus que pertencia ao gênero *Siadenovirus* (Schumacher et al. 2012). O diagnóstico de Advs atualmente é feito por meio de ferramentas moleculares tais como Reação em Cadeia Polimerase (PCR) a partir de esfregaços ou órgãos, seguida de sequenciamento genético (Wellehan et al. 2004).

2.2.2- Rotavírus

O gênero *Rotavirus*, pertencente à família Reoviridae, é um vírus não envelopado, possui formato icosaédrico, diâmetro de aproximadamente 70 nm e possui genoma viral formado por 11 segmentos de RNA dupla-fita (Clark e McKendrick 2004; Estes e Kapikian 2007 e ICTV 2015). O tamanho dos segmentos genômicos varia entre 3302 pares de base (pb) para o maior e o menor com 667 pb. Essa diferença de tamanho permite caracterizar o perfil de migração singular dos segmentos genômicos para os rotavírus quando separados por eletroforese em gel de poliacrilamida (Than e Kim 2013). Dessa forma, podem ser classificados de acordo com peso molecular e pelo padrão eletroforético de migração de cada

segmento genômico por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, apresentando um perfil eletroforético típico para este vírus (Gombold et al. 1994).

É historicamente o principal agente causador da gastroenterite viral aguda e responsável por alta taxa de hospitalização (Ramani e Kang 2009 e Madsen et al. 2014). Eles infectam os enterócitos das vilosidades do intestino delgado e replica exclusivamente no citoplasma celular sendo capazes de realizar rearranjo genético (Estes e Kapikian 2007 e Trask, McDonald e Patton 2012). Esses vírus são predominantemente espécie-específicos, entretanto, infecções heterólogas são relatadas com grande frequência. Cepas virais que são geneticamente relacionadas com vírus de origem bovina, suína, canina, felina e aviária têm sido isoladas de crianças com infecções sintomáticas ou assintomáticas (da Silva Medeiros et al. 2015 e Komoto et al. 2016). Ademais, combinações genotípicas comumente associadas com cepas de rotavírus do grupo A de origem humana têm sido identificadas em animais (Rahman et al. 2003 e Steyer et al. 2008).

2.2.3- Picobirnavírus

Picobirnavirus (PBV) é o único gênero pertencente à família Picobirnaviridae. De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV) são classificados em duas espécies *Human picobirnavirus* e *Rabbit picobirnavirus*. Sua nomenclatura está diretamente relacionada às características estruturais do vírus (Nates, Gatti e Ludert 2011 e ICTV 2015). Seu diâmetro vai de 30 a 35 nm, não é envelopado e é constituído por um capsídeo icosaédrico que

protege os dois segmentos do RNA dupla-fita (Mondal e Majee 2014). O tamanho dos segmentos genômicos tem sido estimado utilizando como referência o perfil de migração eletroforética do genoma, tendo um padrão em eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) (Ludert et al.1991). Assim como ocorre com outros vírus de genoma RNA dupla-fita, tais como rotavírus e birnavírus, as bandas que constituem os segmentos genômicos do *Picobirnavírus* podem apresentar perfis de mobilidade eletroforética distintos (longo ou curto) em diferentes amostras submetidas à EGPA (Gatti et al. 1989).

A transmissão do vírus ocorre por via fecal-oral, relatado como zoonótico (Malik et al. 2014). São descritos vários estudos de detecção e/ou caracterização molecular de PBV encontrados em diversas espécies, em répteis, esses vírus foram encontrados em diferentes espécies de serpentes (Fregolente et al.2009). Alguns surtos de infecções virais novas e emergentes indicam picobirnavirus envolvidos, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (Ganesh, Masachessi e Mladenova 2014).

2.2.4- Herpesvírus

De acordo com o ICTV os herpesvírus pertencem a Ordem Herpesvirales, Família Herpesviridae, constituída por três subfamílias: a *Herpesviridae* que inclui os herpesvírus, que acometem aves, répteis e mamíferos; a família *Alloherpesviridae*, que inclui os que acometem peixes e anfíbios; e a *Malacoherpesviridae*, que inclui os que acometem bivalves. A família *Herpesviridae* é dividida em três subfamílias, a

Alphaherpesvirinae, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae* (Davison et al. 2009). Os herpesvírus são grandes, possuem o DNA de fita dupla linear, que é envolto por capsídeo icosaédrico. Este capsídeo é rodeado por um envelope lipídico que apresenta projeções em sua superfície. Os vírions são envelopados e possuem tamanho entre 100-300 nm, sendo sua estrutura facilmente identificada por microscopia eletrônica (Strauss e Strauss 2006; Nathanson 2007). Em geral, infecções graves são observadas em animais imunossuprimidos, ou muito jovens, ou quando o vírus infecta um hospedeiro não natural (Davison 2013 e Marschang 2011).

A característica mais marcante do vírus é a capacidade de latência no organismo do hospedeiro, o que significa que estes agentes se mantêm no organismo do animal infectado por longos períodos (Marschang 2014). São descritos mais de 100 tipos de herpesvírus, que acometem vertebrados e invertebrados. Tendem a ser adaptados a uma determinada espécie na qual ficam disseminados na população; contudo, podem infectar outras espécies (Mader e Divers 2013). Em répteis, já foram descritos em testudines, lagartos e crocodilianos (Marschang 2011). Nos testudines, os herpesvírus foram associados a várias doenças, que são caracterizadas por estomatite necrosante, difteria, hepatite, rinite, traqueíte e pneumonia (Jacobson et al. 1991 e Johnson et al. 2010).

Os herpesvirus de reptéis estão classificados dentro da subfamília *Alphaherpesvirinae*, junto com, os herpesvirus de mamíferos e aves e recentemente foi criado um novo gênero *Scutavirus*, cuja única espécie é o *Chelonid alphaherpesvirus 5* (ChHV5) associado à fibropapilomatose de tartarugas marinhas.

Outro gênero, ainda sem denominação, cujo representante é o *Chelonid alphaherpesvirus 6*, está associado à doença *Lung-eye-trachea* (LETV), responsável por acometer pulmão, olho e traqueia de tartarugas marinhas (Curry et al. 2000, Ariel 2011 e Monenzi et al.2016). Embora outros herpesvírus de testudines de águas salgadas já tenham sido descritos, como o ChHV1, associado à doença *Grey Patch Disease* (GPD) (Rebell et al. 1975), o ChHV2, o ChHV3 e o ChHV4, até a presente data não foram reconhecidos e nem classificados pelo ICTV (Monenzi et al.2016).

Baseado no sequenciamento parcial do gene da DNA polimerase viral, quatro genótipos foram identificados como *Testudinid herpesvirus 1 a 4* (TeHV-1 a TeHV-4) (Bicknese et al. 2010). Entre esses genótipos, o TeHV-3 parece ser o mais patogênico, e tem sido demonstrado que afeta várias espécies de testudines, com as do gênero *Testudo* sendo o mais sensível (Marschang 2014). As infecções por herpesvírus podem se manifestar com sinais agudos ou pode se tornar latente para o resto da vida do animal, ou até que o hospedeiro fique suficientemente. O diagnóstico dos Herpesvírus atualmente é feito por meio de ferramentas moleculares tais como Reação em Cadeia Polimerase (PCR) a partir de esfregaços ou órgãos, seguida de sequenciamento genético (Wellehan et al. 2004).

REFERENCIAS

Alho, C. J., & Pádua, L. F. (1982). Sincronia entre o regime de vazante do rio e o comportamento de nidificação da tartaruga da Amazônia *Podocnemis expansa* (Testudinata: Pelomedusidae). *Acta Amazonica*, 12(2), 323-326.

Almeida, C. G. D. (2007). Fontes e disponibilidade de cálcio e fósforo para a tartaruga-da-amazônia- *Podocnemis expansa* criada em cativeiro. *Dissertação de conclusão do Curso de Pós-Graduação em Aquicultura*, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Alves, R. D. O. (2009). Criação abate e comercialização de animais silvestres. *Monografia de conclusão de curso de especialização em vigilância sanitária e controle da qualidade de alimentos*. Universidade Castelo Branco. Brasília, DF.

Ariel, E. (2011). Viruses in reptiles. *Veterinary research*, 42(1), 1-12.

Barbosa, A. D., Martins, N. R. S., & Magalhães, D. F. (2011). Zoonoses e saúde pública: riscos da proximidade humana com a fauna silvestre. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, 14 (1), 1-9.

Benko, M., & Harrach, B. (2003). Molecular evolution of adenoviruses. In *Adenoviruses: Model and Vectors in Virus-Host Interactions*. Springer, Berlin, Heidelberg, 3- 35.

Benko, M., Elo, P., Ursu, K., Ahne, W., LaPatra, S. E., Thomson, D., & Harrach, B. (2002). First molecular evidence for the existence of distinct fish and snake adenoviruses. *Journal of virology*, 76(19), 10056-10059.

Benko, M., Harrach, B., Both, G. W., Russell, W. C., Adair, B. M., Adam, E., & Kidd, A. H. (2005). Adenoviridae. *Virus Taxonomy. Eighth Report of the international*

committee on taxonomy of viruses, 1st ed. CM Fauquet, MA Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and LA Ball, eds. Elsevier, San Diego, 213-218.

Bicknese, E. J., Childress, A. L., & Wellehan Jr, J. F. (2010). A novel herpesvirus of the proposed genus Chelonivirus from an asymptomatic bowsprit tortoise (*Chersina angulata*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 41(2), 353-358.

Castro, S. S. (2011). Erosão hídrica na alta bacia do rio Araguaia: distribuição, condicionantes, origem e dinâmica atual. *Revista do Departamento de Geografia*, 17 (1), 38-60.

Clark, B., & McKendrick, M. (2004). A review of viral gastroenteritis. *Current opinion in infectious diseases*, 17(5), 461-469.

Curry, S. S., Brown, D. R., Gaskin, J. M., Jacobson, E. R., Ehrhart, L. M., Blahak, S., ... & Klein, P. A. (2000). Persistent infectivity of a disease-associated herpesvirus in green turtles after exposure to seawater. *Journal of Wildlife Diseases*, 36(4), 792-797.

da Silva Medeiros, T. N., Lorenzetti, E., Alfieri, A. F., & Alfieri, A. A. (2015). Phylogenetic analysis of a G6P [5] bovine rotavirus strain isolated in a neonatal diarrhea outbreak in a beef cattle herd vaccinated with G6P [1] and G10P [11] genotypes. *Archives of virology*, 160(2), 447-451.

Daszak, P., Cunningham, A. A., & Hyatt, A. D. (2001). Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta tropica*, 78(2), 103-116.

Davison, A. J. (2013). Evolution of the herpesviruses. *Veterinary Microbiology*, 86, 69–88.

Davison, A. J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G. S., McGeoch, D. J., Minson, A. C., & Thiry, E. (2009). The order herpesvirales. *Archives of virology*, 154(1), 171-177.

Davison, A. J., Wright, K. M., & Harrach, B. (2000). DNA sequence of frog adenovirus. *Journal of General Virology*, 81(10), 2431-2439.

Estes, M. K., & Kapikian, Z. A. (2007). Rotaviruses. *Fields Virology*, (2), 1917-74.

Farkas, S. L., & Gál, J. (2009). Adenovirus and mycoplasma infection in an ornate box turtle (*Terrapene ornata ornata*) in Hungary. *Veterinary Microbiology*, 138(1-2), 169-173.

Farkas, S. L., Benko, M., Élo, P., Ursu, K., Dán, Á., Ahne, W., & Harrach, B. (2002). Genomic and phylogenetic analyses of an adenovirus isolated from a corn snake (*Elaphe guttata*) imply a common origin with members of the proposed new genus Atadenovirus. *Journal of general virology*, 83(10), 2403-2410.

Fregolente, M. C. D., de Castro-Dias, E., Martins, S. S., Spilki, F. R., Allegretti, S. M., & Gatti, M. S. V. (2009). Molecular characterization of picobirnaviruses from new hosts. *Virus research*, 143(1), 134-136.

Ganesh, B., Masachessi, G., & Mladenova, Z. (2014). Animal picobirnavirus. *Virusdisease*, 25(2), 223-238.

García, M. (2006). Fatores ambientais relacionados à nidificação de *Podocnemis expansa*, no rio Javaés, entorno do Parque Nacional do Araguaia, Tocantins. *Dissertação de conclusão do Curso de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente*, Universidade Federal do Tocantins, Rio Javaés, entorno do Parque Nacional do Araguaia, Tocantins.

Gatti, M. S., de Castro, A. F., Ferraz, M. M., Fialho, A. M., & Pereira, H. G. (1989). Viruses with bisegmented double-stranded RNA in pig faeces. *Research in Veterinary Science*, 47(3), 397-398.

Godoy, R., Undurraga, E. A., Wilkie, D., Reyes-García, V., Huanca, T., Leonard, W. R., & Vadez, V. (2010). The effect of wealth and real income on wildlife consumption

among native Amazonians in Bolivia: estimates of annual trends with longitudinal household data (2002–2006). *Animal Conservation*, 13(3), 265-274.

Gombold, J. L., & Ramig, R. F. (1994). Genetics of the rotaviruses. *Current topics in microbiology and immunology*, 185, 129-177.

Grisotti, M. (2010). Doenças infecciosas emergentes e a emergência das doenças: uma revisão conceitual e novas questões. *Ciência & Saúde Coletiva*, 15, 1095-1104.

Hahn, A. T. (2005). Análise da dieta de *Trachemys dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835) no sul do Rio Grande do Sul (Testudines: Emydidae). *Dissertação de conclusão do Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Heard, M. J., Smith, K. F., Ripp, K. J., Berger, M., Chen, J., Dittmeier, J., & Ryan, E. (2013). The threat of disease increases as species move toward extinction. *Conservation Biology*, 27(6), 1378-1388.

Hoberg, E. P. (2010). Invasive processes, mosaics and the structure of helminth parasite faunas. *Revue Scientifique et Technique*, 29(2), 255.

ICTV. International committee on taxonomy of virus, 2015: Virus Taxonomy: the classification and nomenclature of viruses.

Jacobson, E. R., Buergett, C., Williams, B., & Harris, R. K. 1991. Herpesvirus in cutaneous fibropapillomas of the green turtle *Chelonia mydas*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 12(1), 1-6.

Johnson, A. J., Wendland, L., Norton, T. M., Belzer, B., & Jacobson, E. R. 2010. Development and use of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of iridovirus exposure in gopher tortoises (*Gopherus polyphemus*) and eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*). *Veterinary microbiology*, 142(3-4), 160-167.

Komoto, S., Tacharoenmuang, R., Guntapong, R., Ide, T., Tsuji, T., Yoshikawa, T., & Taniguchi, K. (2016). Reassortment of human and animal rotavirus gene segments in emerging DS-1-like G1P [8] rotavirus strains. *PLoS One*, *11*(2), e0148416.

Ludert, J. E., Hidalgo, M., Gil, F., & Liprandi, F. (1991). Identification in porcine faeces of a novel virus with a bisegmented double stranded RNA genome. *Archives of virology*, *117*(1-2), 97-107.

Mader, D. R. & Divers, S. J. (2013). *Current Therapy in Reptile Medicine and Surgery*, 1^oed, Elsevier, Missouri, US., 488p.

Madsen, L. B., Ustrup, M., Hansen, K. S., Nyasulu, P. S., Bygbjerg, I. C., & Konradsen, F. (2014). Estimating the costs of implementing the rotavirus vaccine in the national immunisation programme: the case of Malawi. *Tropical medicine & international health*, *19*(2), 177-185.

Magalhães Filho, L. N. L. (2013). Estudo de viabilidade para implantação de cobrança pelo uso da água na Bacia hidrográfica do Rio Formoso. *Dissertação de conclusão do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental*, Universidade Federal do Tocantins, Universidade Federal do Tocantins. 84f.

Malik, Y. S., Sharma, A. K., Kumar, N., Sharma, K., Ganesh, B., & Kobayashi, N. (2014). Identification and characterisation of a novel genogroup II picobirnavirus in a calf in India. *Veterinary Record*, vetrec-2013.

Malvasio, A. (2001). *Aspectos do mecanismo alimentar e da biologia reprodutiva em Podocnemis expansa (Schweigger, 1812), P. unifilis (Troschel, 1848) e P. sextuberculata (Cornalia, 1849)(Testudines, Pelomedusidae)*. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Zoologia.

Marschang, R. E. (2011). Viruses infecting reptiles. *Viruses*, *3*(11), 2087-2126.

Marschang, R. E. (2014). Clinical virology. *Current Therapy in Reptile Medicine and Surgery*, Elsevier Saunders, St. Louis, MO, 32-52.

Mogollones, S. C., Rodríguez, D. J., Hernández, O., & Barreto, G. R. (2010). A demographic study of the arrau turtle (*Podocnemis expansa*) in the Middle Orinoco River, Venezuela. *Chelonian Conservation and Biology*, 9(1), 79-89.

Mondal, A., & Majee, S. (2014). Novel bisegmented virus (Picobirnavirus) of animals, birds and humans. *Asian Pacific journal of tropical disease*, 4(2), 154.

Monezi, T. A., Mehnert, D. U., de Moura, E. M., Müller, N. M., Garrafa, P., Matushima, E. R., ... & Borella, M. I. (2016). Chelonid herpesvirus 5 in secretions and tumor tissues from green turtles (*Chelonia mydas*) from Southeastern Brazil: A ten-year study. *Veterinary microbiology*, 186, 150-156.

Nates, S. V., Gatti, M. S. V., & Ludert, J. E. (2011). The picobirnavirus: an integrated view on its biology, epidemiology and pathogenic potential. *Future Virology*, 6(2), 223-235.

Nathason, N. (2007). *Viral pathogenesis and Immunity*. Elsevier, 266p.

Oliveira, A. T., Cruz, W. R., Pantoja-Lima, J., Araújo, S. B., Araújo, M. L., Marcon, J. L., & Tavares-Dias, M. (2011). Morphological and cytochemical characterization of thrombocytes and leukocytes in hatchlings of three species of Amazonian freshwater turtles. *Veterinarski arhiv*, 81(5), 657-670.

Pritchard, P. C. H., & Trebbau, P. (1984). *The Turtles of Venezuela (No. 2)*. Society for the Study of Amphibians and Reptiles Contribution to Herpetology., 403p.

Rahman, M., De Leener, K., Goegebuer, T., Wollants, E., Van der Donck, I., Van Hoovels, L., & Van Ranst, M. (2003). Genetic characterization of a novel, naturally occurring recombinant human G6P [6] rotavirus. *Journal of clinical microbiology*, 41(5), 2088-2095.

Ramani, S., & Kang, G. (2009). Viruses causing childhood diarrhoea in the developing world. *Current opinion in infectious diseases*, 22(5), 477-482.

Rebell, G., Rywlin, A., & Haines, H. (1975). A herpesvirus-type agent associated with skin lesions of green sea turtles in aquaculture. *American journal of veterinary research*, 36(08), 1221-1224.

Ribeiro, N. V., Ferreira, L. G., & Ferreira, N. C. (2016). Avaliação Da Expansão Do Cultivo Da Cana-De-Açúcar No Bioma Cerrado Por Meio De Modelagem Dinâmica Da Paisagem. *Revista Brasileira de Cartografia*, 68(1), 1-14.

Rivera, S., Wellehan Jr, J. F. X., McManamon, R., Innis, C. J., Garner, M. M., Raphael, B. L., & Marlar, A. B. (2009). Systemic adenovirus infection in Sulawesi tortoises (*Indotestudo forsteni*) caused by a novel siadenovirus. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 21(4), 415-426.

Rueda-Almonacid, J. V., Carr, J. L., Mittermeier, R. A., Rodríguez-Mahecha, J. V., Mast, R. B., Vogt, R. C., & Mittermeier, C. G. (2007). Las tortugas y los cocodrilianos de los países andinos del trópico. *Serie de guías tropicales de campo*, (6), 412-423.

Salera Júnior, G., Portelinha, T. C. G., & Malvasio, A. (2009). Predation on adult females of *Podocnemis expansa* Schweigger (Testudines, Podocnemididae) by *Panthera onca* Linnaeus (Carnivora, Felidae), in Tocantins State. *Biota Neotropica*, 9(3), 387-391.

Schrenzel, M., Oaks, J. L., Rotstein, D., Maalouf, G., Snook, E., Sandfort, C., & Rideout, B. (2005). Characterization of a new species of adenovirus in falcons. *Journal of clinical microbiology*, 43(7), 3402-3413.

Schumacher, V. L., Innis, C. J., Garner, M. M., Risatti, G. R., Nordhausen, R. W., Gilbert-Marcheterre, K., & Frasca Jr, S. (2012). Sulawesi tortoise adenovirus-1 in two impressed tortoises (*Manouria impressa*) and a Burmese star tortoise (*Geochelone platynota*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 43(3), 501-510.

Silva, H. D., Anunciação, C. E., Santos, S. D. F. O., & García-Zapata, M. T. A. (2011). Análise virológica da qualidade da água: uma revisão das metodologias de concentração e detecção viral. *Revista brasileira de Biociências*, 9(3), 405.

Siqueira, K. C. (2014). Avaliação da produção científica sobre as espécies do gênero *Podocnemis* (tartarugas de água doce): implicações para a conservação. *Monografia de conclusão de curso de graduação em Ciências Biológicas*. Universidade Federal de Goiás. Goiânia.

Steyer, A., Poljšak-Prijatelj, M., Barlič-Maganja, D., & Marin, J. (2008). Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: evidence of interspecies transmission and genome reassortment. *Journal of General Virology*, 89(7), 1690-1698.

Strauss, E.G.; Strauus, J.H. (2006). *Viruses and human disease*. 2.ed. Amsterdam: Elsevier, 461p.

Tavares, T. M., Cardoso, D. P. & Brito W. M. (2005). Vírus entéricos veiculados por água: aspectos microbiológicos e de controle de qualidade da água. *Revista patologia tropical* (34), 85-104.

Than, V. T., & Kim, W. (2013). Prevalence of rotavirus genotypes in South Korea in 1989-2009: implications for a nationwide rotavirus vaccine program. *Korean journal of pediatrics*, 56(11), 465-473.

Trask, S. D., McDonald, S. M., & Patton, J. T. (2012). Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nature reviews microbiology*, 10(3), 165.

Vogt, R. C. (2008). *Tartarugas da Amazônia*. INPA-Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.Lima, Peru: Gráfica Biblos, 2008.104p.

Walker, E., & Ison, M. G. (2014). Respiratory viral infections among hospitalized adults: experience of a single tertiary healthcare hospital. *Influenza and other respiratory viruses*, 8(3), 282-292.

Wellehan, J. F., Johnson, A. J., Harrach, B., Benkö, M., Pessier, A. P., Johnson, C. M., & Jacobson, E. R. (2004). Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the adenoviruses. *Journal of virology*, 78(23), 13366-13369.

3- ARTIGO CIENTÍFICO

A seguir foram redigidos seguindo as normas de citações e referências da revista *Biota Neotropical* (ISSN 1676-0611), no entanto não se encontram formatados para submissão, uma vez que alterações serão consideradas, de acordo com correções ou sugestões propostas pela banca examinadora. As normas encontram-se disponíveis em: <http://www.scielo.br/revistas/bn/iinstruc.htm>

3.1- Investigação de vírus entéricos em amostras de intestino de *Podocnemis expansa* (SCHWEIGGER, 1812) do Cerrado, centro-oeste do Brasil.

Amanda Toledo Lourenço^{1,4}; Alexandra Frossard¹; Ana Paula Jejesky Oliveira¹; Adriana Regina Chippari-Gomes¹; Mária Benkő³; Balazs Harrach³; Kajan Victor Gyozo³; João Luiz Rossi Jr¹;
Fernando Vicentini²;

1. Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, Universidade Vila Velha, Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, 29102-770, Vila Velha, ES, Brasil
2. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciência da Saúde, Rua do Cajueiro, Cajueiro, 44574490 - Santo Antônio de Jesus, BA - Brasil.
3. Instituto de Pesquisa Médica Veterinária, da Academia de Ciências da Hungria, krt. 21 1143 Budapest, Hungary.
4. amandatoledo575@gmail.com, autor correspondente.

Resumo

Conhecer as doenças infecciosas que acometem espécies selvagens é importante não só para a saúde e conservação das mesmas, mas também é de

grande relevância para saúde pública e animal. Algumas espécies de testudines sofrem com declínio de suas populações por epidemias causadas por doenças infecciosas. A *Podocnemis expansa* possui alto potencial para exploração zootécnica, pelo alto valor econômico que agrega sua carne e seus subprodutos. Essa exploração relacionada com atividades antrópicas propicia o aumento do contato entre essas populações favorecendo a transmissão de doenças. Isso permite que espécies de patógenos causadores de doenças infectem novas populações de hospedeiros. Neste estudo, amostras de intestino de filhotes recém-eclodidos de *Podocnemis expansa*, que foram coletadas no rio Araguaia e Crixás-açu utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) para avaliar a presença da ocorrência de Rotavírus e Picobirnavírus e avaliar a ocorrência de Adenovírus e Herpesvírus através da amplificação por Reação em Cadeia Polimerase (PCR) e o sequenciamento. Das 43 amostras avaliadas nenhuma apresentou perfil eletroforético (EGPA) para os vírus de RNA testados. Nos testes de PCR, uma amostra apresentou bandas específicas para adenovírus e com uma sequência similar a de símios. Em testudines, várias espécies estão sendo descritas com diferentes tipos de infecções para adenovírus e herpesvírus. Considerando que não há descrição prévia destes vírus em *P. expansa* e os fragmentos sequenciados de 300 pb para adenovírus, há possibilidade de estar diante da primeira descrição em *Podocnemis expansa*, mostrando a similaridade dos vírus de outros hospedeiros.

Palavras chaves: vírus, vida selvagem, conservação, zoonoses, tartaruga-da-amazônia.

Introdução

A maioria das recentes emergências ou reemergências de doenças infecciosas é causada por diversos fatores como mudanças climáticas, redução de habitats naturais, caça, redução de presas e poluição (Grisotti 2010; Barbosa et al. 2011 e Hoberg 2015), alterando as interações ecológicas entre patógenos e hospedeiros. Além do impacto que as doenças podem causar nas populações de animais selvagens, existe uma crescente preocupação com a transmissão de patógenos entre espécies, contribuindo para o aparecimento de epizootias ou mesmo zoonoses, por sobreposição entre habitats animais e humanos (da Silva Medeiros et al. 2015 e Komoto et al. 2016).

A degradação ambiental vem contribuindo consideravelmente para o aparecimento ou surgimento de novas doenças. Uma infecção causada por adenovírus do gênero *Siadenovirus* resultou em uma alta taxa de mortalidade (82%) em *Indotestudo forsteni* (Rivera et al. 2009), o mesmo vírus também foi encontrado em *Manouria impressa* e *Geochelone platynota* (Schumacher et al. 2012). Os herpesvírus foram isolados de indivíduos saudáveis ou doentes pertencentes a diversas espécies de testudines. O vírus *Testudinid herpesvirus 3* (TeHV-3) afeta várias espécies de tartarugas, sendo as do gênero *Testudo* a mais sensível (Bicknese et al. 2010). A existência de infecções causadas por herpesvírus que exibam patogenicidade elevada são resultado de desequilíbrios que alteram a dinâmica vírus-hospedeiro (Davison 2013 e Pellett e Roizman 2013). O Rotavírus e Picobirnavírus são vírus de RNA de transmissão fecal-oral (Malik et al. 2014), relatados como zoonóticos. Alguns estudos de caracterização genômica já

descreveram algumas diversificações desses vírus envolvendo cepas humanas e animais (Gouvea et al. 1990; da Silva Medeiros et al. 2015 e Komoto et al. 2016). Em geral, infecções graves são observadas em animais imunossuprimidos, ou muito jovens, ou quando o vírus infecta um hospedeiro não natural (Marschang 2011 e Davison 2013).

Algumas espécies de testudines sofrem com declínio de suas populações por epidemias causadas por doenças infecciosas (Rivera et al. 2009, Bicknese et al. 2010 e Pellett e Roizman 2013). O declínio de populações que ocupavam grandes áreas no passado é motivo de alarme para aqueles que se preocupam não apenas com as tartarugas, mas também com a saúde e o bem estar dos rios e dos humanos. Assim, algumas espécies podem atuar como reservatórios, desempenhando um papel importante na manutenção de patógenos nas comunidades e sua transmissão para populações pequenas, causando declínios populacionais (Komoto et al. 2016).

Neste estudo investigamos a presença de Rotavírus, Picobirnavirus Herpesvírus e Adenovírus em filhotes de *Podocnemis expansa*. Esta espécie esta entre os maiores componentes das redes tróficas dos rios, desempenhando importantes papéis nas funções vitais, como fluxo de energia, ciclagem de nutrientes, dispersão da vegetação ripária e manutenção da qualidade da água (Hahn 2005). Possui alto potencial para exploração zootécnica, pelo alto valor econômico que agrega sua carne e seus subprodutos (Malvasio 2001e Godoy et al. 2010). O uso como fonte de proteína animal para a alimentação humana é antiga e originou-se com índios e ribeirinhos, tornando-se hábito alimentar e cultural (Alves 2009; Mogollones et al. 2010 e Vogt 2008). Essa exploração relacionada com

atividades antrópicas propicia o aumento do contato entre essas populações favorecendo a transmissão de doenças.

Acredita-se que as abordagens holísticas, levando em conta a "Saúde Única", isto é, saúde humana, animal e ambiental, para o manejo e mitigação de riscos de doenças infecciosas emergentes têm maior probabilidade de sucesso (Cunningham et al. 2017). Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar a presença de Rotavírus, Picobirnavirus, Herpesvírus e Adenovírus em amostras de intestino de filhotes recém-eclodidos de *Podecnemis expansa*, coletados no rio Araguaia e Crixás-açu.

Material e Métodos

Áreas de Estudo

As áreas de estudo se localizam em dois grandes rios da bacia Tocantins/Araguaia (Figura 2), onde ocorrem desovas de *P. expansa* sob controle do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis/IBAMA – o rio Araguaia e Crixás-açu, no estado de Goiás.

Os pontos de coleta as margens do rio Araguaia estão dentro da Área de Proteção Ambiental (APA) Meandros do Rio Araguaia, no município de São Miguel do Araguaia (13°17'49.0"S 50°36'16.5"W até 13°30'00.0"S 50°43'29.51"W). Sendo o maior tributário do rio Tocantins, nasce na Serra dos Caiapós, na divisa dos estados de Goiás e Mato Grosso, possui cerca de 2.600 km e desemboca no rio Tocantins na localidade de São João do Araguaia (Carvalho e Latrubesse 2004). No extremo nordeste do estado de Mato Grosso, o rio divide-se em dois braços, rio Araguaia,

pela margem esquerda, e rio Javaés, pela margem direita, formando assim a ilha de Bananal, a maior ilha fluvial do mundo. Os principais rios da região são os rios Araguaia, Rio Verde, Crixás Açú, Pintado e Riozinho (Magalhães Filho et al. 2013).

Os pontos de coletas as margens do rio Crixás-açu estão em uma Área de Preservação Permanente (APP) ($13^{\circ}45,02'13''S$ $49^{\circ}56'21,52''W$ até $13^{\circ}25'44,21''S$ $50^{\circ}33'30,53''W$), no município de Mundo Novo. Este rio é um importante afluente da margem direita do rio Araguaia e drena áreas da Depressão do Araguaia. Nessa região, as atividades agropecuárias se intensificaram promovendo um aumento constante do desmatamento da vegetação nativa (Ribeiro 2016). Devido a uma constante inserção econômica da região que data do século XIX e que foi promovida basicamente pela expansão da fronteira agrícola sobre o Cerrado (Bayer 2010).

A região possui vegetação de cerrado, variando de cerrado denso a ralo, de relevo plano o que favorece constantes alagamentos no período chuvoso (Magalhães Filho et al. 2013). Tipologias características de transição entre floresta amazônica e cerrado com grande diversidade de espécies ocorrentes nesses dois biomas. O Clima tropical quente semiúmido predominante, com temperaturas máximas de $38^{\circ}C$ nos meses de agosto a setembro e mínima de $22^{\circ}C$ em julho. Duas estações são bem marcadas, o verão (de novembro a abril) meses em que predominam as chuvas, e o inverno (maio a outubro) onde se marca o período da seca (Ribeiro 2016) (Figura 2).



Figura 1: Rio Crixás-açu, localizado no estado do Goiás- Brasil, no período de seca (I) e chuvoso (II). Autor: Elaborada pelo autor.

Coletas dos espécimes biológicos e tecido

Foram utilizados três filhotes eclodidos de cada ninho sendo o total de 10 ninhos por temporada de desova e eclosão que ocorre de setembro a abril. As coletas se repetiram por duas temporadas consecutivas: 2016/2017 no rio Araguaia e 2017/2018 no rio Crixás-açu, totalizando 60 de filhotes eclodidos.

Em campo, os animais foram eutanasiados com injeção de lidocaína 3%, via intratecal, e em seguida foi feita necropsia para retirada do intestino para a realização das análises virais, sendo que os mesmos foram congelados e armazenados no Laboratório de Saúde de Vida Selvagem na Universidade Vila Velha (UVV), autorizado pelo SISBIO com registro nº 50290 (Anexo 3) e pela Comissão de Ética da Universidade Vila Velha com registro nº357-2015 (Anexo 4).

As amostras do intestino foram analisadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Espírito Santo, campus São Mateus (CEUNES) e em seguida foram feitas as extrações do ácido nucléico.

As extrações de DNA foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do Instituto de Pesquisa Médica Veterinária no Centro de Investigação Agrícola, da Academia de Ciências da Hungria para o sequenciamento genético.

Processamentos das amostras

Para a suspensão fecal foi utilizado aproximadamente 200mg de amostra fecal de cada animal e diluídas a uma concentração de 20% (g / 100 mL) de tampão Tris-Cálcio (Anexo 1). A extração de RNA e DNA virais foi realizada segundo Herring e colaboradores (1982) com modificações, utilizando como reagente TRIzol® seguindo as instruções do fabricante.

A detecção de Rotavírus e Picobirnavírus após a extração de RNA, foi realizada segundo o procedimento proposto por Pereira et al. (1988), com algumas adaptações. A eletroforese em gel poliacrilamida (EGPA) foi realizada em gel descontínuo, constituído por um concentrador de 3,5% e um separador de 7% (Anexo 2). A corrida eletroforética foi realizada em cuba LVC 10 x 10 (Loccus) a uma tensão constante de 150 V e corrente elétrica inicial de 15 mA por aproximadamente 2:00 horas. O gel foi corado pelo método de impregnação pela prata (Hering et al. 1982). A técnica é utilizada para identificar os vírus RNA que permite a detecção e identificação viral por meio dos eletroferótipos de cada gênero.

Para a detecção do Adenovírus, a partir da extração do DNA foi realizada a PCR seguida por nested-PCR utilizando os pares de iniciadores POL_OUT_RE/POL_OUT_FO e POL_IN_RE/POL_IN_FO, gerando fragmento de 550 pb e 300 pb, respectivamente, de acordo com a descrição original de Wellehan et al. (2004) com ligeiras modificações. Para assegurar a gama ampla, que inclui todos os membros da família de adenovírus, iniciadores foram concebidos para atingir a região mais conservada do DNA viral, o gene DNA-polimerase. Os produtos foram submetidos à eletroforese em agarose a 1,5%. O sequenciamento direto dos produtos amplificados e purificados foi determinado com iniciadores internos apropriados. As sequências de DNA foram editadas usando o pacote Staden (Staden et al. 2000), avaliadas e comparadas a outras sequências já depositadas no GenBank, usando o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Para a detecção do Herpesvírus, a partir da extração do DNA foi realizada a PCR seguida por nested-PCR com base na amplificação parcial da sequência do gene da DNA polimerase utilizando o conjunto de primers ChHV-1 e ChHV-2, gerando fragmento 404 pb e 244 pb, respectivamente, de acordo com Monenzi (2016). Também foi utilizado o conjunto de primers TeHV3-1 e TeHV3-2 com 225 pb. Os produtos foram submetidos à eletroforese em agarose a 1,5%.

Resultados

Na temporada 2016/2017 no rio Araguaia foram coletados 23 filhotes recém-eclodidos e na temporada de 2017/2018 no rio Crixás-açu 20 filhotes recém-

eclodidos, totalizando 43 amostras. Acompanhamos a desova para a proteção dos ninhos e após, aproximadamente, 60 dias de incubação retornamos para a eclosão e captura dos recém-nascidos, sendo que alguns desses ninhos foram predados. Posteriormente, os animais foram eutanasiados com injeção de lidocaína 3%, via intratecal, e em seguida foi feita necropsia para retirada do intestino para a realização das análises virais.

Todas as amostras apresentaram resultados negativos para os RNA dos vírus aqui estudados. Em todos os géis preparados, em nenhuma das amostras analisadas pela técnica EGPA foi observado perfis eletroforéticos para Rotavírus ou Picobirnavirus.

As extrações de DNA foram encaminhadas ao Instituto de Pesquisa Médica Veterinária, da Academia de Ciências da Hungria para os testes de PCR e sequenciamento para detecção dos adenovírus. Nos testes de PCR, seguido por nested-PCR de cada amostra de intestino, em uma amostra VS 447 apresentou bandas específicas para adenovírus (Tabela 1). E a partir do sequenciamento do gene DNA-polimerase, as sequencias de nucleotídeos gerados tiveram fragmento de 300 pb. Em seguida foram avaliadas e comparadas usando o programa BLAST que se confirmou com 96% de identidade adenovírus sismio da espécie, *Simian mastadenovirus1* (SAdV-1) em um exemplar de *P. expansa* a partir de amostra de intestino.

Nos testes de PCR, seguido por nested-PCR para detecção dos herpesvírus de cada amostra de intestino, foram observadas 5 amostras com bandas específicas, com peso esperado de 404 pb, 244 pb e 225 pb e também bandas

inespecíficas. A amostra VS 468 apresentou bandas na PCR e nested-PCR, as outras apresentaram bandas apenas na nested-PCR. Foram realizadas contraprovas no laboratório do Instituto de Pesquisa Médica Veterinária no Centro de Investigação Agrícola, da Academia de Ciências da Hungria e nenhuma amostra apresentou bandas específicas.

Tabela 1: Resultados das análises de RNA de Rotavírus e Picobirnavírus, utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e detecção de DNA de Adenovírus e Herpesvírus, por PCR em amostras de intestino de *Podocnemis expansa*.

Vírus	Araguaia	Crixás-açu
Rotavírus	-	-
Picobirnavírus	-	-
Adenovírus	-	+
Herpesvírus	-	-

(-) negativo, (+) positivo

Discussão

A *P. expansa* é uma espécie com ampla distribuição geográfica, incluindo áreas fora do Brasil. Grandes populações podem ser encontradas onde suas áreas

de desova são protegidas, como é o caso da Reserva Biológica Abufari (AM) e da Reserva Biológica do rio Trombetas (PA) (Cantarelli 2006). Ataídes et al. (2010), afirmam em seu estudo que *P. expansa* está entre as espécies mais consumidas pelos ribeirinhos e assentados da região do entorno do Parque Nacional do Araguaia-TO, afirma também que seus ovos são consumidos e este consumo está associado a cultura de muitas comunidades tradicionais (pescadores, ribeirinhos, caboclos, quilombolas, entre outros), aspecto relacionado provavelmente pela facilidade de captura desses animais no período de desova, quando saem em grandes grupos para nidificação. Devido a esta alta predação de *P. expansa*, a *International Union for Conservation of Nature* classificou a espécie em alto risco de extinção, mas graças a programas de conservação no ano de 2016 se apresenta em menor risco de extinção, mas que depende intimamente de métodos de conservação, para que futuramente não ocorra a extinção da espécie (IUCN 2016).

Entre todas as famílias de vírus descritas em animais, apenas seis ocorrem em testudines (Mader e Divers 2013). Duas delas são bem documentadas em tartarugas marinhas, Herpesviridae e Papillomaviridae (Herbst et al. 2004 e Work et al. 2014) e, novos estudos estão sendo realizados com quatro outras famílias: Iridoviridae, Reoviridae, Retroviridae, Adenoviridae e Togaviridae (Alfaro et al. 2010; Benko et al. 2005 e Farkas et al. 2009). Estudos envolvendo Rotavírus e Picobirnavírus em espécies selvagens livres são poucos. Para o melhor conhecimento, o presente estudo é o pioneiro na investigação de Rotavírus e Picobirnavírus em *P. expansa* no centro oeste do Brasil.

O uso da técnica PAGE para a detecção do vírus RNA é um dos métodos mais utilizados (Pereira et al.1988). Utilizada para amostras de animais e humanos, a técnica permite a visualização do perfil eletroforético de qualquer grupo Rotavírus e Picobirnavírus (Pereira et al.1988 e Gouvea et al. 1990). O PAGE seguido de coloração com nitrato de prata também é usado em vários estudos (Haga et al. 1999; Fregolente et al. 2009 e Santos et al. 2017), por ser sensível para detecção de segmentos genômicos e caracterização do eletroferogrupos desses vírus (Pereira et al. 1988). No entanto, todas as amostras testadas no presente estudo apresentaram resultados negativos, o que pode estar relacionado à baixa carga viral ou não estava em viremia, o que não deve ser descartado.

Em geral, os Rotavirus são frequentemente específicos da espécie. No entanto, a disseminação do rotavírus que afeta animais domésticos e humanos para espécies silvestres tem sido facilitada (Monteiro et al. 2015) principalmente pelo aumento da fragmentação e perda de habitat, resistência do vírus ao meio ambiente e sua capacidade fecal-oral (Daszak et al. 2001 e Monteiro et al. 2015). Vários estudos de caso indicam infecção por cepas de rotavírus humanos em animais, assim Tsugawa e Hoshino 2008; como o inverso também é verdadeiro (Otsyula et al. 1996; Ng et al. 2014; Gouvea et al. 1990; Das et al.1993; Matthijnssens et al. 2008; Komoto et al. 2016 e Jamnikar-Ciglenecki et al. 2016). O Picobirnavírus já foi encontrado em amostras de fezes de diferentes hospedeiros mamíferos, incluindo o homem, aves e répteis. São descritos vários estudos de detecção e/ou caracterização molecular encontrado em diversas espécies, em répteis, esses vírus foram encontrados em diferentes espécies de serpentes (Fregolente et al. 2009).

Nossa hipótese de que há ocorrência de sequências do genoma de vírus entéricos em *Podocnemis expansa*, foi aceita, assim foi encontrado vírus nas amostras de intestino. A partir dos resultados preliminares, sugestivos de casos positivos que foram enviados para confirmação no laboratório de Microbiologia da Academia de Ciências da Hungria, confirmando a presença de adenovírus no intestino do animal. A amplificação do gene DNA-polimerase, foi possível identificar a presença de adenovírus do gênero *Mastadenovirus*. O vírus detectado, a partir do sequenciamento com sequência de 300 pb foram avaliadas e comparadas usando o programa BLAST classificado como adenovírus da espécie simio, *Simian mastadenovirus1* (SAdV-1).

Nos últimos anos surgiram várias evidências que apoiam potenciais eventos de transmissão de adenovírus entre diferentes espécies de hospedeiros (Ersching et al. 2010; Xiang et al. 2006; Chen et al. 2011e Chiu et al. 2013). As infecções por adenovírus podem ser acompanhadas por letargia, esofagite, hepatite ou gastroenterite (Ariel 2011). No entanto, a patogenicidade dos adenovírus nos reptéis pode variar dependendo do tipo de vírus e do hospedeiro (Rivera et al. 2009).

Os adenovírus têm sido descritos como patógenos oportunistas em muitas espécies animais, especialmente quando fatores adicionais (particularmente infecções concomitantes) afetam a saúde do hospedeiro; no entanto, alguns tipos de adenovírus pode ter um papel patogênico primário (Ariel 2011). Em testudines, diferentes tipos de infecções têm sido descritas, foi relatado em *Indotestudo forsteniie* (Rivera et al. 2009) e *Manouria impresso* (Schumacher et al. 2012) o vírus que pertenciam ao gênero *Siadenovirus*. Em outras espécies, como *Malacochersus*

tornieri, *Terrapen carolina carolina*, *Trachemys scripta elegans* e *T. scripta scripta* foram isoladas uma nova linhagem de adenovírus e esta sendo proposto como um novo gênero (Doszpoly et al. 2013 e Garcia-Morante et al. 2016).

Quanto as espécies de SAdVs, o *International committee on taxonomy of virus* (ICTV) reconhece a existência de uma espécie, *Simian mastadenovirus A* (SAdV-A), que engloba 7 tipos (Harrach et al. 2011 e Harrach 2014). Porém, nos últimos anos, têm sido obtidas sequências genômicas completas de SAdVs anteriormente isolados e identificados e caracterizados inúmeros novos AdVs apartir de primatas em cativeiro e no seu habitat natural (Bányai et al. 2010; Chen et al. 2011; Chiu et al. 2013; Foytich et al. 2014; Malouli et al.2014; Pantó et al. 2015 e Seimon et al. 2015). O genoma do SAdV-1 foi isolado em *Macaca fascicularis* pertence à espécie HAdV-G (Kovács et al. 2005), juntamente com um adenovírus humanos (HAdV) tipo, HAdV-52 sendo o único membro de origem humana da espécie HAdV-G (Jones et al. 2007).

Uma vez que esses animais foram coletados dentro dos ninhos, não tendo contado com meio externo, o vírus possivelmente foi transmitido da mãe para o filhote, sendo uma transmissão vertical. Diante do exposto e sabendo que a transmissão do vírus ocorre principalmente por via fecal-oral, é provável que a mãe esteve em contato com vírus símio pela contaminação da água, sendo uma contaminação ambiental (Figura 2). Evidenciando o contato de *P. expansa* com vírus de origem símio, pois os fragmentos apresentaram alto grau de similaridade para SAdV-1.



Figura 2: Indivíduo da espécie *Sapajus sp.* tomando água no rio Crixás-açu, evidenciando o contato de primatas e o ambiente onde vivem as *Podocnemis expansa*. Autor: Elaborada pelo autor.

Os adenovírus são considerados agentes infecciosos muito resistentes às condições ambientais. São resistentes a secreções gástricas e biliares, podendo ser excretados em grande quantidade nas fezes (Lion 2014). Logo, essa espécie de testudine possivelmente pode atuar como um agente disseminador do vírus, uma vez que o vírus tem sido eliminado nas amostras e que possivelmente contaminam o ambiente. O uso da *P. Expansa* como fonte de proteína animal e seus ovos para a alimentação humana é um hábito alimentar e cultural (Ataídes 2010), assim essa exploração propicia o aumento do contato entre essas populações favorecendo a transmissão de doenças.

Dos resultados para o herpesvírus apresentados nesta pesquisa, as amostras apresentaram resultados negativos para teste de PCR. Em tartarugas marinhas a transmissão vertical, não foi devidamente estudada ainda. Em recente

estudo, foi verificada a presença de DNA de um herpesvírus em 1 fêmea entre 41 analisadas. Foram analisados também 59 filhotes de 6 diferentes ninhos, inclusive da fêmea positiva, e foram negativos. (Alfaro-Núñez et al. 2014). Esse vírus já foi isolado de indivíduos saudáveis ou doentes pertencentes a várias espécies de testudines, têm sido descritas em *Testudo hermanni*, *T. horsfieldii*, *T. graeca*, *T. marginata*, *Gopherus agassizii*, *Geochelone pardalis* e *Geochelone chilensis* (Harper et al. 1982; Jacobson et al. 1985; Pettan-Brewer et al. 1996; Drury et al. 1998 e Muro et al. 1998). No entanto, todas as amostras testadas no presente estudo apresentaram resultados negativos, o que pode estar relacionado à baixa carga viral ou não estava em viremia, o que não deve ser descartado.

Conclusão

Amostras de intestino de filhotes recém-eclodidos de *P. expansa* na região dos rios Araguaia e Crixás Açu não foram positivas para Rotavírus ou Picobirnavírus. Considerando que não há descrição prévia destes vírus em *P. expansa* e que os fragmentos sequenciados de 300 pb para adenovírus, há possibilidade de estar diante da primeira descrição em *P. expansa*, mostrando a similaridade dos vírus de outros hospedeiros. Sendo provavelmente uma contaminação ambiental, o vírus possivelmente foi transmitido da mãe para o filhote, assim há possibilidade destes animais selvagens estarem vulneráveis a estes vírus. Mais estudos com números amostrais maiores, além de avaliação dos ovos poderão elucidar melhor se há transmissão vertical.

O uso da *P. Expansa* como fonte de proteína animal e seus ovos para a alimentação humana é um hábito cultural, assim essa exploração propicia o aumento do contato entre essas populações favorecendo a transmissão desses patógenos. Sabe-se que investigações de doenças infecciosas são escassas, especialmente para a espécie *P. expansa*, o que nos leva à necessidade de melhorias nas investigações e controle de vírus em animais selvagens com implementação de estudos como este, devido à carência de dados, a fim de conhecer e entender as circulações virais que acomete as espécies.

Referências

ALFARO-NÚÑEZ, A., BERTELSEN, M. F., BOJESSEN, A. M., RASMUSSEN, I., ZEPEDA-MENDOZA, L., OLSEN, M. T., & GILBERT, M. T. P. 2014. Global distribution of Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus among clinically healthy sea turtles. *BMC Evolutionary Biology*, 14(1), 206.

ALFARO-SHIGUETO, J.; MANGEL, J.C.; CACERES, C.; SEMINOFF, J. A., GAOS, A. & YAÑEZ, I. 2010. Hawksbill turtles in Peruvian coastal fisheries. *Marine Turtle Newsletter*, 129, 19-21.

ALVES, R. D. O. 2009. Criação abate e comercialização de animais silvestres. *Monografia de conclusão de curso de especialização em vigilância sanitária e controle da qualidade de alimentos. Universidade Castelo Branco. Brasília, DF.*

ARIEL, E. 2011. Viruses in reptiles. *Veterinary research*, 42(1), 1-12.

ATAÍDES, A. G.; MALVASIO, A. & PARENTE, T.G. 2010. Percepções sobre o consumo de quelônios no entorno do Parque Nacional do Araguaia, Tocantins: conhecimentos para conservação. *Gaia Scientia*. 4 (1), 07-20.

BÁNYAI, K., ESONA, M.D., LIU, A., WANG, Y., TU, X. & JIANG, B. 2010. Molecular detection of novel adenoviruses in fecal specimens of captive monkeys with diarrhea in China. *Veterinary Microbiology*. 142 (3-4), 416–419.

BARBOSA, A. D., MARTINS, N. R. S., & MAGALHÃES, D. F. 2011. Zoonoses e saúde pública: riscos da proximidade humana com a fauna silvestre. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, 14 (1), 1-9.

BAYER, M. 2010. *Dinâmica do transporte, composição e estratigrafia dos sedimentos da planície aluvial do Rio Araguaia*. Tese de doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Ambientais. Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

BENKO, M., HARRACH, B., BOTH, G. W., RUSSELL, W. C., ADAIR, B. M., ADAM, E., & KIDD, A. H. 2005. Adenoviridae. *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses (Fauquet, CM, Mayo, MA, Maniloff, J., Desselberger U. and Ball, LA eds.)*, San Diego, CA, USA, 213-228.

BICKNESE, E. J., CHILDRESS, A. L., & WELLEHAN JR, J. F. 2010. A novel herpesvirus of the proposed genus Chelonivirus from an asymptomatic bowsprit tortoise (*Chersina angulata*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 41(2), 353-358.

CANTARELLI, V. H. 2006. *Alometria reprodutiva da tartaruga-da-Amazônia (Podocnemis expansa): bases biológicas para o manejo*. Tese de doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ecologia de Agrossistemas. Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CARVALHO, T. M., & LATRUBESSE, E. M. 2004. Aplicação de modelos digitais do terreno (MDT) em análises macrogeomorfológicas: o caso da bacia hidrográfica do Araguaia. *Revista Brasileira de Geomorfologia*, 5(1), 85- 93.

CHEN, E.C., YAGI, S., KELLY, K.R., MENDOZA, S.P., MANINGER, N., ROSENTHAL, A., SPINNER, A., BALES, K.L., SCHNURR, D.P., LERCHE, N.W. & CHIU, C.Y. 2011. Cross-species transmission of a novel adenovirus associated with a fulminant pneumonia outbreak in a New World monkey colony. *PLoS Pathogens*. 7 (7), e1002155.

CHIU, C.Y., YAGI, S., LU, X., YU, G., CHEN, E.C., LIU, M., DICK, E.J., CAREY, K.D., ERDMAN, D.D., LELAND, M.M. & PATTERSON, J.L. 2013. A novel adenovirus species associated with an acute respiratory outbreak in a baboon colony and evidence of coincident human infection. *MBio*. 4 (2), e0008413.

CUNNINGHAM, A A, DASZAK, P, & WOOD, J L. 2017. One Health, emerging infectious diseases and wildlife: two decades of progress? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1725), 1- 8.

DA SILVA MEDEIROS, TN, LORENZETTI, E, ALFIERI, A F, & ALFIERI, AA. 2015. Phylogenetic analysis of a G6P [5] bovine rotavirus strain isolated in a neonatal diarrhea outbreak in a beef cattle herd vaccinated with G6P [1] and G10P [11] genotypes. *Archives of virology*, 160(2), 447-451.

DAS, M, DUNN, SJ, WOODE, GN, GREENBERG, HB, & RAO, C D. 1993. Both surface proteins (VP4 and VP7) of an asymptomatic neonatal rotavirus strain (1321) have high levels of sequence identity with the homologous proteins of a serotype 10 bovine rotavirus. *Virology*, 194(1), 374-379.

DASZAK, P, CUNNINGHAM, A.A, & HYATT, A D. 2001. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta tropica*, 78(2), 103-116.

DAVISON, A. J. 2013. Evolution of the herpesviruses. *Veterinary Microbiology*, 86, 69–88.

DOSZPOLY, A., WELLEHAN JR, J. F., CHILDRESS, A. L., TARJÁN, Z. L., KOVÁCS, E. R., HARRACH, B., & BENKŐ, M. 2013. Partial characterization of a

new adenovirus lineage discovered in testudinoid turtles. *Infection Genetics and Evolution*, 17, 106-112.

DRURY, S. E. N., GOUGH, R. E., MCARTHUR, S., & JESSOP, M. 1998. Detection of herpesvirus-like and papillomavirus-like particles associated with diseases of tortoises. *Veterinary Record*, 143, 639.

ERSCHING, J., HERNANDEZ, M.I.M., CEZAROTTO, F.S., FERREIRA, J.D.S., MARTINS, A.B., SWITZER, W.M., XIANG, Z., ERTL, H.C.J., ZANETTI, C.R. & PINTO, A.R. 2010. Neutralizing antibodies to human and simian adenoviruses in humans and New-World monkeys. *Virology*. 407 (1), 1–6.

FARKAS, B., & GULÁCSI, E. 2009. The European pond turtle in Hungary. *European pond turtles. The genus Emys*, 197-199.

FOYTICH, K.R., DESHAZER, G., ESONA, M.D., LIU, A., WANG, Y., TU, X. & JIANG, B. 2014. Identification of new provisional simian adenovirus species from captive monkeys, China. *Emerging Infectious Diseases*. 20 (10), 1758–1759.

FREGOLENTE, MCD, DE CASTRO-DIAS, E, MARTINS, SS, SPILKI, FR, ALLEGRETTI, SM, & GATTI, MSV. 2009. Molecular characterization of picobirnaviruses from new hosts. *Virus research*, 143(1), 134-136.

GARCIA-MORANTE, B., PÉNZES, J. J., COSTA, T., MARTORELL, J., & MARTÍNEZ, J. 2016. Hyperplastic stomatitis and esophagitis in a tortoise (*Testudo graeca*) associated with an adenovirus infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 28(5), 579-583.

GODOY, R., UNDURRAGA, E. A., WILKIE, D., REYES-GARCÍA, V., HUANCA, T., LEONARD, W. R., & VADEZ, V. 2010. The effect of wealth and real income on wildlife consumption among native Amazonians in Bolivia: estimates of annual trends with longitudinal household data (2002–2006). *Animal Conservation*, 13(3), 265-274.

GOUVEA, V, GLASS, R I, WOODS, P, TANIGUCHI, K, CLARK, H F, FORRESTER, B, & FANG, Z. Y.1990. Polymerase chain reaction amplification and

typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *Journal Of Clinical Microbiology*, 28(2), 276-282.

GRISOTTI, M. 2010. Doenças infecciosas emergentes e a emergência das doenças: uma revisão conceitual e novas questões. *Ciência & Saúde Coletiva*, 15, 1095-1104.

HAGA, IR, MARTINS, SS, HOSOMI, ST, VICENTINI, F, TANAKA, H, & GATTI, MSV. 1999. Identification of a bisegmented double-stranded RNA virus (Picobirnavirus) in faeces of giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*). *The Veterinary Journal*, 158(3), 234-236.

HAHN, A. T. 2005. Análise da dieta de *Trachemys dorbigni* (duméril & Bibron, 1835) no sul do Rio Grande do Sul (Testudines: Emydidae). *Dissertação de conclusão do Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

HARPER, P. A. W., HAMMOND, D. C., & HEUSCHELE, W. P. 1982. A herpesvirus-like agent associated with a pharyngeal abscess in a desert tortoise. *Journal of Wildlife Diseases*, 18(4), 491-494.

HARRACH, B. 2014. Adenoviruses: general features. In: Mahy BW, van Regenmortel MH, editors. *Encyclopedia of virology*. Oxford: Elsevier; 2008. 1–9.

HARRACH, B., BENKÖ, M., BOTH, G.W., BROWN, M., DAVISON, A.J., ECHAVARRIA, M., HESS, M., JONES, M.S., KAJON, A., LEHMKUHL, H.D., MAUTNER, V., MITTAL, S.K. & WADELL, G. 2011. Adenoviridae. In: A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, & E. J. Lefkowitz (eds.). *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, USA: Elsevier Inc., 125–141.

HERBST, L., ENE, A., SU, M., DESALLE, R., & LENZ, J. 2004. Tumor outbreaks in marine turtles are not due to recent herpesvirus mutations. *Current Biology*, 14(17), 697-699.

HERRING, A. J., INGLIS, N. F., OJEH, C. K., SNODGRASS, D. A., & MENZIES, J. D. 1982. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Clinical Microbiology*, 16(3), 473-477.

HOBERG, E. P., E BROOKS, D. R. 2015. Evolution in action: climate change, biodiversity dynamics and emerging infectious disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 370, 2013-2553.

ICTV. International committee on taxonomy of virus, 2015: Virus Taxonomy: the classification and nomenclature of viruses.

IUCN Red List of Threatened Species. Tortoise & Freshwater Turtle Specialist Group. 1996. *Podocnemis sextuberculata* (errata version published in 2016). The IUCN Red List of Threatened Species 1996.

JACOBSON, E. R., CLUBB, S., GASKIN, J. M., & GARDINER, C. 1985. Herpesvirus-like infection in Argentine tortoises. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 187(11), 12-27.

JAMNIKAR-CIGLENECKI, U, KUCHAR, U, STURM, S, KIRBIS, A, RACKI, N, & STEYER, A. 2016. The first detection and whole genome characterization of the G6P [15] group A rotavirus strain from roe deer. *Veterinary microbiology*, 191, 52-59.

JONES, M. S., HARRACH, B., GANAC, R. D., GOZUM, M. M., DELA CRUZ, W. P., RIEDEL, B., & SCHNURR, D. P. 2007. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *Journal of virology*, 81(11), 5978-5984.

KOMOTO, S., TACHAROENMUANG, R., GUNTAPONG, R., IDE, T., TSUJI, T., YOSHIKAWA, T., & TANIGUCHI, K. 2016. Reassortment of human and animal rotavirus gene segments in emerging DS-1-like G1P [8] rotavirus strains. *PLoS One*, 11(2), e0148416.

KOVACS, G. M., HARRACH, B., ZAKHARTCHOUK, A. N., & DAVISON, A. J. 2005. Complete genome sequence of simian adenovirus 1: an Old World

monkey adenovirus with two fiber genes. *Journal of General Virology*, 86(6), 1681-1686.

LION, T. 2014. Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Reviews*. 27 (3), 441–462.

MADER, D. R., & DIVERS, S. J. (Eds.). 2013. *Current Therapy in Reptile Medicine and Surgery-E-Book*. Elsevier Health Sciences, 425p.

MAGALHÃES FILHO, L. L., MARINHO FILHO, G. M., MACIEL, G. F., DIAS, R. R., REZENDE, C. D. S. A., FIGUEROA, F. E. V., & DE MOURA OLIVEIRA, L. 2013. Avaliação de características morfométricas da bacia hidrográfica do rio formoso-TO. *Revista de Ciências Ambientais*, 7(1), 37-48.

MALIK, Y. S., SHARMA, A. K., KUMAR, N., SHARMA, K., GANESH, B., & KOBAYASHI, N. 2014. Identification and characterisation of a novel genogroup II picobirnavirus in a calf in India. *Veterinary Record*, 174(11), 278-278.

MALOULI, D., HOWELL, G.L., LEGASSE, A.W., KAHL, C., AXTHELM, M.K., HANSEN, S.G. & FRÜH, K. 2014. Full genome sequence analysis of a novel adenovirus of rhesus macaque origin indicates a new simian adenovirus type and species. *Virology Reports*. 3(4), 18–29.

MALVASIO, A. 2001. *Aspectos do mecanismo alimentar e da biologia reprodutiva em Podocnemis expansa (Schweigger, 1812), P. unifilis (Troschel, 1848) e P. sextuberculata (Cornalia, 1849) (Testudines, Pelomedusidae)*. Tese de doutorado do Curso de Pós-Graduação em Zoologia. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

MARSCHANG, R. E. 2011. Viruses infecting reptiles. *Viruses*, 3(11), 2087-2126.

MATTHIJNSSENS, J, CIARLET, M, HEIMAN, E, ARIJS, I, DELBEKE, T, MCDONALD, SM & RAHMAN, M. 2008. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus

strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *Journal of virology*, 82(7), 3204-3219.

MOGOLLONES, S. C., RODRÍGUEZ, D. J., HERNÁNDEZ, O., & BARRETO, G. R. 2010. A demographic study of the arrau turtle (*Podocnemis expansa*) in the Middle Orinoco River, Venezuela. *Chelonian Conservation and Biology*, 9(1), 79-89.

MONENZI, T. A., MEHNERT, D. U., DE MOURA, E. M., MÜLLER, N. M., GARRAFA, P., MATUSHIMA, E. R., ... & BORELLA, M. I. 2016. Chelonid herpesvirus 5 in secretions and tumor tissues from green turtles (*Chelonia mydas*) from Southeastern Brazil: a ten-year study. *Veterinary microbiology*, 186, 150-156.

MONTEIRO, G S., FLECK, JD, KLUGE, M, RECH, NK, SOLIMAN, MC, STAGGEMEIER, R & SPILKI, FR. 2015. Adenoviruses of canine and human origins in stool samples from free-living pampas foxes (*Lycalopex gymnocercus*) and crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) in Sao Francisco de Paula, Rio dos Sinos basin. *Brazilian Journal of Biology*, 75(2), 11-16.

MURO, J., RAMIS, A., PASTOR, J., VELARDE, R., TARRES, J., & LAVIN, S. 1998. Chronic rhinitis associated with herpesviral infection in captive spur-thighed tortoises from Spain. *Journal of wildlife diseases*, 34(3), 487-495.

NG, TFF, MESQUITA, J R., NASCIMENTO, MSJ, KONDOV, NO, WONG, W, REUTER, G & VINJE, J. 2014. Feline fecal virome reveals novel and prevalent enteric viruses. *Veterinary microbiology*, 171(1-2), 102-111.

OTSYULA, M, YEE, J, SULEMAN, M, TARARA, R, MARTIN, J, WOODS, P & JENNINGS, M.1996. Rotavirus infection in African, non-human primates. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 90(6), 659-661.

PANTÓ, L., PODGORSKI, I.I., JÁNOSKA, M., MÁRKÓ, O. & HARRACH, B. 2015. Taxonomy proposal for Old World monkey adenoviruses: characterisation of several nonhuman, non-ape primate adenovirus lineages. *Archives of Virology*. 160 (12). p. 3165–3177.

PELLETT, P. E., & ROIZMAN, B. 2013. Herpesviridae. *Fields virology*, 2(6), 1802-22.

PEREIRA, HG, FLEWETT, TH, CANDEIAS, JAN, & BARTH, OM. 1988. A virus with a bisegmented double-stranded RNA genome in rat (*Oryzomys nigripes*) intestines. *Journal of General Virology*, 69(11), 2749-2754.

PETTAN-BREWER, K. C. B., DREW, M. L., RAMSAY, E., MOHR, F. C., & LOWENSTINE, L. J. 1996. Herpesvirus particles associated with oral and respiratory lesions in a California desert tortoise (*Gopherus agassizii*). *Journal of Wildlife Diseases*, 32(3), 521-526.

RIBEIRO, N. V., FERREIRA, L. G., & FERREIRA, N. C. 2016. Avaliação da expansão do cultivo da cana-de-açúcar no bioma cerrado por meio de modelagem dinâmica da paisagem. *Revista Brasileira de Cartografia*, 68(1), 1-14.

RIVERA, S., WELLEHAN JR, J. F. X., MCMANAMON, R., INNIS, C. J., GARNER, M. M., RAPHAEL, B. L., & MARLAR, A. B. 2009 Systemic adenovirus infection in Sulawesi tortoises (*Indotestudo forsteni*) caused by a novel siadenovirus. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 21(4), 415-426.

SANTOS, V, MASCARIN, GM, DA SILVA LOPEZ M., ALVES, MCDF, REZENDE, JM, GATTI, MSV, & JÚNIOR, ÍD. 2017. Identification of double-stranded RNA viruses in Brazilian strains of *Metarhizium anisopliae* and their effects on fungal biology and virulence. *Plant Gene*, 11, 49-58.

SCHUMACHER, V. L., INNIS, C. J., GARNER, M. M., RISATTI, G. R., NORDHAUSEN, R. W., GILBERT-MARCHETERRE, K., & FRASCA JR, S. 2012. Sulawesi tortoise adenovirus-1 in two impressed tortoises (*Manouria impressa*) and a Burmese star tortoise (*Geochelone platynota*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 43(3), 501-510.

SEIMON, T.A., OLSON, S.H., LEE, K.J., ROSEN, G., ONDZIE, A., CAMERON, K., REED, P., ANTHONY, S.J., JOLY, D.O., MCALOOSE, D. & LIPKIN,

W.I. 2015. Adenovirus and herpesvirus diversity in free-ranging great apes in the Sangha region of the Republic of Congo. *PLoS ONE*. 10 (3). e0118543.

STADEN, R., BEAL, K. & BONFIELD, J. 2000. The Staden package, 1998. *Methods Mol. Biol.* 132, 115–130.

TSUGAWA, T. & HOSHINO, Y. 2008. Whole genome sequence and phylogenetic analyses reveal human rotavirus G3P [3] strains Ro1845 and HCR3A are examples of direct virion transmission of canine/feline rotaviruses to humans. *Virology*, 380(2), 344-353.

VOGT, R. C. 2008. Tartarugas da Amazônia. INPA-Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Lima, Peru: Gráfica Biblos, 2008.104p.

WELLEHAN, J. F., JOHNSON, A. J., HARRACH, B., BENKO, M., PESSIER, A. P., JOHNSON, C. M. & JACOBSON, E. R. 2004. Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the atadenoviruses. *Journal of virology*, 78(23), 13366-13369.

WORK T.M.; DAGENAIS J.; BALAZS G.H.; SCHETTLE N. & ACKERMANN M. 2014. Dynamics of Virus Shedding and In Situ Confirmation of Chelonid Herpesvirus 5 in Hawaiian Green Turtles With Fibropapillomatosis. *Veterinary Pathology*, 52(6), 1195-1201.

XIANG, Z., LI, Y., CUN, A., YANG, W., ELLENBERG, S., SWITZER, W.M., KALISH, M.L. & ERTL, H.C.J. 2006. Chimpanzee adenovirus antibodies in humans, sub-Saharan Africa. *Emerging Infectious Diseases*. 12 (10), 1596–1599.

A seguir foram redigidos seguindo as normas de citações e referências da revista *Herpetology Notes* (ISSN 2071-5773), no entanto não se encontram formatados para submissão, uma vez que alterações serão consideradas, de acordo com correções ou sugestões propostas pela banca examinadora. As normas encontram-se disponíveis em:
<https://biotaxa.org/hn/about/submissions#authorGuidelines>

3.2- Primeiro Relato De Vírus Simio em *Podocnemis expansa* (SCHWEIGGER, 1812) no Cerrado, Centro-Oeste do Brasil.

Amanda Toledo Lourenço^{1,*}; Alexandra Frossard¹; Ana Paula Jejesky Oliveira¹; Adriana Regina Chippari-Gomes¹; Mária Benkő²; Balazs Harrach²; Kajan Victor Gyozo²; João Luiz Rossi Jr¹; Fernando Vicentini³;

- 1 Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, Universidade Vila Velha, Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, 29102-770, Vila Velha, ES, Brasil.
- 2 Instituto de Pesquisa Médica Veterinária, da Academia de Ciências da Hungria, krt. 21 1143 Budapest, Hungary.
- 3 Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciência da Saúde, Rua do Cajueiro, Cajueiro, 44574490 - Santo Antônio de Jesus, BA - Brasil.

*amandatoledo575@gmail.com, autor correspondente.

A ocorrência de doenças infecciosas que acometem espécies selvagens vem sendo relatada como uma importante ameaça para a conservação, causando sérios problemas à saúde única (Heard, 2013 e Komoto et al., 2016). Algumas espécies de testudines sofrem com declínio de suas populações por epidemias

causadas por doenças infecciosas (Rivera et al., 2009; Bicknese et al., 2010 e Marschang, 2011). O declínio de populações que ocupavam grandes áreas no passado é motivo de alarme para aqueles que se preocupam não apenas com as tartarugas, mas também com a saúde e o bem estar dos rios e dos humanos. Uma infecção causada por adenovirus do gênero *Siadenovirus* resultou em uma alta taxa de mortalidade (82%) em *Indotestudo forsteni* (Rivera et al., 2009), o mesmo vírus também foi encontrado em *Manouria impressa* e *Geochelone platynota* (Schumacher et al., 2012).

A *Podocnemis expansa* esta entre os maiores componentes das redes tróficas dos rios, desempenhando importantes papéis nas funções vitais do ecossistema (Mogollones et al., 2010). Possui alto potencial para exploração zootécnica, pelo alto valor econômico que agrega sua carne e seus subprodutos (Salera Júnior, Portelinha, e Malvasio, 2009 e Godoy et al., 2010). Essa exploração relacionada com atividades antrópicas propicia o aumento do contato entre essas populações favorecendo a transmissão de doenças. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar a presença de Adenovírus em amostras de intestino de filhotes recém-eclodidos de *Podocnemis expansa*, coletados no rio Araguaia e Crixás-açu.

Um total de 43 filhotes recém-eclodidos avaliados, capturados manualmente no rio Araguaia (13°17'49.0"S 50°36'16.5"W até 13°30'00.0"S 50°43'29.51"W) e no rio Crixás-açu (13°45,02'13"S 49°56'21,52"W até 13°25'44,21"S 50°33'30,53"W), no estado de Goiás Brasil. Em campo, os animais foram eutanasiados com injeção de lidocaína 3%, via intratecal, e em seguida foi feita necropsia para retirada do intestino para a realização das análises virais. As

amostras do intestino foram analisadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Espírito Santo, campus São Mateus (CEUNES). As amostras de intestinos foram submetidas à técnica de suspensão se utilizou aproximadamente 200mg de amostra de cada animal, estas foram maceradas e diluídas a uma concentração de 20% (g / 100 mL) de tampão Tris-Cálcio. A extração do DNA viral foi realizada, utilizando o reagente TRIzol® seguindo as instruções do fabricante.

A partir da extração do DNA foi realizada a PCR seguida por nested-PCR de acordo com a descrição original de Wellehan et al. (2004) com ligeiras modificações, gerando fragmento de 550 pb e 300 pb utilizando pares de iniciadores do gene DNA-polimerase específico para detecção de Adenovírus. Os produtos foram submetidos à eletroforese em agarose a 1,5%. O sequenciamento direto dos produtos amplificados e purificados foi determinado com iniciadores internos apropriados. As sequências de DNA foram editadas usando o pacote Staden (Staden et al., 2000), avaliadas e comparadas a outras sequencias já depositadas no GenBank, usando o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Dos resultados preliminares, sugestivos de casos positivos que foram enviados para confirmação no laboratório de Microbiologia da Academia de Ciências da Hungria, confirmando a presença de adenovírus no intestino do animal. O resultado da amplificação gerou uma sequência de 300 pb, classificado com alto grau de similaridade com 96% de identidade para adenovírus da espécie simio,

Simian mastadenovirus1 (SAdV-1), quando avaliada e comparada usando o programa BLAST.

O vírus encontrado em amostra de intestino de filhote pode evidenciar uma transmissão vertical. Diante do exposto, uma vez que a transmissão do vírus ocorre principalmente por via fecal-oral, é provável que a mãe esteve em contato e/ou apresentava uma possível infecção com uma cepa de alta similaridade com o SAdV1. Um ponto importante e não se pode descartar é a possibilidade da progenitora ter se contaminado com o próprio SAdV1, indicando que esta cepa pode contaminar não somente mamíferos mas répteis. A carne e os ovos de *P. Expansa* tem sido utilizada como fonte de proteína animal para a alimentação humana há alguns anos, caracterizando como um hábito alimentar e cultural (Ataídes, Malvasio e Parente, 2010). Essa exploração propicia o aumento do contato entre essas populações favorecendo a transmissão de doenças.

Nos últimos anos surgiram várias evidências que apoiam potenciais eventos de transmissão de adenovírus entre diferentes espécies de hospedeiros (Xiang et al., 2006; Ersching et al., 2010; Chen et al., 2011 e Chiu et al., 2013). Os adenovírus têm sido descritos como patógenos oportunistas em muitas espécies animais, especialmente quando fatores adicionais (particularmente infecções concomitantes) afetam a saúde do hospedeiro; no entanto, alguns tipos de adenovírus pode ter um papel patogênico primário (Ariel, 2011). Os adenovírus são considerados agentes infecciosos muito resistentes às condições ambientais. São resistentes a secreções gástricas e biliares, podendo ser excretados em grande

quantidade nas fezes (Lion, 2014). Logo, essa espécie de testudine possivelmente também pode atuar como um agente disseminador do vírus, uma vez que o vírus foi encontrado no intestino e pode ser eliminado nas fezes.

Considerando que não há descrição prévia destes vírus em *P. expansa* e que os fragmentos sequenciados de 300 pb para adenovírus, há possibilidade de estar diante da primeira descrição em *P. expansa*, mostrando a similaridade dos vírus de outros hospedeiros. Mais estudos com números amostrais maiores, além de avaliação dos ovos poderão elucidar melhor se há transmissão vertical. Investigações de doenças infecciosas são escassas, especialmente para a espécie *P. expansa*, o que nos leva à necessidade de melhorias nas investigações e controle de vírus em animais selvagens com implementação de estudos como este, a fim de conhecer e entender as circulações virais que acomete as espécies.

Referencias

Ariel, E (2011). Viruses in reptiles. *Veterinary research*, **42**: 1-12.

Atáides, AG, Malvasio, A, Parente, TG (2010): Percepções sobre o consumo de quelônios no entorno do Parque Nacional do Araguaia, Tocantins: conhecimentos para conservação. *Gaia Scientia*, **4**: 07-20.

Bicknese, EJ, Childress, AL, Wellehan Jr, JF (2010): A novel herpesvirus of the proposed genus *Chelonivirus* from an asymptomatic bowsprit tortoise (*Chersina angulata*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **41**: 353-358.

Chen, EC, Yagi, S, Kelly, KR, Mendoza, SP, Maninger, N, Rosenthal, A, SPINNER, A, BALES, KL, SCHNURR, DP, LERCHE, NW, CHIU, CY (2011): Cross-species

- transmission of a novel adenovirus associated with a fulminant pneumonia outbreak in a New World monkey colony. *PLoS Pathogens*, **7**: e1002155.
- Chiu, CY, Yagi, S, Lu, X, Yu, G, Chen, EC, Liu, M, Dick, EJ, Carey, KD, Erdman, DD, Leland, MM, Patterson, JL (2013): A novel adenovirus species associated with an acute respiratory outbreak in a baboon colony and evidence of coincident human infection. *MBio*, **4**: e0008413.
- Ersching, J, Hernandez, MIM, Cezarotto, FS, Ferreira, JDS, Martins, AB, Switzer, WM, Xiang, Z, Ertl, HCJ, Zanetti, CR, Pinto, AR (2010): Neutralizing antibodies to human and simian adenoviruses in humans and New-World monkeys. *Virology*, **407**: 1–6.
- Godoy, R, Undurraga, EA, Wilkie, D, Reyes-García, V, Huanca, T, Leonard, WR, Vadez, V (2010): The effect of wealth and real income on wildlife consumption among native Amazonians in Bolivia: estimates of annual trends with longitudinal household data (2002–2006). *Animal Conservation*, **13**: 265-274.
- Heard, MJ, Smith, KF, Ripp, KJ, Berger, M, Chen, J, Dittmeier, J, Ryan, E (2013): The threat of disease increases as species move toward extinction. *Conservation Biology*, **27**: 1378-1388.
- Komoto, S, Tacharoenmuang, R, Guntapong, R, Ide, T, Tsuji, T, Yoshikawa, T, Taniguchi, K (2016): Reassortment of human and animal rotavirus gene segments in emerging DS-1-like G1P [8] rotavirus strains. *PLoS One*, **11**: e0148416.
- Lion, T (2014): Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Reviews*. **27**: 441–462.
- Marschang, RE(2011): Viruses infecting reptiles. *Viruses*, **3**: 2087-2126.
- Mogollones, SC, Rodríguez, DJ, Hernández, O, Barreto, GR (2010): A demographic study of the arrau turtle (*Podocnemis expansa*) in the Middle Orinoco River, Venezuela. *Chelonian Conservation and Biology*, **9**: 79-89.

- Rivera, S, Wellehan Jr, JFX, McManamon, R, Innis, CJ, Garner, MM, Raphael, BL, Marlar, AB (2009): Systemic adenovirus infection in Sulawesi tortoises (*Indotestudo forsteni*) caused by a novel siadenovirus. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, **21**: 415-426.
- Salera Júnior, G, Portelinha, TCG, Malvasio, A (2009): Predation on adult females of *Podocnemis expansa* Schweigger (Testudines, Podocnemididae) by *Panthera onca* Linnaeus (Carnivora, Felidae), in Tocantins State. *Biota Neotropica*, **9**: 387-391.
- Schumacher, VL, Innis, CJ, Garner, MM, Risatti, GR, Nordhausen, RW, Gilbert-Marcheterre, K, Frasca Jr, S (2012): Sulawesi tortoise adenovirus-1 in two impressed tortoises (*Manouria impressa*) and a Burmese star tortoise (*Geochelone platynota*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **43**: 501-510.
- Staden, R, Beal, K, Bonfield, J (2000): The Staden package, 1998. *Methods Mol. Biol.*, **132**:115–130
- Wellehan, JF, Johnson, AJ, Harrach, B, Benkö, M, Pessier, AP, Johnson, CM, Jacobson, ER (2004): Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the adenoviruses. *Journal of virology*, **78**:13366-13369.
- Xiang, Z, Li, Y, Cun, A, Yang, W, Ellenberg, S, Switzer, WM, Kalish, ML, Ertl, HCJ (2006): Chimpanzee adenovirus antibodies in humans, sub-Saharan Africa. *Emerging Infectious Diseases*. **12**: 1596–1599.

4-ANEXOS

1- Tampão tris-cálcio

Tris base 0,01 M	1,21 g
Cloreto de cálcio 0,0015 M	0,22 g
Água destilada q.s.p.....	1000 ml

2 - Soluções para o preparo do gel de poliacrilamida

2.1 Gel concentrador 3,5%

Acrilamida/Bis-acrilamida	0,14 ml
UpperTRIS	0,5 ml
Água destilada	1,5 ml
Persulfato de amônio	50 µL
TE ED	10 µL

2.1.1 Acrilamida/Bis-acrilamida

Bis-acrilamida	1,3 g
Acrilamida	50 g
Água destilada q.s.p	100 ml

2.1.2 Upper TRIS

TRIS (Base)	6,06 g
HCl concentrado	q.s.p pH 6,8
Água destilada	q.s.p 100 ml

2.1.3 Persulfato de amônio (20 mg/mL)

Persulfato de amônio	20 mg
----------------------------	-------

86

Água destilada	q.s.p. 1,0 ml
----------------------	---------------

2.2 Gel separador 7%

Acrilamida/Bis-acrilamida	1,02 ml
LowerTRIS	1,75 ml
Água destilada	4,02 ml
Persulfato de amônio	200 µL

TE ED	10 µL
3.2.1 Lower TRIS	
TRIS (Base)	18,17 g
HCl concentrado	q.s.p. pH 8,8
Água destilada	q.s.p. 100 ml
2.3 Etanol 10% - ácido acético 0,5%	
Etanol	10 ml
Ácido acético	0,5 ml
Água destilada	q.s.p. 100 ml
2.4 Nitrato de prata	
Nitrato de prata	0,185 g
Água destilada	q.s.p. 100 ml
2.5 Solução reveladora	
NaOH	3,75 g
Formaldeído (40%)	0,95 ml
Água destilada	q.s.p. 125 ml
2.6 Ácido acético 5%	
Ácido acético	5,0 ml
Água destilada	q.s.p. 100 ml

3- Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 50290-1	Data da Emissão: 21/03/2016 09:50	Data para Revalidação*: 20/04/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Nome: Alexandra Frossard	CPF: 094.084.737-01
Título do Projeto: Efeito da ecotoxicológicos em Podocnemis expansa expostas à compostos de defensivos agrícolas	
Nome da Instituição : SOCIEDADE EDUCACIONAL DO ESPIRITO SANTO - UVV	CNPJ: 27.067.651/0001-55

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Desenvolvimento da pesquisa, seja pela coleta de animais e ovos em campo, ou desenvolvimento do expe	10/2015	03/2019

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		TO	ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL MEANDROS DO RIO ARAGUAIA	UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Podocnemis expansa
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Podocnemis expansa
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Podocnemis expansa (*Qtde: 300)
4	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Podocnemis expansa
5	Observação e gravação de imagem ou som de taxon em UC federal	Podocnemis expansa

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 50290-1	Data da Emissão: 21/03/2016 09:50	Data para Revalidação*: 20/04/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		
Nome: Alexandra Frossard		CPF: 094.084.737-01
Título do Projeto: Efeito da ecotoxicológicos em Podocnemis expansa expostas à compostos de defensivos agrícolas		
Nome da Instituição : SOCIEDADE EDUCACIONAL DO ESPIRITO SANTO - UVV		CNPJ: 27.067.651/0001-55

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Répteis)	Ovos
2	Método de captura/coleta (Répteis)	Coleta manual
3	Método de marcação (Répteis)	Corte de escudos marginais

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	SOCIEDADE EDUCACIONAL DO ESPIRITO SANTO - UVV	

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 50290-1	Data da Emissão: 21/03/2016 09:50	Data para Revalidação*: 20/04/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Nome: Alexandra Frossard		CPF: 094.084.737-01
Título do Projeto: Efeito da ecotoxicológicos em Podocnemis expansa expostas à compostos de defensivos agrícolas		
Nome da Instituição : SOCIEDADE EDUCACIONAL DO ESPIRITO SANTO - UVV		CNPJ: 27.067.651/0001-55

4- Comissão de Ética da Universidade Vila Velha (CEUA)

 **Universidade Vila Velha**
Comissão de Ética, Bioética e Bem Estar Animal (CEUA-UVV)

PARECER DO RELATOR

Parecer Nº: 357-2015

Pesquisador (a) Responsável: Profa. Adriana Regina Chippari Gomes

Tipo de Pesquisa: _____, Registro do CEUA: 357-2015

Instituição onde será desenvolvido: UVV

Situação: **APROVADO**

Ao analisar o projeto de pesquisa: "**Efeitos Ecotoxicológicos do cobre em *Podocnemis expansa***", tendo como pesquisador(a) responsável Profa. Adriana Regina Chippari Gomes, e considero que o projeto se encontra adequado e satisfatoriamente de acordo com as exigências das Resoluções que regem esse Comitê.

Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta, a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, sou de parecer favorável à realização do projeto classificando-o como **APROVADO**, pois o mesmo atende aos Requisitos Fundamentais da Normas de Conduta para a Utilização de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão no Centro Universitário Vila Velha.

Vila Velha, 01 de Dezembro de 2015.



Prof. Dra. Rute Beatriz Garcia Clemente Carvalho
Relator da CEUA-UVV.

Centro Universitário Vila Velha
Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha-ES, CEP.: 29102-770
E-mail xxx@vuv.br

ADM-14