

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

**AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE TRANSMISSÃO VERTICAL E
ESTUDO MOLECULAR DE *Adenoviridae*, *Iridoviridae*, *Reoviridae* e
Picobirnaviridae EM *Caretta caretta* E *Chelonia mydas* DE VIDA LIVRE**

ANA PAULA JEJESKY DE OLIVEIRA

VILA VELHA
OUTUBRO/2020

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

**AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE TRANSMISSÃO VERTICAL E
ESTUDO MOLECULAR DE *Adenoviridae*, *Iridoviridae*, *Reoviridae* e
Picobirnaviridae EM *Caretta caretta* E *Chelonia mydas* DE VIDA LIVRE**

Tese apresentada a Universidade Vila Velha, como
pré-requisito do Programa de Pós-graduação em
Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do título de
Doutora em Ecologia de Ecossistemas.

ANA PAULA JEJESKY DE OLIVEIRA

VILA VELHA
OUTUBRO/2020

INTRODUÇÃO GERAL

A virosfera certamente inclui todos os ambientes da Terra, da atmosfera. Historicamente os parasitos como vírus e bactérias são sub-representados nos estudos ecológicos, no entanto lentamente vem ganhando reconhecimento (Suttle, 2005; Suttle, 2007). Os vírus são os microrganismos mais abundantes no planeta, com estimativas de que milhões de partículas semelhantes aos vírus estão presentes em cada mililitro de água apenas no oceano (Reche et al., 2018).

Estes parasitos intracelulares foram descritos muito tempo depois que seus efeitos foram conhecidos, principalmente devido ao seu tamanho minúsculo, mas ainda hoje seu papel na ecologia permanece pouco compreendido (Bower et al., 2019). Porém, a importância dos vírus tem sido mais evidente. Os vírus, além de agentes de mortalidade, são um dos maiores reservatórios de diversidade genética ainda inexplorada na Terra. Eles não podem se replicar fora do hospedeiro e sua transmissão pode ocorrer diretamente através do contato com hospedeiros, superfícies infectadas ou ainda através de vetores como carrapatos e mosquitos (Marschang, 2011).

Os fenômenos naturais são conhecidos por causarem desordens no ambiente reciclando o ecossistema, entretanto, a intervenção humana, além de modificar, tem intensificado tais alterações ambientais resultando em emergências ou a reemergência de doenças infecciosas (Cunningham et al., 2017). Além de fatores como mudanças climáticas, fragmentação e redução de habitats naturais, caça, redução de presas e poluição, os agentes infecciosos também são reconhecidos como um elemento na dinâmica populacional e na evolução das populações hospedeiras, assim como uma importante ameaça para a conservação de animais selvagens de vida livre, saúde pública e animal (Cleaveland et al., 2001; Barbosa et al., 2011). Estes fatores modificam as interações ecológicas entre patógenos e hospedeiros e permitem o aumento do contato entre espécies de agentes biológicos causadores de doenças com novas populações de hospedeiros. Dessa forma a seleção natural pressiona para a dominância de patógenos que se adaptam a novas condições ambientais (Daszak et al., 2001). Neste contexto, hospedeiros podem atuar como reservatórios desempenhando um importante papel na manutenção dos agentes patogênicos nas comunidades e na sua transmissão a pequenas populações, causando declínios populacionais, muitas vezes significativos (Roelke-Parker et al., 1996) .

Os vírus abrangem efeitos extremos. Podem variar com seu impacto benigno até causar eventos de morbimortalidade em massa das populações. Variam de altamente específicos ou

generalistas quanto aos seus hospedeiros e podem ser zoonóticos, embora a patogenicidade em relação a diferentes hospedeiros não seja bem compreendida para vários vírus (Ariel, 2011). Além disso, apesar da alta diversidade genética dentro das comunidades virais, algumas pesquisas têm observado repetidamente que sequências de vírus idênticas ou com alta identidade pode ser encontradas em ambientes amplamente separados, ambientalmente muito diferentes. As três principais hipóteses para explicar essas observações são (1) que microrganismos intimamente relacionados que podem servir como células hospedeiras para esses vírus devem viver em ambientes muito diferentes, (2) que os vírus devem ter ampla variedade de hospedeiros que lhes permitam infectar hospedeiros distantes, ou (3) que a dispersão de alguns vírus é tão alta que eles são distribuídos globalmente (Reche et al., 2018), através de evidências teóricas (Hammond et al., 1989) e empíricas (Sharoni et al., 2015; Whon et al., 2012).

As doenças que acometem o ambiente marinho têm ganhado um foco maior nos trabalhos por ecologistas marinhos (Lafferty, 2017). Um dos estudos que possivelmente instigou esta área de pesquisa, foi o de Ernesto Weil e Jim Porter, ecologistas marinhos que pesquisaram *Diadema antillarum*, uma espécie de ouriço-do-mar. Esses ouriços eram comuns em todo o Caribe, mas durante 1983-1984, os animais apresentavam quedas dos espinhos e muitos indivíduos morreram em dias, chegando a uma perda populacional de 95% (Lessios et al., 1984). Com isso um desequilíbrio ecológico se estabeleceu e as algas começaram a dominar os recifes e a superar os corais e então estes recifes foram devastados (Hughes, 1994). Este foi um dos eventos de mortalidade em massa importante já documentado, entretanto a microbiologia marinha estava nos primórdios e nenhum diagnóstico foi possível, mas acredita-se que este evento foi causado por um microorganismo (Lafferty, 2017).

É evidente que os ecossistemas marinhos costeiros tropicais estão sob severos estresses antrópicos. Nesse sentido, animais de ambientes marinhos, têm sido alvo de severa ação antropogênica (Zwarg et al. 2014), o que torna essas espécies sentinelas do ambiente, indicando a saúde ambiental destes habitats (Aguirre e Lutz, 2004; Bucchia et al., 2015). Importantes informações são descobertas quando o assunto são os efeitos da poluição sobre estes animais, pois além de prejudicar fatores comportamentais, genéticos e fisiológicos, modificações nas interações entre os hospedeiros e seus parasitos acontecem. Com isso há um aumento no surgimento de doenças infecciosas que também abrange a população humana (Bauerle et al., 1975; Bucchia et al., 2015; Bower et al., 2019). O uso de testudines selvagens já é descrito como bioindicadores ambientais em razão de que muitas espécies serem

generalistas, apresentam vida relativamente longa, ocorrem em uma variedade de habitats e ocupam diferentes níveis tróficos (Bauerle et al., 1975; Campbell e Campbell, 2001).

Dentre os répteis pertencentes a ordem Testudines, as tartarugas-marinhas são animais que apresentam estrutura corpórea formada por uma carapaça de formato hidrodinâmico resultante da fusão dos ossos das vértebras e das costelas, sendo esta característica mantida por 300 milhões de anos (Wyneken, 2001). Estes testudines pertencentes à mais antiga linhagem de répteis vivos, com surgimento da espécie no período Jurássico. Somente duas (*Cheloniidae* e *Dermochelyidae*) das quatro (*Toxochelyidae*, *Protostegidae*, *Cheloniidae* e *Dermochelyidae*) famílias de tartarugas-marinhas resistem até os dias de hoje (Marcovaldi et al., 2011). Das sete espécies de tartaruga-marinhas existentes, cinco delas são encontradas na costa brasileira para alimentação e reprodução, são elas: *Caretta caretta* (tartaruga-cabeçuda), *Chelonia mydas* (tartaruga-verde), *Eretmochelys imbricata* (tartaruga-de-pente), (tartaruga-oliva), representantes da família *Cheloniidae* e *Dermochelys coriacea* (tartaruga-de-couro) da família *Dermochelyidae*. Todas em ameaça de extinção em âmbito nacional e internacional, sendo encontradas na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN (*International Union for Conservation of Nature*), nas categorias ameaçada, vulnerável ou criticamente ameaçada. Essas considerações têm enfatizado pesquisas sobre doenças das tartarugas-marinhas como uma questão prioritária (IUCN, 2015).

A espécie *Chelonia mydas* possui distribuição a partir dos trópicos até as zonas temperadas, sendo a espécie que apresenta hábitos mais costeiros, utilizando estuários de rios e lagos. No Brasil, as desovas ocorrem principalmente nas ilhas oceânicas da Trindade (ES), Atol das Rocas (RN) e Fernando de Noronha (PE). Na costa brasileira, áreas de desova secundárias ocorrem no litoral norte do estado da Bahia. Esporadicamente ocorrem também ninhos nos estados do Espírito Santo, Sergipe e Rio Grande do Norte (Almeida et al., 2011).

Eretmochelys imbricata tem distribuição em águas tropicais e, em menor extensão, em águas subtropicais. No Brasil, as áreas de desova distribuem-se desde os estados do Espírito Santo ao Ceará, porém desovas regulares com maior concentração encontram-se apenas no litoral norte do estado da Bahia e Sergipe, e no litoral sul do Rio Grande do Norte. Há evidências de desovas regulares, mas em menor número, no estado de Pernambuco e no norte do Rio Grande do Norte (Marcovaldi et al., 2011).

A *Lepidochelys olivacea* tem distribuição circunglobal e no Brasil a área prioritária de reprodução está localizada entre o litoral sul do estado de Alagoas e o litoral norte da Bahia com maior densidade de desovas no estado de Sergipe. Ocorrências reprodutivas em menor densidade também são registradas no estado do Espírito Santo. Desovas ocasionais já foram

registradas nos estados do Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte e Ceará (Castilhos et al., 2011).

A espécie *Caretta caretta* também apresenta distribuição circunglobal e ocorrências de indivíduos em diferentes estágios de vida são registradas na costa de diversos estados do Brasil, entre o Pará e o Rio Grande do Sul. No Brasil, as áreas prioritárias de desova estão localizadas no norte da Bahia, Espírito Santo, norte do Rio de Janeiro e Sergipe e áreas secundárias ocorrem em alguns pontos dos litorais do Espírito Santo e sul da Bahia. Desovas ocasionais foram registradas em Parati (RJ), litoral norte de São Paulo, Pontal do Peba (AL), litoral do Ceará, Pipa (RN), Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Santos et al., 2011).

A espécie *Dermochelys coriacea* é cosmopolita, ocorre nos oceanos tropicais e temperados de todo o mundo, chegando próximo de águas subárticas, vive usualmente na zona oceânica durante a maior parte da vida. Existem registros de ocorrências de encalhes nos estados do Maranhão, Pará, Ceará, Rio Grande do Norte, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (Figueredo et al., 2008). A área conhecida com desovas regulares de *D. coriacea* situa-se no litoral norte do Espírito Santo, com relatos de desovas ocasionais no Rio Grande do Norte, Bahia, Rio de Janeiro, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Almeida et al., 2011).

As enfermidades que acometem as tartarugas-marinhas, podem ser representadas como um fator de mortalidade natural. Entretanto, é importante esclarecer a antropização ambiental além modificar interações ecológicas, fragilizam mecanismos fisiológicos e imunológicos que predisõem as espécies a vários patógenos (Work et al., 2003; Orós et al., 2005), reduz a população e gera problemas ligados à conservação (Van Houtan et al., 2010).

Estudos que visam conhecer o padrão das doenças e o estado de saúde de populações não estão totalmente elucidados. Possivelmente a falta de maiores informações sobre a transmissão dos vírus, é devido ao acesso a todos os estágios de vida das tartarugas-marinhas que ainda é limitado pelo ciclo de vida complexo. Elas atravessam inúmeros habitats marinhos durante a vida, isso resulta em um conhecimento fragmentado sobre o comportamento das tartarugas-marinhas (Une et al., 1999). Todas as características de vida das tartarugas-marinhas limitam o seu acesso e torna difícil determinar todas as influências, via de transmissão e o impacto das doenças infecciosas nas suas populações, embora esteja bem estabelecido que as infecções com agentes patogênicos sejam capazes de causar mortalidade significativa.

É possível que devido à relativa facilidade de contabilização de processos ecológicos competitivos, como os sistemas predadores, os sistemas de parasitos recebem

comparativamente menos atenção (Raffel et al., 2008). Muitas são as dificuldades envolvidas na identificação e classificação (McManus e Bowles 1996) de patógenos, especialmente dos vírus, devido normalmente ao seu pequeno tamanho e a preservação pobre de amostras dos hospedeiros para exame futuros. Isso dificulta a capacidade de quantificar parasitos e assim incorporar seus efeitos em pesquisas ecológicas por falta de poder estatístico (Bower et al., 2019). Alguns avanços na tecnologia genômica e reconhecimento dos impactos severos de parasitos catalisaram pesquisas que não eram possíveis ou priorizadas anteriormente (Huggins et al., 2017; McKnight et al., 2017).

Em várias pesquisas, lesões em tartarugas-marinhas são relatadas por vírus, incluindo problemas do trato respiratório, enterites, anorexias, conjuntivites, fibropapilomatose (Marschang, 2011), além de outras doenças. A importância de compreender a disseminação e etiologia das doenças em animais selvagens está diretamente ligada a conservação das espécies.

A presença de patógenos é esperada em populações selvagens e a relação parasito-hospedeiro possui uma especificidade bastante singular. No entanto, a mortalidade elevada e a interferência das doenças na estrutura populacional de cada espécie devem ser alvo de estudos constantes, particularmente para o caso de patógenos ou hospedeiros que circulam por áreas amplas e por longo tempo como observado em tartarugas-marinhas (Caughley e Sinclair, 1994; Terracciano, 2016).

Nas últimas décadas, as pesquisas com vírus reptilianos têm se concentrado em três assuntos principais: os répteis como hospedeiros de vírus que afetam várias espécies incluindo os humanos; o papel da saúde dos répteis e as causas que pré determinam a doença seja ela por infecções secundárias ou fatores ambientais e evolução taxonômica a partir de análises genômicas, levando a uma melhor compreensão ecológica da coevolução dos vírus e seus hospedeiros (Marschang, 2011).

Vários estudos estão sendo realizados com famílias de vírus de DNA (*Iridoviridae*, *Poxviridae*, *Adenoviridae*, *Parvoviridae*, *Circoviridae*) (Ene et al., 2005; Alfaro et al., 2010; Fichi et al., 2016; Marschang, 2011) e também RNA (*Retroviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Bunyaviridae*, *Picornaviridae*, *Caliciviridae*, *Flaviviridae*, *Togaviridae*) que podem acometer testudines (Marschang, 2011). Mas em tartarugas-marinhas, somente duas famílias de vírus, *Herpesviridae* e *Papillomaviridae*, vem sendo bem documentadas (Tabela 1).

Tabela 1: Vírus encontrados em diferentes amostras biológicas de tartarugas-marinhas.

Espécie	Vírus	Material biológico	Técnica usada	Referência
<i>Chelonia mydas</i> , <i>Eretmochelys imbricata</i> , <i>Caretta caretta</i> e <i>Dermochelys coriacea</i>	Herpesvírus (FPTHV) (ChHV-5)	Tecido neoplásico, Tecido epitelial, tecido cerebral, tecido pulmonar, sangue, secreção ocular, cloaca e saliva.	PCR e RT-PCR	Herbst, L.H. 1994. Quackenbush et al., 1998; Lackovich et al., 1999; Matushima, 2003; Ene et al., 2005; Greenblatt et al., 2005; Alfaro-Núñez et al., 2016; Chaves A. et al., 2017; Díaz Delgado J. et al., 2019; Mejía Radillo RY, et al., 2019
<i>Caretta caretta</i>	Betanodavírus	Olhos, pulmões e tecido cerebral	RT-PCR	Fichi G. et al., 2016.
<i>Chelonia mydas</i>	Retrovírus	Tecido neoplásico	PERT e SDS-EGPA	Casey et al., 1997.
<i>Chelonia mydas</i>	Tornovírus (STTV1)	Tecido neoplásico	Análise metagenômica	Ng T.F et al., 2009.
<i>Caretta caretta</i> e <i>Chelonia mydas</i>	Papilomavírus (CcPV-1) e (CmPV-1)	Tecido epitelial	microscopia eletrônica e PCR	Manire et al., 2008, Herbst, L.H. 2009; Mashkour N. et al., 2018.
<i>Chelonia mydas</i>	Poliomavírus	Tecido neoplásico	PCR	Knöbl & Menão 2011.

PCR: reação em cadeia polimerase; PERT: transcriptase reversa baseado em PCR; SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida de sódio e do decil sulfato de sódio; RT-PCR: reação em cadeia polimerase quantitativo em tempo real.

O aumento do surgimento de doenças infecciosas nas últimas duas décadas serviu para consolidar a importância de compreender as interações ecológicas entre hospedeiros e parasitos (Bower et al., 2017). O levantamento microbiológico se revela importante para emergências ou reemergências de patógenos em ambientes costeiros e marinhos que possam afetar as espécies selvagens e até a saúde humana, mas principalmente compreender mais

sobre a variedade de vírus e coevolução destes vírus com seus hospedeiros (Cunningham et al., 2017; Liu et al., 2020).

Portanto, a oportunidade de explorar agentes infecciosos em tartarugas-marinhas, torna-se propício este estudo. O principal objetivo é determinar algumas das famílias de vírus entéricos de DNA (*Adenoviridae* e *Iridoviridae*) e RNAfd (*Reoviridae* e *Picobirnaviridae*) em amostra biológicas das espécies *Chelonia mydas* e *Caretta caretta* de Trindade/ES, Regência/ES e Vitória/ES. A possibilidade de transmissão vertical dos vírus de DNA e RNAfd encontrados será investigada. Além disso, será feita análises das sequências dos vírus encontrados para entender se são típicos da espécie ou similares a outros hospedeiros e assim buscarevidências sobre a coevolução, os possíveis fatores associados à presença dos vírus encontrados nas espécies foco desta pesquisa e seu impacto no ambiente marinho.

HIPÓTESES

- *Chelonia mydas* e/ou *Caretta caretta* de vida livre apresentam uma frequência maior de diversidade viral quando capturadas próximo a costa.
- As sequências do genoma de vírus de DNA e RNAfd encontrados em *Chelonia mydas* e/ou *Caretta caretta* de vida livre são típicos de vírus hospedeiro-específico e não apresentam similaridade das encontradas em hospedeiros de outras espécies marinhas.
- As sequências do genoma de vírus DNA e RNAfd encontradas em tartarugas progenitoras são encontrados em amostras de sua prole.

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

CAPÍTULO 2:
DETECÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE UM ADENOVÍRUS ISOLADO EM
Chelonia mydas (LINNAEUS,1758)

ANA PAULA JEJESKY DE OLIVEIRA

VILA VELHA

OUTUBRO/2020

OLIVEIRA, Ana Paula Jejesky. Universidade Vila Velha - ES, outubro de 2020. **Deteccão e análise filogenética de um adenovírus isolado em *Chelonia mydas* (Linnaeus,1758)**

Orientador: João Luiz Rossi Jr.

Co orientador: Fernando Vicentini.

Resumo

Os adenovírus (AdVs) são um grupo muito diversificado de patógenos que causam doenças em animais domésticos e selvagens. Tais vírus podem ter um grande efeito na população de tartarugas-marinhas quando são hospedeiras, pois são espécies que se encontram em ameaça de extinção. Eles também podem colocar em perigo outras espécies, devido as tartarugas ocuparem papel na transmissão em grande escala, pois são espécies migratórias. Utilizando de PCR com iniciadores específicos foi rastreado amostras *swabs* (ocular e cloacal) e fragmentos de tecido (baço, fígado e intestino) de indivíduos da espécie *Chelonia mydas*. Neste estudo, um novo AdVs foi descrito a partir de uma amostra fecal de *Chelonia mydas*. A sequência foi classificada no gênero *Aviadenovirus*, uma nova linhagem é hipotetizada pois a cepa parece ter co-evoluído com os AdVs aviários. Esses resultados mostram que há informações limitadas sobre a biodiversidade de AdVs em tartarugas-marinhas e que pesquisas como essa fornecem novos olhares sobre a diversidade, evolução, variedade de hospedeiros e distribuição de AdVs em testudines.

Palavras-chaves: Testudines, evolução, Adenoviridae, PCR.

Introdução

Os adenovírus (AdVs) são agentes infecciosos de DNA de fita dupla, não envelopados, comuns em um grande número de animais vertebrados em todo o mundo (Davison et al 2000; Wellehan et al., 2004; Harrach et al., 2011; Harrach & Kaján et al., 2011; Doszpoly et al., 2019). Embora as cepas mais bem documentadas ocorram em mamíferos e aves, estudos mostraram que também são difundidos entre os répteis (Marschang, 2011; Ariel, 2011) causando morbidade e mortalidade, no entanto a patogenicidade da infecção entre répteis ainda não é clara (Doszpoly et al., 2013).

A família *Adenoviridae* está dividida em cinco gêneros, *Aviadenovirus*, *Mastadenovirus*, *Atadenovirus*, *Siadenovirus*, *Ichtadenovirus* (Harrach et al., 2011). *Mastadenovirus* e *Aviadenovirus* foram estabelecidos há algum tempo e são isolados exclusivamente em mamíferos ou aves, respectivamente. O gênero *Ichtadenovirus* foi isolado de um esturjão

branco. Os dois gêneros adicionais consistem em AdVs de origem mista de hospedeiro. Os *Atadenovirus* foram encontrados em répteis, ruminantes e aves; *Siadenovirus* em anfíbios, aves e répteis (Benko et al., 2002; Prado-Irwin et al., 2018). Nos últimos anos, com base na distância filogenética encontrada, a sexta nova linhagem de adenovírus em testudines (*Testadenovirus*) parece merecer a classificação de um novo gênero “*Testuvine-infecting AdV*” (Doszpoly et al., 2013).

A taxonomia sugere uma linhagem co-evolutiva do vírus com seus hospedeiros (Benko et al., 2005). De acordo com essa teoria, cada gênero da família do vírus evoluiu dentro de uma classe diferente de vertebrados. No entanto, descobertas de AdVs em testudines e rãs mostram que é necessário mais investigação para entender completamente as relações evolutivas entre esses vírus e sua capacidade de alternar os hospedeiros (Farkas e Gál 2009). Esses resultados mostram que há informações muito limitadas sobre a biodiversidade de AdVs em répteis e muito mais em tartarugas-marinhas. Embora os vírus possam ter um grande efeito na população de seus hospedeiros, visto que as tartarugas-marinhas são espécies que estão em ameaça de extinção, elas podem ainda colocar em perigo outras espécies por poderem desempenhar um papel na transmissão em grande escala devido serem espécies migratórias, atravessando oceanos e regiões costeiras, transitando entre regiões equatoriais, tropicais e até temperadas (Heithaus, 2013).

Buscando esclarecer o papel dos AdVs na evolução das linhagens existentes em testudines, buscou-se explorar evidências sobre a co-evolução de AdVs em amostras biológicas da espécie *Chelonia mydas* na baía da grande Vitória/ES.

Material e métodos

Coleta de espécimes biológicos

As coletas foram realizadas no Instituto de Pesquisa e Reabilitação de Animais Marinhos (IPRAM) no período de 2017 e 2019. Os animais vivos que chegaram para reabilitação foram submetidos a coleta de *swabs* estéreis da mucosa ocular e cloacal. Os animais mortos e as carcaças encaminhadas ao IPRAM, foram submetidos a necropsia para coleta de fezes diretamente da ampola retal e fragmentos de tecidos (intestino, fígado e baço). Todas as amostras de *swab* recolhidas eram acondicionadas em microtubos com uma solução salina (tampão Tris-Cálcio) para conservação do material genético, os fragmentos de tecidos apenas em microtubos e posteriormente todas as amostras foram congeladas até o momento do processamento em laboratório. Todas as amostras foram mantidas em -20°C.

As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Espírito Santo, Campus São Mateus (CEUNES) para processamento. Posteriormente, a partir das amostras que apresentaram tamanhos esperados (550 pb e 300 pb) para os vírus de interesse nos géis de agarose, as amostras de extração foram cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) e encaminhadas ao Laboratório Dra. Maria Benko do Instituto de Pesquisa Médica Veterinária no Centro de Investigação Agrícola, da Academia de Ciências da Hungria para sequenciamento.

O projeto inscrito com nº D01-2017DR003 apresenta as devidas licenças para execução, já aprovadas, com Sistema de Autorização e informação em biodiversidade nº 53977, 62642-1 e CEUA/UVV nº 425.

Processamento das amostras

Preparo da suspensão

Aproximadamente 200mg de amostra foram diluídas a uma concentração de 20% (g/ml) de 1000 µL tampão Tris-Cálcio(Tris 0,01 M, CaCl₂ 1,5 mM, pH 7,2) com pH 7,2, homogeneizadas em agitador tipo Vortex (Biomixer) e centrifugadas em micro centrífuga refrigerada (Novatecnica) a 3000 rpm por 10 min. Após, para garantir a extração de ácido nucleico, os tecidos foram submetidos a três ciclos de congelamento e descongelamento (De la Torre et al. 2018). Em seguida, as amostras de *swabs* e tecidos foram centrifugadas e o sobrenadante foi coletado. Depois da transferência do sobrenadante de 700 µL, foram mantidas a - 20°C até a extração do ácido nucleico viral (Boom et al., 1990).

Extração de ácido Nucleico

O ácido nucleico foi extraído através do reagente Trizol, seguindo as instruções do fabricante (*Thermo Fisher Scientific*).

Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Reação de PCR seguida por nested-PCR foram feitas para investigar a ocorrência de adenovírus utilizando os pares de iniciadores POL_OUT_RE/POL_OUT_FO(DGC RAA NSH NCC RTA BAR NGM RTT e MGN GGN GGN MGN TGY TAY CC) e POL_IN_RE/POL_IN_FO(CCA NCC BCD RTT RTG NAR NGT RA e GTN TWY GAY ATH TGY GGH ATG TAY GC), gerando fragmento de 550 pb e 300 pb, respectivamente, descritos por Wellehan et al. (2004), com algumas modificações (Davison et al., 2000; Kaján

et al., 2016). O volume final de cada reação de PCR foi de 25µL, contendo 2,5µl de 10x PCR buffer(-Mg), 0,75µl de MgCl₂, 0,5µl de 10 µM dNTP, 0,5µM de cada primer, 0,1µl de Taq DNA polimerase, 2,0µl de amostra e 18,15µl de h₂O MilliQ + Depc. Os ciclos de reação foram executados da seguinte forma: PCR = 5 min a 94° C, seguidos de 44 ciclos de 94° C por 30 s, 58,7° C por 1 min, 72° C por 1 min e 72° C por 5 min. Com o produto de PCR, foi feita a Nested-PCR = 5 min a 94° C, seguidos de 44 ciclos de 94° C por 30 s, 53,6° C por 1 min e 72° C por 1 min, finalizando a 72° C por 5 min. Os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

Sequenciamento

O sequenciamento direto dos produtos amplificados e purificados foram determinados com iniciadores internos apropriados. As sequências foram editadas usando o pacote *Staden* (Staden et al., 2000) avaliadas e comparadas com outras sequências já depositadas no GenBank, usando o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Análise filogenética

Foi gerado alinhamentos no MAFFT v. 7 (Katoh e Toh 2008) com a estratégia L-INS-i. Critérios de inferência bayesiana (BI) que foram usados para análises filogenéticas. Realizou-se análise de BI usando MrBayes 3.2.7 (Huelsenbeck e Ronquist 2001).

Os modelos de evolução molecular foram selecionados usando o Partition Finder 2.1.1 (Lanfear et al. 2012). O modelo de substituição GTR + I + G foi selecionado para o conjunto de dados de sequências de parte do gene da DNA polimerase como o modelo de substituição de nucleotídeo ideal. Para a análise *bayesiana*, foram realizadas 25 milhões de gerações com quatro cadeias de amostragem, amostrando 1000 gerações cada e com duas execuções independentes. Usou-se da sequência de Fago de *Bacillus* - Tectivírus (DNA polimerase) (KF188458.1) como grupo externo para as análises filogenéticas, visto ser o mais provável ancestral de adenovírus (Koonin & Yutin, 2019). As sequências do gene DNA polimerase usadas para as análises estão disponíveis no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Uma matriz de dados para comparar a distribuição pareada dos Adenovírus e os hospedeiros das espécies foi criada, fornecendo estados de caracteres ancestrais sob análise de mapeamento de caracteres estocásticos - SIMMAP (Bollback, 2006) com 1.000 simulações, levando em consideração a incerteza filogenética. Inferindo sobre a filogenia calibrada em tempo real de Adenovírus pela árvore filogenética *bayesiana* (Figura 3). Para análise de sinal

filogenético, usamos a estatística D (Fritz e Purvis, 2010), que é uma medida de sinal filogenético para atributos discretos. A estatística adiciona as diferenças de atributos entre cladogramas irmãos e compara essa soma com aquela gerada pelo movimento browniano. Para permitir a comparação entre as filogenias, essa diferença nas somas é dividida subtraindo-se a soma das diferenças simuladas aleatoriamente em relação à soma pelo movimento browniano. Realizamos todas as análises filogenéticas e as simulações nulas no software R (R Development Core Team, 2019), utilizando os pacotes “*caper*” (Orme et al., 2018) e “*phytools*” (Revell, 2012).

Resultados e discussão

Swabs cloacais e oculares foram coletados em 34 indivíduos mantidos em reabilitação, enquanto amostras de fezes, baço, fígado e intestino foram coletadas de 10 animais mortos recolhidos e enviados ao IPRAM. Informações sobre o possível papel patogênico não puderam ser confirmadas neste estudo. A contaminação alimentar ou o contato oral não podem ser descartados, pois as fezes foram coletadas diretamente da ampola retal dos animais por meio de necropsias.

A presença de genoma de adenovírus foi confirmada em 1/44 pela técnica de PCR visando a região do gene DNA polimerase. A amostra positiva encontrada nas fezes foi testada para o sequenciamento. Amplificou-se com sucesso parte do genoma e o *amplicon* purificado foi sequenciado, gerando uma sequência com comprimento de 299pb (pares de bases).

A sequência de adenovírus encontrada foi avaliada e comparada com as sequências da mesma região da DNA polimerase de adenovírus já publicadas no *GenBank*. Os resultados mostraram que o hit BlastX com a identidade de sequência de aminoácidos mais alta foi a *western box turtle* AdV com 72,06% (JN632574 / E-value: 4e-05, *query coverage*: 46%).

O resultado da análise filogenética (ou seja, inferência *Bayesiana*) é mostrado na Figura 3. O método usado resultou em uma árvore filogenética com altos valores apoiando a monofilia de *Siadenovirus* (probabilidade 78%), *Mastadenovirus* (probabilidade 94%), *Atadenovirus* (probabilidade 96%) e *Aviadenovirus* (probabilidade 87%) (Figura 3). *Chelonia mydas* Adenovirus sp. nov. apresentou altos valores de suporte (probabilidade 87%) alocado no clado *Aviadenovirus*.

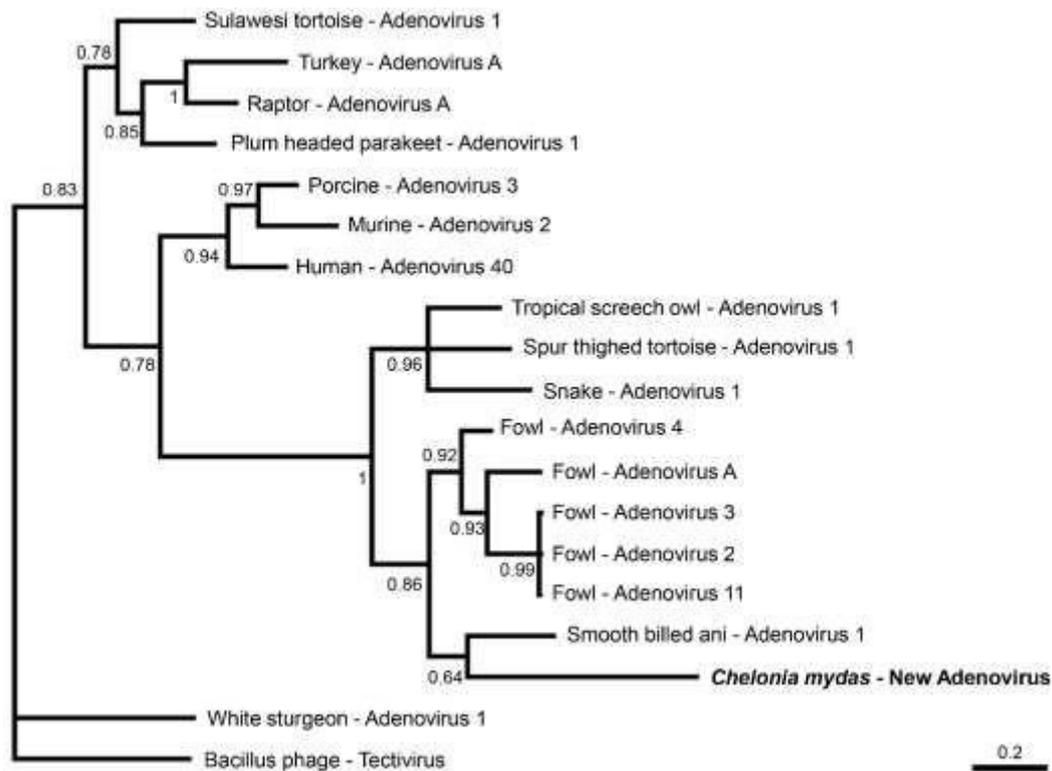


Figura 3: Análise Filogenética de adenovírus encontrado em *Chelonia mydas*.

A árvore é baseada na sequência de aminoácidos derivada de sequências parciais do gene da DNA polimerase, com critérios de inferência bayesiana. As cepas de adenovírus são representadas usando o nome do hospedeiro, número ordinal do sorotipo e do gênero. Números de acesso: *Smooth billed ani*: MN540448.1; *Fowl 11*: KT862812.1; *Fowl 4*: MG856954.1; *Fowl 2*: KT862806.1; *Fowl 3*: KT862807.1; *Fowl A*: MK572875.1; *Sulawesi tortoise 1*: EU056826.1; *White sturgeon*: MK101347.1; *Plum headed parakeet 1*: EU056825.1; *Raptor adenovirus A*: NC_015455.1; *Turkey adenovirus A*: AY849321.1; *Tropical screech owl 1*: MN540447.1; *Spur-thighed tortoise 1*: KT310086.1; *Snake 1*: DQ106414.1; *Bat*: MF404985.1; *Murine 2*: HM049560.1; *Porcine 3*: AF083132.1; *Human 40*: KU162869.1; Fago de *Bacillus Tectivirus*: KF188458.1.

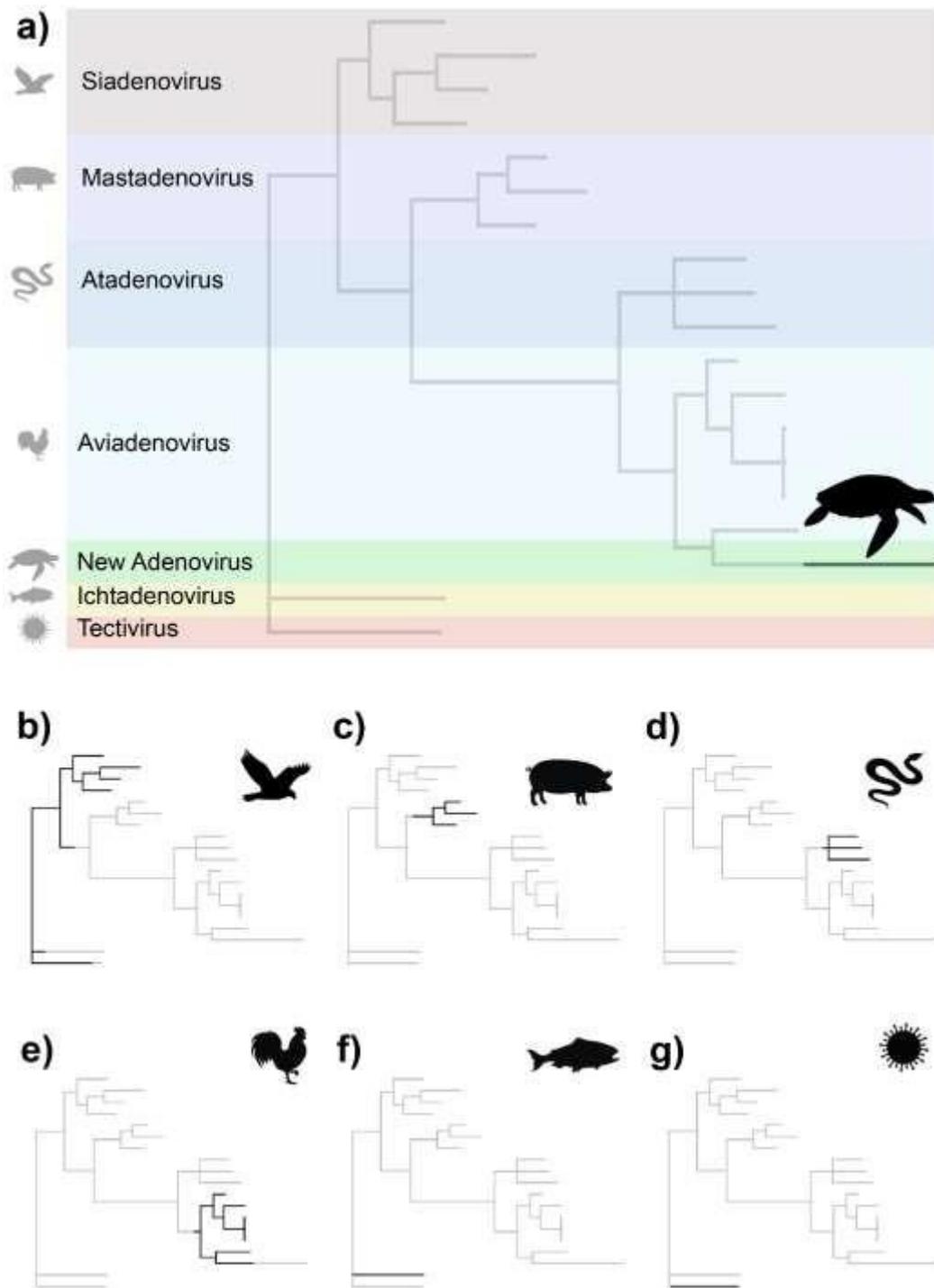


Figura 4. Árvore filogenética obtida da análise *bayesiana* entre adenovírus. As reconstruções de estado ancestral de máxima verossimilhança para 18 espécies hospedeiras por mapeamento de caracteres estocásticos (SIMMAP). (A) *Chelonia mydas* Adenovirus **sp. nov.**, (B) *Siadenovirus*, (C) *Mastadenovirus*, (D) *Atadenovirus*, (E) *Aviadenovirus*, (F) *Ichtyadenovirus*, and (E) *Tetactivirus*.

Tabela 1. Sinal filogenético de evolução de espécies de adenovírus. A estatística D indica a aleatorização dos hospedeiros dentro da filogenia do Adenovírus. Os valores em negrito indicam estrutura filogenética (não aleatória) ou estrutura *browniana* (aleatória).

Espécies de Adenovírus	Estatística D	Estrutura filogenética	Estrutura Brownian
<i>Siadenovirus</i>	-1.77	0	1
<i>Atadenovirus</i>	-2.21	0	1
<i>Mastadenovirus</i>	-1.72	0	0.85
<i>Aviadenovirus</i>	-1.01	0	0.93
<i>Chelonia mydas</i> Adv sp nov.	-2.40	0	0.87

A sequência encontrada, quando comparada com outras sequências no *Genbank* apresenta um nível de divergência maior que 27%, apresentando maior identidade com uma cepa isolada em *Terrapene carolina carolina* (Harrach et al., 2011). Este nível de divergência de sequência sugere que a cepa de vírus encontrada representa nova espécie de AdV, já que o critério de demarcação de espécie primária para AdVs é 10-15% de divergência na sequência de aminoácidos da DNA polimerase (Wellehan et al., 2004). No entanto, uma descrição mais detalhada do vírus é necessária para apoiar essa hipótese, principalmente, mais informações genômicas incluindo a sequência completa da DNA polimerase seriam essenciais.

O padrão observado mostra que embora a sequência se enquadre na linhagem de *Aviadenovirus* (Figura 3), o tamanho de seu ramo é bastante evidente, superando os subtipos de adenovírus de galinha. Esse detalhe esclarece o fato de que a sequência encontrada apresenta maior identidade com uma cepa isolada em testudine (Harrach et al., 2011).

Com base na distância filogenética em relação ao comprimento do ramo da sequência isolada de fezes de tartaruga-marinha disposta entre sequências de adenovírus aviários e sua semelhança com uma cepa de testudine já descrita como um possível novo gênero (Doszpoly et al., 2013), essas evidências apoiam a hipótese da sequência de Adv encontrada neste estudo ser uma nova linhagem de Adv e supõe-se que o novo possível gênero tenha co-evoluído com aves.

Devido à grande variedade de hospedeiros, os AdVs criam um modelo interessante para estudar a coevolução do vírus hospedeiro (Benko & Harrach, 2003). De acordo com a hipótese mais antiga, os cinco grupos reconhecidos de AdVs são representados por cepas, cada uma com suas principais classes de vertebrados. No entanto, o *status* parafilético, como o da classe Reptilia com adenovírus do gênero *Atadenovirus*, apresentou problemas significativos com essa teoria. Um refinamento prevê a possível existência de cepas adicionais de AdV pertencentes a outras ordens reptilianas (Benko & Harrach, 2003) o que evidencia e apoia a hipótese apresentada neste estudo.

Logo, diante de uma possível nova espécie de AdV encontrada em *Chelonia mydas*, a cepa evidencia uma maior capacidade evolutiva e salto do hospedeiro. Isso sugere a capacidade de AdV de aves ter mutado e evoluído para um novo tipo de AdVs que pode acometer tartarugas-marinhas. Assim, esta espécie de Adenovírus pode evoluir para parasitar outras classes de hospedeiros com facilidade. É necessário maior investimento na investigação da sequência encontrada, sequenciando o gene completo da DNA polimerase e / ou outros genes, além de esforços contínuos na pesquisa de AdVs principalmente em animais silvestres para examinar mais claramente a coevolução vírus / hospedeiro e sustentar esta hipótese.

