



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

AMANDA BARBOSA GARCIA

SEQUENCIAMENTO GENÔMICO DO CORONAVÍRUS MHV-3 E
METAGENÔMICA VIRAL EM MORCEGOS: DO SUPORTE ÀS
PESQUISAS SOBRE O SARS-COV-2 A IDENTIFICAÇÃO DE
DIVERSIDADE VIRAL DE IMPORTÂNCIA MÉDICA

CAMPINAS

2024

AMANDA BARBOSA GARCIA

SEQUENCIAMENTO GENÔMICO DO CORONAVÍRUS MHV-3 E
METAGENÔMICA VIRAL EM MORCEGOS: DO SUPORTE ÀS
PESQUISAS SOBRE O SARS-COV-2 A IDENTIFICAÇÃO DE
DIVERSIDADE VIRAL DE IMPORTÂNCIA MÉDICA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Doutora em
Ciências, na área de concentração Clínica Médica.

ORIENTADOR(A): PROFA. DRA. CLARICE WEIS ARNS

COORIENTADOR: DR. RICARDO DURÃES DE
CARVALHO

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
AMANDA BARBOSA GARCIA, E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. CLARICE WEIS ARNS.

CAMPINAS
2024

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

G165s Garcia, Amanda Barbosa, 1995-
Sequenciamento genômico do coronavírus MHV-3 e metagenômica viral em morcegos : do suporte às pesquisas sobre o SARS-COV-2 a identificação de diversidade viral de importância médica / Amanda Barbosa Garcia. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Clarice Weis Arns.

Coorientador: Ricardo Durães de Carvalho.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Bioinformática. 2. Saúde única. 3. Vírus. 4. Epidemiologia. I. Arns, Clarice Weis, 1956-. II. Carvalho, Ricardo Durães de, 1985-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Genomic sequencing of coronavirus MHV-3 and viral metagenomics in bats : from supporting research on SARS-COV-2 to identifying viral diversity of medical importance

Palavras-chave em inglês:

Bioinformatic

One health

Viruses

Epidemiology

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Clarice Weis Arns [Orientador]

Marcelo Lancellotti

Jansen de Araujo

Liana Maria Cardoso Verinaud

Danielle Bruna Leal de Oliveira Durigon

Data de defesa: 23-02-2024

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-4163-2130>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9395298829188940>

*“Ouse, ouse tudo! Seja na vida o que você é,
aconteça o que acontecer.” - Lou Andreas-
Salomé*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Dr. Ricardo Durães de Carvalho e ao Dr. Paulo Vitor Marques Simas, que são partes essenciais deste trabalho, que acreditaram em mim e me acompanharam desde o delineamento do projeto até o último ponto final desta tese. Obrigada por toda a ajuda, os ensinamentos e por serem peças chaves no meu desenvolvimento acadêmico. Fico muito feliz em ter trabalhado com profissionais tão dedicados e ainda mais feliz por poder chamá-los de amigos!

A minha orientadora Dra. Clarice Weis Arns, por ter confiado em mim e ter disponibilizado a melhor estrutura que um aluno poderia ter para trabalhar. Sua dedicação a este laboratório foi extremamente importante na minha formação.

Ao Professor Fábio André Facco Jacomasa e toda a sua equipe, que foram responsáveis pelas coletas do material utilizado neste trabalho, além disto sua dedicação e disponibilidade em me ajudar foram essenciais para a conclusão do mesmo.

Aos meus pais, Rita de Lourdes Barbosa e Edmilson Coelho Garcia, por sempre me apoiarem em tudo o que me propus fazer, mesmo que meu novo sonho me levasse para longe. Fui a primeira da família a ter uma graduação e um título de Mestre, carregar o nome de vocês é o meu maior orgulho!

Aos amigos que fiz durante o doutorado, Ana Paula, Pedro, Gislaine, Alessandra, Thais, Junko, Mayara, por toda a ajuda dentro do laboratório e momentos de alegria fora dele. Obrigada pelos almoços no restaurante universitário, cafés no Laggiu e drinks nos barzinhos, que nossa amizade perdure por toda vida.

Às minhas amigas e companheiras de jornada acadêmica, Maria Eduarda Furquim e Victória Valente, que mais uma vez estiveram ao meu lado, mesmo que metaforicamente. Nossa amizade ultrapassa distancias e sem vocês não seria metade do que sou hoje.

Ao meu grande amigo, presente em todas as minhas fases acadêmicas, Andrei Itajahy, por acreditar em mim, mesmo quando eu duvidei que conseguiria. Por todas as conversas leves e também pela troca profissional que temos. É um prazer dividir meus devaneios acadêmicos e pessoais com você.

Aos amigos que participaram indiretamente desta minha jornada, Juliana, Fabiana, Giulia, Amanda Rosa, Amanda Tonnetto, Thamires, Flávia, Carolina, Gabriela, Murilo, Gustavo. As palavras tem poderes incríveis e foi pelas palavras de vocês que passei por todos os meus momentos de dúvida. Obrigada pelo companheirismo de anos, me considero muito sortuda por ter a amizade de vocês.

Ao amor da minha vida, Felipe Pereira de Matos, companheiro de mais uma fase acadêmica, o primeiro a assistir minhas aulas, a ver minhas apresentações, aquele que busco em todos os momentos. Você disse uma vez “estou nos seus agradecimentos do TCC, nos da dissertação de mestrado e, um dia, estarei na tese de doutorado”, pois bem, cá está você. Não tenho palavras para agradecer o suficiente. Que nossos caminhos sigam unidos por toda essa vida.

A REDE PREVIR, ao CNPq e à CAPES. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

RESUMO

A pandemia de COVID-19 trouxe uma preocupação no que diz respeito aos patógenos que circulam nos animais e que podem ser transmitidos para humanos, nas chamadas doenças emergentes zoonóticas. Os morcegos são animais chave na linha de transmissão de patógenos, pois vivem em proximidade com os seres humanos e são reservatórios de uma grande variedade de microrganismos. Os objetivos deste trabalho foram: disponibilizar o genoma completo do *Betacoronavírus* da Hepatite Murina (MHV-3), considerado modelo de trabalho para estudos envolvendo o SARS-CoV-2; fornecer novas abordagens para os métodos de amplificação de fragmentos genômicos, visando otimizar os protocolos de Metagenômica; Identificar e compreender a diversidade viral de morcegos saudáveis capturados no estado de São Paulo através do Sequenciamento de Nova Geração (NGS). Para o sequenciamento completo do vírus MHV-3 foi utilizado isolado proveniente de cultivo celular. Ensaio de amplificação gene-específicas (PCR) foram realizados para obtenção de fragmentos sobrepostos e posterior Sequenciamento de Sanger. Para a Padronização de Protocolo de Amplificação testes com Primer único e diferentes metodologias de PCR foram realizados, utilizando MHV-3 e SARS-CoV-2 como controle. Para o estudo de diversidade viral em morcegos foram realizadas capturas no município de Rio Claro-SP, obtendo-se 60 suabes retais e orais. Os suabes foram posteriormente agrupados em três pools distintos, usando como critério sua área geográfica. Foi realizada a extração do RNA Viral e enriquecimento das amostras. Em seguida, estas amostras purificadas foram encaminhadas ao Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), para protocolo de NGS por meio da técnica da *Illumina*. As sequências geradas foram filtradas e analisadas em duas plataformas distintas: *Centrifuge* e *Kraken2*. Nos dois *softwares* foram identificados bacteriófagos como Streptococcus phage IPP54; Proteus phage VB_PmiS-Isfahan; Felsduovírus, entre outros. Também foram identificados Retrovírus como o Baboon endogenous virus strain M7 e *Desmodus rotundus* endogenous retrovirus. Os bacteriófagos identificados podem ser de interesse para a comunidade médica, uma vez que, mostram-se uma boa alternativa aos

antimicrobianos, nos tratamentos envolvendo fagoterapia. Os retrovírus identificados possivelmente são Elementos Retrovirais Endógenos, sendo um indicativo de coevolução a longo prazo de morcegos e vírus.

Palavras-chave: bioinformática; saúde única, vírus, epidemiologia

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic has raised concerns regarding pathogens that circulate in animals and that can be transmitted to humans, in so-called emerging zoonotic diseases. Bats are key animals in the pathogen transmission line, as these animals live in close proximity to humans and are reservoirs of a wide variety of microorganisms. The objectives of this work were: to make available the complete genome of the Murine Hepatitis-Betacoronavirus (MHV-3), considered a working model for studies involving SARS-CoV-2; Provide new approaches to genomic fragment amplification methods, aiming to optimize Metagenomics protocols; Identify and understand the viral diversity of healthy bats captured in the state of São Paulo through Next Generation Sequencing (NGS). For the complete sequencing of the MHV-3 virus, an isolate from cell culture was used. Gene-specific amplification (PCR) assays were performed to obtain overlapping fragments and subsequent Sanger Sequencing. For the Standardization of the Amplification Protocol, tests with a single Primer and different PCR methodologies were performed, using MHV-3 and SARS-CoV-2 as controls. To study viral diversity in bats, captures occurred in the city of Rio Claro-SP, obtaining 60 rectal and oral swabs. The Swabs were later grouped into three distinct pools, using their geographic area as a criterion. Viral RNA extraction and sample enrichment were performed. Then, these purified samples were sent to the Central High Performance Technology Laboratory – LaCTAD, for NGS protocol using the Illumina technique. The sequences generated were filtered and analyzed on two different platforms: *Centrifuge* and *Kraken2*. In both softwares, bacteriophages were identified, such as Streptococcus phage IPP54; Proteus phage VB_PmiS-Isfahan; Felsduovirus, among others. Retroviruses such as Baboon endogenous virus strain M7 and *Desmodus rotundus* endogenous retrovirus were also identified. The identified bacteriophages may be of interest to the medical community, as they prove to be a good alternative to antibiotics in treatments involving phage therapy. The identified retroviruses are possibly Endogenous Retroviral Elements, indicative of long-term coevolution of bats and viruses.

Keywords: bioinformatics; One health, virus, epidemiology

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Saúde Única: compreendendo a importância das interações entre humanos, animais e ambientes para a saúde pública.....	12
1.2. Quirópteros – mamíferos que exercem papel chave na emergência e disseminação de agentes zoonóticos.....	13
1.2.1. Os vírus de RNA.....	18
1.2.2. Família <i>Coronaviridae</i>	19
1.2.3. Bacteriófagos.....	22
1.2.4. Elementos Endógenos Virais (EVE).....	24
1.3. Tecnologias utilizadas como estratégias para identificação de diversidade de microrganismos em amostras ambientais.....	25
1.3.1. Metagenômica e Sequenciamento de Nova Geração.....	25
1.3.2. Enriquecimento e pré tratamentos de amostras para NGS.....	27
2. OBJETIVOS.....	29
2.1. Objetivos específicos.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1. Parte 1: Sequenciamento Completo do vírus MHV-3.....	30
3.2. Parte 2: Padronização de Protocolo utilizando Amplificação de iniciador único independente de sequência (SISPA).....	32
3.3. Parte 3: Amostragem de quirópteros capturados no estado de São Paulo	35
3.3.1. Captura de morcegos e colheita de amostras.....	35
3.3.2. Agrupamento dos suabes em pools.....	36
3.3.3. Extração de RNA Viral.....	39
3.3.4. PCR convencional para o gene RdRp – rastreamento direto de Coronavirus.....	39
3.3.5. Tratamento do RNA para NGS.....	40
3.3.6. Sequenciamento de Nova Geração (NGS).....	40
3.3.7. Análises <i>in silico</i>	41
4. RESULTADOS.....	42
4.1. Parte 1: Sequenciamento do genoma Completo do vírus MHV-3.....	42
4.2. Parte 2: Padronização do Protocolo com SISPA primers.....	43
4.3. Parte 3: Amostragem de quirópteros capturados no estado de São Paulo	46
4.3.1. Espécies de quirópteros capturados.....	46
4.3.2. <i>Reads</i> obtidas em cada pool através do NGS.....	47
4.3.3. Análise descritiva da diversidade Viral identificada pelo <i>Centrifuge</i> 51	

4.3.4.	Diversidade Viral identificada pelo <i>Kraken2</i> utilizando banco de dados de genomas virais	52
4.3.5.	Diversidade Viral em cada Pool.....	54
5.	DISCUSSÃO.....	55
5.1.	Genoma Completo do vírus MHV-3	55
5.2.	Protocolo de Amplificação utilizando Primer SISPA (Sequence-independent, single-primer amplification).....	55
5.3.	Diversidade viral identificada nas amostras de morcegos.....	56
6.	CONCLUSÃO.....	59
7.	REFERÊNCIAS	61
8.	APÊNDICES	74
8.1.	Tabela com a concentração (em ng/μL) de cada amostra que compõe o Pool 1 e seu volume final no Pool.....	74
8.2.	Tabela com a concentração (em ng/μL) de cada amostra que compõe o Pool 2 e seu volume final no Pool.....	75
8.3.	Tabela com a concentração (em ng/μL) de cada amostra que compõe o Pool 3 e seu volume final no Pool.....	76
8.4.	Tabela de espécies de vírus e o número de <i>scaffolds</i> na classificação do <i>Kraken2</i> para o Pool 1.	77
8.5.	Tabela de espécies de vírus e o número de <i>scaffolds</i> na classificação do <i>Kraken2</i> para o Pool 2.	77
8.6.	Tabela de espécies de vírus e o número de <i>scaffolds</i> na classificação do <i>Kraken2</i> para o Pool 3.	78
8.7.	Tabela de espécies de vírus contendo ao menos 0,1% de cobertura de genoma segundo o <i>software Centrifuge</i> para o Pool 1.....	79
8.8.	Tabela de espécies de vírus contendo ao menos 0,1% de cobertura de genoma segundo o <i>software Centrifuge</i> para o Pool 2.....	79
8.9.	Tabela de espécies de vírus contendo ao menos 0,1% de cobertura de genoma segundo o <i>software Centrifuge</i> para o Pool 3.....	80
8.10.	Concentração em ng/μL e suas razões de pureza 260/280 e 260/230, mensuradas em Nanodrop (ThermoFisher Scientific) dos controles utilizados na padronização de protocolo de amplificação utilizando Primer SISPA.....	81

1. INTRODUÇÃO

1.1. Saúde Única: compreendendo a importância das interações entre humanos, animais e ambientes para a saúde pública.

A pandemia de COVID-19 trouxe à tona um aumento na preocupação no que diz respeito a doenças emergentes causadas por animais, chamadas de zoonoses. Vários fatores contribuem para o surgimento de zoonoses, entre eles a evolução dos patógenos, o crescimento populacional de animais domésticos, o avanço da população humana no ambiente habitado por animais selvagens, as mudanças climáticas, o desmatamento e a globalização (1). Todos estes fatores mostram que o meio ambiente, os seres humanos e os animais possuem uma estreita relação e, a partir disto, foi criado o conceito de Saúde Única (ou *One Health* em inglês) definido da seguinte forma: uma abordagem integrada e unificadora que visa equilibrar e otimizar de forma sustentável a saúde das pessoas, animais e ecossistemas (2).

Em 2021, quatro parceiros globais, sendo eles a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, a Organização Mundial de Saúde Animal, o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente e a Organização Mundial da Saúde, estabeleceram um painel interdisciplinar de especialistas de alto nível em Saúde Única para aprimorar sua colaboração intersetorial. Este painel recebeu a sigla OHHLEP (*One Health High-Level Expert Panel*). Esta criação representa um reconhecimento da urgência e complexidade em torno da Saúde Única e a intenção de levar este conceito adiante em políticas e ações concretas (2).

A abordagem em Saúde Única envolve muitos setores e comunidades em vários níveis da sociedade. Em trabalho publicado por Adisasmito e colaboradores, juntamente com responsáveis pelo painel OHHLEP, encontram-se as 5 palavras chaves vistas como princípios da Saúde Única: **equidade** entre setores e disciplinas; **paridade** sociopolítica e multicultural e inclusão e engajamento de comunidades e vozes marginalizadas; **equilíbrio** socioecológico que busca um equilíbrio harmonioso entre a interação humano-animal-ambiente; **responsabilidade** dos seres humanos para mudar seu comportamento e adotar soluções sustentáveis

que reconheçam a importância do bem-estar animal e a integridade de todo o ecossistema e **transdisciplinaridade** e colaboração multissetorial (2) (Figura 1).

Alguns animais desempenham papéis-chave na transmissão de zoonoses, entre eles os morcegos, por serem animais que fazem parte do convívio humano, habitando florestas próximas ou até mesmo edificações. Neste contexto a abordagem de Saúde Única se faz necessária, pois a proximidade entre estes animais e os seres humanos acaba sendo um catalizador para a transmissão de doenças. É imprescindível seguir os preceitos recomendados e investir em estudos que nos ajudem a compreender melhor o papel de cada um - animal, humano e ambiente – pois o surgimento de enfermidades que podem ser um problema para a saúde pública está intimamente ligado com como lidamos com o nosso ecossistema.

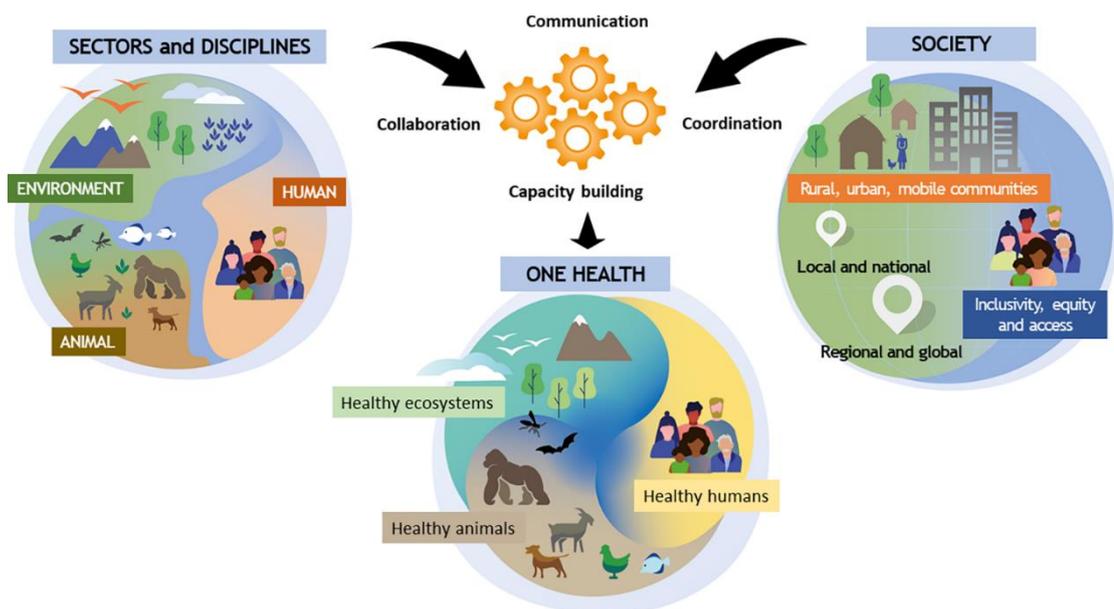


Figura 1. Conceito de Saúde Única em busca de um equilíbrio entre os três pilares (animal, humano e meio ambiente) desenvolvido pelo *One Health High Level Expert Panel* (OHHLEP) por Adasasmitho e colaboradores, 2022 (2).

1.2. Quirópteros – mamíferos que exercem papel chave na emergência e disseminação de agentes zoonóticos

A Ordem *Chiroptera* (*cheir*: mão; *pteron*: asa) pertence a Classe *Mammalia*, e constituem aproximadamente 20% dos mamíferos conhecidos mundialmente, sendo assim o segundo maior grupo de mamíferos (ficando atrás apenas da Ordem *Rodentia*), com mais de 1200 espécies distribuídas em todos os continentes, exceto Antártida (3). Segundo Teling (4), em seu estudo de filogenia molecular de todas as espécies de morcegos existentes, esta ordem é dividida em duas Subordens: *Yinpterochiroptera*, que inclui os *Megachiroptera* e mais outras seis famílias, e *Yangochiroptera*. No Brasil estão aproximadamente 15% da diversidade de quirópteros, com 181 espécies, 68 gêneros e 9 famílias (5). São animais com grande diversidade de espécies, complexidade biológica e grande importância ecológica. Possuem hábitos noturnos e permanecem em grandes colônias, sendo animais gregários, podendo habitar diversos tipos de locais, desde topo das árvores até cavernas e edificações humanas. Apresentam praticamente todos os hábitos alimentares, compreendendo hematofagia, polinivoria, nectarivoria, piscivoria, onivoria, insetivoria, frugivoria e carnivoria, o que remete a grande importância desses animais na dispersão de sementes, polinização e controle de insetos (6).

A família *Phyllostomidae* faz parte da Subordem *Microchiroptera* e possui aproximadamente 150 espécies de morcegos tropicais e sub-tropicais, sendo conhecidos popularmente como “morcegos nariz-de-folha americanos”, por possuírem, em sua maioria, uma folha nasal em forma triangular ou lanceolada, exceto nos morcegos hematófagos, que possuem o nariz em formato de ferradura (Figura 2). Seu tamanho pode variar entre 4,0 a 13,5 cm sem a cauda, que pode estar ausente ou até 5,5 cm de comprimento (7).



Figura 2. Morcego da espécie *Carollia perspicillata*, pertencente à família *Phyllostomidae*, cuja principal característica morfológica é a folha nasal. Arquivo pessoal do Professor Fábio André Facco Jacomasa, responsável pelas coletas.

Esta família desempenha um papel importante em alguns processos biológicos, como a polinização, devido a variedade de hábitos alimentares, tendo animais frugívoros, insetívoros, nectarívoros, hematófagos (8). As espécies desta família são adaptadas a baixas altitudes em regiões tropicais e subtropicais do Novo Mundo, sendo encontradas desde o sudeste dos Estados Unidos até a Argentina (9). No Brasil é a família mais comumente encontrada devido as condições climáticas favoráveis e a grande variedade de alimento em florestas. A família *Phyllostomidae* é dividida em sete subfamílias: *Desmodontinae*, *Glossophaginae*, *Phyllostominae*, *Carollinae*, *Stenodermatinae*, *Phyllonycterinae* e *Brachyphyllinae* e mais de 160 espécies estão agrupadas em 48 gêneros (10).



Figura 3. Distribuição global da família *Phyllostomidae*. Copyright 2012 Charles H. Smith (11).

Cerca de 60% das doenças humanas tem origem em animais (12) sendo transmitidas de animais silvestres e domésticos para a população humana. Por sua vez o papel dos morcegos nesta linha de transmissão se mostra importante, visto que são reservatórios de uma grande variedade de microrganismos, entre eles, vírus, fungos e protozoários, podendo ser transmitidos a outros animais, incluindo os seres humanos, se tornando assim agentes com potencial zoonótico (13; 5). Dentre os microrganismos presentes estão os vírus lyssavirus e hantavírus, bactérias *Leptospira* spp. e *Pasteurella* spp., entre outros, e fungos como o *Pseudogymnoascus destructans* (*White nose syndrome*) (5).

O vírus da raiva (Lyssavirus) é um clássico exemplo de infecção zoonótica. Tendo como hospedeiro original os morcegos, este patógeno, na maioria dos casos, é transmitido à humanos através de animais domésticos, causando uma mortalidade

de até 99% das infecções (12). Outros exemplos são os coronavírus, pertencentes à família *Coronaviridae*, como o CoV-1 – responsável pela Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) publicado por Marra et al. em 2003 (14); o MERS-CoV – doença respiratória grave que surgiu na Arábia Saudita em 2012 (15), o SARS-CoV-2, agente causador da COVID-19 (16) e outros vírus causadores de resfriados comuns no ser humano como o 229E, NL63, OC43 e HKU.

Com um papel importante no ciclo epidemiológico de agentes patogênicos, os morcegos contribuem para a dispersão destes agentes (17). Apesar de não serem, em sua maioria, o transmissor direto do agente patogênico, vários fatores contribuem para que esta ordem tenha sucesso na disseminação de patógenos potencialmente zoonóticos, como exemplos: a capacidade de voar longas distâncias e de se adaptar a diferentes ambientes (18); a proximidade com seres humanos e animais domésticos, devido a perda de seu habitat natural para as edificações; a sua biologia e possível coevolução com diversos patógenos, que proporcionam aos morcegos uma suscetibilidade reduzida a estes agentes, permanecendo assintomáticos (5).

Uma das explicações para a diversidade viral nestes animais se dá pelas respostas do seu sistema imune frente às infecções. Como exemplos, temos que os genes que identificam e reparam o DNA danificado sofrem seleção positiva em espécies do gênero *Myotis* (19) e a presença de vários tipos de interferon em morcegos, como o Tipo I e Tipo III, que possuem papel importante na resposta imune inata para o controle da replicação viral (20). Estes animais também possuem mecanismos para evitar o excesso de indução de genes inflamatórios, que induzem a patologia em outros animais e até em humanos, mas não em morcegos (21). Várias espécies de morcegos controlam a inflamação por meio de uma mutação em uma serina altamente conservada em uma das principais moléculas adaptadoras para detecção de DNA danificado (20). Trabalho de Bittar e colaboradores (22), encontrou *Alphacoronavirus* no intestino, fígado e pulmões de morcegos da área urbana e peri-urbana de São José do Rio Preto, em São Paulo e em Barreiras, na Bahia. Os animais foram capturados durante o seu voo habitual e não apresentavam sintomas de alguma enfermidade, sendo considerados saudáveis no momento da captura.

A seleção positiva que contribuiu para uma melhor tolerância aos danos no DNA e a resposta imune singular dos morcegos frente aos agentes patogênicos,

juntamente com sua capacidade de voo e seu rápido metabolismo deram a esta Ordem um papel chave na disseminação de agentes potencialmente zoonóticos.

1.2.1. Os vírus de RNA

Os vírus são microrganismos que, para sobreviver e se multiplicar, fazem uso da maquinaria anabólica presente no interior das células hospedeiras, fazendo deles parasitas intracelulares obrigatórios. O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (International Committee on Taxonomy of Viruses-ICTV) define uma espécie viral como uma população de vírus com características similares (incluindo morfologia, genes e enzimas) que ocupa um nicho ecológico em particular (23).

O material genético de um vírus pode ser composto de DNA ou RNA, tendo variações entre dupla fita ou fita simples, segundo a classificação de Baltimore (24). Os vírus de RNA (pertencentes às classes III, IV e V da classificação de Baltimore) compartilham um único gene de marca registrada do vírus, RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (25, 26). Estas sequências RdRp são altamente divergentes entre as três classes, no entanto, análises comparativas de milhares de sequências de diversos RdRps e Transcriptases Reversas (RTs) nas classes III, IV e V e das estruturas dessas polimerases demonstram a monofilia dessas enzimas, todas contendo o chamado “domínio de palma” (27).

Os vírus de RNA são responsáveis pela maior proporção de vírus associados a morcegos, e causam mais eventos de transmissão entre espécies e com maior patogenicidade (28). Entre os vírus mais comumente descritos circulando em morcegos estão os coronavírus, rabdovírus, paramixovírus e astrovírus, seguidos por filovírus, picobirnavírus, calicivírus, reovírus e flavivírus (29). Os vírus de RNA têm altas taxas de mutação (até um milhão de vezes mais altas, comparadas com a de seus hospedeiros) e estas taxas estão correlacionadas com maior virulência e capacidade de evolução, características consideradas benéficas para os vírus (30). Somando todos estes fatores: alta taxa de mutação dos vírus RNA, a sua relação estreita com os morcegos ao longo de toda a evolução, a capacidade ímpar de dispersão destes morcegos e também a sua proximidade com outros animais,

incluindo humanos, colocam os vírus de RNA como os mais importantes na área médica e alvo principal de estudos envolvendo o conceito *One Health* (meio ambiente, animais e microrganismos).

1.2.2. Família *Coronaviridae*

Coronavírus (CoVs) é o nome conhecido de um grupo de vírus envelopados de forma esférica e pleomórfica pertencentes a ordem *Nidovirales*, à família *Coronaviridae*, subfamília *Orthocoronavirinae* e são divididos em quatro gêneros: *alpha*, *beta*, *gamma* e *delta*. Estes vírus possuem uma grande variedade de hospedeiros, entre eles aves selvagens e sinantrópicas, morcegos e humanos. Os gêneros *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus* parasitam apenas mamíferos, já os *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus* infectam aves e, em alguns casos, mamíferos específicos (28).

O genoma dos coronavírus é composto por RNA mensageiro (mRNA) de fita simples no sentido positivo com um tamanho aproximado de 25-31 Kb. Possui um número variável de sequências abertas de leitura (*open Reading frames – ORFS*) que codificam proteínas estruturais, sendo elas: glicoproteína de superfície (S ou Spike), membrana (M), Envelope (E), e nucleocapsídeo (N) e também proteínas não estruturais envolvidas no processo de replicação viral (31).

O Complexo de Replicação Viral dos coronavírus contém duas ORFS, sendo elas a 1a e 1b. Dentro da ORF 1b há regiões de codificação conservadas com polimorfismo suficiente para classificação filogenética, como a RNA-polimerase RNA-dependente (RdRp), usada como alvo para diferenciação molecular entre os gêneros de CoVs e no desenvolvimento de ensaios de PCR (*polymerase chain reaction*) para a identificação de novos CoVs (32).

A pandemia de COVID-19 trouxe a necessidade de estudos sobre o novo vírus SARS-Cov-2 e a capacidade de produtos e equipamentos em inativá-lo. Estes estudos foram conduzidos com coronavírus modelo, o Vírus da Hepatite Murina estirpe 3 (MHV-3). Este vírus pertence ao gênero *Betacoronavirus* que causa infecção

em murinos, mas não apresenta perigo ao ser humano. O MHV-3 já foi descrito como vírus modelo ideal (33, 34) e vem sendo utilizado desde 2009, quando o foco ainda era somente no SARS-CoV-1, responsável pela primeira pandemia causada por um Coronavírus, em protocolos onde o objetivo é elucidar a atividade antiviral de equipamentos e produtos, entre eles saneantes, antissépticos, tecidos, tintas, superfícies e outros (33, 35, 36).

Nos últimos anos nossa equipe, no Laboratório de Virologia e Biotecnologia Aplicada (VirBio), contribuiu para a realização de testes antivirais, visando a inativação do SARS-CoV-2. Estas contribuições junto a empresas públicas e privadas resultou em trabalhos submetidos e publicados que contribuiriam para a comunidade científica (37, 38, 39).

Nas Figuras 4 e 5 encontram-se a estrutura morfológica e genômica do SARS-Cov-2 e MHV-3, mostrando as semelhanças entre os dois vírus, por ambos se tratarem de um *Betacoronavirus*.

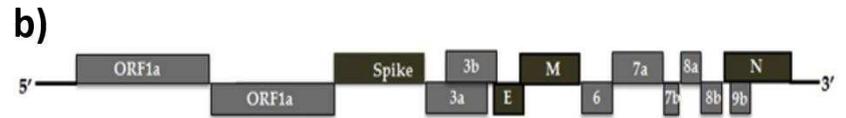
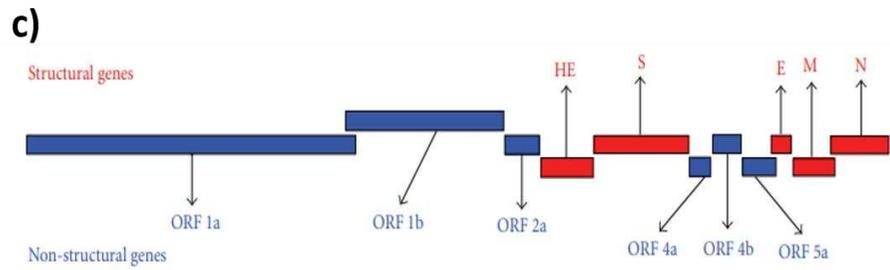
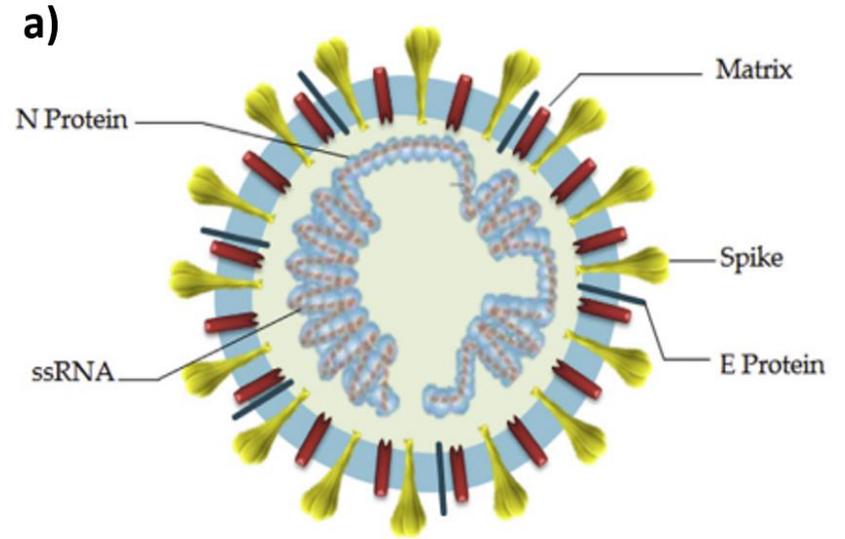
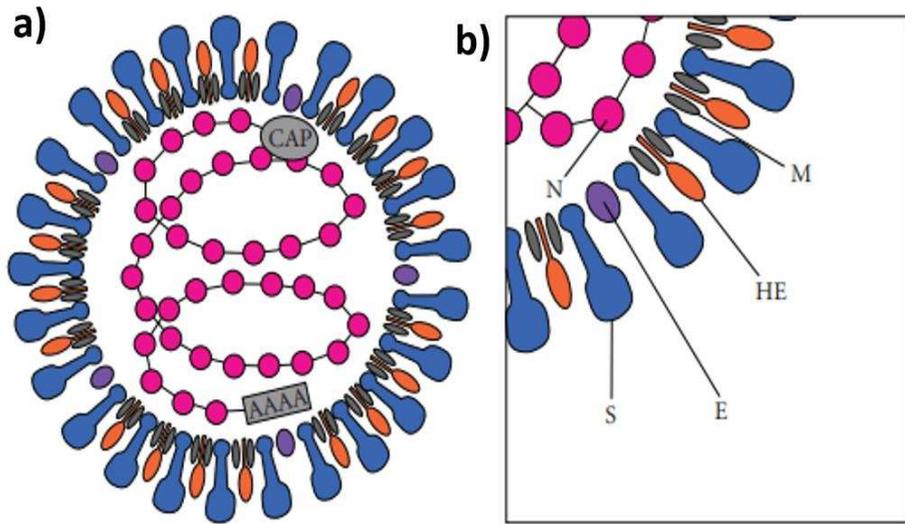


Figura 4. (a) Estrutura do MHV-3, gênero *Betacoronavirus* pertencente à família *Coronaviridae* e agente causador da Hepatite Murina. **(b)** Estruturas proteicas do vírus: nucleocapsídeo (N), envelope (E) e Spike (S) e glicoproteínas (HE e M). **(c)** Organização dos genes no genoma do MHV; os genes estruturais são mostrados em letras vermelhas e os genes não estruturais em letras azuis (40).

Figura 5. (a) Estrutura do SARS-CoV-2, *Betacoronavirus* pertencente à família *Coronaviridae* e agente da COVID-19 e suas proteínas estruturais: N: nucleocapsídeo; S: spike; E: envelope. **(b)** Organização dos genes de SARS-CoV-2, onde as porções em marrom indicam proteínas estruturais (41).

1.2.3. Bacteriófagos

Os bacteriófagos, ou apenas fagos, são vírus que possuem a capacidade de infectar bactérias. Estima-se que existam 10^{31} tipos de fagos no planeta, tendo uma grande diversidade e abundância. São encontrados em praticamente todos os ecossistemas e possuem papéis importantes dependendo do seu habitat. Fagos aquáticos, por exemplo, têm papel importante no ciclo biogeoquímico, no fluxo de carbono através da morte bacteriana, conhecida como derivação (42, 43). Nos seres humanos eles podem ser encontrados no intestino, onde desempenham papéis de moduladores, afetando o metabolismo (44).

Através das ferramentas de Metagenômica é possível descrever uma grande diversidade de fagos. De acordo com o National Center for Biotechnology Information (NCBI), em setembro de 2019, havia 8.437 genomas fagos completos divididos em 12 famílias (com base na classificação ICTV), sendo mais da metade deles membros da família *Siphoviridae* (43). Este número certamente irá crescer exponencialmente nos próximos anos, devido aos avanços das tecnologias de Sequenciamento de Nova Geração e ao crescente interesse científico neste grupo viral, tendo como objetivo a “fagoterapia”, termo usado atualmente na área médica para descrever o tratamento de doenças bacterianas fazendo o uso de bacteriófagos.

A resistência bacteriana causada pelo uso de antibióticos é uma grande preocupação mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) destacou em seu primeiro relatório global sobre resistência a antibióticos o perigo de uma era pós-

antibiótica, onde infecções simples poderiam ser letais (45). Neste contexto, a fagoterapia se mostra promissora como uma alternativa para o uso dos antibióticos, evitando assim o aumento da resistência de bactérias patogênicas.

Os fagos podem ser divididos em virulentos e temperados com base em seu ciclo de vida. Fagos virulentos produzem o ciclo lítico onde o fago se liga ao seu hospedeiro bacteriano, injeta seu genoma, se reproduz, utilizando a maquinaria molecular do hospedeiro e, finalmente, lisa a célula hospedeira, liberando a sua progênie. Já os fagos temperados produzem o ciclo lisogênico, onde o genoma do fago permanece dormente como um pró-fago, replica junto com seu hospedeiro e ocasionalmente entra em um ciclo lítico sob um gatilho específico (46).

Para ser utilizado na fagoterapia é necessário que o fago seja selecionado (levando em consideração a sua especificidade, e eficácia em produzir o ciclo lítico em seu hospedeiro), seja isolado, e sequenciado (47). Os fagos são considerados seguros, com base em sua abundância na natureza e na constante exposição dos seres humanos a eles (45). Apesar disto, é importante a realização de estudos sobre cada fago e o seu papel na fagoterapia, de animais modelo. Os camundongos são animais muito utilizados em estudos envolvendo a fagoterapia. Dentre eles estão os realizados para verificar a eficiência em eliminar a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (48, 49), também aplicado à bactéria *Acinetobacter baumannii* (50, 51), à bactéria *Klebsiella pneumoniae* (52, 53) entre outros patógenos bacterianos causadores de doenças. Kakasis e Panitsa (45) relatam em seu artigo de revisão uma gama de estudos em fase avançada, sendo realizados em pacientes humanos com objetivo de eliminar estas bactérias. Certamente este é um ramo da medicina em ascensão, por isto é de suma importância a compreensão dos fagos existentes ao nosso redor, sendo novas tecnologias moleculares auxiliadoras nesta busca.

As pesquisas envolvendo os bacteriófagos e suas aplicações na biomedicina vem sendo conduzidas por vários grupos científicos. Com o auxílio das ferramentas de bioinformática e de sequenciamento de nova geração, novas aplicações na medicina terapêutica (como na terapia contra o câncer), em diagnósticos, regeneração de tecidos, vacinas, nanodispositivos, e outros, podem ser desenvolvidos (54).

1.2.4. Elementos Endógenos Virais (EVE)

Os elementos endógenos virais (EVE - *Endogenous Viral Elements*) surgem quando os vírus se tornam permanentemente integrados no genoma de uma célula hospedeira, seja por meio de uma etapa obrigatória em seu processo de replicação (como nos retrovírus) ou eventos casuais como interação com retro-elementos celulares ou re-combinação com o DNA genômico do hospedeiro (55). Se os EVEs forem integrados em células germinativas estes pequenos fragmentos virais irão passar através das gerações e constituir o DNA da espécie. Quando se trata da família *Retroviridae*, onde estão inclusos os retrovírus, estes elementos são chamados de ERV - Endogenous Retrovirus. Estes ERVs surgem de infecções virais antigas podem persistir e se acumular nos genomas de seus hospedeiros, constituindo, por exemplo, aproximadamente 8% do genoma em humanos (56), cerca de 10% em camundongos (57) e cerca de 5% em morcegos (58, 59).

Os retrovírus pertencem à Família *Retroviridae* e segundo a classificação de Baltimore (24) fazem parte do grupo VI, cujo material genético é composto por fita simples de RNA (ssRNA-RT) que, através de uma enzima Transcriptase Reversa produz DNA viral que pode ser integrado ao DNA do hospedeiro (60). A família *Retroviridae* possui vírus zoonóticos, entre eles o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e o vírus T-linfotrópico humano (HTLV) (61). Os retrovírus são conhecidos por infectar várias espécies de vertebrados, entre eles os quirópteros, que representam uma grande parte deste grupo de animais (62).

As primeiras descrições de uma associação entre morcegos e retrovírus foram estudos nas décadas de 1970 e 1980 com linhagens celulares provenientes de tecido pulmonar de *Tadarida brasiliensis*, conhecido como “morcego brasileiro de cauda livre” (63). Os estudos envolvendo estas células mostraram a susceptibilidade destas de serem infectadas por retrovírus de diversas espécies de mamíferos, como o vírus endógeno de babuíno (BaEV) (64) e o vírus da leucemia murina, pertencente ao gênero *Gammaretrovirus* (65).

As descrições de Retrovírus só foram possíveis com métodos independentes de culturas, sendo eles a técnica de PCR (reação em cadeia da

polimerase) e de sequenciamento de alto rendimento (61). A primeira descrição de uma sequência retroviral de morcegos ocorreu em 2004 por Baillie e colaboradores (66) que descreveram a presença de ERVs do gênero *Betaretrovirus* em genomas de roedores. Esta sequência se tratava de um *Betaretrovirus* pertencente a espécie de morcego *Carollia perspicillata* (CpERV-b5). Neste mesmo trabalho foram descritos sete novos grupos de *Betaretrovirus* endógenos, nomeados de $\beta 1$ a $\beta 7$, nos genomas de roedores e outros mamíferos.

Com o advento das novas tecnologias de sequenciamento houve um aumento nas descrições de ERVs em morcegos. Desde 2012 análises genômicas e transcriptômicas levaram à identificação de diversos *Gammaretrovirus* e *Betaretrovirus* endógenos em diferentes espécies de morcegos (67, 68, 69). Desde então, sequências retrovirais já foram relatadas em 51 espécies de morcegos (61). Em 2017 houve a descoberta do retrovírus endógeno *Miniopterus* (MINERVa) nos genomas de morcegos da família *Miniopteridae*, sendo o primeiro relato de um *Deltaretrovirus* endógeno em animais (70).

Hayward e Tachedjian (61), em seu trabalho de revisão sobre a associação entre morcegos e retrovírus, mostraram a presença de Retrovírus Endógenos em diferentes famílias de morcegos, entre elas a família *Vespertilionidae*, *Molossidae* e *Phyllostomidae*. Nesta última família foram descritos ERVs dos gêneros *Beta* e *Deltaretrovirus*, em morcegos das espécies *Anoura caudifer*, *Carollia perspicillata* e *Desmodus rotundus*, presentes na América do Sul, Central e do Norte.

1.3. Tecnologias utilizadas como estratégias para identificação de diversidade de microrganismos em amostras ambientais

1.3.1. Metagenômica e Sequenciamento de Nova Geração

O Sequenciamento de Nova Geração (NGS) é uma ferramenta que possibilita o sequenciamento paralelo ou profundo de milhares de fragmentos de DNA simultaneamente e revolucionou a pesquisa genômica (71). O NGS pode ser usado para sequenciar genomas inteiros ou restrito a áreas específicas de interesse, incluindo todos os 22.000 genes codificadores (um exoma inteiro) ou pequenos

números de genes individuais (71) A redução de custos para a utilização desta ferramenta ao longo dos anos possibilitou a aplicação do NGS em organismos não-modelo (72) sendo utilizada, por exemplo, para a detecção de agentes patogênicos *de novo*, ou seja, que não haviam sido descritos anteriormente.

Bolatti e colaboradores (73), em 2022 detectaram 35 sequências de genomas completos de novos vírus em morcegos da Argentina, fazendo uso da ferramenta de NGS *Illumina MiSeq*, o que mostra a importância desta abordagem para a compreensão da diversidade viral presente nos morcegos e a prevenção, através de estudos preliminares, de novas doenças zoonóticas. A tecnologia de NGS combinado com as análises bioinformáticas de metagenômica das sequências nucleotídicas obtidas constituem uma poderosa ferramenta que possibilita a identificação de um grande número de vírus novos emergentes em, praticamente, qualquer amostra ambiental (74, 75).

Não só para descobrir genomas virais podem ser aplicadas estas tecnologias. Também pode-se fazer uso destas para obtenção de diversidade e compreensão de genomas de animais e outros patógenos como bactérias. Tian e colaboradores, obtiveram através do sequenciamento metagenômico de mais de 20 mil amostras de carrapatos, contemporâneos e antigos (com até 60 anos de preservação) na China, genomas mitocondriais completos ou quase completos de 46 espécies, sendo 23 espécies relatadas pela primeira vez. Esses novos dados de genomas mitocondriais expandiram a diversidade de muitos grupos de carrapatos e revelaram cinco espécies enigmáticas. Através da mesma ferramenta metagenômica foram obtidos também sequências de nove espécies de bactérias patogênicas e espécies potencialmente novas dentro do gênero *Borrelia*. Além desta abordagem de NGS prover novas informações sobre a diversidade genética de carrapatos e bactérias patogênicas através da análise do DNA mitocondrial, foi possível explorar a relação evolutiva entre carrapatos e suas bactérias associadas, revelando um padrão de relação de co-divergência de longo prazo entre carrapatos e as bactérias *Rickettsia* e *Coxiella* (76).

Quando se trata de vírus de RNA o protocolo utilizado é o de RNA-Seq, que utiliza o RNA viral como base para a construção de uma biblioteca de DNA complementar, onde estarão presentes milhões de pequenos fragmentos de DNA, que então serão sequenciados. A abordagem de RNA-Seq pode ser utilizada de várias maneiras, Hoque e colaboradores (77) obtiveram através desta abordagem milhões

de *reads* que foram confrontadas com banco de dados virais. O resultado foi uma grande diversidade viral nas amostras de pacientes que eram negativos para a COVID-19. Em contrapartida, as amostras obtidas de pacientes que eram positivos para a doença mostraram a predominância de um gênero viral em específico, o gênero *Betacoronavirus*, gênero do SARS-Cov-2, causador da COVID-19. Através do RNA-Seq, foi possível identificar que há diferenças importantes na diversidade da microbiota respiratória entre pacientes positivos e negativos para COVID-19.

Wiederkehr e colaboradores (78), analisaram amostras fecais de três colônias, de 3 espécies endêmicas distintas de morcegos da Suíça, que foram coletadas ao longo de três anos e analisadas usando sequenciamento de última geração. Esta metodologia seguiu uma linha diferente da que vem sendo feita em outros estudos, onde o foco é definir a diversidade viral de uma determinada espécie em um ponto específico do tempo. Neste trabalho o objetivo foi acompanhar a diversidade viral destas colônias ao longo de um período de tempo. Foram encontradas sequências de 22 famílias diferentes de vírus, das quais 13 são conhecidas por infectar vertebrados. Adicionalmente, em uma colônia de *Vespertilio murinus*, as sequências de um *Betacoronavirus* relacionado ao MERS foram consistentemente detectadas ao longo de três anos consecutivos, o que permitiu investigar a evolução do genoma viral em um hospedeiro reservatório natural (78).

Além disto, através do NGS é possível a identificação de vírus em amostras que anteriormente apresentaram-se negativas em outros métodos moleculares convencionais de identificação de material genético, como a PCR, por exemplo. Simas e colaboradores (79) detectaram, através da plataforma de NGS *Illumina HiSeq 2500*, coronavírus estreitamente relacionado filogeneticamente com o *Porcine Epidemic Diarrhea Virus* (PEDV), em 10 amostras de *Tadarida brasiliensis*, cujo 9 apresentaram-se negativas na reação de PCR convencional para o gene conservado de coronavírus.

1.3.2. Enriquecimento e pré tratamentos de amostras para NGS

Para que as tecnologias de Sequenciamento de Nova Geração nos forneçam bons resultados é imprescindível realizar um bom tratamento das amostras, principalmente quando estas têm origem ambiental, não sendo oriundas de

isolamentos. Algumas tecnologias possuem o passo de amplificação da biblioteca de DNA antes do sequenciamento propriamente dito, como exemplo o NGS realizado pelas tecnologias da Illumina® (80). Outras tecnologias, por sua vez, não necessariamente fazem a amplificação dos fragmentos, como o PacBIO® (81) e o MinION da Nanopore® (82). Por este motivo, trabalhos realizados para a obtenção de sequências em amostras ambientais buscam adicionar passos de amplificação anteriores ao NGS. Chzastek e colaboradores (83) trazem a metodologia de somar estes dois processos, amplificação e sequenciamento, para garantir um enriquecimento dos genomas virais e assim otimizar o diagnóstico nas amostras.

Uma das técnicas utilizadas para esta amplificação é a dos Primers SISPA (Sequence-independent, single-primer amplification) que, traduzido para o português, significa Amplificação Independente de Sequência com Iniciador Único, ou seja, um primer que se liga em uma determinada sequência de nucleotídeos e a partir disto há a amplificação logarítmica de sequências. Essas sequências amplificadas terão sempre o mesmo início, onde o primer se anela, mas terão tamanhos moleculares diferentes, amplificando assim vários fragmentos distintos do genoma. Esta técnica vem sendo desenvolvida desde 1991, sendo o primeiro trabalho de Reynolds e Kim (84).

Juntamente à técnica de Primer SISPA também existe a abordagem *Touchdown*, que consiste em uma corrida em termociclador com o objetivo de produzir bandas distintas e específicas de um genoma. A PCR *Touchdown* emprega uma temperatura de anelamento superior (5-10°C) à temperatura de *melting* (T_m) do primer nos ciclos iniciais, então sofre uma redução progressiva de 1º ou 2º C por ciclo ou a cada dois ciclos. Essa redução se dá até alcançar a temperatura ideal do primer, a qual é mantida até o término do programa. A utilização de temperaturas de anelamento mais elevadas nos ciclos iniciais proporciona um aumento na especificidade da reação, entre o primer e a sequência, sem prejudicar o rendimento do produto amplificado (85).

A soma de todas estas abordagens, Primer SISPA, PCR *Touchdown*, juntamente com um bom tratamento das amostras ambientais, fazendo-se uso de DNases e RNases, filtragem do conteúdo coletado, entre outros procedimentos, podem garantir um melhor resultado no NGS e classificações mais fidedignas.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve três objetivos gerais:

- 1º) Disponibilizar o genoma completo do vírus da Hepatite Murina estirpe 3 (MHV-3), um Coronavírus, gênero *Betacoronavirus*, para ser utilizado como modelo de trabalho para o SARS-CoV-2;
- 2º) Fornecer novas abordagens no que diz respeito ao método de amplificação de fragmentos genômicos utilizando Primer Independente de Sequência;
- 3º) Identificar agentes virais, utilizando a técnica de Metagenômica (Sequenciamento de Nova Geração) de suabes orais e retais colhidos de morcegos de diferentes espécies, assintomáticos, de áreas próximas a Universidade Estadual Paulista (UNESP), na cidade de Rio Claro-SP.

2.1. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Montagem do genoma completo do vírus da Hepatite Murina estirpe 3 (MHV-3) através de PCR convencional e Sequenciamento de Sanger;
- Padronização de Protocolo de PCR convencional utilizando Primers SISPA;
- Estimar a diversidade e a abundância dos agentes virais identificados;
- Analisar a diversidade viral existente em cada microárea, levando em conta a sua localização;
- Busca por agentes de importância para a Saúde Única.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Parte 1: Sequenciamento Completo do vírus MHV-3

O vírus da hepatite murina (MHV-3) foi cultivado em garrafas de células da linhagem L-929, linhagem de células de fibroblastos de camundongo (ATCC CCL-1) no Laboratório de Virologia e Biotecnologia Aplicada (VirBio) do Instituto de Biologia da Unicamp. Em seguida foi realizada a extração do RNA viral a partir do sobrenadante do cultivo (proveniente de centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos) utilizando o kit *QiAMP RNA viral Minikit* (Qiagen®). O RNA extraído passou pelo protocolo de Transcrição Reversa, para a obtenção do DNA complementar, utilizando o *High Capacity cDNA reverse transcription kit* (Applied Biosystems®), de acordo com as recomendações do fabricante. Para sequenciar todo o genoma viral, que possui aproximadamente 36 mil pares de bases, foram desenhados primers alvo específicos para 36 regiões distintas do genoma, gerando fragmentos de 1000 pb. O desenho dos primers foi feito através da ferramenta Primal Scheme (86), baseado no genoma publicado por Spiro e colaboradores (87) objetivando produzir amplicons sobrepostos (técnica de *overlapping*). Os primers então foram utilizados em 36 PCRs alvo-específicas, que produziram amplicons que foram purificados com o *ExoSAP-IT Express PCR product cleanup reagent*. Em seguida, as amostras purificadas foram enviadas para Sequenciamento de Sanger no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), na Unicamp. Após a chegada dos resultados de sequenciamento foi feita a montagem do genoma através de sobreposições entre os fragmentos. As sequências dos 36 pares de primers desenhados se encontra na Tabela 1.

Tabela 1. Primers usados para o sequenciamento completo do genoma do vírus MHV-3. Cada fragmento gerado continha 1000pb.

Primer ID	Sequência	Tamanho (pb)
MHV-3_1_LEFT	ACTTTATAAACGGCACTTCCTGC	23
MHV-3_1_RIGHT	GCCACACAGGGAATAACTCCTT	22
MHV-3_2_LEFT	GCTATCGCGGTGTTAATCCCAT	22
MHV-3_2_RIGHT	GCGGGGCACTAAACCATCTAAT	22
MHV-3_3_LEFT	AATAGGGGCGACTACAGTCTCC	22
MHV-3_3_RIGHT	AAACTCTGAACACGCCTTCGAA	22
MHV-3_4_LEFT	TCAATGCTGGAGGTTTCCTTGC	22
MHV-3_4_RIGHT	TAATTGACTTGGGCACGCTCTT	22
MHV-3_5_LEFT	GCTGGCTGCGTTCTACTTTGAT	22
MHV-3_5_RIGHT	ACATTCTTTGTCACAACACCAAGT	24
MHV-3_6_LEFT	ACTTTTAGAACGTGCCTATCAGCA	24
MHV-3_6_RIGHT	GACACAAACCTTAGTGGCTTGC	22
MHV-3_7_LEFT	AAGCAGGCGAATAACAATTGCT	22
MHV-3_7_RIGHT	CTCAAAGATGCATCACCATGGC	22
MHV-3_8_LEFT	TTACAGAATGGCCAGCAGCTAC	22
MHV-3_8_RIGHT	TTCTATAGCCCACATCCGATGC	22
MHV-3_9_LEFT	TCTGCCTAATATTGGATTCTTCCCT	25
MHV-3_9_RIGHT	TCCACCATCAGCATCGGTCTAT	22
MHV-3_10_LEFT	GTGTGCCTGAAACCCATGTAGT	22
MHV-3_10_RIGHT	TAACAGCAACCACAACAGGACA	22
MHV-3_11_LEFT	TAATGGTGTGCTACGGGATGTG	22
MHV-3_11_RIGHT	GTTTGAAACAACGACTGCTGCA	22
MHV-3_12_LEFT	CAACCCTTATTTCCCATCGGAGA	24
MHV-3_12_RIGHT	CGGTGTGACAACCAGTACTCAA	22
MHV-3_13_LEFT	CCCAAGGAGCCTTCCATGTTAC	22
MHV-3_13_RIGHT	AGTACCACATAGACACCAGGCT	22
MHV-3_14_LEFT	GGTGTGCTGTTGCTAGTTGCTA	22
MHV-3_14_RIGHT	ATACGTTGAGCTTACGTGCAA	22
MHV-3_15_LEFT	AGGCTAGTGGCTCTGCTAATCA	22
MHV-3_15_RIGHT	CAATTAGTGACAGGAGCGCCAC	22
MHV-3_16_LEFT	ATCGTCGACGGTAAGATTGCAG	22
MHV-3_16_RIGHT	CAGTGTTAAGCAGGGCCCTATT	22
MHV-3_17_LEFT	CCTATGCTGAGTGTGAAGAGTCC	23
MHV-3_17_RIGHT	ACACCCACCCTCATAGATCTCA	22
MHV-3_18_LEFT	AGGATGGTAATGCTGCTATTACTGA	25
MHV-3_18_RIGHT	CCTTGACGCGAACTCTGAATT	22
MHV-3_19_LEFT	TGACCCCGCATTTGTTAGTGAG	22
MHV-3_19_RIGHT	ACAATTTAAGGCGCTCGGTACA	22
MHV-3_20_LEFT	ACAATCTTGTACTGGTTCGCCC	22
MHV-3_20_RIGHT	GTTCTTTATTCAGCAGCACACG	23
MHV-3_21_LEFT	CCCGAGTTGGTACTGACATTA	22
MHV-3_21_RIGHT	CCCAATGCTATCACGTATCGCA	22

MHV-3_22_LEFT	GCTTGACTTGACCCTTGATGGT	22
MHV-3_22_RIGHT	CGTGTCGAACCTACACAACT	22
MHV-3_23_LEFT	ATGATGCCTCGCCTGTTGTAA	22
MHV-3_23_RIGHT	ACAACTACGCCATTTAGCTCGG	22
MHV-3_24_LEFT	TGATGGTCGTGATAATGGTGCT	22
MHV-3_24_RIGHT	CCTTATCTGACCCTGCACCAAG	22
MHV-3_25_LEFT	CTCTGGAATTATGGCAAGCCGA	22
MHV-3_25_RIGHT	TCCACCTGTTTGTATTGTTCTGCT	24
MHV-3_26_LEFT	TCCATTGGCCCAATTTAGTGGC	22
MHV-3_26_RIGHT	ACCTGAATGGCACAACCTTTGG	22
MHV-3_27_LEFT	TGATGACTGGTTCCTCTTTGGC	22
MHV-3_27_RIGHT	CGTGCAAGGAAATACACTGCAC	22
MHV-3_28_LEFT	TGTCAGCCGCCATATTGTTTCT	22
MHV-3_28_RIGHT	ACGCATAAAAAGTACCACCCTGT	23
MHV-3_29_LEFT	GCTTTTGGCACACAGATGTCAA	22
MHV-3_29_RIGHT	CTCCTAGAACATTCCCGATGCG	22
MHV-3_30_LEFT	TGCCTATGCCAGCAATGTTTT	22
MHV-3_30_RIGHT	CCATCAATGGCTTGAACACTATCA	24
MHV-3_31_LEFT	GGTGCTGGACTATGCGTTGATT	22
MHV-3_31_RIGHT	AGAAGCACTAATAGCGCCAAAC	22
MHV-3_32_LEFT	TGGGTTTCGATGCAACCAATTCT	22
MHV-3_32_RIGHT	ATCCTGGTGTCTCCATACTCA	22
MHV-3_33_LEFT	GGCCTTGGTACATTTGGTTGCT	22
MHV-3_33_RIGHT	TTTCGAGCAACAAGGCCCTAAA	22
MHV-3_34_LEFT	CGAAAAATCAGGCCACCCAAAA	22
MHV-3_34_RIGHT	AAAACCGCTAACACCGTCTACC	22
MHV-3_35_LEFT	GTGGCCACCTCTATATGCAAGG	22
MHV-3_35_RIGHT	GACTTCTTTGGCGCTTTGCTTT	22
MHV-3_36_LEFT	CGTGGGCCAAATAATCGCTCTA	22
MHV-3_36_RIGHT	GGGCATTGCAGGAATAGTACCC	22

3.2. Parte 2: Padronização de Protocolo utilizando Amplificação de iniciador único independente de sequência (SISPA)

Com o objetivo de otimizar as amostras de RNA extraído para o protocolo de Metagenômica, foi desenvolvido um protocolo utilizando primers SISPA. Foram utilizados para esta padronização uma amostra contendo isolado de MHV-3 e uma amostra positiva para SARS-CoV-2, proveniente de paciente positivo para COVID-19. O protocolo de Schirtzinger, de 2015 (88), foi utilizado como base. Ele se inicia

realizando o tratamento das amostras com a *Baseline ZERO DNase* (Lucigen®), seguindo as recomendações do fabricante.

Após o tratamento com DNase do RNA extraído as amostras foram purificadas com *AMPure XP Beads*. Em seguida foi realizada reação para obter a primeira fita de cDNA, utilizando o *Superscript III First Strand Synthesis System* (Life Technologies®). O mix da reação continha 1 µL do Primer FR20RV-12N (100 µM) (GCCGGAGCTCTGCAGATATC>NNNNN), 1 µL de dNTP (10 mM), 8 µL do RNA extraído. A corrida em termociclador foi de 65 °C por 5 min. O segundo passo para a transcrição reversa foi adicionar um MasterMix final ao tubo. Este MasterMix continha: 2µL de 10X RT buffer, 4 µL de MgCl₂ (25mM), 2 µL de DTT (0.1M), 1 µL de RNase Out (40 U/µl) e 1 µL de Superscript III RT enzyme, totalizando volume final no tubo de 20 µL. A corrida em termociclador foi de 25 °C por 10 minutos, 50 °C por 50 minutos e 95 °C por 5 minutos. Por último, foi adicionado 1 µL de RNase H ao tubo, na temperatura de 37 °C por 20 minutos.

Para a obtenção da segunda fita do cDNA foram adicionados 5 µL de 5X *Sequenase buffer* e 0,3 µL de *Sequenase enzyme*. Em termociclador os ciclos realizados foram: 4 °C por 2 min, 10 °C por 2 min, 15 °C por 2 min, 20 °C por 2 min, 25 °C por 2 min, 30 °C por 2 min, 35 °C por 2 min, 37 °C por 30 min. Ao final do protocolo de transcrição reversa uma nova purificação com *AMPure XP Beads* foi realizada.

Em seguida, testes de Amplificação utilizando o primer SISPA FR20RV (GCCGGAGCTCTGCAGATATC) foram realizados buscando a obtenção de bandas de tamanhos moleculares distintos. O primeiro teste de amplificação foi realizado utilizando o protocolo original de E. Schirtzinger (88), que consistia em um Mix de reagentes sem Cloreto de Magnésio (MgCl₂) e termociclagem com desnaturação inicial de 95 °C por 2 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 1 minuto e 72 °C por 90 segundos, e extensão final de 72 °C por 5 minutos.

O segundo teste consistiu em um aumento no intervalo de desnaturação inicial das fitas, de 2 minutos para 10 minutos, seguindo o protocolo de Rosseel et al. (89). Adicionalmente foi realizado um teste de anelamento do primer SISPA FR20RV com as seguintes temperaturas: 48 °C, 54 °C, 60 °C e 65 °C. Foi incluído ao mix da

reação o Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$) a 2mM, visto que este reagente funciona como um co-fator para a ação da enzima Taq Polimerase, aumentando a eficiência desta.

O terceiro teste consistiu em uma corrida em termociclador seguindo a abordagem de *Touchdown*, que consistiu em desnaturação inicial de 10 min, 15 ciclos onde a temperatura de anelamento foi reduzida 1 °C por ciclo, de 65°C até os 50 °C, e posteriormente 35 ciclos com temperatura de anelamento a 65 °C.

Todos os testes foram realizados com dois volumes de cDNA amostral no Mix da Reação, sendo de 2,5 µL e 5,0 µL, para observar se o volume de material genético poderia gerar bandas de intensidades diferentes. Os produtos destas PCRs foram submetidos à corrida em gel de agarose 1,5%, com brometo de etídio (10 mg/mL), a 400 mA, 120V por 50 minutos. A visualização das bandas geradas pelas reações no termociclador foi feita através do equipamento *GelDoc Go Gel Imaging System* (Bio-Rad®).

Na Tabela 2 encontram-se os protocolos de Mix e Termociclagem utilizados em cada um dos testes.

Tabela 2. Protocolos utilizados para a padronização da reação com SISPA primers

	Mix da Reação de PCR	Termociclador	Protocolo
Teste 1	Água: 37 µL; 10x Tampão de Reação: 5µL; dNTP (2,5 mM): 4 µL; Primer FR20RV (10uM): 1 µL rTaq DNA Polimerase: 0,5 µL	95°C 2 min 40 ciclos de 95°C 30 seg 60°C 60 seg 72°C 90 seg 72°C 5 min	Sample Prep - Metagenomics Hause SOP by E. Schirtzinger (87)
Teste 2	Água: 32,5 uL; 10x Tampão de Reação: 5 µL; dNTP (2,5 mM): 4 µL; Primer FR20RV (10uM): 1 µL; MgCl2 (2mM): 2 µL; rTaq DNA Polimerase 0,5 µL	95°C 10 min 40 ciclos de 95°C 1 min Teste de gradiente (48, 54, 60 e 65°C) por 2 min 72°C 2 min 72°C 10 min	Rosseel et al., 2011 (89)
Teste 3	Água: 32,5 µL; 10x Tampão de Reação: 5 µL; dNTP (2,5 mM): 4 µL; Primer FR20RV (10uM): 1 µL; MgCl2 (2mM): 2 µL; rTaq DNA Polimerase 0,5 µL	95 °C 10 min; 15 ciclos de 96 °C por 5 seg, 65 °C por 8 seg (-1 °C /ciclo) e 72 °C por 15 seg; 35 ciclos de 96 °C por 5 seg, 65 °C por 8 seg e 72 °C por 15 seg. Término com 72 °C por 10 min	Abordagem Touchdown (85)

3.3. Parte 3: Amostragem de quirópteros capturados no estado de São Paulo

3.3.1. Captura de morcegos e colheita de amostras

As capturas dos morcegos ocorreram no município de Rio Claro, SP, no campus da Universidade Estadual Paulista, área periurbana (47°32'40"O, 22°23'47"S), com licença do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - Ibama n. 32486-4 e na Floresta Estadual Edmundo Navarro de Andrade, área rural (47°31'30"O, 22°24'53"S), com licença do Ibama n. 40681-2 pelo Biólogo Fábio André Facco Jacomassa, no período de maio de 2014 a abril de 2015.

Foram utilizadas redes de neblina de diferentes tamanhos (12 × 2,5 m, 9 × 2,5 m, 6 × 2,5 m e 3 × 2,5 m), adequando-se às situações (áreas abertas ou interior de edificações) em média a 0,2 m do chão, bem como diferentes esforços amostrais (estes foram por demanda e ocasionais) (**Figura 6**). Estas foram abertas no entardecer e fechadas cerca de quatro horas depois, sendo revisadas a cada hora, independentemente do tempo utilizado para realizar a revisão anterior. Quando pertinente, nos abrigos, os morcegos foram capturados também com uso de puçás. Após a remoção das redes ou dos puçás os animais foram mantidos em sacos de algodão numerados até serem triados. Nas triagens além de identificados de acordo com Gardner (90), receberam um anel metálico numerado no antebraço e tiveram suas informações morfométricas e biológicas (sexo, idade e estado reprodutivo) anotadas, finalizando com coleta de amostras de suabes traqueais e retais antes de serem liberados. Foram coletados cerca de 60 suabes orotraqueais e retais, que foram transportados em gelo até o Laboratório de Virologia e Biotecnologia Aplicada (VirBio), no Departamento de Genética, Evolução Microbiologia e Imunologia, do Instituto de Biologia, Unicamp e armazenados em meio MEM a -80 °C.



Figura 6. Morcego da família *Phyllostomidae* preso à rede de neblina. Arquivo pessoal do Professor Fábio André Facco Jacomasa.

3.3.2. Agrupamento dos suabes em pools

As coletas foram realizadas em diferentes áreas da região periférica à Universidade Estadual Paulista (UNESP) na cidade de Rio Claro-SP. Estes suabes foram posteriormente agrupados em três pools distintos, usando como critério sua área geográfica. O primeiro pool agrupa os suabes coletados em áreas mais urbanizadas e próxima a edificações. O segundo pool consiste nos suabes coletados em áreas próximas ao Horto da UNESP e a um lago. O terceiro pool agrupa os suabes coletados em áreas mais afastadas das edificações e urbanização, próximas somente a uma trilha de terra. O **Quadro 1** mostra a classificação dos pools e as coordenadas de cada área e a **Figura 7** indica a localização geográfica de cada pool.

Quadro 1. Agrupamento das áreas de coleta em pools e suas coordenadas.

	LOCAL	COORDENADAS
Pool 1	Demac/Unesp	22° 23' 32.93" S, 47° 32' 36.20" W
	Próximo a Torre	22° 23' 58.16" S, 47° 31' 49.82" W
Pool 2	Ponto 2 – Horto	22° 25' 02.07" S, 47° 31' 21.58" W
	Ponto 3 – Horto	22° 25' 02.22" S, 47° 31' 11.90" W
	Casa do Lago – Horto	22° 24' 43.26" S, 47° 31' 29.30" W
	Trilha da Coleção	22° 24' 32.57" S, 47° 31' 21.81" W
	Figueira	22° 24' 53.24" S, 47° 31' 17.35" W
Pool 3	Trilha da Jaguatirica	22° 25' 0.73" S, 47° 30' 28.06" W
	Trilha dos 9 Km	22° 24' 19" S, 47° 30' 37" W



Figura 7. Localização de cada área de coleta e seu agrupamento em pools. Cidade de Rio Claro, estado de São Paulo, Brasil. Mapa a partir do *software Google Earth*.

3.3.3. Extração de RNA Viral

Foi realizada a extração individual do RNA Viral dos suabes anteriormente armazenados em $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando o *QIAmp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen®, USA), conforme as instruções do fabricante.

Após a extração mediu-se a concentração individual das amostras (ng/ μL) e seu grau de pureza através das relações 260/280 e 260/230 utilizando o equipamento Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific®). Foram feitos três pools equimolares das amostras, o Pool 1 contendo 11 amostras, o Pool 2 contendo 26 e o Pool 3 contendo 23 amostras.

3.3.4. PCR convencional para o gene RdRp – rastreamento direto de Coronavirus

Foram utilizados 10 μL do RNA extraído de cada amostra com a finalidade de se obter DNA complementar para uma reação de Nested-PCR, segundo o protocolo de Chu et al. (91) tendo como alvo o gene RdRp, presente em todos os vírus

da família *Coronaviridae*. O protocolo de cDNA foi realizado utilizando o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems®) conforme recomendações do fabricante. Para a visualização das bandas, os amplicons de PCR foram submetidos à corrida em gel de agarose 1,5%, 100V, 440mA por 40 minutos com intercalante de DNA Brometo de Etídeo (10 mg/mL) através do equipamento *GelDoc Go Gel Imaging System* (Bio-Rad®).

3.3.5. Tratamento do RNA para NGS

Após a extração do RNA Viral foi realizado um tratamento com *DNase Baseline Zero* (Lucigen Biosearch Technologies®, USA) em cada um dos pools. Para o Pool 1 a reação teve volume final de 200 µL, sendo 74 µL de RNA da amostra, solução tampão 10X *Baseline ZERO™ DNase Reaction Buffer* (100 mM Tris HCl (pH 7.5), 25 mM MgCl₂, e 5 mM CaCl₂) e 1 MBU de Baseline-ZERO DNase. No Pool 2 foram utilizados 184 µL da amostra e os mesmos reagentes, totalizando 300 µL. No Pool 3 foram utilizados 128 µL da amostra, os mesmos reagentes, num volume total de 300 µL. Após a homogeneização, a reação foi incubada a 37 °C por 30 minutos. Em seguida uma solução de parada (*DNase Stop Solution*: 30 mM EDTA) foi adicionada e os tubos foram incubados a 65 °C por 10 minutos. Após a realização do tratamento utilizando DNase foi feita uma purificação dos Pools utilizando-se a *Agencourt AMPure XP beads* (Beckman Coulter Life Sciences®, USA), seguindo as recomendações do fabricante.

3.3.6. Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

As amostras, após tratamento com DNase, foram encaminhadas ao Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD) (UNICAMP) para avaliação de integridade do RNA utilizando-se o equipamento *BioAnalyzer* modelo 2100 da marca Agilent®. Após esta avaliação realizou-se o procedimento de sequenciamento RNA-Seq em *HiSeq 2500 Sequencing System – Illumina®*. Foi preparada uma biblioteca de RNA, conforme instruções do fabricante (Illumina®) e posteriormente realizada a corrida *paired-end 2x100pb* em 1 *lane*.

3.3.7. Análises *in silico*

As sequências geradas foram analisadas em duas plataformas distintas. A primeira plataforma utilizada foi o servidor *online Galaxy*, que disponibiliza diversos programas para tratamento de *reads* e montagem de genomas, de forma rápida e gratuita. As *reads* de cada pool foram filtradas de acordo com a qualidade do sequenciamento, baseando-se na escala *Phred*, e seus adaptadores foram retirados utilizando *software Trimmomatic* (92). Essas etapas foram monitoradas por meio do *software FastQC* (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). A montagem *denovo* da biblioteca de RNA foi realizada utilizando o programa *MetaSPAdes* (93). Os *outputs* dessa análise foram arquivos em *contigs* e *scaffolds*. As *scaffolds* resultantes de cada montagem foram utilizadas como *input* no programa *Kraken2* (94) que realiza a classificação taxonômica com abordagem baseada em *k-mer* para classificar as leituras comparando-as com um banco de dados de referência de genomas e sequências microbianas. O banco de dados utilizado para a comparação foi o “Prebuilt RefSeq indexes: Viral (Versão de 2022)”. As *k-mers* são subsequências de comprimento *k*. Cada programa divide as sequências de entrada em *k-mers* e, em seguida, procura por correspondências no banco de dados. Com base nessas correspondências, o *Kraken2* atribui identificações taxonômicas às sequências de entrada. Cada banco de dados do *Kraken2* divide as *k-mers* de uma forma, em um comprimento distinto. A versão “Prebuilt indexes Viral” do *Kraken2* utiliza *k-mers* de tamanho 35.

A segunda plataforma utilizada para análise das *reads* foi o servidor online *Genome Detective* que possui um banco de dados viral para comparação utilizando o *software Centrifuge* (95). O *Centrifuge* também é baseado em *k-mers* e faz a classificação taxonômica das *reads* em poucos minutos.

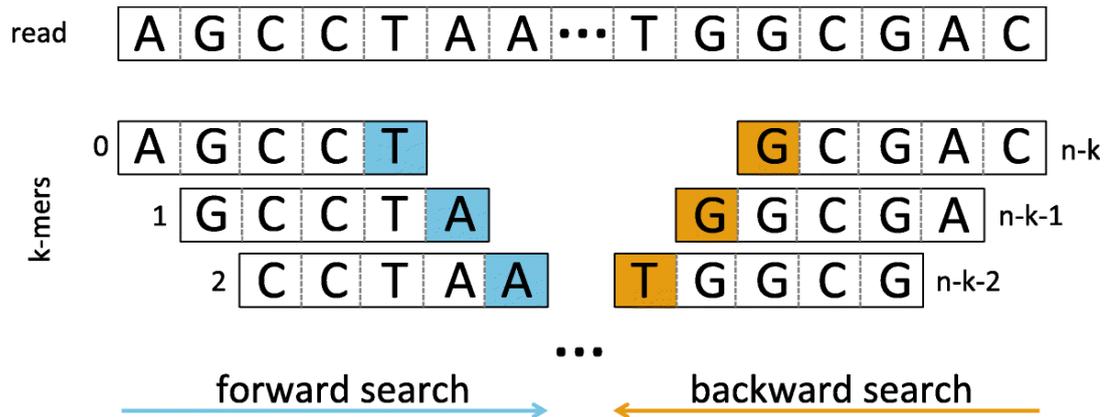


Figura 8: Ilustração da divisão das *reads* provenientes do NGS em subsequências de tamanho K (*k-mers*) por Zhao et al. (96).

4. RESULTADOS

4.1. Parte 1: Sequenciamento do genoma Completo do vírus MHV-3

O sequenciamento do genoma completo do vírus da hepatite murina estirpe 3 (MHV-3) foi realizado e o produto deste trabalho encontra-se depositado no *GenBank* com número de acesso MW620427.1. Um dos géis de agarose feitos para visualização dos fragmentos de 1000 pb gerados pelos primers desenhados se encontra na Figura 9.

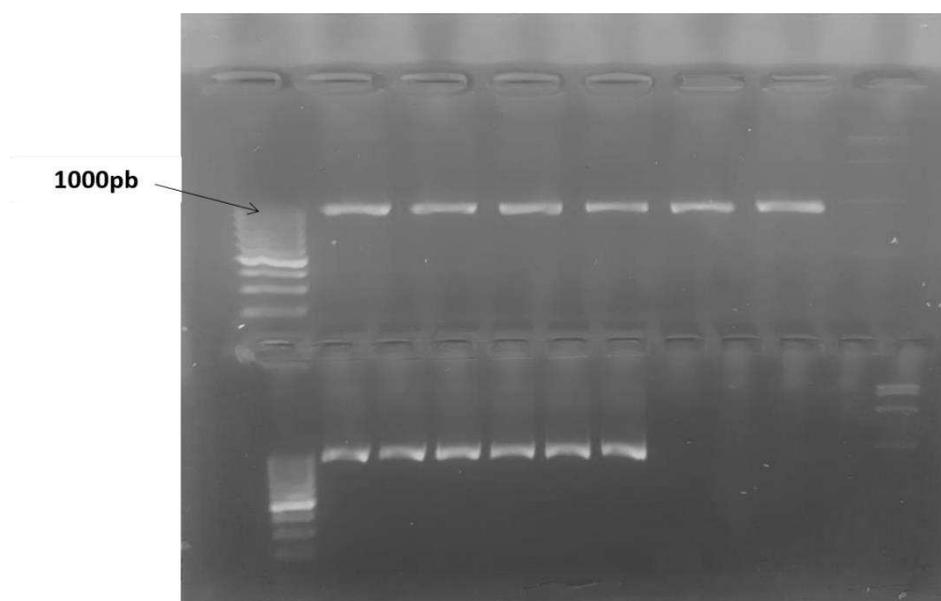


Figura 9: Eletroforese em gel de Agarose 1,5% para confirmação de banda de 1000pb. Par de primers: MHV-3-1-LEFT e MHV-3-1-RIGHT.

4.2. Parte 2: Padronização do Protocolo com SISPA primers

A análise em eletroforese mostrou que, para o Teste 1, seguindo o protocolo original de E. Schirtzinger (87), não houve a amplificação de bandas, nem dos controles (SARS-CoV-2 e MHV-3) nem dos pools de RNA (Figura 10).

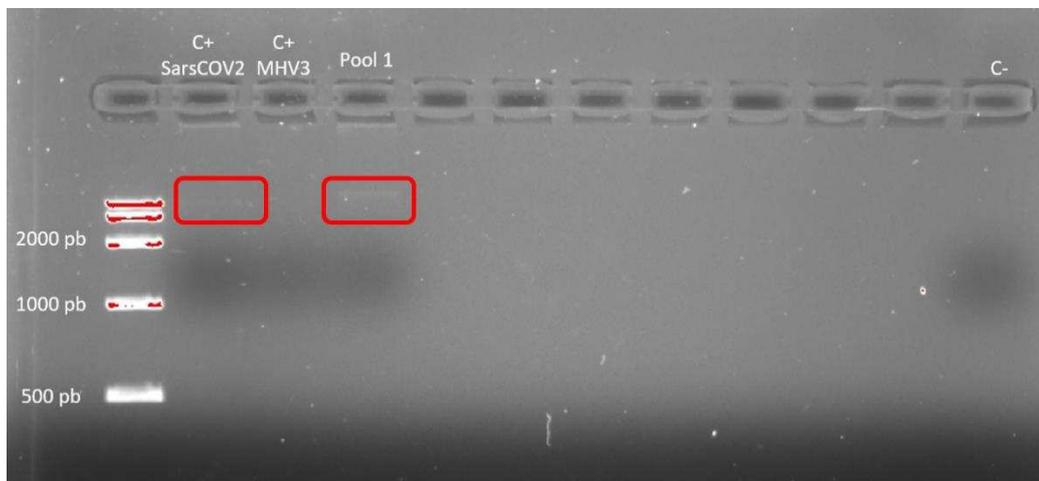


Figura 10. Gel de agarose 1,5% do Teste 1, referente ao protocolo original de E. Schirtzinger (88)

O gel de agarose referente ao Teste 2 mostrou que a desnaturação inicial com intervalo de 10 minutos e a temperatura de anelamento de 65 °C foram mais efetivas na reação (Figura 11).

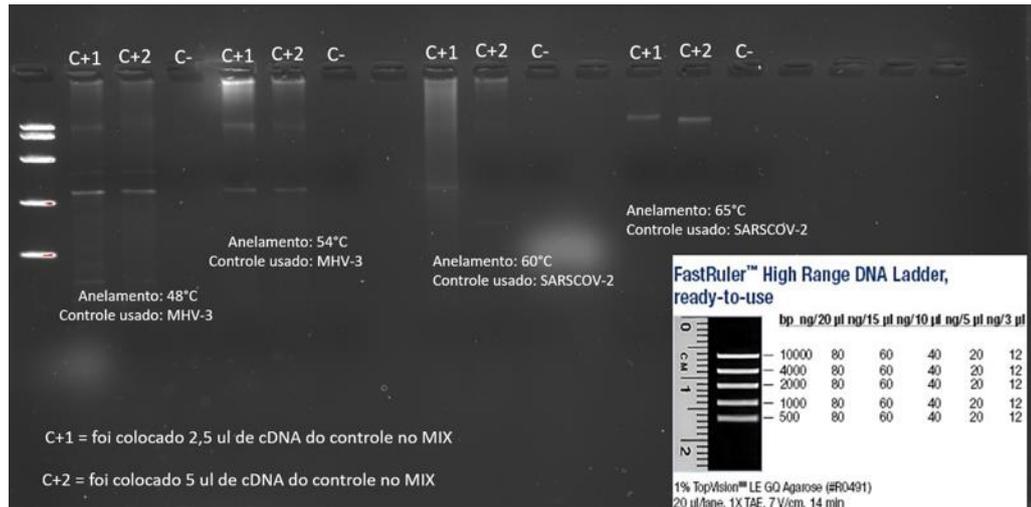


Figura 11. Gel agarose 1,5% do Teste 2, baseado no protocolo de Rosseel et al. (89).

Os resultados referentes ao Teste 3, seguindo a abordagem de amplificação em *Touchdown*, mostraram a formação de bandas de diferentes tamanhos e com uma boa intensidade no gel de agarose, tanto para o controle de MHV-3, quanto para o controle de SARS-CoV-2 (Figura 12). Para os pools de RNA referentes às amostras de morcego as bandas não ficaram bem definidas, como mostra a Figura 13.

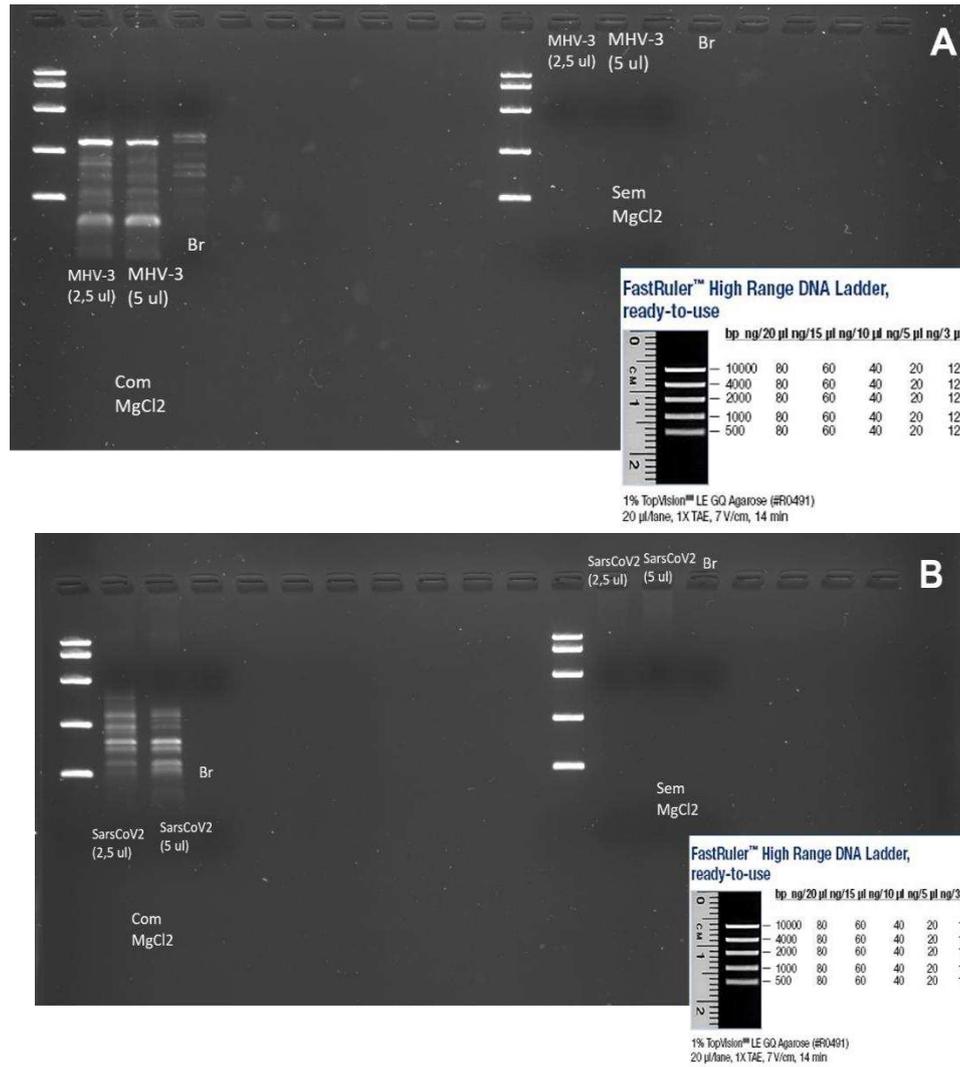


Figura 12. Gel agarose 1,5% do Teste 3, utilizando a abordagem de *Touchdown*. **A.** Controle positivo de MHV-3. **B.** Controle positivo de SARS-CoV-2. **Br**= Branco, refere-se ao controle negativo da reação. **MgCl2** = Cloreto de Magnésio a 2mM.

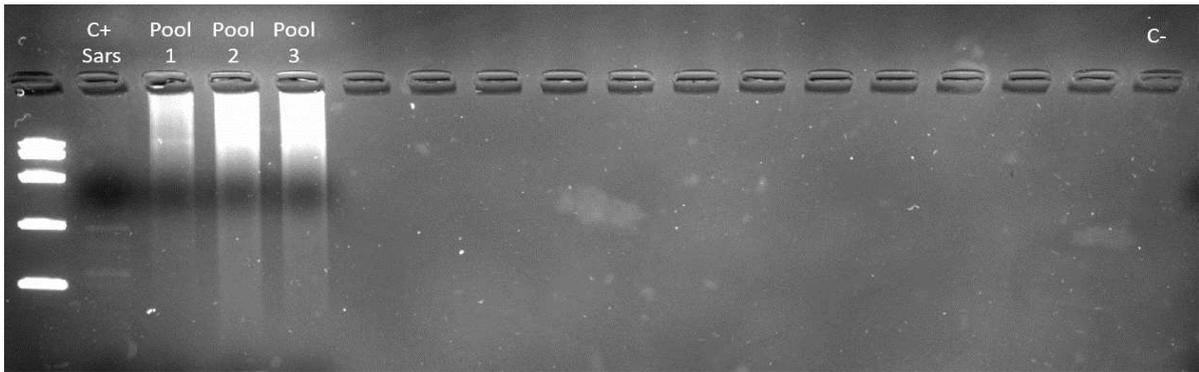


Figura 13. Gel agarose 1,5% referente ao protocolo *Touchdown*, resultante do Teste 3, com as amostras dos Pools 1, 2 e 3. O controle positivo utilizado foi amostra de Sars-CoV-2. O controle negativo foi água ultrapura.

Observou-se que, independentemente do volume, as bandas possuíam intensidades semelhantes no gel, sendo assim, optamos por utilizar o volume de 2,5 μL de cDNA, assim mais protocolos podem ser realizados com a mesma amostra de cDNA. No Item 8.10, presente no Apêndices, encontram-se os valores, mensurados em Nanodrop®, da quantificação em $\text{ng}/\mu\text{L}$, razões de pureza 260/280 e 260/230 de cada uma das amostras utilizadas nos testes de padronização.

Em suma, o protocolo contendo MgCl_2 no Mix de Reagentes, o protocolo de ciclagem seguindo a técnica de *Touchdown* e o volume de cDNA no mix final de 2,5 μL demonstraram serem boas estratégias ao se trabalhar com Primers SISPA, objetivando fragmentos moleculares de tamanhos distintos em amostras contendo um único genoma viral visto que, nas amostras controle (MHV-3 e SARS-CoV-2) obteve-se o resultado esperado. Já nas amostras com os Pools não houve uma boa amplificação. Devido a este resultado os Pools contendo o RNA dos morcegos foram enviados apenas até o passo de Purificação para a realização do RNA-Seq.

4.3. Parte 3: Amostragem de quirópteros capturados no estado de São Paulo

4.3.1. Espécies de quirópteros capturados

Dentre o período de captura dos morcegos foram identificadas, de acordo com Gardner (90), as seguintes espécies: 13 espécimes de *Carollia perspicillata*; 12

espécimes de *Artibeus lituratus*; 5 espécimes de *Sturnira lilium*; 1 espécime de *Artibeus fimbriatus*; 1 espécime de *Micronycteris megalotis*; 1 espécime de *Glossophaga soricina* e 1 espécime de *Anoura caudifer*. Todas as espécies pertencem à família *Phyllostomidae* (Tabela 3).

As amostras de RNA individuais dos morcegos capturados se mostraram negativas para a PCR alvo-específica para o gene RdRp. Portanto, não houve indicativos de que os animais portavam vírus da família *Coronaviridae*.

Tabela 3. Espécies de morcegos e guildas alimentares. Guildas = G; f = frugívoro; n = necatarívoro; i = insetívoro.

Espécies	G
<i>Carollia perspicillata</i> (Linnaeus, 1758)	F
<i>Anoura caudifer</i> (È. Geoffroy, 1818)	n
<i>Glossophaga soricina</i> (È. Geoffroy, 1810)	n
<i>Micronycteris megalotis</i> (Gray, 1842)	i
<i>Artibeus fimbriatus</i> (Gray, 1838)	f
<i>Artibeus lituratus</i> (Olfers, 1818)	f
<i>Sturnira lilium</i> (È. Geoffroy, 1810)	f

Ordenamento segue 'Abreu EF, Casali D, Costa-Araújo R, Garbino GST, Libardi GS, Loretto D, Loss AC, Marmontel M, Moras LM, Nascimento MC, Oliveira ML, Pavan SE, & Tirelli FP. 2022. Lista de Mamíferos do Brasil (2022-1) [Data set]. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7469767>' e as guildas 'Reis, N.R., A.L. Peracchi, W.A. Pedro and I.P. Lima. 2007. *Morcegos do Brasil*. Londrina, PR, Brasil. 253 p.'

4.3.2. Reads obtidas em cada pool através do NGS

Por meio do sequenciamento de nova geração RNASeq, realizado nos 3 pools de amostras, obteve-se um total de 10.540.564 *reads* na amostra do Pool 1 sendo 71,96% com índice de qualidade superior a 30 na escala *Phred*. No Pool 2 foram 3.200.332 *reads* sendo 82,84% com bom índice de qualidade. E por último, no Pool 3 foram 21.377.090 *reads*, sendo 82,89% com bom índice de qualidade.

A escala *Phred* é utilizada para avaliar a qualidade das sequências de DNA obtidas por técnicas de sequenciamento. A escala atribui um valor de qualidade (Q) para cada base sequenciada, indicando a probabilidade de erro no sequenciamento da base, quanto maior o valor Q, melhor a qualidade da base. Por exemplo, um valor Q de 30 indica uma probabilidade de 1 em 1.000 de erro. Portanto, valores de Q mais altos correspondem a sequências de maior qualidade (97).

O procedimento de montagem das *reads* para a obtenção de *contigs* e *scaffolds* foi realizado utilizando o programa *MetaSPAdes*, obtendo-se 9983, 7273 e 9820 *scaffolds* para os Pools 1, 2 e 3, respectivamente.

As Tabelas 4 e 5 mostram o número total de *reads* e o número final das mesmas, analisadas pelos programas disponíveis na plataforma *Galaxy* e na plataforma *Genome Detective*.

Tabela 4. Número de *reads* obtidas através do RNA-Seq montagem *de novo* utilizando o servidor **Galaxy**.

<i>Pool ID</i>	<i>Paired-end reads</i>	<i>Paired-end reads após trimagem</i>	<i>Paired-end reads montadas (Contigs)</i>	<i>Paired-end reads montadas (Scaffolds)</i>	<i>Scaffolds Virais*</i>	<i>Scaffolds Virais (%)</i>
1	10.540.564	7.585.914	10.011	9.983	59	0,59
2	3.200.332	2.651.430	7.287	7.273	44	0,60
3	21.377.090	17.719.948	9.726	9.720	63	0,64
Total	35.117.986	27.957.292	27.024	26.976	166	1,83

*tamanho médio das *scaffolds*: 3400pb

Tabela 5. Número de *reads* obtidas através do RNA-Seq e leitura no *software Centrifuge (Genome Detective)*.

<i>Pool ID</i>	<i>Paired-end reads</i>	<i>Paired-end reads após trimagem</i>	<i>Paired-end reads virais</i>	<i>Contigs Virais</i>	<i>Contigs Virais (%)</i>
1	10.540.564	7.585.914	291.830	1.554	0,53
2	3.200.332	2.651.430	92.802	1.024	1,10
3	21.377.090	17.719.948	319.390	640	0,2
Total	35.117.986	27.957.292	704.022	3.218	1,83

4.3.3. Análise descritiva da diversidade Viral identificada pelo *Centrifuge*

Submetendo-se as *reads* trimadas através do *Trimmomatic* no servidor *online* do *Genome Detective* foi possível obter uma classificação taxonômica frente a um banco de dados “Default Viral Analysis”. Nos três pools foram identificadas *reads* com similaridade com vírus do gênero *Gammaretrovirus*, como o Vírus do sarcoma murino e o Vírus da leucemia murina de Moloney, sendo considerados elementos retrovirais endógenos. Vírus relacionados à fagos também foram identificados, sendo os fagos de *Escherichia coli* (Traversivirus P27, Wadgaonvirus wv5004651, Enterobacteria phag) os mais abundantes. Fagos de *Streptococcus* foram identificados no Pool 2. Também foram identificados vírus comumente encontrados na microbiota de morcegos, devido a sua dieta insetívora/frugívora, como o Streptococcus phage 20617; Enterococcus phage EF62phi e Ocimum basilicum RNA virus 2. Na **Tabela 6** observa-se as classificações obtidas para cada pool.

Tabela 6. Classificação Viral no *software Centrifuge*, frente ao banco de dados Default Viral Analysis, para os Pools 1, 2 e 3. Os nomes de cada vírus estão de acordo com a nomenclatura dada pelo banco de dados Viral depositado no *Centrifuge*.

	Pool 1	Pool 2	Pool 3
Elementos Retrovirais Endógenos	Baboon endogenous virus strain M7;	Harvey murine sarcoma vírus;	Finkel-Biskis-Jinkins murine sarcoma vírus;
	Finkel-Biskis-Jinkins murine sarcoma vírus;	Finkel-Biskis-Jinkins murine sarcoma vírus;	Baboon endogenous virus strain M7;
	Abelson murine leukemia virus	Moloney murine leukemia vírus;	Abelson murine leukemia virus;
		RD114 retrovirus	Desmodus rotundus endogenous retrovírus; RD114 retrovirus;
			Rous sarcoma virus
Bacteriófagos	Traversvirus P27;	Streptococcus phage SMP;	
	Wadgaonvirus wv5004651;	Streptococcus phage IPP54;	Não detectado
	Enterobacteria phage P7	Streptococcus phage MM1	
Presentes na Microbiota normal de quirópteros	Streptococcus phage 20617	Enterococcus phage EF62phi	Ocimum basilicum RNA virus 2;

4.3.4. Diversidade Viral identificada pelo *Kraken2* utilizando banco de dados de genomas virais

As análises do programa *Kraken2* para a classificação taxonômica foram realizadas a partir das *scaffolds* montadas pelo programa *metaSPAdes*. Estas *scaffolds* foram confrontadas com um banco de dados viral do próprio *Kraken2*. Evidenciou-se, nos três pools, que poucas *scaffolds* foram classificadas, sendo a sua

maioria disposta como “Unclassified”. O número de *scaffolds* classificadas foram 62/9983, 46/7273 e 69/9820, para os pools 1, 2 e 3, respectivamente.

Foram identificados elementos retrovirais endógenos como Woolly monkey sarcoma vírus, Snyder-Theilen feline sarcoma vírus e outros Gammaretrovirus não classificados. Dois vírus relacionados à dieta insetívora/frugívora dos morcegos foram classificados, sendo eles o Pepper chlorotic spot vírus (parasita de plantas) e o *Agrotis segetum* nucleopolyhedrovirus B (parasita de insetos). O vírus *Shamonda orthobunyavirus*, responsável por infectar gado bovino, foi identificado nos 3 pools. Vírus que infectam bactérias, como vários fagos de *Escherichia coli* (Enterobacteria phage P7; Enterobacteria phage f1; Escherichia phage DE3; Escherichia phage 500465-1; Inovirus M13; Traversivirus P27) e fagos de possível importância para a área médica como o Felsduovirus, fago de *Salmonella entérica subsp. Entérica serovar Typhimurium*; Serratia phage Muldoon, fago que infecta *Serratia marcescens*, bactéria gram-negativa pertencente à família *Enterobacteriaceae* e o Proteus phage VB_PmiS-Isfahan fago da bactéria *Proteus mirabilis*, foram identificados.

Na Tabela 7 encontram-se as classificações obtidas para cada pool.

Tabela 7. Classificação Viral das *scaffolds* através do *software Kraken2*, frente ao banco de dados “Prebuilt RefSeq indexes: Viral (Versão de 2022)”, para os Pools 1, 2 e 3. Os nomes de cada vírus estão de acordo com a nomenclatura dada pelo banco de dados Viral depositado no *Kraken2*.

	Pool 1	Pool 2	Pool 3
Elementos Retrovirais Endógenos	Gammaretrovirus;	Gammaretrovirus;	Gammaretrovirus;
	Woolly monkey sarcoma virus	Woolly monkey sarcoma virus	Woolly monkey sarcoma vírus; Snyder-Theilen feline sarcoma vírus
Bacteriófagos	Enterobacteria phage P7;	Proteus phage VB_PmiS-Isfahan;	Enterobacteria phage P7;
	Enterobacteria phage f1;	Corynebacterium phage Darwin;	Traversivirus P27;
	Escherichia phage DE3;	Escherichia phage 500465-1;	Escherichia phage DE3;
	Serratia phage Muldoon;	Escherichia phage DE3;	Felsduovirus;
	Proteus phage VB_PmiS-Isfahan	Inovirus M13;	Proteus phage VB_PmiS-Isfahan;
		Enterobacteria phage P7	Corynebacterium phage Darwin
Presentes na Microbiota normal de quirópteros	Agrotis segetum nucleopolyhedrovirus B	Agrotis segetum nucleopolyhedrovirus B	Pepper chlorotic spot vírus

4.3.5. Diversidade Viral em cada Pool

A maioria dos vírus classificados tanto pelo *Kraken2* quanto pelo *Centrifuge* foram encontrados nos três pools, com exceção de *Serratia phage Muldoon*, fago da bactéria *Serratia marcescens*, identificado apenas no Pool 1; no Pool 2 foi descrito a presença de fagos de *Streptococcus*, sendo o *Streptococcus phage MM1* e o *Streptococcus phage IPP54* vírus que infectam *Streptococcus pneumoniae*, bactéria de grande importância médica, causadora da pneumonia e meningite. O

Streptococcus phage SMP também foi identificado no Pool 2, fago que infecta *S. suis*. Felsduovirus (fago de *Salmonella entérica subsp. Entérica serovar Typhimurium*) esteve presente somente no Pool 3.

5. DISCUSSÃO

5.1. Genoma Completo do vírus MHV-3

As atividades realizadas durante o período, com o sequenciamento completo do genoma do vírus da Hepatite Murina (MHV-3) se mostram importantes para estudos sobre a COVID-19 visto que o MHV-3, do gênero *Betacoronavirus*, pertence ao mesmo gênero do SARS-CoV-2. Este trabalho foi realizado visando dar suporte aos estudos sobre o SARS-CoV-2, já que o MHV-3 pode ser utilizado como vírus modelo em laboratórios de NB-2 (nível de Biossegurança 2) (98, 99, 100). Nosso trabalho auxiliou em outros estudos e desde de 2021 foi citado em oito publicações até o momento, entre elas a de Freitas et al (101), Choi et al. (102), Hefler et al. (103). O produto deste trabalho foi o segundo genoma completo de MHV-3 depositado na plataforma *GenBank* e o primeiro da América Latina, trazendo informações atualizadas do primeiro genoma depositado em 2009 por Spiro et al. (87). O artigo publicado em 2021 através da revista científica *Microbiology Resource Announcements* pode ser consultado através do doi: <https://doi.org/10.1128/mra.00248-21> (104).

5.2. Protocolo de Amplificação utilizando Primer SISPA (Sequence-independent, single-primer amplification)

Segundo Chrzastek et al. (83), para realizar uma boa análise de amostras ambientais a ideia seria utilizar os Primers SISPA e o NGS para enriquecimento do genoma viral e detecção de diferentes vírus nas amostras, principalmente no quesito de diagnóstico. Estudos anteriores utilizaram este conjunto de técnicas para detecção de vírus influenza (105), novos mink astrovirus (106), paramyxovirus (107), assim como estudos mais recentes como o de Brinkmann et al. (108) que fizeram uso do primer SISPA juntamente com a tecnologia da Nanopore® e detectaram patógenos

virais transmitidos por carrapatos e Di Profio et al. (109) que exploraram o viroma entérico de gatos para compreender melhor a enfermidade de gastroenterite aguda.

Porém, seguindo a mesma abordagem utilizando os Pools de RNA proveniente dos morcegos capturados neste trabalho não houve amplificação de fragmentos de tamanhos distintos. Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar este resultado, sendo elas: presença de grande diversidade da população presente nas amostras; excesso de DNA complementar em cada pool; *template* muito fragmentado, ou ainda, que a estratégia *Touchdown* pode se inserir melhor no contexto de amplificação de grandes fragmentos de uma amostra única. Sendo assim o protocolo com o Primer SISPA não foi aplicado para os Pools. Porém este protocolo se mostrou muito eficaz para a Amplificação de fragmentos distintos em uma única corrida em termociclador e produção de vários fragmentos de um mesmo genoma (sem alvo específico); Estes fragmentos podem ser enviados para posterior sequenciamento e permitir a análise de diferentes regiões de um genoma viral. Neste contexto o Protocolo de Amplificação com primer SISPA pode proporcionar a produção de genomas virais completos, nos levando a ter uma melhor compreensão da natureza dos vírus (como se ele se replica, sua patogenicidade, etc), o que facilita o diagnóstico de doenças e o combate a elas de forma eficaz.

5.3. Diversidade viral identificada nas amostras de morcegos

Visando identificar diversidade viral nos morcegos capturados na cidade de Rio Claro foi possível observar através do NGS resultados interessantes. Foram identificados vários vírus comumente descritos em morcegos através da técnica de Metagenômica, entre eles *Serratia* phage Muldoon, bacteriófago que parasita a bactéria *Serratia marcescens*. Esta bactéria já foi descrita na microbiota de morcegos da Mata Atlântica brasileira, por Claudio et al. (110). O vírus *Serratia* phage Muldoon foi identificado apenas no Pool 1, que contém as amostras coletadas mais próximas a edificações humanas possivelmente existindo uma proximidade entre a bactéria *S. marcescens* e os humanos deste local de coleta.

Identificou-se uma grande variedade de bacteriófagos nos três pools, entre eles muitos que parasitam a bactéria *Escherichia coli*, tanto nas classificações do

Centrifuge quanto nas do *Kraken2*. Este resultado já era esperado visto que esta bactéria faz parte da microbiota intestinal dos morcegos, sendo descrita em vários trabalhos semelhantes (77, 111). Outros bacteriófagos identificados que chamaram a atenção foram os que parasitam a bactéria *Streptococcus pneumoniae*, sendo eles o Streptococcus phage IPP54 e o Streptococcus phage MM1. Estes dois fagos foram identificados apenas no Pool 2 pelo *software Centrifuge*. O Pool 2 refere-se a microárea mais próxima ao Horto e ao lago localizado próximo, tendo um fluxo considerável de pessoas, apesar de estar mais afastado de edificações. Não foram descritos ainda na literatura a presença destes fagos, assim como da bactéria que eles parasitam, em amostras de morcegos. Este achado se mostra interessante visto que a *S. pneumoniae* é uma bactéria importante e é a quarta causa fatal de infecção em humanos, causando pneumonia e meningite, de acordo com a Organização Mundial da Saúde. O pneumococo é um colonizador regular do trato respiratório superior e, além da pneumonia, causa infecções frequentes associadas às vias aéreas, como otite média, sinusite e bronquite (112). Visto a importância de soluções alternativas aos antibióticos, encontrar um fago capaz de eliminar o *S. pneumoniae* se mostra interessante para os estudos em fagoterapia.

Um outro bacteriófago que foi identificado nos três Pools foi o Proteus phage VB Pmis, parasita da bactéria *Proteus mirabilis*, que é amplamente distribuída em solos, água e pode fazer parte da microbiota normal de animais (113), o que corrobora com a sua presença nas três microáreas. *P. mirabilis* também está associada a infecções do trato urinário humano e, nos últimos anos, vem sendo descrita resistência desta bactéria à antibióticos usados, sendo um problema de saúde pública (113). Hoque et al. (77) trabalharam com RNA provenientes de suabes de pacientes positivos para a COVID-19 e pacientes negativos para avaliar se a presença do SARS-CoV-2 influencia na microbiota do trato respiratório. Por meio de RNA-Seq obtiveram *reads* que foram confrontadas com banco de dados proveniente do *RefSeq*, através do *software Kraken2*. Os pesquisadores encontraram alguns vírus que também foram identificados neste trabalho como: Shamonda *Shamonda orthobunyavirus*, Proteus phage VB Pmis, Choristoneura fumiferana granulovirus, nas amostras de pacientes negativos pra a COVID-19. Enquanto nos pacientes com a doença prevaleceram vírus do gênero *Betacoronavirus* mostrando que há mudanças na microbiota respiratória quando o SARS-CoV-2 está presente, diminuindo a

diversidade viral da microbiota. Este achado demonstra que a microbiota de morcegos e a de humanos tem semelhanças em relação a diversidade viral e tendo em vista estes resultados podemos considerar que os morcegos deste trabalho estavam saudáveis.

As classificações dos vírus *Shamonda orthobunyavirus* e *Choristoneura fumiferana granulovirus*, feitas pelo *Kraken2*, provavelmente não são fidedígnas, podendo tratar-se de erros do programa ao classificar *reads* curtas. No caso *Shamonda orthobunyavirus*, vírus que parasita a espécie *Bos taurus* (boi doméstico) identificada pelo *Kraken2*, refere-se a fragmentos muito curtos que podem estar associados aos kits de laboratório usados para o tratamento das amostras, como as DNAses. Asplund et al. (114) identificaram *Shamonda* vírus como sendo derivado de componentes de laboratório, assim como outras sequências classificadas como vírus, mas que não se tratam de sequências virais. Já o vírus *Choristoneura fumiferana granulovirus*, parasita de uma espécie de lagarta nativa na América do Norte, trata-se de *reads* da região 28S do RNA ribossômico de fungos (115)

Presente nos Pools 2 e 3, sendo estes mais afastados de edificações, estando em área de mata densa, está o bacteriófago *Corynebacterium phage Darwin*, parasita da bactéria *Corynebacterium vitaeruminis*, que pode ser encontrada em plantas, no solo e na água, vias que podem facilitar a infecção em humanos e animais. Este fago foi descrito recentemente, no ano de 2019 por Monti et al. (116) que publicaram o seu genoma completo. Até o momento não há publicações que identificaram a bactéria *C. vitaeruminis* em morcegos, porém é uma bactéria que requer atenção, pois outras do mesmo gênero causam doenças em humanos (*Corynebacterium diphtheriae*) (117), bovinos, ovinos e caprinos (*C. pseudotuberculosis*) (118).

Outro bacteriófago de possível importância na área médica e que foi identificado apenas no Pool 3 foi o *Felsduovirus*, fago de *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium*. Esta bactéria é de preocupação para a Saúde Única, pois tem a capacidade de infectar humanos e animais. *S. Typhimurium*, têm uma ampla gama de hospedeiros e em humanos causam mais frequentemente gastroenterite autolimitada e são referidos como sorovares “não tifóides” (119). Estes sorovares são zoonóticos ou potencialmente zoonóticos. Tendo em vista a crescente

resistência à antibióticos este fago se mostra uma possível alternativa para a eliminação da bactéria patogênica, através da fagoterapia. A Organização Mundial da Saúde (OMS) já destacou a preocupação mundial ao uso de antibióticos (120), alertando para crises sanitárias que podem surgir da resistência antimicrobiana (ARM). Sendo assim, trabalhos como este, que permitem identificar bacteriófagos em amostras de animais, tornam-se uma alternativa para começar a entender como estes microrganismos agem e como podemos, futuramente, isola-los e utiliza-los para combater estas doenças.

Os Retrovirus, pertencentes a família *Retroviridae*, foram identificados nos 3 pools e em grande variedade, sendo de diferentes espécies pelos dois *softwares*. Acreditamos que tratar-se de Elementos Retrovirais Endógenos (ERV), ou seja, sequências provenientes de uma antiga infecção viral e que se inseriram ao genoma do hospedeiro. Pequenos fragmentos de retrovírus (ERV) já foram descritos anteriormente em amostras sequenciadas oriundas de morcegos. Hayward e Tachedjian (61), em sua revisão, mostraram que já foram descritos ERV em morcegos da família *Phyllostomidae* (*Anoura caudifer*, *Carollia perspicilata*, *Desmodus rotundus*), mesma família de morcegos capturada no presente trabalho. Acreditamos que as espécies de retrovírus, assim como os gênero *Gammaretrovirus*, que foram classificados tanto pelo *Kraken2* quanto pelo *Centrifuge* sejam ERVs, visto que os morcegos, no momento de sua captura, estavam visivelmente saudáveis. Tem sido sugerido que a falta de sintomas de infecção viral e baixa taxa de mortalidade em morcegos pode ser devido a adaptações imunes que resultam de sua coevolução de longo prazo com vírus, entre eles, o retrovírus.

Voisset et al. (121), demonstraram, através de árvores filogenéticas, a origem do gene ERVW1, um elemento retroviral endógeno remanescente de uma antiga infecção retroviral integrada à linhagem germinativa dos primatas e passado às espécies descendentes, incluindo os seres humanos. Este gene codifica a proteína Sincitina-1, que por sua vez, desempenha papel importante no desenvolvimento placentário. Estudos como este demonstram como o ERVs apresentam funções importantes em cada espécie.

6. CONCLUSÃO

A montagem do genoma completo do vírus da Hepatite Murina estirpe 3 (MHV-3) permitiu auxiliar a comunidade científica em estudos onde o vírus foi utilizado como modelo para aplicações sobre o SARS-CoV-2, de forma segura e eficaz.

O Protocolo de Amplificação utilizando o SISPA Primer padronizado permitiu a produção de fragmentos distintos de um mesmo genoma para análise de diferentes regiões do genoma viral dos controles utilizados.

A busca por agentes virais circulantes em morcegos do Estado de São Paulo fazendo uso da técnica de metagenômica possibilitou a identificação de diversas espécies virais, algumas delas com potencial para uso futuro pela comunidade médica, assim como a identificação de vírus que indicam uma coevolução a longo prazo entre os morcegos e as espécies virais.

7. REFERÊNCIAS

- [1] Keusch GT, Amuasi JH, Anderson DE, Daszak P, Eckerle I, Field H, et al. Pandemic origins and a One Health approach to preparedness and prevention: Solutions based on SARS-CoV-2 and other RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2022 Oct 10;119(42).
- [2] Adisasmito WB, Almuhairi S, Behravesch CB, Bilivogui P, Bukachi SA, Casas N, et al. One Health: A new definition for a sustainable and healthy future. Dvorin JD, editor. *PLOS Pathogens*. 2022 Jun 23;18(6):e1010537.
- [3] Letko M, Seifert SN, Olival KJ, Plowright RK, Munster VJ. Bat-borne virus diversity, spillover and emergence. *Nature Reviews Microbiology*. 2020 Jun 11;18(8):461–71.
- [4] Teeling EC. A Molecular Phylogeny for Bats Illuminates Biogeography and the Fossil Record. *Science*. 2005 Jan 28;307(5709):580–4.
- [5] Castelo-Branco DSCM, Nobre JA, Souza PRH, Diógenes EM, Guedes GMM, Mesquita FP, et al. Role of Brazilian bats in the epidemiological cycle of potentially zoonotic pathogens. *Microbial Pathogenesis*. 2023 Apr;177:106032.
- [6] Gorbunova V, Seluanov A, Kennedy BK. The World Goes Bats: Living Longer and Tolerating Viruses. *Cell Metabolism*. 2020 Jul;32(1):31–43.
- [7] Phyllostomidae | mammal family | Britannica [Internet]. www.britannica.com. Available from: <https://www.britannica.com/animal/Phyllostomidae>
- [8] Reis NR. *Morcegos do Brasil*. Londrina: Edição Dos Editores; 2007.
- [9] Nowak, RM. *Walker's Mammals of the World (Volume 1)*. 6th Edition, Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1166-1170; 1999.
- [10] Holanda GM, de Oliveira EHC, Ribeiro NAB. Geographic dispersion of Phyllostomidae family (Chiroptera) based on Cytochrome b sequences. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. 2012 3(3), 11-11.
- [11] Phyllostomidae distribution map [Internet]. people.wku.edu. [cited 2023 Nov 7]. Available from: <http://people.wku.edu/charles.smith/faunmaps/Phyllostomidae.htm>

- [12] Weiss RA, Sankaran N. Emergence of epidemic diseases: zoonoses and other origins. *Faculty Reviews*. 2022 Jan 18;11.
- [13] Brook CE, Dobson AP. Bats as “special” reservoirs for emerging zoonotic pathogens. *Trends in Microbiology*. 2015 Mar;23(3):172–80.
- [14] Marra MA. The Genome Sequence of the SARS-Associated Coronavirus. *Science*. 2003 May 1;300(5624):1399–404.
- [15] Baharoon S, Memish ZA. MERS-CoV as an emerging respiratory illness: A review of prevention methods. *Travel medicine and infectious disease*. 2019; 101520.
- [16] Wang C, Horby PW, Hayden FG, Gao GF. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *The Lancet*. 2020 Jan;395(10223):470–3.
- [17] Allocati N, Petrucci AG, Di Giovanni P, Masulli M, Di Ilio C, De Laurenzi V. Bat–man disease transmission: zoonotic pathogens from wildlife reservoirs to human populations. *Cell Death Discovery*. 2016 Jun 27;2(1).
- [18] Federici L, Masulli M, de Laurenzi V, Allocati N. An overview of bats microbiota and its implication in transmissible diseases. *Frontiers in Microbiology*. 2022 13, 1012189.
- [19] Zhang G, Cowled C, Shi Z, Huang Z, Bishop-Lilly KA, Fang X, et al. Comparative Analysis of Bat Genomes Provides Insight into the Evolution of Flight and Immunity. *Science*. 2013 Jan 25;339(6118):456–60
- [20] Subudhi S, Rapin N, Misra V. Immune System Modulation and Viral Persistence in Bats: Understanding Viral Spillover. *Viruses*. 2019 Feb 23;11(2).
- [21] Channappanavar R, Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Seminars in Immunopathology*. 2017 May 2;39(5):529–39.
- [22] Bittar C, Machado RRG, Comelis MT, Bueno LM, Beguelini MR, Morielle-Versute E, et al. Alphacoronavirus Detection in Lungs, Liver, and Intestines of Bats from Brazil. *Microbial Ecology*. 2019 May 29;79(1):203–12.

- [23] Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiology: An introduction. 13th ed. Boston: Pearson; 2018.
- [24] Baltimore D. Expression of animal virus genomes. *Bacteriological Reviews*. 1971;35(3):235–41.
- [25] Kamer G, Argos P. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Research*. 1984; 12(18):7269–82.
- [26] Koonin EV. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *Journal of General Virology*. 1991 Sep 1;72(9):2197–206.
- [27] Koonin EV, Dolja VV, Krupovic M, Varsani A, Wolf YI, Yutin N, et al. Global Organization and Proposed Megataxonomy of the Virus World. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2020 Mar 4;84(2).
- [28] Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*. 2018 Dec 10;17(3):181–92.
- [29] Tian J, Sun J, Li D, Wang N, Wang L, Zhang C, Meng X, Ji X, Suchard MA, Zhang X, Lai A, Su S, Veit M. Emerging viruses: Cross-species transmission of coronaviruses, filoviruses, henipaviruses, and rotaviruses from bats. *Cell Reports*. 2022.
- [30] Duffy S. Why are RNA virus mutation rates so damn high? *PLOS Biology*. 2018 Aug 13;16(8)
- [31] Jackwood MW, Hall D, Handel A. Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012 Aug;12(6):1305–11.
- [32] Brian DA, Baric RS. Coronavirus Genome Structure and Replication. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2019; 287:1–30
- [33] Körner RW, Majjouti M, Alcazar MAA, Mahabir E. Of Mice and Men: The Coronavirus MHV and Mouse Models as a Translational Approach to Understand SARS-CoV-2. *Viruses*. 2020 Aug 12;12(8):880.
- [34] Ahmed W, Bertsch PM, Bibby K, Haramoto E, Hewitt J, Huygens F, et al. Decay of SARS-CoV-2 and surrogate murine hepatitis virus RNA in untreated wastewater to

inform application in wastewater-based epidemiology. *Environmental Research*. 2020 Dec;191:110092.

[35] Dellanno C, Vega Q, Boesenberg D. The antiviral action of common household disinfectants and antiseptics against murine hepatitis virus, a potential surrogate for SARS coronavirus. *American Journal of Infection Control*. 2009 Oct;37(8):649–52.

[36] Pereira Oliveira G, Kroon EG. Mouse hepatitis virus: A betacoronavirus model to study the virucidal activity of air disinfection equipment on surface contamination. *Journal of Virological Methods*. 2021 Nov;297:114274.

[37] Mancini MW, Almeida-Lopes L, Jacinto GS, Tsukamoto J, Arns CW. Prompt Inactivation of Coronavirus Using a 280 nm Light-Emitting Diode Cluster Device. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*. 2022 Apr 1;40(4):273–9.

[38] de Moraes Segundo J de DP, Constantino JSF, Calais GB, de Moura Junior CF, de Moraes MOS, da Fonseca JHL, et al. Virucidal PVP-Copper Salt Composites against Coronavirus Produced by Electrospinning and Electro spraying. *Polymers*. 2022 Oct 4;14(19):4157.

[39] Mancini MW, Almeida-Lopes L, Bossini PS, Jacinto GS, Tsukamoto J, Arns CW. Fast inactivation of coronavirus in filtering-facepiece respirators in a reflective cylindrical UV-C chamber. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 2022.

[40] Das Sarma J. A Mechanism of Virus-Induced Demyelination. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2010;2010:1–28.

[41] Astuti I, Ysrafil. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews [Internet]*. 2020 Apr;14(4):407–12

[42] Suttle CA. Viruses in the sea. *Nature [Internet]*. 2005 Sep [cited 2019 Sep 2];437(7057):356–61.

[43] Dion MB, Oechslin F, Moineau S. Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology*. 2020 Feb 3;18(3):125–38.

[44] Kim MS, Bae JW. Lysogeny is prevalent and widely distributed in the murine gut microbiota. *The ISME Journal*. 2018 Feb 7;12(4):1127–41.

- [45] Kakasis A, Panitsa G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. *International Journal of Antimicrobial Agents* [Internet]. 2019 Jan [cited 2019 Oct 21];53(1):16–21.
- [46] Kutter E, Sulakvelidze A. *Bacteriophages: Biology and Applications*. Google Books. CRC Press; 2004.
- [47] Weber-Dąbrowska, B, Jończyk-Matysiak, E, Żaczek, M, Łobočka, M, Łusiak-Szelachowska, M, Górski, A. Bacteriophage procurement for therapeutic purposes. *Frontiers in microbiology*. 2016 7, 1177.
- [48] Wang J, Hu B, Xu M, Yan Q, Liu S, Zhu XH, et al. Use of bacteriophage in the treatment of experimental animal bacteremia from imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. 2006 Feb 1;
- [49] Watanabe R, Matsumoto T, Sano G, Ishii Y, Tateda K, Sumiyama Y, et al. Efficacy of Bacteriophage Therapy against Gut-Derived Sepsis Caused by *Pseudomonas aeruginosa* in Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006 Nov 20;51(2):446–52.
- [50] Regeimbal JM, Jacobs AC, Corey BW, Henry MS, Thompson MG, Pavlicek RL, et al. Personalized Therapeutic Cocktail of Wild Environmental Phages Rescues Mice from *Acinetobacter baumannii* Wound Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016 Sep 23 [cited 2020 Apr 18];60(10):5806–16.
- [51] Hua, Y, Luo, T, Yang, Y, Dong, D, Wang, R, Wang, Y, et al. Phage therapy as a promising new treatment for lung infection caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in mice. *Frontiers in microbiology*. 2018, 8, 318476.
- [52] Hung CH, Kuo CF, Wang CH, Wu CM, Tsao N. Experimental phage therapy in treating *Klebsiella pneumoniae*-mediated liver abscesses and bacteremia in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [Internet]. 2011 Apr 1;55(4):1358–65.
- [53] Cao F, Wang X, Wang L, Li Z, Che J, Wang L, et al. Evaluation of the Efficacy of a Bacteriophage in the Treatment of Pneumonia Induced by Multidrug Resistance *Klebsiella pneumoniae* in Mice. *BioMed Research International*. 2015;2015:1–9.

- [54] Hussain W, Yang X, Ullah M, Wang H, Aziz A, Xu F, et al. Genetic engineering of bacteriophages: Key concepts, strategies, and applications. *Biotechnology Advances* [Internet]. 2023 May 1 [cited 2023 Jun 23];64:108116.
- [55] Katzourakis A, Gifford RJ. Endogenous Viral Elements in Animal Genomes. Malik HS, editor. *PLoS Genetics*. 2010 Nov 18;6(11):e1001191.
- [56] International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb;409(6822):860–921.
- [57] Mouse Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 2002 Dec;420(6915):520–62.
- [58] Zhuo X, Rho M, Feschotte C. Genome-Wide Characterization of Endogenous Retroviruses in the Bat *Myotis lucifugus* Reveals Recent and Diverse Infections. *Journal of Virology*. 2013 May 29;87(15):8493–501.
- [59] Skirmuntt EC, Katzourakis A. The evolution of endogenous retroviral envelope genes in bats and their potential contribution to host biology. *Virus Research* [Internet]. 2019 Sep 1;270:197645.
- [60] Poltronieri P, Sun B, Mallardo M. RNA Viruses: RNA Roles in Pathogenesis, Coreplication and Viral Load. *Current Genomics* [Internet]. 2015 Oct 16(5):327–35.
- [61] Hayward JA, Tachedjian G. Retroviruses of Bats: a Threat Waiting in the Wings? Prasad VR, editor. *mBio*. 2021 Sep 7;
- [62] Teeling EC, Vernes SC, Dávalos LM, Ray DA, Gilbert MTP, Myers E. Bat Biology, Genomes, and the Bat1K Project: To Generate Chromosome-Level Genomes for All Living Bat Species. *Annual Review of Animal Biosciences*. 2018 Feb 15;6(1):23–46.
- [63] Graves DC, Ferrer JF. In Vitro Transmission and Propagation of the Bovine Leukemia Virus in Monolayer Cell Cultures¹. *Cancer Research* [Internet]. 1976 Nov 4:152–9.
- [64] Thiry L, Cogniaux-Leclerc J, R Olislager, S. Sprecher-Goldberger, Buekens P. Cell receptors for baboon endogenous virus recognized by monoclonal antibodies. *Journal of Virology*. 1983 Dec 1;48(3):697–708.

- [65] Cloyd MW, Thompson MM, Hartley JW. Host range of mink cell focus-inducing viruses. *Virology*. 1985 Jan;140(2):239–48.
- [66] Baillie GJ, van de Lagemaat LN, Baust C, Mager DL. Multiple Groups of Endogenous Betaretroviruses in Mice, Rats, and Other Mammals. *Journal of Virology*. 2004 Jun;78(11):5784–98.
- [67] Cui J, Tachedjian G, Tachedjian M, Holmes EC, Zhang S, Wang LF. Identification of diverse groups of endogenous gammaretroviruses in mega- and microbats. *Journal of General Virology*. 2012 Sep 1;93(9):2037–45.
- [68] Cui J, Tachedjian M, Wang L, Tachedjian G, Wang LF, Zhang S. Discovery of Retroviral Homologs in Bats: Implications for the Origin of Mammalian Gammaretroviruses. *Journal of Virology*. 2012 Apr 15;86(8):4288–93.
- [69] Hayward JA, Tachedjian M, Cui J, Field H, Holmes EC, Wang LF, et al. Identification of diverse full-length endogenous betaretroviruses in megabats and microbats. *Retrovirology*. 2013 Mar 27;10(1).
- [70] Farkašová H, Hron T, Pačes J, Hulva P, Benda P, Gifford RJ, et al. Discovery of an endogenous Deltaretrovirus in the genome of long-fingered bats (Chiroptera: Miniopteridae). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017 Mar 9;114(12):3145–50.
- [71] Behjati S, Tarpey PS. What Is next Generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood - Education & Practice Edition*. 2013 Aug 28;98(6):236–8.
- [72] Garg KM, Lamba V, Sanyal A, Pilot Dovich, Chattopadhyay B. Next Generation Sequencing Revolutionizes Organismal Biology Research in Bats. 2023 May 8;91(4):391–404.
- [73] Bolatti EM, Viarengo G, Zorec TM, Cerri A, Montani ME, Hošnjak L, et al. Viral Metagenomic Data Analyses of Five New World Bat Species from Argentina: Identification of 35 Novel DNA Viruses. *Microorganisms*. 2022 Jan 24;10(2):266–6.
- [74] Kumar A, Murthy S, Kapoor A. Evolution of selective-sequencing approaches for virus discovery and virome analysis. *Virus Research [Internet]*. 2017 Jul [cited 2019 Dec 13];239:172–9.

- [75] Simmonds P, Adams MJ, Benkő M, Breitbart M, Rodney Brister J, Carstens EB. Consensus statement: Virus taxonomy in the age of metagenomics. *Nat Publ Gr*. 2017.
- [76] Tian J, Hou X, Ge Mihong, Xu H, Yu B, Liu J, et al. The diversity and evolutionary relationships of ticks and tick-borne bacteria collected in China. *Parasites & Vectors* [Internet]. 2022 Oct 1 [cited 2023 Apr 25];15(1).
- [77] Hoque MN, Rahman MS, Ahmed R, Hossain MdS, Islam MdS, Islam T, et al. Diversity and genomic determinants of the microbiomes associated with COVID-19 and non-COVID respiratory diseases. *Gene Reports* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2022 Mar 27];23:101200.
- [78] Wiederkehr MA, Qi W, Schoenbaechler K, Cornel Fraefel, Kubacki J. Virus Diversity, Abundance, and Evolution in Three Different Bat Colonies in Switzerland. *Viruses*. 2022 Aug 29;14(9):1911–1.
- [79] Simas PVM, Barnabé AC de S, Durães-Carvalho R, Neto DF de L, Caserta LC, Artacho L, et al. Bat Coronavirus in Brazil Related to Appalachian Ridge and Porcine Epidemic Diarrhea Viruses. *Emerging Infectious Diseases*. 2015 Apr;21(4):729–31.
- [80] Podnar J, Deiderick H, Huerta G, Hunicke-Smith S. Next-Generation Sequencing RNA-Seq Library Construction. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2014 Apr;106(1).
- [81] Rhoads A, Au KF. PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* [Internet]. 2015 Oct;13(5):278–89.
- [82] Lu H, Giordano F, Ning Z. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. 2016 Oct;14(5):265–79.
- [83] Chrzastek K, Lee D, Smith D, Sharma P, Suarez DL, Pantin-Jackwood M, et al. Use of Sequence-Independent, Single-Primer-Amplification (SISPA) for rapid detection, identification, and characterization of avian RNA viruses. *Virology* [Internet]. 2017 Sep 1;509:159–66.
- [84] Reyes GR, Kim JP. Sequence-independent, single-primer amplification (SISPA) of complex DNA populations. *Molecular and Cellular Probes*. 1991 Dec;5(6):473–81.

- [85] Korbie DJ, Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols* [Internet]. 2008 Aug 21;3(9):1452–6.
- [86] PrimalScheme: primer panels for multiplex PCR [Internet]. primalscheme.com. [cited 2023 Nov 15]. Available from: <https://primalscheme.com/>
- [87] Spiro D, Halpin R, Wang S, Hostetler J, Overton L, Tsitrin T, et al. Murine coronavirus MHV-3, complete genome. Accession Number: FJ647224. Genbank. 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ647224.1>
- [88] E. Schirtzinger. Sample Prep: Metagenomics Hause SOP. 2015 April, 3.
- [89] Rosseel T, Lambrecht B, Vandenbussche F, van den Berg T, Van Borm S. Identification and complete genome sequencing of paramyxoviruses in mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) using random access amplification and next generation sequencing technologies. *Virology Journal*. 2011 Oct 6;8(1).
- [90] Gardner AL. *Mammals of South America, Volume 1 Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats*. Chicago University Of Chicago Press Ann Arbor, Michigan Proquest; 2014.
- [91] Chu DKW, Leung CYH, Gilbert M, Joyner PH, Ng EM, Tse TM, et al. Avian coronavirus in wild aquatic birds. *Journal of Virology* [Internet]. 2011 Dec 1 [cited 2023 Feb 23];85(23):12815–20.
- [92] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014 Apr 1;30(15):2114–20.
- [93] Nurk S, Meleshko D, Korobeynikov A, Pevzner PA. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Research*. 2017 Mar 15;27(5):824–34.
- [94] Wood DE, Lu J, Langmead B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*. 2019 Nov 28;20(1).
- [95] Kim D, Song L, Breitwieser FP, Salzberg SL. Centrifuge: rapid and sensitive classification of metagenomic sequences. *Genome Research*. 2016 Oct 17;26(12):1721–9.

- [96] Zhao L, Xie J, Bai L, Chen W, Wang M, Zhang Z, et al. Mining statistically-solid k-mers for accurate NGS error correction. *BMC Genomics*. 2018 Dec;19(S10).
- [97] Goswami K, Sanan-Mishra N. Chapter 7 - RNA-seq for revealing the function of the transcriptome [Internet]. Singh DB, Pathak RK, editors. ScienceDirect. Academic Press; 2022. p. 105–29.
- [98] Ahmed W, Bertsch PM, Bibby K, Haramoto E, Hewitt J, Huygens F, et al. Decay of SARS-CoV-2 and surrogate murine hepatitis virus RNA in untreated wastewater to inform application in wastewater-based epidemiology. *Environmental Research*. 2020 Dec;191:110092.
- [99] Ahmed W, Bertsch PM, Bivins A, Bibby K, Farkas K, Gathercole A, et al. Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. *Science of The Total Environment*. 2020 Oct;739:139960.
- [100] Körner RW, Majjouti M, Alcazar MAA, Mahabir E. Of Mice and Men: The Coronavirus MHV and Mouse Models as a Translational Approach to Understand SARS-CoV-2. *Viruses*. 2020 Aug 12;12(8):880.
- [101] Freitas GG de, Barbosa JM, Santana CJC de, Magalhães ACM, Macedo KWR, Souza JO de, et al. Purification and Biological Properties of Raniseptins-3 and -6, Two Antimicrobial Peptides from *Boana raniceps* (Cope, 1862) Skin Secretion. *Biomolecules* [Internet]. 2023 Mar 1
- [102] Choi A, Kots ED, Singleton DT, Weinstein H, Whittaker G. Analysis of the molecular determinants for furin cleavage of the spike protein S1/S2 site in defined strains of the prototype coronavirus murine hepatitis virus (MHV). *bioRxiv* (Cold Spring Harbor Laboratory) [Internet]. 2023 Jan 12
- [103] Hefler J, Marfil-Garza BA, Pawlick RL, Freed DH, Karvellas CJ, Bigam DL, et al. Preclinical models of acute liver failure: a comprehensive review. *PeerJ*. 2021 Dec 9;9:e12579.

- [104] Garcia AB, de Moraes AP, Rodrigues DM, Gilioli R, Oliveira-Filho EF, Durães-Carvalho R, et al. Coding-Complete Genome Sequence of Murine Hepatitis Virus Strain 3 from Brazil. 2021 Apr 15;10(15).
- [105] Afonso CL. Sequencing of avian influenza virus genomes following random amplification. 2007 Aug 1;43(2):188–92.
- [106] Blomström AL, Widén F, Hammer AS, Belák S, Berg M. Detection of a Novel Astrovirus in Brain Tissue of Mink Suffering from Shaking Mink Syndrome by Use of Viral Metagenomics. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010 Dec;48(12):4392–6.
- [107] Miller PJ, Afonso CL, Spackman E, Scott M, Pedersen JC, Senne DA, et al. Evidence for a New Avian Paramyxovirus Serotype 10 Detected in Rockhopper Penguins from the Falkland Islands. 2010 Nov 1;84(21):11496–504.
- [108] Brinkmann A, Uddin S, Krause E, Surtees R, Dinçer E, Kar S, et al. Utility of a Sequence-Independent, Single-Primer-Amplification (SISPA) and Nanopore Sequencing Approach for Detection and Characterization of Tick-Borne Viral Pathogens. *Viruses* [Internet]. 2021 Jan 29;13
- [109] Di Profio F, Sarchese V, Fruci P, Aste G, Martella V, Palombieri A, et al. Exploring the Enteric Virome of Cats with Acute Gastroenteritis. *Veterinary Sciences*. 2023 May 18;10(5):362–2.
- [110] Cláudio VC, Gonzalez I, Barbosa G, Rocha V, Moratelli R, Rassy F. Bacteria richness and antibiotic-resistance in bats from a protected area in the Atlantic Forest of Southeastern Brazil. Cloeckert A, editor. *PLOS ONE*. 2018 Sep 14;13(9):e0203411.
- [111] Popov IV, Mazanko MS, Kulaeva ED, Golovin SN, Malinovkin AV, Aleshukina IS, et al. Gut microbiota of bats: pro-mutagenic properties and possible frontiers in preventing emerging disease. *Scientific Reports* [Internet]. 2021 Oct 26 [cited 2023 Jun 30];11(1):21075.

- [112] Engholm DH, Kilian M, Goodsell DS, Andersen ES, Kjærgaard RS. A visual review of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. FEMS Microbiology Reviews. 2017 Oct 5;41(6):854–79.
- [113] Schaffer JN, Pearson MM. *Proteus mirabilis* and Urinary Tract Infections. Urinary Tract Infections. 2016 Apr 19;383–433.
- [114] Asplund M, Kjartansdóttir KR, Møllerup S, Vinner L, Fridholm H, Herrera JAR, et al. Contaminating viral sequences in high-throughput sequencing viromics: a linkage study of 700 sequencing libraries. Clinical Microbiology and Infection. 2019 Oct;25(10):1277–85.
- [115] Van Borm S, Fu Q, Winand R, Vanneste K, Hakhverdyan M, Höper D, et al. Evaluation of a commercial exogenous internal process control for diagnostic RNA virus metagenomics from different animal clinical samples. Journal of Virological Methods [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2023 Nov 22];283:113916.
- [116] Monti DL, McPhail CW, Foksinska AM, Opsteen SA, Casey KN, Ali SY, et al. Corynebacterium phage Darwin, complete genome. Accession Number: MG198777.1. Genbank. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MG198777.1>
- [117] Sharma NC, Efstratiou A, Mokrousov I, Mutreja A, Das B, Ramamurthy T. Diphtheria. Nature Reviews Disease Primers [Internet]. 2019 Dec;5(1).
- [118] Fu M, Su H, Su Z, Yin Z, Jin J, Wang L, et al. Transcriptome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*-infected spleen of dairy goats. Microbial Pathogenesis. 2020 Oct;147:104370.
- [119] Galán JE. *Salmonella Typhimurium* and inflammation: a pathogen-centric affair. Nature Reviews Microbiology. 2021 May 19;
- [120] Antimicrobial resistance [Internet]. WOAHA - World Organisation for Animal Health. Available from: <https://www.woah.org/en/what-we-do/global-initiatives/antimicrobial-resistance/>
- [121] Voisset C, Blancher A, Perron H, Mandrand B, Mallet F, Paranhos-Baccala G. Phylogeny of a Novel Family of Human Endogenous Retrovirus Sequences, HERV-W,

in Humans and Other Primates. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 1999
Nov;15(17):1529–33.

8. APÊNDICES

8.1. Tabela com a concentração (em ng/ μ L) de cada amostra que compõe o Pool 1 e seu volume final no Pool.

Amostra	Concentração (ng/ μ L)	260/280	260/230	Volume para o Pool final de 766 ng
614	137,2	3,36	1,39	5,58
614A	129,4	3,28	3,32	5,92
615	151,1	3,38	0,8	5,07
615A	95,1	3,29	2,99	8,05
739A	76,6	3,31	1,74	10,00
779	86,5	3,34	1,31	8,86
779A	119,9	3,56	0,132	6,39
781	129,3	3,35	1,11	5,92
781A	131,4	3,37	2,34	5,83
800	142,7	3,32	2,36	5,37
800A	107,8	3,29	2,77	7,11

8.2. Tabela com a concentração (em ng/ μ L) de cada amostra que compõe o Pool 2 e seu volume final no Pool.

Amostra	Concentração (ng/ μ L)	260/280	260/230	Volume para o Pool final de 888 ng
739	125,4	3.320	2.494	7,08
744R	138,7	3.290	2.523	6,40
767	177,6	3.347	1.955	5,00
533A	126,0	3.440	0.296	7,05
755	146,7	3.442	0.375	6,05
756	161,8	3.293	2.423	5,49
756A	101,3	3.304	1.925	8,77
604	131,4	3.384	0.802	6,76
604A	161,7	3.348	2.659	5,49
605A	135,7	3.331	1.536	6,54
759A	95,5	3.368	0.837	9,30
758	180,3	3.339	1.869	4,93
758A	-5.858,0	4.838	0.049	-0,15
611	121,0	3.268	2.082	7,34
761A	142,6	3.360	2.462	6,23
764	105,4	3.298	2.293	8,43
774	123,0	3.338	2.659	7,22
774A	115,0	3.386	1.293	7,72
775	98,5	3.295	2.773	9,02
775A	93,7	3.299	2.145	9,48
617	121,5	3.311	2.282	7,31
617A	102,5	3.289	3.163	8,66
618	88,8	3.088	2.589	10,00
618A	99,1	3.215	1.833	8,96
616	122,6	3.332	2.079	7,24
616A	113,9	3.279	2.612	7,80

8.3. Tabela com a concentração (em ng/ μ L) de cada amostra que compõe o Pool 3 e seu volume final no Pool.

Amostra	Concentração (ng/μL)	260/280	260/230	Volume para o Pool final de 563 ng
777	84,3	3.276	2.460	6,68
777A	79,0	3.272	0.954	7,13
619	114,3	3.314	0.972	4,93
619A	101,2	3.318	0.932	5,56
620	86,9	3.321	1.137	6,48
620A	-6.235,0	3.608	0.052	-0,09
780	62,2	2.161	-8.809	9,05
780A	90,2	3.321	2.628	6,24
Mic	104,1	3.295	0.406	5,41
Mic A	114,3	3.486	0.126	4,93
776	80,2	3.326	0.701	7,02
778	109,2	3.327	1.311	5,16
778A	81,8	3.311	1.559	6,88
715	112,5	3.351	2.018	5,00
715A	130,9	3.307	2.594	4,30
621	118,7	3.315	2.631	4,74
621A	116,3	3.322	2.784	4,84
782	169,8	3.324	2.223	3,32
782A	133,5	3.288	3.020	4,22
623	92,2	3.311	2.632	6,11
623A	142,6	3.415	1.160	3,95
622	56,3	3.324	3.914	10,00
622A	78,9	3.293	2.532	7,14

8.4. Tabela de espécies de vírus e o número de *scaffolds* na classificação do *Kraken2* para o Pool 1.

Vírus	nº de scaffolds
Shamonda orthobunyavirus	2
Choristoneura fumiferana granulovirus	22
Agrotis segetum nucleopolyhedrovirus B	1
Proteus phage VB_PmiS-Isfahan	4
BeAn 58058 virus	11
Oxbow vírus	10
Enterobacteria phage P7	2
Enterobacteria phage f1	1
Escherichia phage DE3	2
Gammaretrovirus	1
Woolly monkey sarcoma virus	2
Serratia phage Muldoon	1

8.5. Tabela de espécies de vírus e o número de *scaffolds* na classificação do *Kraken2* para o Pool 2.

Vírus	nº de scaffolds
Choristoneura fumiferana granulovirus	14
Shamonda orthobunyavirus	1
Agrotis segetum nucleopolyhedrovirus B	1
Proteus phage VB_PmiS-Isfahan	6
Gammaretrovirus	1

BeAn 58058 virus	3
Woolly monkey sarcoma virus	2
Oxbow virus	10
Murine hepatitis vírus	1
Escherichia phage 500465-1	1
Escherichia phage DE3	1
Inovirus M13	1
Enterobacteria phage P7	1
Corynebacterium phage Darwin	1

8.6. Tabela de espécies de vírus e o número de *scaffolds* na classificação do *Kraken2* para o Pool 3.

Vírus	nº de scaffolds
Shamonda orthobunyavirus	1
Proteus phage VB_PmiS-Isfahan	6
Choristoneura fumiferana granulovirus	21
Gammaretrovirus	1
Oxbow virus	23
Felsduovirus	1
Woolly monkey sarcoma virus	1
Enterobacteria phage P7	2
BeAn 58058 virus	2
Snyder-Theilen feline sarcoma virus	1
Stx converting phage vB_EcoS_P27	1
Escherichia phage DE3	1
Pepper chlorotic spot virus	1
Corynebacterium phage Darwin	1

8.7. Tabela de espécies de vírus contendo ao menos 0,1% de cobertura de genoma segundo o software *Centrifuge* para o Pool 1

<i>Strain name</i>	<i># Reads</i>	<i>Depth of Coverage</i>	<i>NT Identity</i>	<i>AA Identity</i>	<i>genome Coverage (%)</i>
Baboon endogenous virus strain M7	42	3,019147084	0,920801	0,93913	13,5065
Pseudogymnoascus destructans partitivirus-pa (segment 1)	8	4	0,818713	0,87931	10,1665
Finkel-Biskis-Jinkins murine sarcoma virus	60	17,33564014	0,878893	0	7,58331
Avian myelocytomatosis virus	37	11,45177665	0,85567	0,907692	5,80778
Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus	23	2,272727273	0,994019	0,964286	2,79571
Abelson murine leukemia virus	2	1,357142857	0,904762	0,97619	2,13777
Traversvirus P27	280	46,08230453	0,755144	0,968553	0,789217
Streptococcus phage 20617	2	1,357142857	1	1	0,258197
Wadgaonvirus wv5004651	2	2	0,988372	1	0,219505
Coventryvirus SP441	2	1,476744186	0,77907	0,892857	0,202044

8.8. Tabela de espécies de vírus contendo ao menos 0,1% de cobertura de genoma segundo o software *Centrifuge* para o Pool 2

<i>Strain name</i>	<i># Reads</i>	<i>Depth of Coverage</i>	<i>NT Identity</i>	<i>AA Identity</i>	<i>genome Coverage (%)</i>
Harvey murine sarcoma virus	3	2,554455	0,861386	0,911765	10,1304
Finkel-Biskis-Jinkins murine sarcoma virus	40	8,759791	0,89295	0,95	10,0499
Murine hepatitis virus	48	2,132066	0,951928	0,92887	6,04928
Rat coronavirus	50	2,27043	0,909674	0,894737	5,9872
Baboon endogenous virus strain M7	21	4,4	0,898515	0,93985	4,93711

Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus	23	2,202475	0,996625	0,967672	2,97295
Avian myelocytomatosis virus	2	1,83871	0,860215	0,870968	2,74175
Moloney murine leukemia virus	3	2,406977	0,755814	0,928571	1,03217
Traversvirus P27	190	24,61392	0,738924	0,956731	1,02631
RD114 retrovirus	1	1	0,848837	0,892857	1,02308
Puma feline foamy virus	2	1,693069	0,990099	0,970588	0,867027
Streptococcus phage SMP	3	1,222749	0,781991	0,884058	0,585802
Enterococcus phage EF62phi	4	3,953488	1	1	0,281921
Streptococcus phage IPP54	5	5	0,918605	0,896552	0,22108
Streptococcus phage MM1	5	5	0,882353	0,857143	0,211191
Cyanophage KBS-P-1A	2	1,872093	0,860465	0,931034	0,18806

8.9. Tabela de espécies de vírus contendo ao menos 0,1% de cobertura de genoma segundo o *software* Centrifuge para o Pool 3

<i>Strain name</i>	<i># Reads</i>	<i>Depth of Coverage</i>	<i>NT Identity</i>	<i>AA Identity</i>	<i>genome Coverage (%)</i>
Ocimum basilicum RNA virus 2	125	17,45143	0,622857	0,6875	18,8578
Finkel-Biskis-Jenkins murine sarcoma virus	42	8,754098	0,868852	0,901961	8,00315
Ocimum basilicum RNA virus 2	24	11,62963	0,648148	0,666667	5,81897
Baboon endogenous virus strain M7	8	1,335456	0,859873	0,89899	5,53662
Abelson murine leukemia virus	6	1,535604	0,903427	0,962963	5,48015
Rat coronavirus	12	1,741197	0,943662	0,938462	1,8176
Desmodus rotundus endogenous retrovirus	2	1,04023	0,869822	0,910714	1,65951
Pestivirus G	3	1,38172	0,946237	0,920635	1,47596
Murine hepatitis virus	6	1,199531	0,955399	0,948052	1,36133
RD114 retrovirus	4	3,744186	0,813953	0,862069	1,02308

Squirrel monkey retrovirus	1	1	0,895349	0,928571	0,978941
Rous sarcoma virus	1	1	0,813953	0,896552	0,915673
Desmodus rotundus endogenous retrovirus	2	1,55814	0,860465	0,857143	0,820219
Traversvirus P27	101	16,93089	0,752033	0,957317	0,798961
Pestivirus A	1	1	0,976744	0,965517	0,684005
Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus	2	1	0,994152	0,964912	0,571849

8.10. Concentração em ng/μL e suas razões de pureza 260/280 e 260/230, mensuradas em Nanodrop (ThermoFisher Scientific) dos controles utilizados na padronização de protocolo de amplificação utilizando Primer SISPA.

Teste	Amostra	Obs.	Volume	Concentração (ng/ μL)	260/280	260/230
Teste 1	C+ SARS-CoV-2	-	2,5 μL	112,7	1,77	2,03
	C+ MHV-3	-	2,5 μL	167,4	1,80	2,11
	Pool 1	-	2,5 μL	243,1	1,89	2,00
Teste 2	C+1 48°C	48°C	2,5 μL	336,5	1,92	2,14
	C+2 48°C	48°C	5 μL	458,3	1,93	2,16
	C+1 54°C	54°C	2,5 μL	285,1	1,88	2,01
	C+2 54°C	54°C	5 μL	310,2	1,89	2,10
	C+1 60°C	60°C	2,5 μL	281,5	1,89	2,10
	C+2 60°C	60°C	5 μL	340,3	1,91	2,11
	C+1 65°C	65°C	2,5 μL	278,5	1,93	2,15
	C+2 65°C	65°C	5 μL	369,8	1,90	2,06
Teste 3	MHV-3	Sem MgCl ₂	2,5 μL	129,8	1,75	2,08
	MHV-3	Sem MgCl ₂	5 μL	1002,6	1,88	2,03
	MHV-3	Com MgCl ₂	2,5 μL	560,4	1,46	0,94
	MHV-3	Com MgCl ₂	5 μL	416,1	1,59	1,75
	SARS-CoV-2	Sem MgCl ₂	2,5 μL	173,5	1,74	2,10

SARS-CoV- ₂	Sem MgCl ₂	5 µL	428,1	1,76	2,04
SARS-CoV- ₂	Com MgCl ₂	2,5 µL	317,6	1,80	2,11
SARS-CoV- ₂	Com MgCl ₂	5 µL	1128,6	1,88	2,02



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 32486-4	Data da Emissão: 28/12/2013 11:38	Data para Revalidação*: 27/01/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, 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.		

Dados do titular

Nome: Fábio André Facco Jacomassa	CPF: 822.461.220-15
Título do Projeto: Restauração de processos ecológicos: a interação entre morcegos frugívoros e plantas e a dispersão de sementes em áreas restauradas	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA	CNPJ: 48.031.918/0018-72

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Campos para captura de morcegos	02/2012	04/2015

Observações e ressalvas

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 NAO exime 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 IBAMA nº 154/2007 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	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.
5	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 e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
6	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 .
7	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.

Outras ressalvas

1	As armadilhas de interceptação de voo (redes de neblina) deverão ser vistoriadas, no mínimo, a cada 30 minutos.
---	---

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	RIO CLARO	SP	47°28'41"O e 22°21'32"S; 47°32'40"O e 22°23'41"S;	Fora de UC Federal
2	COSMOPOLIS	SP	47°12'18"O e 22°40'16"S	Fora de UC Federal
3	IRACEMAPOLIS	SP	47°30'19"O e 22°34'09"S	Fora de UC Federal
4	SANTA BARBARA D'OESTE	SP	47°25'04"W 22°49'14"S	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Chiroptera
2	Marcação de animais silvestres in situ	Chiroptera

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 28682771





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 32486-4	Data da Emissão: 28/12/2013 11:38	Data para Revalidação*: 27/01/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, 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.		

Dados do titular

Nome: Fábio André Facco Jacomassa	CPF: 822.461.220-15
Título do Projeto: Restauração de processos ecológicos: a interação entre morcegos frugívoros e plantas e a dispersão de sementes em áreas restauradas	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA	CNPJ: 48.031.918/0018-72

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Rede de neblina
2	Método de marcação (Outros mamíferos)	Anel

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA	





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 32486-4	Data da Emissão: 28/12/2013 11:38	Data para Revalidação*: 27/01/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, 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.		

Dados do titular

Nome: Fábio André Facco Jacomassa	CPF: 822.461.220-15
Título do Projeto: Restauração de processos ecológicos: a interação entre morcegos frugívoros e plantas e a dispersão de sementes em áreas restauradas	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA	CNPJ: 48.031.918/0018-72

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 28682771





Autorização

Autorizamos os pesquisadores "Fábio André Facco Jacomassa, Pedro Henrique Miguel do Instituto de Biociências Campus da Unesp- Rio Claro, a desenvolverem atividades de campo na Floresta Estadual Edmundo Navarro de Andrade. Estas atividades fazem parte do Projeto de Pesquisa intitulado: "Frutos consumidos por morcegos Filostomídeos em área urbanizada" Processo SMA N^o. 260108 – 010.626/2013

Períodos de Trabalhos de Campo

Julho de 15 a 31, Agosto de 01 a 31, Setembro de 01 a 30, Outubro de 01 a 31, novembro de 01 a 30, e dezembro de 01 a 23 de 2014

Informamos que as seguintes regras deverão ser observadas:

- Em caso de acidente pessoal, a instituição idealizadora da aula de campo torna-se responsável pela ocorrência.
- Em Caso de Chuva, devido aos riscos que a Floresta possa oferecer, deverá ser agendada nova data para a realização do trabalho de campo.
- Os veículos deverão fazer uso do estacionamento, não sendo permitida a circulação e permanência de veículos na área de Uso Público.

Rio Claro, 17 de julho de 2014.



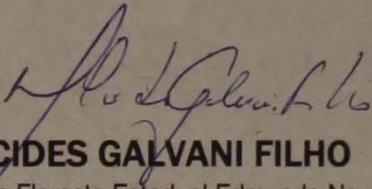
FUNDAÇÃO FLORESTAL



SERGIO RICARDO CRISTOFOLETTI

Pesquisador Científico V

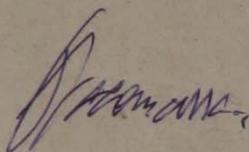
Coordenador do Programa de Pesquisa Científica-
FEENA-SMA



ALCIDES GALVANI FILHO

Gestor da Floresta Estadual Edmundo Navarro de
Andrade e Gerente do Interior da FF

Ciente



Fábio André Facco Jacomassa

COORDENADOR DO PROJETO



Autorização

Vimos autorizar a senhora **Vanessa Ferraz de Campos Bortolotti e Sr. Pedro Henrique Miguel** sob a orientação do Sr. Marco Aurelio Puzo Ferreira, tendo como titular o Sr. **Fábio André Facco Jacomassa**, da Universidade Estadual Paulista, a desenvolverem atividades de campo na Floresta Estadual Edmundo Navarro de Andrade. Estas atividades fazem parte do **Projeto de Pesquisa intitulado: "Frutos consumidos por morcegos Filostomídeos em área urbanizada. O período para desenvolvimento das atividades são:**

- Janeiro 20 a 31; Fevereiro 01 a 28; Março 01 a 31; abril 01 a 30 e Maio de 01 a 31 de 2015

Informamos que as seguintes regras deverão ser observadas:

- Em caso de acidente pessoal, a instituição idealizadora da aula de campo torna-se responsável pela ocorrência.
- Em Caso de Chuva, devido aos riscos que a Floresta possa oferecer, deverá ser agendada nova data para a realização do trabalho de campo.
- Os veículos deverão fazer uso do estacionamento, não sendo permitida a circulação e permanência de veículos na área de Uso Público.

Rio Claro, 23 de janeiro de 2015.


SERGIO RICARDO CHRISTOFOLETTI

Pesquisador Científico V

Coordenador do Programa de Pesquisa Científica



ALCIDES GALVANI FILHO

Floresta Estadual Edmundo Navarro de Andrade –
Gestor -FEENA/FF