

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TAMANHO CORPORAL  
NA DIVERSIDADE VIRAL DO TRATO  
GASTROINTESTINAL DE DUAS ESPÉCIES DE  
JARARACA: *Bothrops jararaca* (WIED, 1824) E *Bothrops*  
*sazimai* BARBO ET AL., 2016

**SOPHIA MENEZES DE AZEVEDO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

**ABRIL - 2025**



AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TAMANHO CORPORAL  
NA DIVERSIDADE VIRAL DO TRATO  
GASTROINTESTINAL DE DUAS ESPÉCIES DE  
JARARACA: *Bothrops jararaca* (WIED, 1824) E *Bothrops*  
*sazimai* BARBO ET AL., 2016

Sophia Menezes de Azevedo

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientador: Dr. Leandro de Oliveira Drummond  
Coorientadora: Dra. Mirela D'arc Ferreira da Costa

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

**ABRIL – 2025**

**FICHA CATALOGRÁFICA**

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

A994

Azevedo, Sophia Menezes de.

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TAMANHO CORPORAL NA DIVERSIDADE VIRAL DO TRATO GASTROINTESTINAL DE DUAS ESPÉCIES DE JARARACA : *Bothrops jararaca* (WIED, 1824) E *Bothrops sazimai* BARBO ET AL., 2016 / Sophia Menezes de Azevedo. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2025.

81 f. : il.

Bibliografia: 52 - 78.

Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2025.

Orientador: Leandro de Oliveira Drummond.

Coorientadora: Mirela D'Arc Ferreira da Costa.

1. Viroma. 2. *Bothrops jararaca*. 3. *Bothrops sazimai*. 4. metagenômica. 5. tamanho corporal. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 577

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TAMANHO  
CORPORAL NA DIVERSIDADE VIRAL DO TRATO  
GASTROINTESTINAL DE DUAS ESPÉCIES DE  
JARARACA: *Bothrops jararaca* (WIED, 1824) E *Bothrops  
sazimai* BARBO ET AL., 2016**

**SOPHIA MENEZES DE AZEVEDO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

**Aprovada em 03/02/2025**

**Banca examinadora:**



Documento assinado digitalmente  
**JORLAN FERNANDES DE JESUS**  
Data: 24/04/2025 12:05:41-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Dr. Jorlan Fernandes de Jesus –  
IOC/FIOCRUZ - UERJ



Documento assinado digitalmente  
**SELMA MARIA DE ALMEIDA SANTOS**  
Data: 16/04/2025 16:57:51-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Dra. Selma Maria de Almeida Santos – Instituto Butantan



Documento assinado digitalmente  
**KAROLINE CERON**  
Data: 22/04/2025 15:25:36-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Dra. Karoline Ceron - UFC



Documento assinado digitalmente  
**LEANDRO DE OLIVEIRA DRUMMOND**  
Data: 24/04/2025 11:40:26-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Dr. Leandro de Oliveira Drummond – UENF



Documento assinado digitalmente  
**MIRELA D'ARC FERREIRA DA COSTA**  
Data: 24/04/2025 13:03:47-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Dra. Mirela D'arc Ferreira da Costa – UFRJ

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Roberto e Rosaura que fizeram o possível e impossível para eu chegar até aqui e acreditarem imensamente na ciência assim como eu.

À minha irmã, Isis que sempre acreditou em mim e me auxiliou em todos os momentos da vida.

Aos meus amigos, Glenerson, Natália e Eloah que estão ao meu lado desde 2018 e permanecerão sempre.

Aos meus amigos, Matheus e Mariana que além de me receberem de braços abertos fizeram das minhas idas ao Rio prazerosas.

Aos meus amigos, João, Anna e Daniele por permanecerem ao meu lado no momento mais difícil da minha vida e lutarem junto comigo.

Aos meus colegas de campo, Lígia e Fabiano que me acompanharam nas expedições à Ilha dos Franceses.

Por fim, a cada um que dedicou o seu tempo para a leitura deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>xi</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1 Diversidade Viral e Metagenômica	14
1.2 Diversidade Viral Associada aos Répteis	17
1.3 Família Viperidae e o Gênero <i>Bothrops</i>	19
<b>2. OBJETIVO</b>	<b>23</b>
2.1 Objetivos Específicos	23
<b>3. HIPÓTESES</b>	<b>23</b>
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>24</b>
4.1 Área de estudo	24
4.2 Amostragem	26
4.3 Protocolo Viroma (HTS - sequenciamento de alto rendimento)	27
4.3.1 Preparação das Amostras e Enriquecimento Viral	27
4.3.2 Extração dos Ácidos Nucleicos	29
4.3.3 Síntese da Dupla Fita de DNAC	29
4.3.4 Purificação dos Ácidos Nucleicos	30
4.3.5 Quantificação dos <i>Pools</i>	31
4.3.6 Biblioteca de DNA	31
4.3.7 Purificação da Biblioteca de DNA	32
4.3.8 Avaliação e <i>Mix</i> das Bibliotecas de DNA	32
4.3.9 Corrida MiSeq v3	33
4.3.10 Análise e Interpretação de Dados	33
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>37</b>
5.1 Visão Geral do Sequenciamento	37
5.2 Curva de Rarefação	40

5.3 Riqueza e Famílias Virais	42
5.4 Padrões Ecológicos	42
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>45</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>51</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>52</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>79</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA – Ácido Desoxirribonucleico  
RNA – Ácido Ribonucleico  
COVID-19 – Coronavirus Disease 2019  
dNTPs – Desoxirribonucleosídeos trifosfato  
PCR – Polymerase Chain Reaction  
n – número de indivíduos amostrados  
pM – picomolar  
PB - Paraíba  
CRC – Comprimento Rostro-Cloacal  
CC – Comprimento Caudal  
LDDV – Laboratório de Diversidade e Doenças Virais  
UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro  
UENF – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy  
Ribeiro HTS – High-Throughput Sequencing  
DNAc – DNA complementar  
pb – Pares de base  
mm – Milímetro  
m<sup>2</sup> – Metro  
quadrado  
ml – Mililitro  
μL – Microlitro  
μm – Micrômetro  
mM – Milimolar  
nM – Nanomolar  
M – Molar  
ng/μL – Nanogramas por microlitro  
g – Forças gravitacionais  
NaOH – Hidróxido de sódio  
ES – Espírito Santo  
RJ – Rio de Janeiro

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses

UPGMA - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

HIV - Human Immunodeficiency Virus

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Indivíduos das espécies *B. jararaca* (A) e *B. sazimai* (B). Ambos os indivíduos foram amostrados no estudo. O indivíduo A (V\$51), um juvenil de *B. jararaca* foi coletado em Nova Friburgo (RJ). O indivíduo B (V\$4), um adulto de *B. sazimai* foi coletado na Ilha dos Franceses (ES). 25

**Figura 2** – Municípios e localidades de captura das espécies amostradas no estudo. 25

**Figura 3** – Fluxograma retirado de Braga *et al.*, 2017. Os Elementos da Estrutura de Metacomunidades estão representados pelos losangos. As setas se referem aos valores obtidos em cada um dos Elementos (positivo, negativo, não significativo (NS) e os valores do Índice de Morisita). As esferas mostram o tipo de estrutura formada a partir das etapas anteriores. 36

**Figura 4** – Gráfico interativo do *Krona* com as porcentagens de cada domínio que foram classificados em um dos *pools* avaliados no presente trabalho (Bjar 1). 39

**Figura 5** – Gráfico interativo do *Krona* com as porcentagens de *reads* virais que foram classificados em um dos *pools* avaliados no presente trabalho (Bjar 1). 40

**Figura 6** – Curva de rarefação de cada biblioteca amostrada. 41

**Figura 7** – Relação entre o tamanho médio dos indivíduos por *pools* e a riqueza viral. A) Representa a correlação de ambas as espécies. B) Representa a correlação entre os indivíduos de *B. jararaca*. C) Representa a correlação entre os indivíduos de *B. sazimai*. 43

**Figura 8** – Cluster de dissimilaridade de *Jaccard* 44

**Figura 9** – Estrutura de metacomunidade observada para as espécies de *B. jararaca* e *B. sazimai*. 45

**ANEXO A** – Número de *reads* classificadas e não classificadas (*No hits*) pelo

*Kraken2*, em cada uma das bibliotecas.

79

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Composição dos pools das amostras de *B. jararaca* e *B. sazimai*, com o código de cada *pool*, identificação das amostras individuais bem como sexo, Comprimento Rostro-Cloacal (CRC) (mm), Comprimento Caudal (CC) (mm) e os locais de coleta de *B. jararaca*, apresentados em siglas (Nova Friburgo (NF), Silva Jardim (SJ), Rio das Ostras (RO), Casimiro de Abreu (CA) e Armação de Búzios (B)). 28
- Tabela 2** – Relação de leituras, classificações e riqueza de famílias virais de cada uma das bibliotecas sequenciadas. 38
- Tabela 3** – Valores de média ( $\bar{x}$ ), desvio padrão (d.p), mínimo e máximo de cada um dos grupos classificados pela ferramenta *Kraken2*. 40
- Tabela 4** – Valores de coerência, substituição de espécies (*turnover*) e coincidência de limites. 45
- ANEXO B** – Número de *contigs* classificadas em cada família por biblioteca acompanhadas de seus hospedeiros. 80

## RESUMO

Compreender a diversidade viral existente é uma parte importante da virologia e conservação do hospedeiro. Com novas ferramentas de metagenômica, como o sequenciamento de alto rendimento (HTS), é possível sequenciar genomas virais conhecidas e desconhecidas, contribuindo assim para o enriquecimento do banco de dados viral. Além disso, compreender a diversidade viral (viroma) acerca de sistemas e indivíduos, impulsiona estudos que buscam vírus potencialmente zoonóticos. Em alguns grupos de animais, como os répteis, os estudos de viroma são escassos. Neste trabalho, analisamos o viroma de duas espécies de jararaca usando o método de HTS. *Bothrops jararaca*, distribuída amplamente na Mata Atlântica (ocupando ambientes mais intrincados e diversificados), exibe variação ontogenética em sua dieta. Por outro lado, a *Bothrops sazimai*, uma espécie insular restrita à Ilha dos Franceses (ambiente menos complexo), localizada no município de Itapemirim, no estado do Espírito Santo, não apresenta indícios de variação ontogenética em sua alimentação. Com isso, amostras de *swab* cloacal foram utilizadas para avaliar como a faixa etária e a espécie levam a mudanças na composição viral do trato gastrointestinal a nível de família. Ao final da análise de HTS foram obtidas 20 famílias virais. Majoritariamente, o viroma foi composto por famílias de bacteriófagos e algumas famílias que infectam vertebrados. Por fim, não foi observada relação entre a riqueza viral e as espécies de serpente. A riqueza de famílias virais variou negativamente com o aumento do tamanho corporal dos indivíduos em ambas as espécies. Esse é o primeiro estudo que investiga o viroma gastrointestinal de *B. jararaca* e *B. sazimai*.

**Palavras-chave:** Viroma, *Bothrops jararaca*, *Bothrops sazimai*, metagenômica, tamanho corporal

## ABSTRACT

Understanding existing viral diversity is an important part of virology and host conservation. With new metagenomic tools, such as high-throughput sequencing (HTS), it is possible to sequence both known and unknown viral genomes, thereby contributing to the enrichment of viral databases. Moreover, understanding viral diversity (virome) in systems and individuals drives studies that seek potentially zoonotic viruses. In some animal groups, such as reptiles, virome studies are scarce. In this study, we analyzed the virome of two *Bothrops* species using HTS. *Bothrops jararaca*, which is widely distributed throughout the Atlantic Forest (occupying more intricate and diverse environments), exhibits ontogenetic variation in its diet. On the other hand, *Bothrops sazimai*, an island species restricted to Ilha dos Franceses (a less complex environment), located in the municipality of Itapemirim, in the state of Espírito Santo, shows no evidence of ontogenetic variation in its feeding habits. Cloacal swab samples were used to assess how age class and species influence changes in the viral composition of the gastrointestinal tract at the family level. At the end of the HTS analysis, 20 viral families were identified. The virome was mostly composed of bacteriophage families, along with some families that infect vertebrates. Finally, no relationship was observed between viral richness and snake species. Viral family richness varied negatively with increasing individual body size in both species. This is the first study to investigate the gastrointestinal virome of *B. jararaca* and *B. sazimai*.

**Keywords:** Virome, *Bothrops jararaca*, *Bothrops sazimai*, metagenomic, body size.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Diversidade Viral e Metagenômica

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios que dependem inteiramente de uma célula hospedeira para iniciar seu ciclo replicativo e, sucessivamente, sua infecção. Este grupo possui grande influência em uma gama de ambientes, podendo influenciar inclusive em processos ecossistêmicos de larga escala (Grozinger & Flenniken, 2019). Até o momento, os vírus são classificados em 314 famílias, totalizando 14.690 espécies (ICTV, 2023).

Vírus são as entidades biológicas mais diversas, possuindo uma estrutura simples composta por ácidos nucleicos envoltos por um capsídeo composto por proteínas (Chaitanya, 2019; Li *et al.*, 2019). Os vírus são classificados desde 1971 pela classificação de Baltimore, uma classificação didática que leva em consideração as características do ácido nucleico (DNA e/ou RNA), estrutura do material genético (fita simples ou dupla) e possibilidade de transcrição reversa (Baltimore, 1971). Em 2023, os vírus passaram a ser classificados taxonomicamente com a nomenclatura binominal (gênero + epíteto específico) pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV, do inglês *International Committee on Taxonomy of Viruses*), assim como os demais grupos taxonômicos (Zerbini *et al.*, 2023), sendo avaliados de acordo com a relação filogenética entre eles (Simmonds *et al.*, 2023).

Apenas uma pequena fração da diversidade viral é conhecida, devido às dificuldades metodológicas históricas no estudo do grupo (Oliveira, 2019; Reyes *et al.*, 2012). Inicialmente, o cultivo em laboratório desempenhou um papel fundamental para o estudo básico dos vírus, sendo o principal método de pesquisa nesta área por dois séculos. Entretanto, os cientistas foram confrontados com a existência de organismos que provocavam doenças em seres humanos e que se mostraram um grande desafio para serem cultivados em laboratório (Handelsman, 2004; Simon & Daniel, 2011; Oldstone, 2014). A introdução de ferramentas como a microscopia de epifluorescência e a microscopia eletrônica de transmissão representou um marco nos estudos da virologia, pois viabilizou a observação dos patógenos, o que permitiu a análise detalhada da morfologia e da abundância dos vírus em diferentes ecossistemas e organismos (Weinbauer e Suttle, 1997; Vale *et al.*, 2010). A partir de 1964, a



metodologia do sequenciamento surgiu, impulsionando Frederick Sanger em 1977 a descrever o genoma de um bacteriófago, vírus que infecta bactéria (Barba *et al.*, 2014). A técnica utilizada por Sanger para o sequenciamento deste vírus foi nomeada como “Sequenciamento de Sanger” e consiste na parada da síntese pela DNA polimerase devido a adição de um didesoxinucleotídeo trifosfato (ou seja, sem a 3'-OH em um dos carbonos da ribose). Além disso, os fragmentos de DNA eram marcados radioativamente para que após o processamento pudessem ser separados por eletroforese e a sequência analisada (Men *et al.*, 2008; Sanger *et al.*, 1977).

Por mais de 30 anos, o método de Sanger foi a técnica predominante para sequenciamento de genomas. No entanto, esse método tinha suas limitações, sendo restrito a regiões de interesse menores, o que impossibilitava o sequenciamento simultâneo de regiões mais extensas ou múltiplas regiões dentro do mesmo genoma (Kumar *et al.*, 2019). Há cerca de 20 anos, o desenvolvimento do “sequenciamento de alto rendimento” (HTS, do *inglês High-Throughput Sequencing*), uma ferramenta da metagenômica que consiste na obtenção de um alto número de sequências produzidas simultaneamente, tem levado à caracterização viral de forma mais ampla e rápida (Tucker *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012), aumentando o conhecimento da diversidade viral através da análise de metagenômica (David *et al.*, 2021; Silva, 2021). A metagenômica é uma área da genômica que consiste em caracterizar o material genético presente em comunidades microbianas complexas de amostras biológicas, enquanto a genômica convencional caracteriza o genoma de um único organismo. A metagenômica, acoplada às ferramentas de bioinformática, produzem dados que são analisados a partir das sequências obtidas pelo sequenciamento (Riesenfeld *et al.*, 2004; Thurber *et al.*, 2009). Essa ferramenta permite que diversos conceitos sejam explorados como a diversidade, dinâmica e especificidade dessa microbiota e suas aplicações no ramo da biotecnologia.

A metagenômica combinada com a virologia, equivale à metagenômica viral, o estudo do viroma. O viroma corresponde ao estudo de, virtualmente, todo o material genético viral presente em uma determinada amostra de um indivíduo ou população, e propõe enriquecer o banco de dados a respeito da diversidade viral e contribuir para o desenvolvimento de pesquisas relacionadas à evolução

de vírus e à transmissão viral entre as diversas espécies de organismos (Roux *et al.*, 2019; Santiago-Rodriguez & Hollister, 2019; Virgin, 2014). Porém, ainda é bastante custoso o acesso aos equipamentos requeridos e há a necessidade de conhecimento aprofundado acerca das técnicas e programas envolvidos no processo, o que ainda dificulta o pleno desenvolvimento da metagenômica viral (Bhukya & Nawadkar, 2018; Rose *et al.*, 2016).

A metagenômica viral sequencia genomas de vírus, sendo eles conhecidos ou não em um hospedeiro. Essa metodologia permite identificar não apenas vírus patogênicos, mas também vírus que até o momento não apresentam patogenecidade associada ao organismo estudado. Além disso, a metagenômica possui grande importância na saúde pública, pois é capaz de caracterizar vírus potencialmente zoonóticos, mesmo em indivíduos assintomáticos (Haagmans *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2008; Smits & Osterhaus, 2013). Em termos de conservação, a aplicação da metagenômica é essencial, já que as espécies silvestres estão suscetíveis às infecções virais que, se não controladas, podem causar declínios populacionais (Bacandritsos *et al.*, 2010; Pruvot *et al.*, 2020; Teacher *et al.*, 2010). Isso é crítico para espécies endêmicas e pequenas populações de espécies, que correm risco de extinção (Earl & Gray, 2014; Gilbert *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2018).

A análise do viroma de um organismo depende primeiramente do objetivo da investigação para que seja possível definir a técnica de amostragem, como qual material deve ser coletado, o foco da amostragem e o processamento da amostra. Sangue, órgãos, fezes e *swabs* (orais/cloacais/anais) são alguns tipos de amostras utilizadas na metagenômica viral (Guo *et al.*, 2023; Shan *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2023). Para o estudo do viroma gastrointestinal, por exemplo, é possível utilizar amostras de fezes e *swab* cloacal/anal, duas formas de amostragem eficazes e não invasivas de investigar os patógenos associados ao trato digestivo e à dieta do organismo. Adicionalmente, vírus associados às presas já foram encontrados em seus respectivos predadores, tornando possível a investigação da composição da dieta dos hospedeiros analisados (Li *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2021a; Wille *et al.*, 2020). A microbiota gastrointestinal é formada por uma gama de bactérias e vírus que tendem a permanecer nos órgãos, em simbiose com o organismo (Santiago-Rodriguez & Hollister, 2019;

Stumpf *et al.*, 2016; Tiamani *et al.*, 2022). No entanto, diversas enterites podem ocorrer em caso de infecção por patógenos, causando uma disbiose (desequilíbrio da microbiota gastrointestinal) (Cristofori *et al.*, 2021). A análise do viroma é uma boa opção para identificar o patógeno, acelerando o tratamento e auxiliando na prevenção de possíveis doenças ou surtos epidemiológicos.

## 1.2 Diversidade Viral Associada aos Répteis

Os estudos avaliando viromas têm focado principalmente em vírus associados aos mamíferos devido à proximidade filogenética desses animais com os humanos, o que favorece o transbordamento zoonótico (D'arc *et al.*, 2015; D'arc *et al.*, 2020; Schrago & Barzilai, 2021). Contudo, o fenômeno também pode ser observado entre humanos e outros grupos faunísticos (Harvey & Holmes, 2022). Nos últimos tempos, o número de pesquisas sobre vírus associados a répteis têm aumentado, principalmente devido aos indícios de que esse grupo pode ser hospedeiro de vírus capazes de infectar humanos, como o vírus da Chikungunya (*Alphavirus*) (Bosco-Lauth *et al.*, 2018; Marschang, 2011). Diversos grupos de vírus foram descritos como infectantes de uma ampla variedade de répteis, tais como poxvírus na tartaruga-verde *Chelonia mydas* (Sarker *et al.*, 2021), *Ranavírus* no lagarto *Sceloporus undulatus* (Goodman *et al.*, 2018) e herpesvírus na serpente *Opheodrys vernalis* (Lovstad *et al.*, 2019). O estudo realizado em *C. mydas* observou um animal doente, com diversas lesões e mortalidade associadas à infecção viral. Já a análise que detectou ranavírus em *S. undulatus*, amostrou indivíduos aparentemente saudáveis, mas que testaram positivo para um vírus do gênero *Ranavírus*, vírus patogênicos que infectam peixes, répteis e anfíbios. No caso de *O. vernalis*, o estudo relacionou a presença de carcinomas orais vistos nos indivíduos com infecção por herpesvírus.

O entendimento acerca da diversidade e da dinâmica viral está intimamente relacionado com a compreensão a respeito da transmissão viral entre os hospedeiros. O termo “*spillover*” (transbordamento) caracteriza a transmissão viral entre hospedeiros de espécies diferentes. A transmissão pode ocorrer através da ingestão direta ou indireta do organismo infectado, por contato com mucosa e sangue infectados, aerossóis e superfícies infectadas (Alexander *et al.*, 2018; Becker *et al.*, 2019; Lo *et al.*, 2019). O transbordamento

é facilitado entre espécies que detêm alguma proximidade filogenética entre si (Park, 2019). No entanto, fatores como condições ambientais e adaptações do vírus ao novo hospedeiro permitem que o transbordamento também ocorra em espécies filogeneticamente distantes (Parrish *et al.*, 2008; Walker *et al.*, 2018). Outro fator que influencia na capacidade de transmissão de um vírus a um novo hospedeiro é a alta taxa de mutação, que, na maioria das vezes, confere ao vírus altas taxas evolutivas quando alinhadas a outros fatores determinantes dentro do hospedeiro. As mutações desenvolvidas podem facilitar a capacidade de um vírus de evadir o sistema imunológico, desenvolver resistência a antivirais ou adaptação à uma nova espécie hospedeira (Stern & Andino, 2016; Peck & Lauring, 2018).

No transbordamento zoonótico, um vírus comumente encontrado em um hospedeiro animal passa a infectar e causar doenças em um novo hospedeiro animal, incluindo o humano (Santana, 2020). Aproximadamente 75% das doenças infecciosas emergentes em humanos são de origem zoonótica (Slingenbergh *et al.*, 2004), podendo causar impactos sociais e econômicos, como: a COVID-19, causada por um coronavírus (Mishra *et al.*, 2021); a dengue, causada por um flavivírus (Choumet & Desprès, 2015); e a encefalite equina oriental, causada por um arbovírus (Corrin *et al.*, 2021).

Além de avaliar possíveis zoonoses, é importante considerar o risco de declínio populacional e lesões substanciais causadas por vírus. O declínio populacional é mais preocupante em espécies endêmicas, como observado no cágado *Myuchelys georgesi*, uma espécie endêmica de uma região da Austrália, em que um nidovírus causou uma redução significativa em sua população (Zhang *et al.*, 2018). O estudo analisou tecidos dos indivíduos coletados, que foram submetidos à histopatologia, isolamento viral e HTS. Os resultados revelaram lesões nos tecidos analisados e infecção viral por nidovírus. Infecções virais podem ainda ocasionar lesões importantes em répteis como necrose fibrinóide (necrose do tecido por acúmulo de fibrina) (Dervas *et al.*, 2020), lesões no trato respiratório (Stenglein *et al.*, 2014), tumores (Eleni *et al.*, 2017) e desencadear doenças subsequentes, como pneumonia (Dervas *et al.*, 2017) e câncer (Orós *et al.*, 2004).

Além dos impactos evidentes mencionados, as viremias desempenham um papel significativo como causadoras de mortes por patógenos em criadouros de répteis e zoológicos (Argenta *et al.*, 2020; Hoon-Hanks *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2014). Isso impacta fortemente no comércio de *pets* “não-convencionais”, um ramo que vem crescendo nos últimos tempos, uma vez que pode levar à mortalidade de animais cativos e à transmissão zoonótica de patógenos aos tutores/cuidadores e vice-versa. Nos zoológicos, por exemplo, a infecção pode se alastrar para outros setores resultando em uma epidemia local (De Voe *et al.*, 2004; Jacobson *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 2003; Varga-Kugler *et al.*, 2023).

Desde a década de 60, as serpentes têm recebido atenção em estudos virais, com um crescimento contínuo no número dessas pesquisas (Ahne *et al.*, 1987; Gebhardt & Hill, 1960; Hepojoki *et al.*, 2015; Johnsrude *et al.*, 1997; Khalfi *et al.*, 2024; Lunger *et al.*, 1974; Wellehan Jr. *et al.*, 2008). Entre os répteis, o grupo das serpentes (Squamata; Ophidia) apresenta uma diversidade particularmente alta com 4.108 espécies descritas distribuídas por 30 famílias (Uetz *et al.*, 2024). Embora nos últimos anos o número de estudos avaliando a diversidade viral associado ao grupo tenha crescido, ainda existe uma lacuna a ser preenchida na literatura a respeito de análises metagenômicas com este grupo. A família Viperidae, a terceira mais diversa com 396 espécies descritas (Uetz *et al.*, 2024), é um exemplo do reflexo da escassez de estudos relacionados à metagenômica viral nos ofídios. Até o momento apenas um estudo (Liu *et al.*, 2023) aborda a temática com uma espécie de viperídeo. No entanto, grande parte dos estudos encontrados utilizam métodos convencionais (PCR, sorologia, microscopia eletrônica...) para o diagnóstico de patógenos virais (Jacobson *et al.*, 1981; Kolesnikovas *et al.*, 2006; Leineweber & Marschang, 2023; Piskurek & Okada, 2007; Potgieter *et al.*, 1987;).

### **1.3 Família Viperidae e o Gênero *Bothrops***

Os indivíduos da família Viperidae estão amplamente distribuídos em grande parte das áreas tropicais e temperadas do globo (Terrible *et al.*, 2009). Essa família possui como característica particular as presas inoculadoras de peçonha retráteis e ocas (solenóglifas), sendo esse grupo responsável pela maior incidência de acidentes ofídicos no Brasil (Campbell & Lamar, 2004;

Malague & Gutiérrez, 2016). Dentro dessa família, o gênero *Bothrops* compreende um grupo monofilético de serpentes neotropicais popularmente conhecidas no Brasil como jararacas. Este grupo habita desde a América Central (México) até o território da América do Sul (Campbell & Lamar, 2004; Wüster *et al.*, 2002). Segundo Wüster *et al.* (2002), o ancestral comum das espécies do gênero *Bothrops* foi o primeiro viperídeo a colonizar a América do Sul no Mioceno (entre 10-23 milhões de anos atrás). Assim, ancestrais do gênero colonizaram inicialmente um território sem outros viperídeos para ocupar e expandir seu nicho. Além disso, segundo Cadle (1985) e Cadle & Greene (1993), a América do Sul era primariamente colonizada por colubrídeos e bóídeos, e os viperídeos não contemplavam a dieta desses dois grupos, favorecendo a dispersão do gênero *Bothrops* pelo continente.

Espécies do gênero *Bothrops* podem ser encontradas em diferentes habitats (terrestres, arborícolas e semi-arborícolas). O gênero passou a ocupar a maior parte das ecorregiões neotropicais, desde florestas tropicais e subtropicais até regiões áridas e semiáridas, e desde ilhas e regiões de baixada até cerca de 3.000 metros de altitude (Campbell & Lammar, 2004; Araújo & Martins, 2006; Carrasco *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2002). A grande preferência de habitats ocupados está ligado também às variações morfológicas, como tamanho do corpo e da cauda, e ecológicas, como preferência de presas e períodos reprodutivos (Lillywhite & Henderson, 1993; Martins *et al.*, 2001). Em relação a dieta dos indivíduos que compõem esse grupo é de conhecimento que em algumas espécies ocorra uma variação, com juvenis e adultos apresentando diferentes preferências de presas. Além disso, o gênero é conhecido por apresentar a maioria das suas espécies com dieta generalista e algumas com dieta especialista (Silva *et al.*, 2017; Martins *et al.*, 2002).

No Brasil, o gênero está presente em todos os biomas ocupando uma ampla variedade de ecossistemas terrestres (Furtado, 2007; Martins *et al.*, 2001). No país ocorrem 31 espécies do gênero *Bothrops* (Guedes *et al.*, 2023), compreendendo tanto espécies continentais quanto insulares, que se diferenciam de acordo com o isolamento geográfico, resultando em diferenças morfológicas e moleculares (Barbo *et al.*, 2016; Grazziotin *et al.*, 2006). De

acordo com as filogenias mais recentes, o gênero é composto por seis grupos monofiléticos de espécies – grupo de *Bothrops alternatus*, grupo de *Bothrops atrox*, grupo de *Bothrops jararacussu*, grupo de *Bothrops taeniatus*, grupo de *Bothrops jararaca* e grupo de *Bothrops neuwiedii* – além de várias espécies não associadas a nenhum grupo atualmente (Fenwick *et al.*, 2009). O grupo *Bothrops jararaca* se distribui ao longo da Mata Atlântica Brasileira e em diversas ilhas continentais (Barbo *et al.* 2022.) Atualmente, o grupo é formado por duas espécies continentais – *Bothrops jabrensis* Barbo *et al.*, 2022 e *Bothrops jararaca* – e cinco espécies com distribuições restritas a ilhas – *Bothrops alcatraz* Marques *et al.*, 2002, *Bothrops germanoi* Barbo *et al.*, 2022, *Bothrops insularis* (Amaral, 1922), *Bothrops otavioi* Barbo *et al.*, 2012 e *Bothrops sazimai* (Grazziotin *et al.*, 2006).

As espécies insulares são provenientes do isolamento de populações continentais em ilhas criadas pelas flutuações do nível do oceano durante a transição entre o Pleistoceno e Holoceno, resultando em especiação decorrente de acúmulos de diferenças genéticas, morfológicas e ecológicas ao longo do tempo (Banci, 2023; Marques, 2021; Marques *et al.*, 2002a). Um fator notável nas diferenças entre espécies de *Bothrops* insulares e continentais é o tamanho corporal. É possível observar, por exemplo, que as espécies de *Bothrops* insulares são comumente menores do que as espécies continentais (Marques *et al.*, 2002b). Boback & Guyer (2003) compararam o tamanho corporal de serpentes em ilhas e continentes e correlacionando diversas causas para o possível nanismo em espécies insulares. Fatores como a disponibilidade de presas e a área total da ilha foram identificados como influências diretas nas alterações no tamanho corporal dos animais insulares.

A espécie *B. jararaca* é distribuída amplamente pela Mata Atlântica com hábitos predominantemente noturnos e terrestres, sendo mais ativas nos meses mais quentes e chuvosos (Barbo *et al.*, 2011; Campbell & Lamar, 2004; Salomão *et al.*, 1997; Sazima, 1992). A espécie apresenta variação ontogenética em sua dieta: os juvenis se alimentam de presas ectotérmicas (principalmente anuros e lagartos); enquanto os adultos se alimentam de presas endotérmicas (principalmente pequenos roedores) (Hartmann *et al.*, 2003; Sazima & Haddad, 1992; Sazmia, 1992). Os jovens de *B. jararaca* utilizam frequentemente os

córregos para forragear devido a predominância de anuros em sua dieta. Além disso, podem buscar abrigo em vegetações próximas, contrastando com os adultos da espécie que não recorrem às vegetações (Hartmann *et al.*, 2003; Sazima & Haddad, 1992). Os indivíduos juvenis da espécie apresentam a ponta da cauda com coloração contrastante ao do restante do corpo e utilizam tal variação como estratégia de predação a fim de mimetizar invertebrados para atrair suas presas potencialmente consumidoras desses animais (Martins *et al.*, 2002; Sazima, 1992).

A espécie *B. sazimai* é endêmica da Ilha dos Franceses, localizada no município de Itapemirim no estado do Espírito Santo e dados recentes indicam que é a espécie que sofreu o processo de insularização mais recente dentro do grupo de *B. jararaca* (Barbo *et al.* 2022). As únicas informações disponíveis até o momento sobre sua morfologia e ecologia são aquelas presentes em sua descrição (Barbo *et al.*, 2016). A espécie é similar a *B. jararaca*, mas apresenta algumas diferenças morfológicas como menor tamanho corporal, olhos maiores e cauda relativamente mais comprida. Além disso, possui maior atividade nos períodos crepuscular e noturno, sendo encontradas tanto no solo quanto em porções baixas de árvores e arbustos. Durante o estudo de descrição de *B. sazimai*, o conteúdo estomacal de 26 indivíduos, adultos e juvenis da espécie foram avaliados e apenas presas ectotérmicas foram registradas. As presas mais frequentes (n=17) foram as lagartixas: *Gymnodactylus darwinii*, *Hemidactylus mabouia* (espécie invasora comum na ilha), seguido por lacraias da ordem Scolopendromorpha (n=6) e um indivíduo da própria espécie. O encontro de presas ectotérmicas no conteúdo estomacal de juvenis e adultos sugere que não ocorra variação ontogenética na dieta da espécie (Barbo *et al.*, 2016). Os indivíduos juvenis de *B. sazimai* apresentam variação morfológica na coloração da cauda assim como ocorre em *B. jararaca*, no entanto, a coloração possui um tom mais amarelado (Barbo *et al.*, 2016). Pelo endemismo da espécie, *B. sazimai* foi definida como espécie criticamente em perigo de extinção segundo o decreto Nº 5237-R, estabelecido pelo Governo do Estado do Espírito Santo em 2022.

Apesar de as dessas espécies apresentarem uma estreita relação filogenética, características como a variação ontogenética relacionada à faixa etária dos indivíduos, o ambiente onde esses animais estão inseridos, como



esses animais ocupam esses ambientes e as diferenças genéticas e morfológicas entre as duas espécies reforçam a possibilidade de haver uma diferença na composição viral, tanto entre as espécies, quanto entre indivíduos da mesma espécie (juvenis e adultos). Os vírus têm sido associados a declínios populacionais de répteis (Bower *et al.*, 2018; Marschang *et al.*, 2021), trazendo risco para a biodiversidade do grupo. Assim, o conhecimento e monitoramento da diversidade viral nesse grupo são importantes do ponto de vista tanto epidemiológico quanto da conservação.

## 2. OBJETIVO

Avaliar a diversidade viral presente em amostras de *swab* cloacal de duas espécies do gênero *Bothrops*, *B. jararaca* (continental) e *B. sazimai* (insular), testando a influência da faixa etária e do hábito alimentar na composição viral.

### 2.1 Objetivos Específicos

- a. Caracterizar a diversidade viral, por meio da técnica de metagenômica viral (viroma) usando HTS, presente em amostras de *swab* cloacal de duas espécies de *Bothrops*, *B. jararaca* (continental) e *B. sazimai* (insular);
- b. Analisar comparativamente a modulação da faixa etária e do hábito alimentar na composição viral nestas espécies.

## 3. HIPÓTESES

1. A maior diversidade viral será encontrada nas amostras de *B. jararaca*, visto que está inserida em um ambiente mais complexo e com maior diversidade de presas;
2. Ocorrerá uma variação na composição viral entre juvenis e adultos de *B. jararaca*, em razão da variação ontogenética dos hábitos alimentares. O mesmo não ocorrerá para *B. sazimai*;
3. Uma maior riqueza de famílias virais será vista em indivíduos adultos, quando comparados aos indivíduos jovens de uma mesma espécie, devido ao maior tempo de exposição ao ambiente e interações entre diferentes hospedeiros

virais.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Área de Estudo

Indivíduos de *B. jararaca* (**Figura 1A**) foram amostrados dentro de Unidades de Conservação, como o Parque Ecológico Mico Leão Dourado (município de Silva Jardim), a Reserva Biológica União (municípios de Casimiro de Abreu e Rio das Ostras), a Reserva Biológica de Poço das Antas (municípios de Silva Jardim e Casimiro de Abreu) no estado do Rio de Janeiro (**Figura 2**). A região amostrada é formada por Floresta Ombrófila Densa Submontana e de Baixada (Carvalho *et al.*, 2008). Indivíduos da espécie também foram amostrados fora das Unidades de Conservação, nos municípios de Armação dos Búzios e Nova Friburgo (**Figura 2**). O município de Armação dos Búzios possui vegetação caracterizada como Floresta Estacional, Mata de Restinga e vegetação antrópica (Dantas *et al.*, 2009). A vegetação do município de Nova Friburgo é formada por Floresta Ombrófila Densa Montana (Cortines *et al.*, 2011).

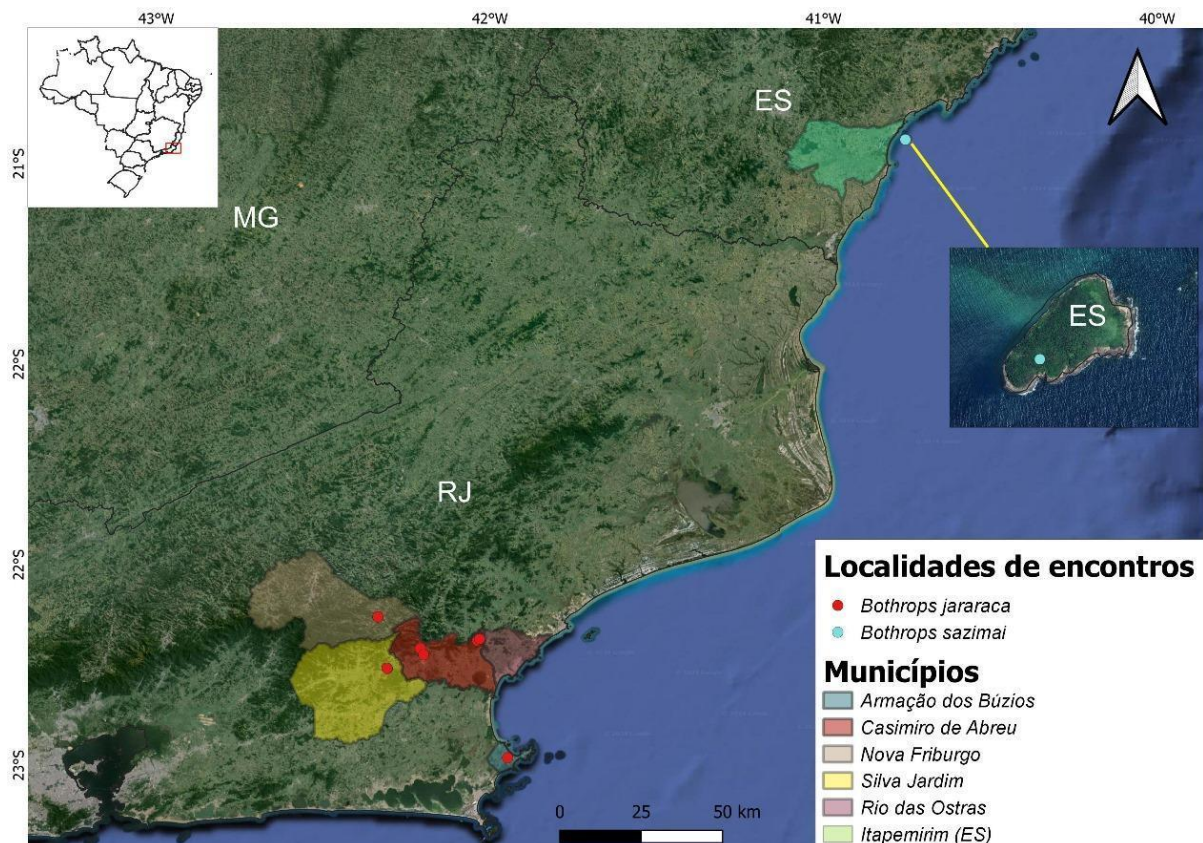
Indivíduos de *B. sazimai* (**Figura 1B**) foram amostrados na Ilha dos Franceses, situada no município de Itapemirim, no estado do Espírito Santo (**Figura 2**). A ilha abrange uma área de 155.926 metros quadrados (m<sup>2</sup>) cobertos pelas seguintes formações vegetais: arbustiva (34%), formação florestal (35%), rupestre (12%), mata de leucenas (13%), poça de maré (<1%), regiões antropizadas (1%) e taquaral (5%). A vegetação antropizada é formada por espécies invasoras e clareiras, observadas nas áreas de trilhas para o farol da ilha e em áreas de visitas turísticas não fiscalizadas. Além disso, as formações de taquaral e de matas de leucena são formações compostas predominantemente por sucessão ecológica dominada por plantas exóticas, ressaltando uma degradação histórica na ilha (Ferreira *et al.*, 2007).

**Figura 1.** Indivíduos das espécies *B. jararaca* (A) e *B. sazimai* (B). Ambos os indivíduos foram amostrados no estudo. O indivíduo A (V\$51), um juvenil de *B. jararaca* foi coletado em Nova Friburgo (RJ). O indivíduo B (V\$4), um adulto de *B. sazimai* foi coletado na Ilha dos Franceses (ES).



Fonte – Azevedo, S.M., 2022.

**Figura 2.** Municípios e localidades de captura das espécies de serpentes amostradas no estudo.



Fonte – QGIS, 2022.

## 4.2 Amostragem

Indivíduos de *B. sazimai* foram amostrados em busca ativa crepuscular e noturna na Ilha dos Franceses em três campanhas realizadas em setembro/2022, março/2023 e fevereiro/2024, com duração de quatro dias cada. Os animais capturados foram sexados, medidos e soltos. Já os indivíduos de *B. jararaca* foram coletados em oito campanhas entre 2022 e 2023, com duração de sete dias, realizadas nas Unidades de Conservação previamente mencionadas. Também foram disponibilizadas algumas caixas para contenção de serpentes em pontos de coleta estratégicos para que funcionários das Unidades de Conservação e população local nos arredores das Unidades capturassem e armazenassem os espécimes encontradas no dia a dia.

Todos os animais foram capturados utilizando gancho e pinção herpetológicos e manuseados com auxílio de tubos de contenção e com luvas esterilizadas. A sexagem foi feita com sondas inseridas na cloaca. A diferenciação foi feita observando se a sonda inserida pode ser introduzida. Isso só é possível em machos, visto que o hemipênis encontra-se invaginado na cloaca e é oco (Melgarejo-Giménez, 2006). O Comprimento Rostro-Cloacal (CRC) e o Comprimento Caudal (CC) foram tomados com auxílio de fita métrica. Os indivíduos de *B. jararaca* foram classificados em juvenis e adultos de acordo com a classificação de Sazima (1992): os machos juvenis apresentam CRC menor que 650 (milímetros) mm, enquanto os adultos possuem CRC maior ou igual a 650 mm; fêmeas juvenis apresentam CRC menor que 750 mm, enquanto as adultas possuem CRC maior ou igual a 750 mm. Os indivíduos de *B. sazimai* foram classificados em juvenis e adultos de acordo com a classificação de Barbo *et al.* (2016): machos juvenis possuem CRC menor que 451 mm, enquanto adultos possuem CRC maior ou igual a 451 mm; fêmeas juvenis possuem CRC menor que 551 mm, enquanto adultas possuem CRC maior ou igual a 551 mm. A captura dos animais, coleta de amostras, transporte e processamento foram aprovadas pelos comitês responsáveis, SISBIO nº 86838-2/CEUA-UENF nº 560.

A coleta do material viral foi realizada por esfregaço da mucosa cloacal

por meio de introdução de *swab* estéril. Cada *swab* foi armazenado em um microtubo estéril de 1,5 (mililitros) mL contendo 400 (microlitros)  $\mu$ L de *RNAlater*® (Thermo Fisher, Massachusetts, Estados Unidos). Todos os tubos foram lacrados com Parafilm® (Merck, Darmstadt, Alemanha), identificados com etiquetas (contendo a numeração correspondente ao animal amostrado e a data de coleta) e encaminhados ao Laboratório de Diversidade e Doenças Virais (LDDV) na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), onde foram armazenados em freezer a -80 graus Celsius (°C) até o processamento.

### 4.3 Protocolo Viroma (HTS)

#### 4.3.1 Preparação das Amostras e Enriquecimento Viral

Para a realização do HTS, a amostra foi completamente descongelada e homogeneizada via vórtex. As amostras foram reunidas em *pools* na primeira etapa do protocolo de viroma visando um maior custo-benefício da testagem. Esses *pools* foram compostos por amostras de cinco indivíduos, levando-se em consideração a similaridade de CRC e espécie (**Tabela 1**). Na primeira etapa faz-se a separação do conteúdo viral dos demais elementos presentes na amostra, para isso utilizou-se o método de filtração com o auxílio de um filtro Millipore (Millex-HV – 0,45 micrômetro ( $\mu$ m); Merck). Para isso, foram unificadas 200  $\mu$ L de cada amostra que constitui um *pool* e, em seguida, o material foi filtrado dentro de um microtubo de 1,5 mL estéril, devidamente identificado por *pool*. O último ponto desta etapa consistiu na confecção de um *mix* de enzimas responsáveis pela digestão de quaisquer ácidos nucleicos livres na amostra. O *mix* consiste na adição de 42  $\mu$ L de *RNase-Free DNase* (Promega, Madison, Estados Unidos), 63  $\mu$ L de *Baseline Zero DNase* (Epicentre, San Diego, Estados Unidos), 21  $\mu$ L de *RNase I* (Ambion, Naugatuck, Estados Unidos), um *tip* de *Benzonase Nuclease* (Sigma, San Luis, Estados Unidos) e 294  $\mu$ L de *10x Baseline-Zero Buffer*. Quando pronto, o *mix* foi centrifugado e pipetado no tubo contendo a amostra. O *mix* foi homogeneizado e centrifugado para que em seguida o tubo fosse levado para o termobloco a 37 °C por 1 hora (h) 30 minutos (min). Passado o tempo de incubação, o tubo foi retirado e centrifugado. Em seguida, foram pipetados 2  $\mu$ L do reagente de inativação (*10x Baseline-Zero Stop Solution*; fornecido com o *kit* da *Baseline Zero DNase*) no tubo contendo as amostras. Essa etapa é

fundamental para que as enzimas de digestão de ácidos nucleicos livres sejam inativadas. O material obtido foi incubado no termobloco a 65 °C por 10 min e em seguida centrifugado. Por fim, o sobrenadante foi retirado (~200 µL) e realocado em um novo tubo estéril de 1,5 mL.

**Tabela 1.** Composição dos *pools* das amostras de *B. jararaca* e *B. sazimai*, com o código de cada *pool*, identificação das amostras individuais bem como sexo, Comprimento Rostro-Cloacal (CRC) (mm), Comprimento Caudal (CC) (mm) e os locais de coleta de *B. jararaca*, apresentados em siglas (Nova Friburgo (NF), Silva Jardim (SJ), Rio das Ostras (RO), Casimiro de Abreu (CA) e Armação de Búzios (B)).

<i>B. jararaca</i>						<i>B. sazimai</i>				
<i>Pool</i>	<i>Amostra</i>	<i>Sexo</i>	<i>CRC</i>	<i>CC</i>	<i>Local</i>	<i>Pool</i>	<i>Amostra</i>	<i>Sexo</i>	<i>CRC</i>	<i>CC</i>
<b>Bjar 1</b>	V\$51	Fêmea	236	NA	NF	<b>Bsaz 1</b>	V\$35	NA	397	78
	V\$77	Macho	270	45	SJ		V\$3	Macho	400	100
	V\$23	Fêmea	382	50	RO		V\$5	Macho	510	110
	V\$65	Macho	395	70	SJ		V\$91	Fêmea	537	86
<b>Bjar 2</b>	V\$37	Fêmea	432	70	NF	<b>Bsaz 2</b>	V\$96	Macho	541	101
	V\$44	Fêmea	434	62	NF		V\$33	Fêmea	545	90
	V\$71	Fêmea	458	68	SJ		V\$31	Fêmea	547	95
	V\$41	Macho	459	80	NF		V\$84	Macho	557	100
<b>Bjar 3</b>	V\$28	Fêmea	475	66	CA	<b>Bsaz 3</b>	V\$92	Fêmea	572	92
	V\$9	Fêmea	489	72	RO		V\$87	Fêmea	580	86
	V\$66	Macho	546	92	SJ		V\$86	Fêmea	592	88
	V\$46	Fêmea	549	78	AB		V\$93	Macho	592	113
<b>Bjar 4</b>	V\$80	Fêmea	596	92	SJ	<b>Bsaz 4</b>	V\$94	Macho	599	104
	V\$76	Fêmea	644	131	RO		V\$32	Macho	600	110
	V\$75	Macho	692	144	RO		V\$88	Fêmea	603	89
	V\$78	Fêmea	710	104	SJ		V\$83	Fêmea	604	100
<b>Bjar 5</b>	V\$62	Fêmea	746	108	SJ	<b>Bsaz 5</b>	V\$29	Fêmea	610	90

Amostra	Sexo	CC	CRC	Local	Amostra	Sexo	CRC	CC
V\$50	Fêmea	806	115	CA	V\$95	Fêmea	611	96
V\$79	Fêmea	955	132	SJ	V\$4	Fêmea	620	100
V\$72	Fêmea	1100	141	SJ	V\$1	Fêmea	650	80

\*NA = não aplicável.

### 4.3.2 Extração dos Ácidos Nucleicos

Para obtenção dos ácidos nucleicos virais, foi utilizado o QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Nesta etapa, algumas modificações do protocolo do kit foram realizadas a fim de melhorar o aproveitamento para a técnica de metagenômica, como: não utilizou-se o Carrier RNA no Buffer AL; ressuspendeu-se a protease com o Buffer AVE, não utilizando assim o Protease Resuspension Buffer; para a etapa da lavagem, não utilizou-se o AW1; e o material foi eluído em 20 µL de água ultra-pura. Resumidamente, foram adicionados 25 µL de protease ao tubo do material obtido na etapa anterior, a fim de degradar o componente proteico dos capsídeos e envelopes virais. Após isso, adicionaram-se 200 µL do Buffer AL para degradar quaisquer lipídios presentes nos envelopes virais e o material homogeneizado via vórtex, incubado e centrifugado rapidamente. Adicionou-se 250 µL de etanol absoluto para precipitar o material genético, seguido de vórtex, incubação e centrifugação. Em seguida, todo o líquido foi transferido para a coluna de purificação fornecida pelo kit e centrifugado. A lavagem da coluna de purificação foi feita com a adição de 500 µL de Buffer AW2. Em seguida, após outra etapa de centrifugação, foi adicionado álcool absoluto à coluna para garantir uma melhor purificação dos ácidos nucleicos. Centrifugou-se novamente e a coluna de purificação foi transferida para um tubo de 1,5 mL estéril, onde foi adicionado água ultra-pura no centro da membrana da coluna de purificação, a fim de desprender os ácidos nucleicos e recuperação em tubo apropriado. Após uma última etapa de incubação e centrifugação, o tubo foi colocado no gelo e seguiu diretamente para a próxima etapa.

### 4.3.3 Síntese da Dupla Fita de DNAC

A primeira etapa para a conversão das moléculas virais de RNA em DNA,

consiste no anelamento dos iniciadores randômicos (*Random Hexamers*), capaz de fornecer uma pequena sequência de nucleotídeos para iniciar a síntese da nova molécula. Primeiramente, foi preparado um *mix* utilizando *Random Hexamers* (50 nanogramas por microlitro - ng/μL) e *dNTP mix* (10 milimolar - mM) - bases nitrogenadas que serão usadas durante a síntese. O próximo passo foi adicionar o *mix* ao tubo contendo as amostras e em seguida levado ao termociclador (5 min a 65° C). Após o tempo necessário, retirou-se a amostra e manteve-se em gelo.

A segunda etapa é a síntese da primeira fita de DNAC, na qual primeiramente foi confeccionado um outro *mix* contendo *5x SSIV Buffer* (84 μL), *100 mM DTT* (21 μL), *Ribonuclease Inhibitor* (21 μL) e *SuperScript IV RT* (21 μL). Quando pronto, o *mix* foi adicionado ao tubo de reação, que após homogeneizado passou por uma ciclagem de: 10 min a 23°C; 10 min a 50 °C; 10 min a 80 °C. Após esse tempo, o tubo foi colocado no gelo até a próxima etapa.

A última etapa da síntese inicia com a preparação de um *mix* contendo: *Klenow Buffer 10x* (58 μL), *DNTPs* (25 mM) (10,5 μL ) e *Klenow Enzyme* (26 μL). O *mix* foi acrescentado ao tubo de reação que após homogeneizado foi levado ao termociclador por: 1 h a 37 °C; 20 min a 75 °C. Após todas as etapas, o tubo foi armazenado em freezer -20 °C até a próxima etapa.

#### 4.3.4 Purificação dos Ácidos Nucleicos

Antes da confecção das bibliotecas é necessário purificar os ácidos nucleicos virais (DNA/DNAC) utilizando o *Agencourt AMPure XP Kit* (Beckman Coulter Genomics; Danvers, Estados Unidos). A amostra (47 μL) foi pipetada em tubos de 1,5 mL e 85 μL de *beads* (esferas magnéticas com afinidade ao DNA) foram adicionados a fim de aderir ao material genético viral. A amostra foi incubada por 15 min para que em seguida os tubos fossem alocados em uma estante magnética por ~3-5 min. Após, removeu-se o sobrenadante para lavar as *beads* duas vezes com álcool 80% (200 μL). Em seguida, descartou-se o etanol e esperou-se a completa secagem do *pellet* de *beads* durante ~5-10 min. Adicionou-se *Resuspension Buffer (RSB)* do *Tagmentation Kit* (Illumina, San Diego, Estados Unidos) para ressuspender o *pellet* contendo o



DNA purificado e removeu-se o tubo da estante magnética. Foi necessário ressuspender as *beads* com o auxílio de uma pipeta e incubar por 2 min. Por fim, os tubos foram incubados por ~5-10 min na estante magnética e foram transferidos ~15  $\mu$ L da amostra para um tubo estéril de 0,6 mL.

#### 4.3.5 Quantificação dos *Pools*

A quantificação dos *pools* foi realizada através do *QuBit dsDNA HS Assay Kit* (LifeTech, Carlsbad, Estados Unidos). Primeiramente preparou-se uma solução com os seguintes reagentes: *Qubit® dsDNA HS Buffer* (4,48 ml) e *Qubit® dsDNA HS Reagent* (22,5  $\mu$ L). Em seguida, adicionou-se a solução a um *Qubit™ Assay Tube* identificado para o *Standard 1* e em seguida adicionou-se o reagente *Standard 1* fornecido pelo *kit* a este tubo. Repetiu-se o processo para o *Standard 2*. Os tubos foram homogeneizados via vórtex e em seguida a solução foi adicionada nos *Qubit™ Assay Tube* identificados para cada *pool* (foram necessários 2 por *pool* – Q3 e Q5). Adicionou-se 3  $\mu$ L (Q3) ou 5  $\mu$ L (Q5) de *pool* nos tubos correspondentes que foram homogeneizados via vórtex. Os tubos foram incubados por 2 min e em seguida foram quantificados pelo aparelho *Qubit 2.0 Fluorometer*, tendo suas concentrações anotadas em ng/ $\mu$ L.

#### 4.3.6 Biblioteca de DNA

Para a construção das bibliotecas que foram sequenciadas, foi utilizado o *Nextera XT DNA Library Preparation Kit* (Illumina). Para isso, adicionou-se 5  $\mu$ L de *Tagment DNA buffer* a microtubo de 0,2 mL para cada *pool*, a fim de fragmentar o DNA, 2,5  $\mu$ L do *pool* de ácido nucléico viral purificado, e 2,5  $\mu$ L de *Amplicon Tagmentation Mix*, contendo o tampão de fragmentação de DNA. Em seguida, os tubos foram centrifugados e colocados em um termociclador. Ao final desta etapa, adicionou-se o *Neutralization buffer* para parar a fragmentação. Após a incubação por 5 min, adicionaram-se 2,5  $\mu$ L de Index 1 (i5) e 2,5  $\mu$ L de Index 2 (i7) e 7,5  $\mu$ L de *Nextera PCR Mix* contendo todos os componentes necessários para a amplificação das bibliotecas. Em seguida, os tubos foram colocados novamente no termociclador seguindo com a ciclagem: 3 min a 72°C; 30 segundos (seg) a 95 °C; (18x) 10 seg a 95 °C, 30 seg a 55 °C

e 30 seg a 72 °C; e 5 min a 72 °C. Por fim, os tubos seguiram para centrifugação a 300 forças gravitacionais (g) por 1 min a 20 °C.

#### 4.3.7 Purificação da Biblioteca de DNA

Nesta etapa, a biblioteca foi transferida para um tubo estéril de 1,5 mL. Adicionaram-se 5 µL de *beads* ao tubo para reter os fragmentos de DNA muito grandes e inadequados para o sequenciamento (>800 pares de base - pb). O material foi incubado por 15min e transferido para uma estante magnética por ~3-5 min. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo e em seguida retiraram-se os tubos da estante magnética. Adicionaram-se 15 µL de *beads* ao segundo tubo, onde iria reter os fragmentos de DNA no tamanho ideal para o sequenciamento (entre 200 e 800 pb), e incubou-se por 5 min para realocar na estante magnética por ~3-5 min. O próximo passo consistiu em descartar o sobrenadante e realizar a lavagem das *beads* da seguinte forma: lavar as *beads* duas vezes com 110 µL álcool 80% e descartar o etanol; incubar para secagem total e remover os tubos da estante magnética. Por fim, foram adicionados 25 µL de *RSB (Illumina)* para ressuspender o material desejado e em seguida incubou-se os tubos por 15 min, transportou-se os tubos novamente para a estante magnética e incubou-se por 2 min. Foram transferidos ~23 µL da biblioteca purificada para um tubo estéril de 0,6 mL.

#### 4.3.8 Avaliação e Mix das Bibliotecas de DNA

A quantificação foi realizada com o *QuBit dsDNA HS Assay Kit* (LifeTech) no *Qubit 2.0 Fluorometer*, como descrito anteriormente. A estimativa de tamanho das bibliotecas foi realizada via PCR com o *NEBNext® kit* (NEB, Ipswich, Estados Unidos). Primeiramente, foi confeccionada uma solução tampão com *NEBNext Dilution Buffer 10x* (4,88 ml) e *Qubit® dsDNA HS Reagent* (24,5 µL). Após vortexar e centrifugar, a biblioteca foi diluída na porção 1:50 em um tubo estéril de 0,6 mL utilizando o *NEBNext Dilution Buffer 1x*. O tubo foi homogeneizado via vórtex e centrifugado para em seguida adicionar o *NEBNext Master Mix + Primer* em um tubo de 0,2 mL a fim de auxiliar na amplificação das bibliotecas. Adicionou-se a biblioteca diluída no tubo anterior. O mesmo processo foi realizado para o controle positivo (ST1) e

o negativo (próprio tampão 1x). Após isso, os tubos foram para a ciclagem. Por fim, os tubos foram centrifugados e o material amplificado foi submetido a separação em gel de agarose 1%, onde foram avaliados os tamanhos pelo rastro visível e comparada ao marcador molecular e ao controle positivo. Com base nesses dados, foi mensurada a molaridade do mix de bibliotecas através da avaliação da concentração final do mix, com o *Qubit*, e da estimativa de tamanho médio do mix, com o PCR *NEBNext*. As bibliotecas foram misturadas e o *mix* de bibliotecas foi diluído a 2 nanomolar (nM). A Illumina recomenda que a o *mix* seja diluído a 4 nM. No entanto, a molaridade obtida nesse preparo foi muito baixa, não sendo possível ser diluída a 4 nM, e sim a 2 nM.

#### 4.3.9 Corrida MiSeq V3

O sequenciamento propriamente dito foi realizado na Plataforma Illumina MiSeq, do Departamento de Genética da UFRJ, usando o *MiSeq v3 Reagent kit* (Illumina). Primeiramente, ocorreu a desnaturação da dupla fita de DNA do *mix* de bibliotecas adicionando 5 µL deste em um tubo estéril de 1,5 mL e 5 µL de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,2 molar (M) (diluído na hora). Após vortexar, centrifugar e incubar o tubo, adicionaram-se 990 µL de *Hybridization Buffer* (HT1), para estabilizar as moléculas de DNA fita simples e auxiliar na etapa inicial do sequenciamento. Para obter a molaridade final de sequenciamento (10 picomolar - pM), foi adicionado 300 µL do *mix* de bibliotecas desnaturado em um tubo estéril de 1,5 mL e 450 µL de HT1, seguido de homogeneização leve e centrifugação rápida. O cartucho de sequenciamento foi carregado com 600 µL do *mix* de bibliotecas à 10 pM.

#### 4.3.10 Análise e Interpretação de Dados

Após o sequenciamento, as *reads* maiores que 50 pb e Qscore maior que 30 foram selecionadas usando a ferramenta *FastQC* 0.11.3 (Andrews, 2010). Em seguida, o *fastp* v.0.20.1 (Kearse *et al.*, 2012) filtra os dados de acordo com os comandos sugeridos pelo pesquisador. Uma nova etapa de avaliação de qualidade foi realizada para confirmação da remoção das *reads* indesejadas e os dados globais de controle de qualidade foram reunidos em um único arquivo com o auxílio da ferramenta *Multiqc* v1.14 (Ewels *et al.*, 2016). Após os filtros de qualidade e tamanho, as sequências passaram pelo filtro para o

genoma do hospedeiro, que exclui as sequências originadas do próprio hospedeiro. Isso garante que as *reads* classificadas posteriormente não tenham como origem o genoma do hospedeiro. Para o filtro foi utilizado o genoma de *B. jararaca* (GCA\_018340635.1) para ambas as espécies, já que *B. sazimai* é próxima filogeneticamente de *B. jararaca*. O mesmo genoma foi utilizado para ambas as espécies pois o genoma completo de *B. sazimai* ainda não está descrito. A etapa seguinte contempla a classificação taxonômica das *reads* filtradas através da ferramenta *Kraken2* v.2.1.2 (Wood *et al.*, 2019). O *Kraken2* v.2.1.2 constrói uma matriz de assinaturas taxonômicas a partir do banco de dados público e identifica pelo padrão apresentado qual a referência mais provável. Com os dados obtidos os vírus foram taxonomicamente classificados a nível de família. A mesma análises de classificação taxonômica também foi realizadas com os *contigs*, formados pelo programa *SPAdes* v3.15.3 (Rice *et al.*, 2000). Os *contigs* são formados através da união das *reads* em regiões de sobreposição de sequência. Os resultados obtidos foram plotados em um gráfico interativo pelo programa *Krona* v.2.7.1 (Ondov *et al.*, 2011).

Após observar que na biblioteca Bsaz 4 não foi possível classificar nenhuma sequência viral, a mesma não pôde ser incluída nas análises seguintes. Com os dados obtidos foi possível construir uma curva de rarefação usando o ambiente *RStudio* (Allaire, 2012), visando avaliar se a diversidade amostrada foi satisfatoriamente sequenciada. A normalidade dos dados foi verificada através do teste de *Shapiro-Wilk*. A fim de verificar se houve diferença significativa na riqueza viral entre as espécies, foi aplicado o teste U de *Mann-Whitney* (Mann & Whitney, 1947). A correlação de *Spearman* (Spearman, 1904) foi utilizada para avaliar a relação entre as variáveis “tamanho de indivíduos” e “riqueza viral”. Para avaliar a similaridade entre os *pools* foi aplicado o Índice de *Jaccard* (Jaccard, 1901). O método de agrupamento utilizado para a montagem do cluster foi o UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*).

Para avaliar como a comunidade viral se comporta entre os diferentes *pools*, foi construída uma estrutura de metacomunidade (Leibold & Mikkelsen, 2002), a qual considera a distribuição das espécies ao longo de um gradiente

ambiental (**Figura 3**). Para a análise, foi utilizada a Média Recíproca (Gauch & Whittaker, 1972), que ordena uma matriz de espécies, agrupando aquelas com distribuições espaciais mais semelhantes.

O primeiro elemento a ser avaliado é a “coerência”, que avalia se as espécies de uma matriz estão associadas ao mesmo gradiente ambiental. Para a avaliação do primeiro elemento é necessário calcular o número de ausências embutidas na matriz ordenada pela média recíproca e verificar sua significância através do teste de Monte Carlo.

A estrutura da metacomunidade pode ser classificada como “tabuleiro de damas” (Diamond, 1975) quando o número de ausências embutidas na matriz ordenada por média recíproca for maior do que a média das matrizes aleatorizadas, ou seja, mais ausências embutidas do que o esperado. Se não houver diferença significativa a estrutura é “aleatória” (Leibold & Mikkelsen, 2002). Caso o número de ausências embutidas seja inferior ao esperado, isso significa que as espécies respondem a um mesmo gradiente ambiental e o próximo elemento deve ser analisado.

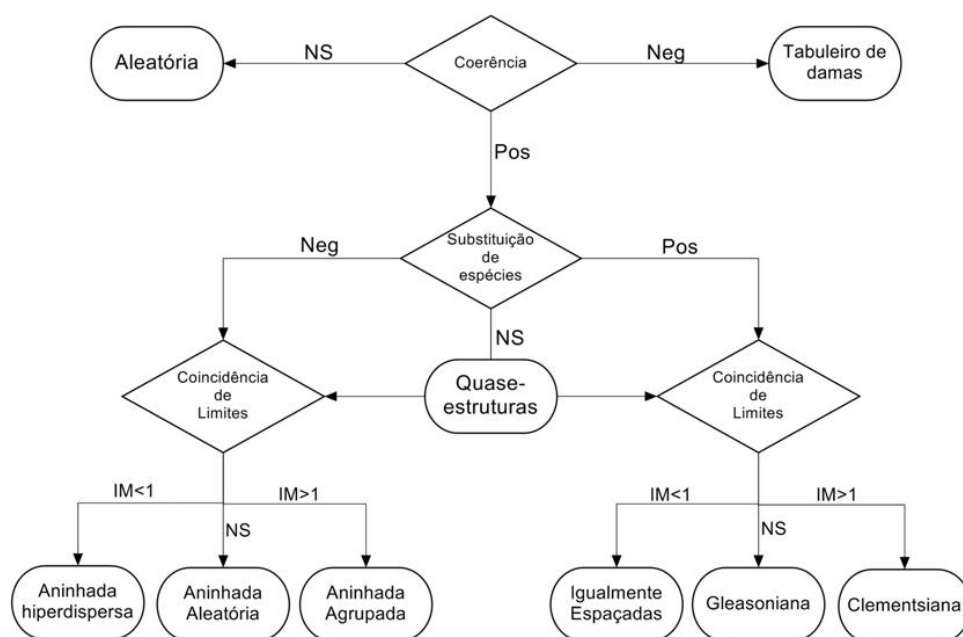
O segundo elemento da análise é a “substituição de espécies (*turnover*)”, em que é calculado o número de substituições de espécies entre locais ao longo do gradiente. Caso o número de substituições seja significativamente inferior à média das matrizes aleatorizadas (negativo), deve ser analisado o próximo elemento: coincidência de limites (Patterson & Atmar, 1986). O mesmo ocorre se o número de substituições for significativamente maior do que a média das matrizes (positivo). Em um cenário em que o número de substituições seja positivo ou negativo, mas sem significância, o modelo se encaminha para uma “quasi-estrutura”, seguido de avaliação de coincidência de limites (Presley *et al.*, 2010). No caso de *turnover* positivo e não significativo, podemos ter uma quasi-estrutura clementsiana, gleasoniana ou igualmente espaçada. Com um *turnover* negativo e não significativo, podemos ter uma quasi-estrutura aninhada hiperdispersada, aninhada aleatória ou aninhada agrupada.

Um *turnover* significativo, devemos observar o Índice de Morisita (IM) obtido. No primeiro caso (*turnover* positivo e significativo), se  $IM > 1$ , a estrutura

é Clementsiana (Clements, 1916). Caso o  $IM < 1$ , a estrutura é “igualmente espaçada” (Tilman, 1981). Caso o IM não seja significativo, é uma estrutura Gleosiana (Gleason, 1926). No segundo caso (*turnover* negativo e significativo), se  $IM > 1$ , a estrutura é “aninhada agrupada”. Caso o  $IM < 1$ , a estrutura é aninhada hiperdispersada. Caso o IM não seja significativo, a estrutura é “aninhada aleatória”.

No caso do viroma, nos modelos “aninhados” a composição das famílias de comunidades menores é parte de comunidades maiores. No modelo “igualmente espaçado”, a distribuição de famílias é mais espaçada do que o esperado, isso é resultado de interações entre as espécies, principalmente a competição. No modelo “gleasoniano”, as espécies se distribuem de uma forma aleatória. Essa distribuição é moldada pelos fatores ambientais e interações entre as espécies, refletindo na coexistência de espécies. No modelo “clementsiano”, a substituição das espécies é de forma agrupada, variando conforme condições ambientais. As espécies podem se associar de forma similar ou evoluir de forma semelhante.

**Figura 3.** Fluxograma retirado de Braga *et al.*, 2017. Os Elementos da Estrutura de Metacomunidades estão representados pelos losangos. As setas se referem aos valores obtidos em cada um dos Elementos (positivo, negativo, não significativo - NS e os valores do Índice de Morisita). As esferas mostram o tipo de estrutura formada a partir das etapas anteriores.



Fonte – Braga *et al.*, 2017.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Visão Geral do Sequenciamento

No HTS, foram obtidas 37.192.404 *reads* brutas (mín. 100; máx. 10.365.422). Ao todo, 28.055.274 *reads* (mín. 2; máx. 8.910.908) passaram pelos filtros de qualidade e tamanho. Destas, 16.550.669 *reads* passaram pelo filtro do hospedeiro (mín. 9; máx. 5.327.728). A partir da ferramenta *Kraken2*, foi possível obter a classificação taxonômica de 9.579.640 *reads* (mín. 7; máx. 2.644.615) – esses valores compreendem todas as classificações, e não apenas os vírus (**Tabela 2; ANEXO A**). Ao final da classificação, obtivemos um total de sequências que não puderam ser classificadas pela ferramenta – *No hits* (**ANEXO A**). Além disso, foram obtidos 437 *contigs* virais (**ANEXO B**).

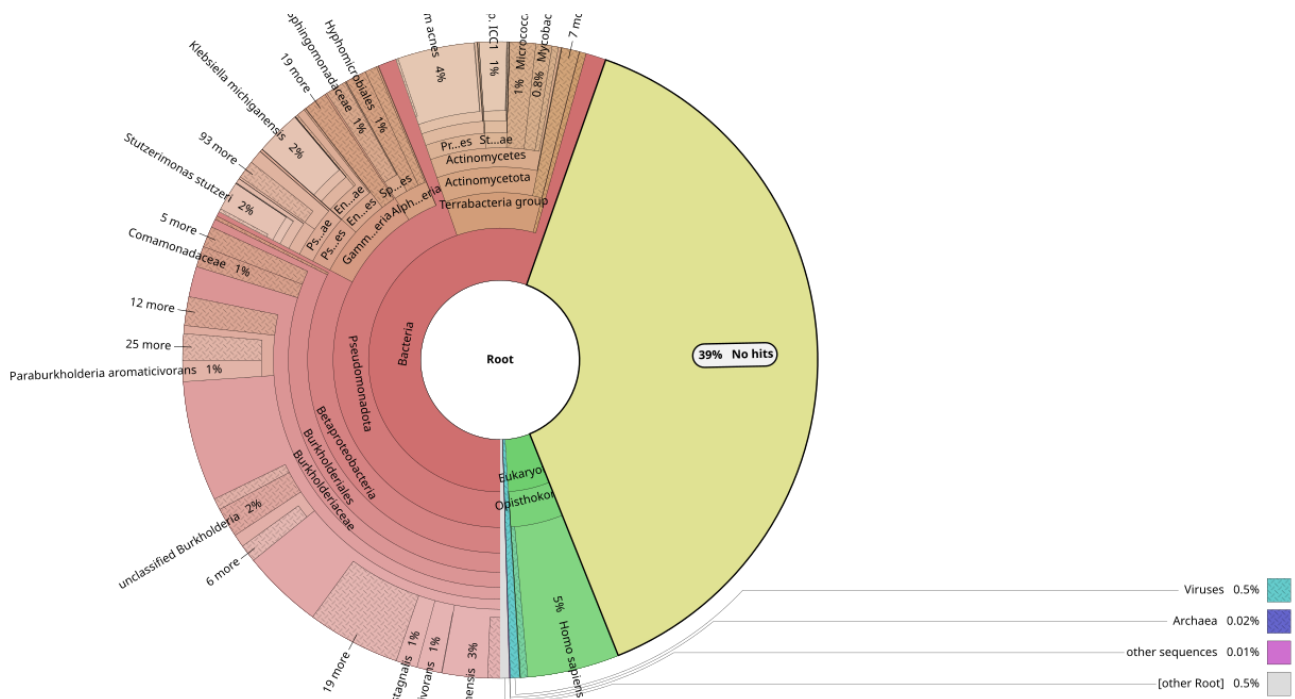
**Tabela 2.** Relação de leituras, classificações e riqueza de famílias virais de cada uma das bibliotecas sequenciadas.

	<i>B. jararaca</i>					<i>B. sazimai</i>				
<b>Bibliotecas</b>	<b>Bjar 1</b>	<b>Bjar 2</b>	<b>Bjar 3</b>	<b>Bjar 4</b>	<b>Bjar 5</b>	<b>Bsaz 1</b>	<b>Bsaz 2</b>	<b>Bsaz 3</b>	<b>Bsaz 4</b>	<b>Bsaz 5</b>
<b>Leituras brutas</b>	2.931.684	2.469.262	6.453.958	3.556.442	2.492.380	10.365.422	4.409.570	1.880.574	100	2.633.012
<b>Reads pós-filtros</b>	1.841.064	1.522.812	5.512.382	2.583.452	2.011.114	8.910.908	3.636.992	799.356	2	1.005.446
<b>Reads classificadas Kraken2</b>	748.490	645.055	1.619.847	1.302.657	693.572	2.644.615	941.548	434.515	7	567.334
<b>Contigs virais</b>	47	53	44	50	51	47	54	49	0	42
<b>Riqueza de famílias virais Kraken2</b>	8	8	7	4	6	13	7	7	0	6

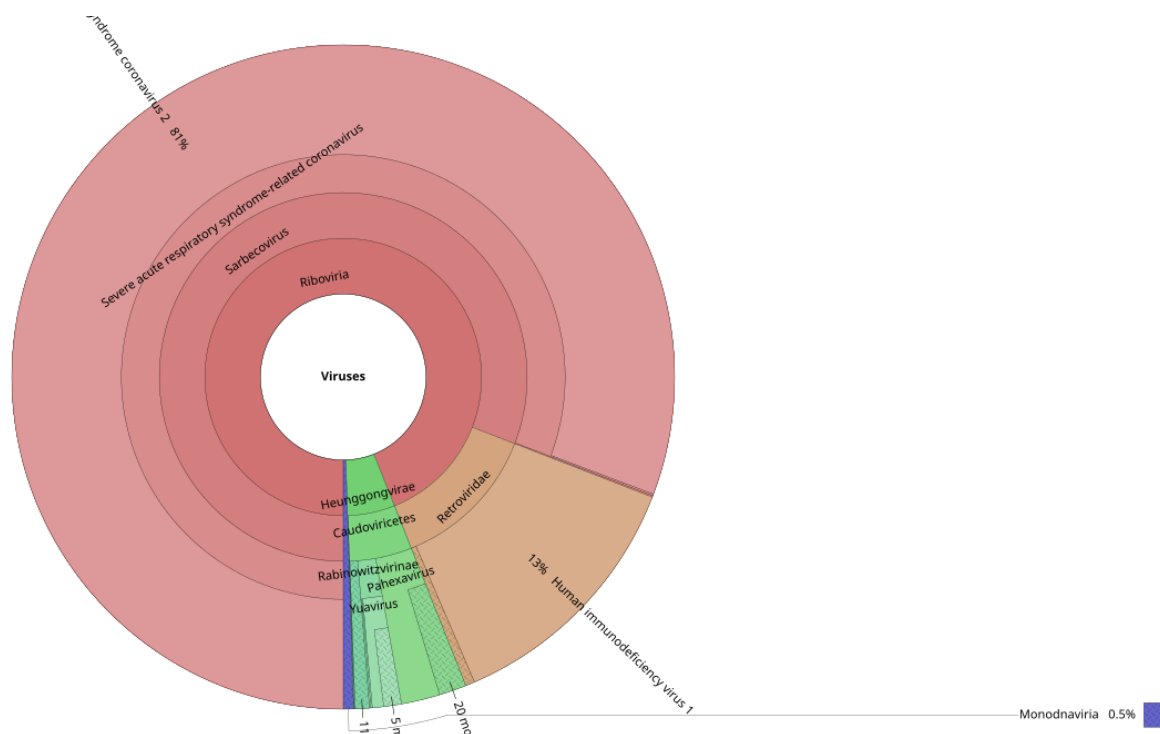


Através dos dados da ferramenta *Kraken2* foi possível calcular a média das *reads* pertencentes à cada domínio. As sequências virais correspondem a 0,48% das sequências classificadas. De maneira geral, a maioria das sequências classificadas pertence ao domínio Bacteria, representando 53,2% das sequências analisadas. Além destes domínios, foi possível classificar sequências do domínio Eukaryota e Archaea (**Tabela 3**). Essas classificações podem ser observadas no *plot* do *Krona* (**Figura 4** e **Figura 5**).

**Figura 4.** Gráfico interativo do *Krona* com as porcentagens de cada domínio que foram classificados em um dos *pools* avaliados no presente trabalho (Bjar 1).



**Figura 5.** Gráfico interativo do *Krona* com as porcentagens de *reads* virais que foram classificadas em um dos *pools* avaliados no presente trabalho (Bjar 1).



Fonte – Krona, 2025

**Tabela 3.** Valores de média ( $\bar{x}$ ), desvio padrão (d.p), mínimo e máximo de *reads* de cada um dos grupos classificados pela ferramenta *Kraken2*.

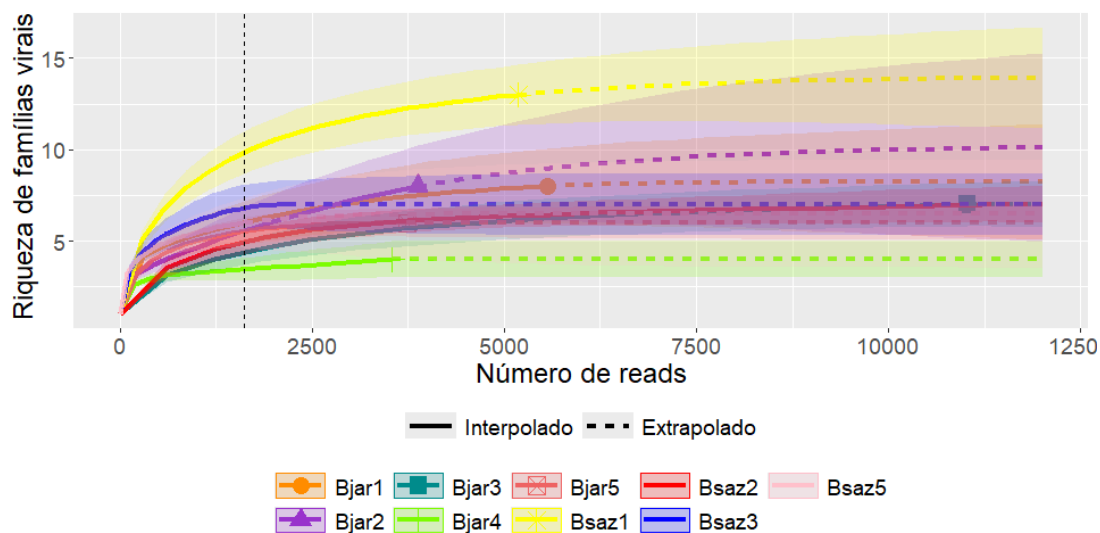
	<i>Kraken2</i>			
	Vírus	Bactérias	Eucariotos	Arquéias
$\bar{x}$ (%)	0,48	53,2	8,3	0,02
d.p (%)	0,57	10,40	10,33	0,01
Mín (%)	0	38	0	0
Máx (%)	2	78	36	0,03

## 5.2 Curva de rarefação

A curva de rarefação foi montada a partir das *reads* virais obtidas pelo sequenciamento. A partir da curva, foi possível observar que todas as bibliotecas atingiram a faixa exponencial, mesmo que Bjar 1, Bsaz 1 e Bsaz 3

não tenham atingido um platô completo, indicando que o número de *reads* amostrado foi suficiente para representar a riqueza viral em cada uma das bibliotecas sequenciadas (**Figura 6**).

**Figura 6.** Curva de rarefação de cada biblioteca amostrada.



Duas famílias virais foram predominantes nos *pools* das duas espécies de *Bothrops*, mas foram retiradas por serem possivelmente decorrentes de contaminações. A maior quantidade de *reads* virais classificada foi atribuída à família *Coronaviridae*, totalizando 41.516 (mín - 1.396; máx - 9.491) *reads*. No entanto, ao fazer uma segunda análise através do BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), as sequências identificadas corresponderam com alta similaridade ( $\mu = 99,58\%$ ) ao SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*). A plataforma MiSeq da UFRJ, onde foi realizado o sequenciamento das amostras do presente estudo, é usada para sequenciar o genoma de SARS-CoV-2 de forma corriqueira, contribuindo assim com a hipótese de que houve contaminação laboratorial pelo vírus mencionado. Por isso, devido a incerteza da origem dos dados da família *Coronaviridae*, esta não foi incluída nos resultados. O mesmo ocorreu para a família *Retroviridae*, na qual foram obtidas 6.008 (mín - 168; máx - 1.696) *reads* a partir do sequenciamento. A família foi removida das análises de dados após uma análise no BLAST que verificou que diversas sequências analisadas correspondem com alta similaridade ( $\mu = 98,3\%$ ), ao HIV (*Human Immunodeficiency Virus*). A grande quantidade de *reads* identificadas por biblioteca sugere também contaminação ambiental ou laboratorial por

retrovírus. A contaminação por retrovírus pode ocorrer na execução do protocolo de viroma, já que alguns componentes dos reagentes utilizados durante o processo podem conter retrovírus em sua composição, ou ainda por contaminação laboratorial, pois o laboratório onde foram sequenciadas as amostras também sequencia amostras contendo HIV.

### 5.3 Riqueza e famílias virais

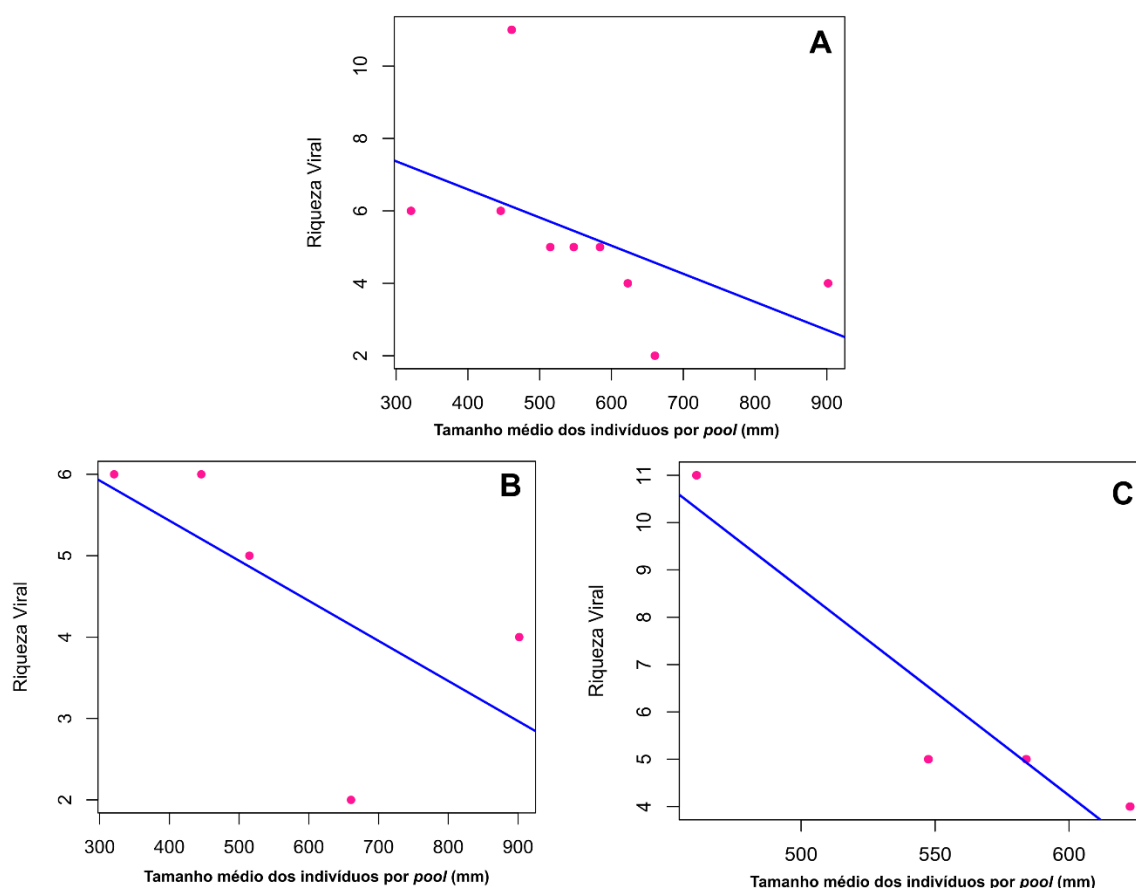
Após a retirada das famílias *Coronaviridae* e *Retroviridae* dos resultados, foram identificadas no total 18 famílias virais. A maior riqueza viral foi encontrada na biblioteca Bsaz 1, nos menores indivíduos de *B. sazimai*, enquanto que a menor riqueza foi encontrada na biblioteca Bjar 4, indivíduos adultos de *B. jararaca* (**Tabela 5**). Ao analisar a riqueza de famílias virais por espécie, foi observado que o maior número de famílias virais foi encontrado, nas duas espécies, em indivíduos juvenis. A riqueza de famílias virais em *B. sazimai* (15 famílias; mín. 4; máx. 11) foi maior do que a encontrada em *B. jararaca* (12 famílias; mín. 2; máx. 6). Embora *B. sazimai* apresente maior riqueza de famílias virais, não houve diferença significativa na riqueza viral média entre os pools de *B. sazimai* e *B. jararaca* ( $U(5,4) = 8,5, p = 0,80$ ). A família *Microviridae* está presente em todas as bibliotecas sequenciadas. As famílias *Schitoviridae*, *Herpesviridae* e *Demerecviridae* foram identificadas exclusivamente em *B. jararaca*, enquanto que as famílias *Cajensviridae*, *Zierdtviridae*, *Iridoviridae*, *Alloherpesviridae* e *Inoviridae* foram identificadas exclusivamente em *B. sazimai*. As famílias *Herpesviridae*, *Genomoviridae*, *Poxviridae*, *Iridoviridae* e *Alloherpesviridae* se destacam como grupos que infectam vertebrados. Ainda, houve a presença de famílias virais que infectam invertebrados, algas, plantas, arqueas e, com destaque para a ampla presença de bacteriófagos (*Mesyazhinovviridae*, *Schitoviridae*, *Autographiviridae*, *Microviridae*, *Demerecviridae*, *Kyanoviridae*, *Herelleviridae*, *Straboviridae*, *Peduoviridae*, *Casjensviridae* e *Inoviridae*) nas bibliotecas sequenciadas (**ANEXO A**).

### 5.4 Padrões Ecológicos

Em relação à variação ontogenética na riqueza viral nas serpentes analisadas, foi registrada uma forte correlação negativa e significativa ( $r_s = -$

0,90;  $p < 0,05$ ) entre a riqueza viral e o tamanho médio dos indivíduos por *pool*, considerando os dados das duas espécies em conjunto (**Figura 6**), ou seja, a riqueza viral diminui a medida que o tamanho dos indivíduos aumenta. Ao avaliar os dados das espécies separadamente, a correlação também foi negativa e significativa em *B. jararaca* ( $r_s = -0,87$ ;  $p = 0,05$ ) e em *B. sazimai* ( $r_s = -0,95$ ;  $p = 0,5$ ) (**Figura 7**)

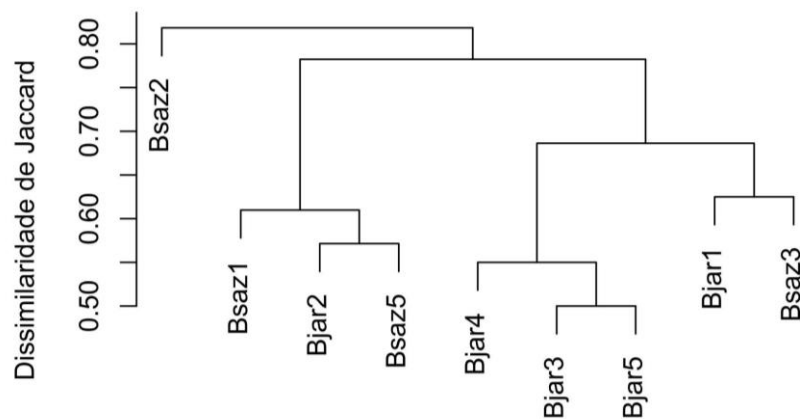
**Figura 7.** Relação entre o tamanho médio dos indivíduos por *pools* e a riqueza viral. A) Representa a correlação de ambas as espécies. B) Representa a correlação entre os indivíduos de *B. jararaca*. C) Representa a correlação entre os indivíduos de *B. sazimai*.



A semelhança nas composições virais dos *pools* de *B. jararaca* e *B. sazimai*, foi comparada a partir do Índice de Jaccard. Não foi observado nenhum padrão de agrupamento de acordo com as variáveis de interesse do presente estudo, seja ele por tamanho dos indivíduos, dieta ou espécie. Foi possível observar que “Bsaz 2”, contendo indivíduos pequenos, apresentou a

maior dissimilaridade quando comparado aos outros *pools*. O restante dos *pools* formaram grupos compostos por ambas as espécies e por tamanhos de indivíduos variados (**Figura 8**).

**Figura 8.** Cluster de dissimilaridade de Jaccard

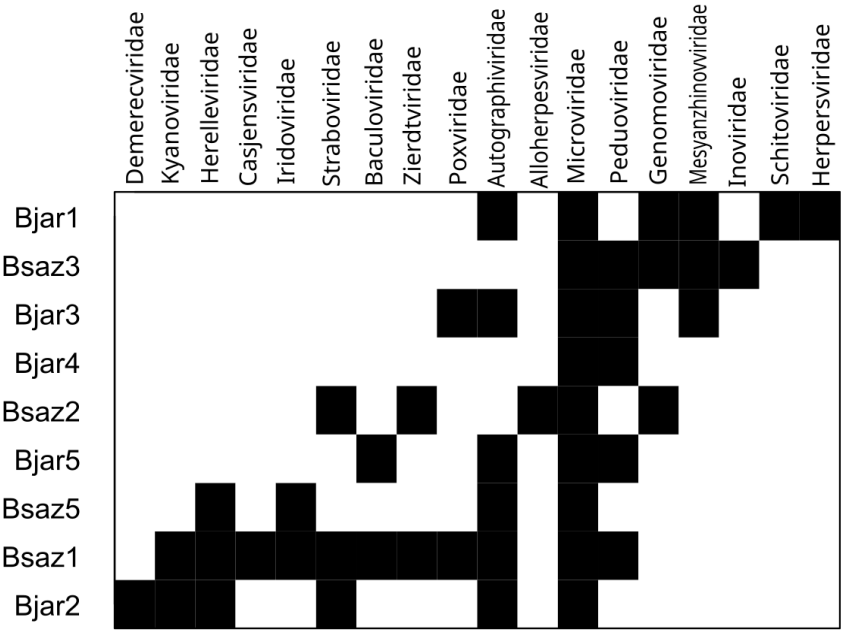


Para compreender como as famílias virais estão distribuídas entre os *pools*, foi analisada a estrutura de metacomunidade das duas espécies. A partir da análise de estrutura de metacomunidade, a configuração da metacomunidade se assemelha ao modelo quasi-clementsiano (**Figura 9**). A coerência foi positiva, bem como a substituição de espécies, que não foi significativa. O Índice de Morisita foi superior a 1 com significância (**Tabela 4**). Nesse tipo de estrutura, grupos são formados ao longo do gradiente de uma forma que a substituição de espécies ocorra de maneira menos acentuada do que uma estrutura Clementsiana. Observa-se que o agrupamento não segue um padrão específico: os *pools* de indivíduos juvenis não estão organizados juntos, assim como os *pools* de adultos. Além disso, não há um padrão de agrupamento entre as espécies, visto que cada *pool* não se agrupa obrigatoriamente com *pools* da mesma espécie.

**Tabela 4.** Valores de coerência, substituição de espécies (*turnover*) e coincidência de limites.

Coerência	
Ausências embutidas	31
Média das simulações	76,46
p < 0,05	
Turnover	
Substituições	347
Média das simulações	291,99
p > 0,05	
Coincidência de limites	
Índice de Morisita	1,43
p < 0,05	

**Figura 9.** Estrutura de metacomunidade observada para as espécies de *B. jararaca* e *B. sazimai*.



6. DISCUSSÃO

O presente estudo é o primeiro a avaliar o viroma em serpentes do gênero *Bothrops*, e o segundo a avaliar a diversidade viral em serpentes por meio de HTS. O primeiro sendo o de Liu *et al.*, (2023), que avaliou o viroma oral e cloacal das serpentes *Protobothrops mucrosquamatus* (família

Viperidae), *Elaphe dione* (família Colubridae) e *Gloydius angusticeps* (família Viperidae). Avaliamos 10 *pools* compostos por 40 indivíduos com diferentes tamanhos, pertencentes às espécies *B. jararaca* e *B. sazimai*. Os resultados indicam que a espécie não influencia na composição viral da forma como prevíamos.

Embora tenhamos um número considerável de indivíduos por *pools* (4 indivíduos), o número de *reads* e *contigs* virais no presente trabalho, foram relativamente baixos. Apenas as famílias *Coronaviridae* e *Retroviridae* apresentaram um número de *contigs* considerável, embora a presença dessas duas famílias seja proveniente, possivelmente de contaminação cruzada. Ao observar as demais famílias, obtivemos o maior número de *reads* (90) para a família *Mesyanzhinovviridae* no *pool* Bjar 1 e o maior número de *contigs* (2) pertenceu a mesma família. Um baixo número de *reads* e *contigs* virais obtidos, reflete provavelmente, no método de amostragem e condição de saúde dos indivíduos amostrados. Animais amostrados através de *swab* que não apresentam sinais clínicos de doenças, tendem a identificar uma menor proporção de *reads* e *contigs* virais (Jakobsen *et al.*, 2020; Smol'ak *et al.*, 2022; Truchado *et al.*, 2020; Waller *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2017) do que animais amostrados, por exemplo, através das fezes (Billaud *et al.*, 2021; Chong *et al.*, 2019; Klukowski *et al.*, 2024; Lu *et al.*, 2022; Ng *et al.*, 2014; Ramírez-Martínez *et al.*, 2018).

A presença de bacteriófagos em todas as bibliotecas (*Mesyanzhinovviridae*, *Schitoviridae*, *Autographiviridae*, *Demereciviridae*, *Kyanoviridae*, *Herelleviridae*, *Straboviridae*, *Peduviridae*, *Casjensviridae*, *Zierdtviridae*, *Inoviridae*) no sequenciamento reflete o método da amostragem. Não é possível inferir a ocorrência de bacteriófagos em espécies de serpentes, visto que não há literatura que relate sua presença. O trato gastrointestinal é um local propício para o crescimento e desenvolvimento de bactérias (Anders *et al.*, 2021; de Jonge *et al.*, 2022; De Sordi *et al.*, 2019), o que torna comum a presença de fagos infectantes desses organismos. Logo, os bacteriófagos são os vírus mais abundantes nos eucariotos (Łusiak-Szelachowska *et al.*, 2017). Esse tipo de vírus possui uma importância significativa no trato gastrointestinal dos animais, muitas vezes combatendo enterites bacterianas



nos organismos (Gindin *et al.*, 2018; Gutiérrez & Domingo-Calap, 2020). Um estudo conduzido por Lu *et al.* (2022), descreveu o viroma gastrointestinal de duas espécies de lagartos: *Phrynocephalus erythrurus* e *Phrynocephalus theobaldi*. O sequenciamento revelou a presença majoritária de bacteriófagos, assim como o presente estudo. Além de serem parte da flora gastrointestinal, os bacteriófagos ainda podem ser utilizados para o tratamento de bactérias resistentes a antibióticos (Gaborieau & Debarbieux, 2023; Golkar *et al.*, 2014). A fagoterapia já foi aplicada no tratamento de infecções em répteis (Carini *et al.*, 2017; Greene *et al.*, 2021), apresentando resultados positivos no tratamento.

Embora os bacteriófagos prevaleçam no viroma gastrointestinal das duas espécies, algumas famílias que abrangem vírus que infectam vertebrados também foram reportadas. A família *Herpesviridae*, presente na biblioteca Bjar 1, destaca-se como um grupo relevante de patógenos em vertebrados. Em répteis, os testudines são mais afetados por esses vírus (Greenblatt *et al.*, 2005; Leineweber *et al.*, 2021; Oriá *et al.*, 2021; Origgi *et al.*, 2015; Weldon *et al.*, 2023), refletindo em manifestações clínicas como doenças oftalmológicas, oncogênese e pneumonia. No entanto, os herpesvírus já foram relatados em outros grupos, como serpentes, lagartos e crocodilos (Govett *et al.*, 2005; Hauser *et al.*, 1983; Hughes-Hanks *et al.*, 2010; Simpson *et al.*, 1979). Em serpentes, a infecção manifestou-se como anemia, hepatite e pancreatite, ocasionando a morte dos indivíduos (Hauser *et al.*, 1983). Já no estudo conduzido por Lovstad *et al.* (2019), as serpentes desenvolveram carcinoma, seguido de morte ou necessidade de eutanásia. No presente estudo, não houve nenhum sinal clínico indicativo de doença nos animais amostrados.

No presente estudo, a família *Poxviridae* foi identificada nas bibliotecas Bjar 3 e Bsaz 1. Os poxvírus são causadores de importantes doenças humanas e animais (MacLachlan & Dubovi, 2016). Seus hospedeiros incluem insetos, mamíferos, aves, répteis e peixes (McInnes *et al.*, 2023). Em répteis, a infecção pode causar lesões cutâneas (Sarker *et al.*, 2019; Seitz *et al.*, 2021), danos múltiplos nos órgãos (pancreatite, vasculite, endocardite) (Sarker *et al.*, 2021), hemorragia, estomatite e doença vesicular (Liu *et al.*, 2011). Especificamente em serpentes, há apenas um estudo que aborda a infecção por poxvírus.

Piskurek & Okada (2007), conduziram um experimento demonstrando que as serpentes podem ser potenciais hospedeiras do vírus *Teterapox*, vírus similar à varíola (Parker *et al.*, 2018).

A família *Iridoviridae*, presente nas bibliotecas Bsaz 1 e Bsaz 5, é conhecida por sua capacidade de infectar tanto vertebrados (peixes, anfíbios e répteis) quanto invertebrados (insetos e crustáceos) (Chinchar *et al.*, 2017). Poucos estudos elucidam sobre a infecção por iridovírus em serpentes (Hyatt *et al.*, 2002; Johnsrude *et al.*, 1997; Wellehan Jr. *et al.*, 2008). O estudo de Hyatt *et al.* (2002), detectou a presença de *Ranavirus* – gênero da família *Iridoviridae* – em *Morelia viridis*, em que os indivíduos infectados apresentavam anorexia e prolapso retal. Já a pesquisa conduzida por Wellehan Jr. *et al.* (2008) também detectou *Ranavirus*, desta vez em *Tamnophis saurita sackenii*, que manifestava anorexia e necrose hepática. Assim como o presente estudo, Johnsrude *et al.* (1997) amostraram um viperídeo, pertencente ao gênero *Bothrops*. Neste caso, uma infecção por iridovírus em *Bothrops moojeni* foi investigada, identificando um carcinoma renal como manifestação clínica. Os resultados destacam a importância de estudos mais aprofundados acerca da infecção por esse tipo de vírus em serpentes, incluindo as do gênero *Bothrops*, a fim de compreender melhor a patogenicidade, transmissão e impactos nas populações de jararacas.

A família *Genomoviridae*, identificada nas bibliotecas Bjar 1, Bsaz 2 e Bsaz 3, não possui registros de infecção em répteis. Os registros para vertebrados incluem animais de produção (König *et al.*, 2021; Shi *et al.*, 2021b), morcegos (Cibulski *et al.*, 2021; Kemenesi *et al.*, 2018), insetos (Liu *et al.*, 2016), aves (Schmidlin *et al.*, 2019), humanos (Zucherato *et al.*, 2023), entre outros. A patogenicidade dos genomovírus ainda é desconhecida para hospedeiros vertebrados e precisa ser melhor explorada.

Por último, a família *Alloherpesviridae* possui como hospedeiros os anfíbios e peixes (Waltzek *et al.*, 2009). Não há evidências na literatura da presença desses vírus em répteis. É necessário ampliar o estudo acerca desse vírus em *B. sazimai*, uma vez que as presas da espécie se restringem apenas aos lagartos, invertebrados e indivíduos da própria espécie, tornando assim menos provável a contaminação indireta desses animais pela dieta.

Os padrões de variação na riqueza e composição de espécies de vírus nas amostras analisadas não corroboraram às predições feitas no presente trabalho. Esperávamos, por exemplo, que fosse encontrada maior diversidade viral em *B. jararaca* quando comparada a *B. sazimai*, uma vez que *B. sazimai* está restrita a uma pequena porção de terra, de ambientes mais homogêneos, com menor diversidade de presas e não apresenta variação ontogenética na dieta (Barbo *et al.*, 2016), enquanto que *B. jararaca* ocupa uma área geográfica mais abrangente, com maior diversidade ambiental e de presas, além de possuir variação ontogenética na dieta (Fraile *et al.*, 2017; Parrat *et al.*, 2016; Sazima, 1992). No entanto, *B. sazimai* apresentou maior número de famílias virais nos *pools* amostrados e não foi observada diferença na riqueza média de famílias virais entre *pools* das duas espécies. Além disso, apesar de existirem famílias virais que foram exclusivamente registradas em *B. jararaca* (*Schitoviridae*, *Herpesviridae* e *Demereciviridae*) e *B. sazimai* (*Inoviridae*, *Alloherpesviridae*, *Iridoviridae*, *Zierdtviridae* e *Casjensviridae*), os resultados das análises de Jaccard indicaram que os *pools* de diferentes tamanhos e diferentes espécies são semelhantes entre si, com exceção de Bsaz 2.

Uma possível explicação para as composições serem semelhantes é a proximidade filogenética entre elas. Os padrões filogenéticos encontrados em diversos estudos indicam que espécies de *Bothrops* insulares do Brasil são decorrentes de especiação recente proveniente de flutuações do nível do mar, e dados recentes indicam que *B. sazimai* foi a espécie que se separou mais recentemente das populações de *Bothrops* continentais, há cerca de 420.000 anos atrás (Barbo *et al.* 2022). Isso sugere que *B. sazimai* tenha se especiado recentemente, diferindo em alguns fatores de *B. jararaca* (Grazziotin *et al.*, 2006). Logo, as duas espécies avaliadas são muito próximas filogeneticamente, embora fatores evolutivos - como efeito fundador (Sendell-Price *et al.*, 2021) e deriva genética (Wiens *et al.*, 2022) – e ecológicos como a grande diferença no ambiente e disponibilidade das presas tenham levado à mudanças ecológicas e morfológicas aceleradas em *B. sazimai*, o curto tempo de especiação pode ter sido um fator importante para não haver diferença na composição de famílias virais entre as espécies.

Um fator que pode ter influenciado especificamente na maior riqueza

viral registrada em *B. sazimai* é a grande densidade populacional dessa espécie (Barbo *et al.* 2016) quando comparado à densidade populacional da espécie continental. Animais insulares que não possuem um predador e competidores, tendem a possuir uma grande densidade populacional (Case, 1975; Hasegawa, 2003; Taverne *et al.*, 2019). A riqueza e densidade de parasitas, frequentemente estão associados positivamente à maior densidade de hospedeiros (Maganga *et al.*, 2014; Mbanzulu *et al.*, 2020). A grande densidade populacional somada à uma maior agregação populacional e à baixa diversidade de hospedeiros na ilha, facilitam a propagação de infecções (Papaix *et al.*, 2015; Susi & Laine, 2020). Esses fatores podem explicar também a menor riqueza viral encontrada em *B. jararaca*. Por habitarem ambientes geograficamente extensos, os indivíduos de *B. jararaca* estão mais dispersos nas áreas, reduzindo o contato frequente entre esses indivíduos e reduzindo a probabilidade de infecção entre eles. Além disso, a grande diversidade de espécies no ambiente em que *B. jararaca* ocupa, pode ocasionar o efeito diluidor: o aumento da biodiversidade em um determinado local, reduz a prevalência e transmissão de patógenos entre hospedeiros (Lee & Mohd, 2020; Johnson & Thielges, 2010; Johnson *et al.*, 2013).

Outras hipóteses de variação da comunidade viral nas *Bothrops* estão ligadas à ontogenia das serpentes. Mais precisamente, esperávamos um acúmulo de famílias virais ao longo do desenvolvimento dos indivíduos. Além disso, esperávamos que as mudanças ontogenéticas na dieta de *B. jararaca* (Sazima, 1992), refletissem em mudanças na composição viral ao longo do desenvolvimento. No entanto, registramos um padrão de riqueza de famílias virais contrário ao previsto com uma correlação negativa entre tamanho das serpentes e a riqueza viral para as duas espécies. As bibliotecas que concentraram a maior riqueza de famílias virais foram a Bjar 1 (n = 6), Bjar 2 (n = 6) e Bsaz 1 (n = 11). Isso possivelmente deve-se ao fato de os animais juvenis, no geral, não possuem o sistema imune completo, diferentemente dos adultos, ficando suscetíveis à diferentes infecções (Burns-Naas *et al.*, 2008; Pilorz *et al.*, 2005; Winzeler *et al.*, 2014). Em répteis, o sistema imune parece responder da mesma forma. Stromsland & Zimmerman (2017) avaliaram o sistema imune de *Trachemys scripta*, espécie de testudine, e confirmaram que a relação de números de parasitas em répteis diminui conforme o avanço da

idade. Isso deve-se ao pleno desenvolvimento e à resposta eficaz dos anticorpos naturais em indivíduos adultos. Outro estudo com testudines refletiu no mesmo resultado, indivíduos adultos de *Chrysemys picta* apresentaram quantidade superior de anticorpos naturais à indivíduos juvenis (Judson *et al.*, 2020). Em serpentes o mesmo foi observado por Ujvari & Madsen (2011), sugerindo que a produção aumentada de anticorpos naturais em pítons adultas possui impacto positivo na resposta imune às infecções. O aumento de anticorpos naturais tende a desempenhar um papel fundamental, auxiliando as serpentes a responderem de forma mais eficaz a patógenos, especialmente à medida que envelhecem.

Uma segunda possibilidade é a de que indivíduos mais jovens de *Bothrops* tendam a se alimentar com uma frequência relativamente maior do que os adultos, resultando em acúmulo de famílias virais no conteúdo intestinal adquirido da dieta. A presença de famílias virais associada à dieta dos indivíduos vem sendo estudada em diversos grupos de animais (Fontenele *et al.*, 2019; Geoghegan *et al.*, 2022; Salmier *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2019). Uma maior frequência de alimentação de jovens foi registrada, por exemplo, para *Bothrops itapetiningae* através de análises de conteúdo estomacal (Leão *et al.*, 2014). Os autores discutiram que a alta taxa metabólica associada ao desenvolvimento e a incapacidade de capturar presas grandes poderiam forçar indivíduos jovens a se alimentar mais frequentemente.

Além disso, nem a espécie de serpente nem o tamanho dos indivíduos pareceu ser importante para a estruturação da composição das comunidades virais a nível de família de acordo com a análise de *Jaccard* e à análise de elementos de estrutura de metacomunidades empregadas. No entanto, a análise de metacomunidades apresentou uma coerência positiva, indicando que as famílias virais avaliadas estão respondendo a um mesmo gradiente ambiental. Isso indica que outros fatores não avaliados podem ser importantes para a estruturação das comunidades virais.

## 7. CONCLUSÃO

O presente estudo, apresentou o viroma gastrointestinal de *B. jararaca* e *B. sazimai*, sendo pioneiro nesta área para ambas as espécies. Observou-se que

o viroma das duas espécies é predominantemente composto por bacteriófagos, além da presença de algumas famílias virais patogênicas em vertebrados. Embora a riqueza média de vírus por *pool* não tenha diferido entre as duas espécies de *Bothrops*, a riqueza total de famílias virais foi maior em *B. sazimai*, mesmo a espécie se alimentando de uma diversidade menor de presas e estando presente uma área geográfica menor e menos complexa. Além disso, não foi possível identificar uma relação entre a faixa etária dos indivíduos/dieta com a diversidade viral observada. Embora tenhamos registrados variação na riqueza de famílias virais de acordo com a espécie e o desenvolvimento ontogenético, não registramos padrões claros de variação na composição de espécies (análises de similaridade e de elementos de estrutura de metacomunidade) de acordo com essas variáveis.

Torna-se essencial ampliar os estudos virais acerca destas espécies e de outros répteis através de métodos de amostragem diversificados, como a utilização de tecidos e fezes, aumento do número amostral e avaliação do viroma de outras espécies de serpentes, a fim de identificar os agentes virais associados a esses indivíduos, principalmente com foco na preservação das espécies no entendimento das relações entre vírus e hospedeiro.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahne, W., Neubert, W.J., Thomsen, I. 1987. Reptilian Viruses: Isolation of Myxovirus-like Particles from the Snake *Elaphe Oxycephala*. Journal of Veterinary Medicine, 34(1-10): 607-612. doi:10.1111/j.1439-0450.1987.tb00441.x
- Alexander, K.A., Carlson, C.J., Lewis, B.L., Getz, W.M., Marathe, M.V., Eubank, S.G., Sanderson, C.E., Blackburn, J.K. 2018. The Ecology of Pathogen Spillover and Disease Emergence at the Human-Wildlife-Environment Interface. The Connections Between Ecology and Infectious Disease, 5: 267-298. doi: 10.1007/978-3-319-92373-4\_8
- Allaire, J. 2012. *RStudio*: Integrated Development Environment for R. Boston, MA, EUA, 770: 165-171.
- Andrews, S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence

- data. Disponível em:  
<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Araújo, M.S. & Martins, M. 2006. Defensive Behavior in Pit Vipers of the Genus *Bothrops* (Serpentes: Viperidae). *Herpetological Journal*, 16(3): 297-303.
- Argenta, F.F., Hepojoki, J., Smura, T., Szirovicza, L., Hammerschmitt, M.E., Driemeier, D., Kipar, A., Hetzel, U. 2020. Identification of Reptarenaviruses, Hartmaniviruses, and a Novel Chuvirus in Captive Native Brazilian Boa Constrictors with Boid Inclusion Body Disease. *Journal of Virology*, 94(1): e00001-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00001-20>.
- Bacandritsos, N., Granato, A., Budge, G., Papanastasiou, I., Roinioti, E., Caldon, M., Falcaro, C., Gallina, A., Mutinelli, F. 2010. Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105(3): 335-340. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.08.004>
- Baltimore, D. 1971. Viral Genetic Systems. *Trans N Y Acad Sci.*, 33(3): 327-332. DOI: 10.1111/j.2164-0947.1971.tb02600.x
- Banci, K.R.S. 2023. História Natural e Ecologia da jararaca-ilhoa, *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae). Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto. 2023.
- Barba, M., Czosnek, H., Hadidi, A. 2014. Historical Perspective, Development and Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Virology. *Viruses*, 6(1): 106-136. DOI: 10.3390/v6010106
- Barbo, F.E., Marques, O.A.V., Sawaya, R.J. 2011. Diversity, Natural History and Distribution of Snakes in the Municipality of São Paulo. *South American Journal of Herpetology*, 6(3): 135-160. <http://dx.doi.org/10.2994/057.006.0301>
- Barbo, F.E., Gasparini, J.L., Almeida, A.P., Zaher, H., Grazziotin, F.G., Gusmão, R.B., Ferrarini, J.M.G. 2016. Another new and threatened species of lancehead genus *Bothrops* (Serpentes, Viperidae) from Ilha dos Franceses, Southeastern Brazil. *Zootaxa*, 4097(4): 511-529. <http://doi.org/10.11646/zootaxa.4097.4.4>

- Barbo, F.E., Grazziotin, F.G., Pereira-Filho, G.A., Freitas, M.A., Abrantes, S.H.F., Kokubum, M.N.C. 2022. Isolated by dry lands: integrative analyses unveil the existence of a new species and a previously unknown evolutionary lineage of Brazilian Lanceheads (Serpentes: Viperidae: *Bothrops*) from a Caatinga moist-forest enclave. *Can. J. Zool.*, 100(1): 147-159. DOI: 10.1139/cjz-2021-0131
- Becker, D.J., Washburne, A.D., Faust, C.L., Pulliam, J.R.C., Mordecai, E.A., Lloyd-Smith, J.O., Plowright, R.K. 2019. Dynamic and integrative approaches to understanding pathogen spillover. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 374: 20190014. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2019.0014>
- Bhukya, P.L. & Nawadkar, R. 2018. Potencial Applications and Challenges of Metagenomics in Human Viral Infections. *Metagenomics for Gut Microbes*. DOI: 10.5772/intechopen.75023
- Billaud, M., Lamy-Besnier, Q., Lossouarn, J., Moncaut, E., Dion, M.B., Moineau, S., Traoré, F., Chatelier, E.L., Denis, C., Estelle, J., Achard, C., Zemb, O., Petit, M. 2021. Analysis of viromes and microbiomes from pig fecal samples reveals that phages and prophages rarely carry antibiotic resistance genes. *ISME Communications*, 1(1): 55. doi: 10.1038/s43705-021-00054-8
- Boback, S.M. & Guyer, C. 2003. Empirical evidence for an optimal body size in snakes. *Evolution*, 57(2): 345-351. DOI: 10.1111/j.0014-3820.2003.tb00268.x
- Bosco-Lauth, A.M., Hartwig, A.E., Bowen, R.A. 2018. Reptiles and Amphibians as Potential Reservoir Hosts of Chikungunya Virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 98(3): 841-844. doi:10.4269/ajtmh.17-0730
- Bower, D.S., Brannelly, L.A., McDonald, C.A., Webb, R.J., Greenspan, S.E., Vickers, M., Gardner, M.G., Greenlees, M.J. 2018. A review of the role of parasites in the ecology of reptiles and amphibians. *Austral Ecology*, 44(3). doi:10.1111/aec.12695
- Braga, C., Oliveira, J.A., Cerqueira, R. 2017. METACOMUNIDADES: UMA INTRODUÇÃO AOS TERMOS E CONCEITOS. *Oecologia Australis*, 21(2): 108-118. DOI: 10.4257/oeco.2017.2102.02
- Burns-Naas, L.A., Hastings, K.L., Ladics, G.S., Makris, S.L., Parker, G.A.,



- Holsapple, M.P. 2008. What's So Special about the Developing Immune System? *International Journal of Toxicology*, 27: 223-254. DOI: 10.1080/10915810801978110
- Cadle, J.E. 1985. The Neotropical Colubrid Snake Fauna (Serpentes: Colubridae): Linage Components and Biogeography. *Systematic Biology*, 34(1): 1-20. doi:10.1093/sysbio/34.1.1
- Cadle, J.E. & Greene, H.W. 1993. Phylogenetic Patterns, Biogeography and the Ecological Structure of Neotropical Snake Assemblages. *Species Diversity in Ecological Communities: Historical and Geographical Perspectives*, 281-293.
- Campbell, J.A. & Lamar, W.W. 2004. *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. vol I e II. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Carini, A.D.P., Ariel, E., Picard, J., Elliot, L. 2017. Antibiotic Resistant Bacterial Isolates from Captive Green Turtles and In Vitro Sensitivity to Bacteriophages. *Int. J. Microbiol.*, 2017:5798161. doi: 10.1155/2017/5798161
- Carrasco, P.A., Mattoni, C.I., Leynaud, G.C., Scrocchi, G.J. 2012. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). *Zoologica Scripta*, 41(2): 109-124. DOI: 10.1111/j.1463-6409.2011.00511.x
- Carvalho, F.A., Nascimento, M.T., Oliveira Filho, A.T. 2008. Composição, riqueza e heterogeneidade da flora arbórea da bacia do rio São João, RJ, Brasil. *Acta bot. bras.*, 22(4): 929-940. DOI: 10.1590/S0102-33062008000400004
- Case, T.J. 1975. Species Numbers, Density Compensation, and Colonizing Ability of Lizards on Islands in the Gulf of California. *Ecology*, 56(1): 3-18. <https://doi.org/10.2307/1935296>
- Chaitanya, K.V. 2019. Structure and Organization of Virus Genome. In: *Genome and Genomics*, 1: 1-30. doi: 10.1007/978-981-15-0702-1\_1
- Chinchar, V.G., Hick, P., Ince, I.A., Jancovich, J.K., Marschang, R., Qin, Q., Subramaniam, K., Waltzek, T.B., Whittington, R., Williams, T., Zhang, Q. 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Iridoviridae*. *Journal of General Virology*, 98(5): 890-891. DOI: 10.1099/jgv.0.000818

- Chong, R., Shi, M., Grueber, C.E., Holmes, E.C., Hogg, C.J., Belov, K., Barrs, V.R. 2019. Fecal Viral Diversity of Captive and Wild Tasmanian Devils Characterized Using Virion-Enriched Metagenomics and Metatranscriptomics. *J. Virol.*, 93(11): e00205-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00205-19>
- Choumet, V. & Desprès, P. 2015. Dengue and other flavivirus infections. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 32(2): 473-478.
- Cibulski, S.P., Lima, F.E.S., Teixeira, T.F., Varela, A.P.M., Scheffer, C.M., Mayer, F.Q., Witt, A.A., Roehe, P.M. 2021. Detection of multiple viruses in oropharyngeal samples from Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) using viral metagenomics. *Archives of Virology*, 166: 207-212. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04825-x>
- Clements, F.E. 1916. Plant succession: an analysis of the development of vegetation. Washington, DC, DC: Carnegie Institution of Washington: 1-512.
- Corrin, T., Ackford, R., Mascarenhas, M., Greig, J., Waddell, L.A. 2021. Eastern Equine Encephalitis Virus: A Scoping Review of the Global Evidence. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 21(5): 305-320. DOI: 10.1089/vbz.2020.2671
- Cortines, E., Pereira, A.L., Santos, P.R.O., Santos, G.L., Valcarcel, R. 2011. Vegetação Arbórea em Vertentes com Orientação Norte e Sul na Floresta Montana, Nova Friburgo-RJ. *Floresta e Ambiente*, 18(4): 428-437. doi 10.4322/floram.2011.062
- Cristofori, F., Dargenio, V.N., Dargenio, C., Miniello, V.L., Barone, M., Francavilla, R. 2021. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects of Probiotics in Gut Inflammation: A Door to the Body. *Front. Immunol.*, 12: 5788386. doi: 10.3389/fimmu.2021.578386
- D'arc, M., Ayoub, A., Esteban, A., Learn, G.H., Boué, V., Liegeois, F., Etienne, L., Tagg, N., Leendertz, F.H., Boesch, C., Madinda, N.F., Robbins, M.M., Gray, M., Cournil, A., Ooms, M., Letko, M., Simon, V.A., Sharp, P.M., Hahn, B.H., Delaporte, E., Ngole, E.M., Peeters, M. 2015. Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. *PNAS*, 112(11). <https://doi.org/10.1073/pnas.1502022112>

- D'arc, M., Moreira, F.R.R., Dias, C.A., Souza, A.R., Seuánez, H.N., Soares, M.A., Tavares, M.C.H., Santos, A.F.A. 2020. The characterization of two novel neotropical primate papillomaviruses supports the ancient within-species diversity model. *Virus Evolution*, 6(1). <https://doi.org/10.1093/ve/veaa036>
- Dantas, H.G.R., Lima, H.C., Bohrer, C.B.A. 2009. Mapeamento da vegetação e da paisagem do município de Armação dos Búzios, Rio de Janeiro, Brasil. *Rodriguesia*, 60(1): 25-38. DOI: 10.1590/2175-7860200960102
- Daszak, P., Berger, L., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., Green, D.E., Speare, R. 1999. Emerging Infectious Diseases and Amphibian Population Declines. *Emerg Infect Dis.* 5(6): 735-748. doi: 10.3201/eid0506.990601
- David, E.S., Fonseca, E.C., Carvalho, J.F.N., Marinho, R.S.S., Duro, R.L.S., Komninakis, S.V., Souto, R.N.P. 2021. Metagenomics applied to the detection of diarrhea viruses in humans: Systematic review. *Acta Tropica*, 227(5). <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106287>
- Dervas, E., Hepojoki, J., Laimbacher, A., Romero-Palomo, F., Jelinek, C., Keller, S., Smura, T., Hepojoki, S., Kipar, A., Hetzel, U. 2017. Nidovirus-Associated Proliferative Pneumonia in the Green Tree Python (*Morelia viridis*). *Journal of Virology*, 91(21): e00718-17. DOI: 10.1128/JVI.00718-17
- Dervas, E., Hepojoki, J., Smura, T., Prähauser, B., Windbichler, K., Blümich, S., Ramis, A., Hetzel, U., Kipar, A. 2020. Serpentoviruses: more than respiratory pathogens. *Journal of Virology*, 94(18). DOI: 10.1128/JVI.00649-20
- De Voe, R., Geissler, K., Elmore, S., Rotstein, D., Lewbart, G., Guy, J., 2004. Ranavirus-associated morbidity and mortality in a group of captive eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 35(4): 534-543. DOI: <http://dx.doi.org/10.1638/03-037>
- de Jonge, N., Carlsen, B., Christensen, M.H., Pertoldi, C., Nielsen, J.L. 2022. The Gut Microbiome of 54 Mammalian Species. *Front. Immunol.*, 13:886252. doi: 10.3389/fmicb.2022.886252
- De Sordi, L., Lourenço, M., Debarbieux, L. 2019. The Battle Within: Interactions of Bacteriophages and Bacteria in the Gastrointestinal Tract. *Cell Host &*

- Microbiome, 25(2): 210-218. doi: 10.1016/j.chom.2019.01.018.
- Domingo-Calap, M.L., Barnabéu-Gimeno, M., Aure, C.M., Marco-Noales, E., Domingo-Calap, P. 2022. Comparative Analysis of Novel Lytic Phages for Biological Control of Phytopathogenic *Xanthomonas* spp. Microbiology Spectrum, 10(6): e02960-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02960-22>
- Earl, J.E. & Gray, M.J. 2014. Introduction of Ranavirus to Isolated Wood Frog Populations Could Cause Local Extinction. EcoHealth, 11: 581-592. DOI: 10.1007/s10393-014-0950-y
- Eleni, C., Corteggio, A., Altamura, G., Meoli, R., Cocumelli, C., Rossi, G., Friedrich, K.G., Di Cerbo, P., Borzacchiello, G. 2017. Detection of Papillomavirus DNA in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma and Multiple Papillomas in Captive Reptiles. J. Comp. Path., 157: 23-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2017.04.005>
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., Käller, M. 2016. MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. Bioinformatics. 32(19): 3047- 3048. doi: 10.1093/bioinformatics/btw354
- Lee, L.W.F. & Mohd, M.H. 2020. The Effects of Amplification and Dilution Agent in Transmitting Sin Nombre Virus (SNV) in Deer Mouse Population. MATEMATIKA, 36(2): 85-98. DOI: 10.11113/matematika.v36.n2.1244
- Fenwick, A.M., Gutberlet Jr., R.L., Evans, J.A., Parkinson, C.L. 2009. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). Zoological of Journal of de Linnean Society, 156(3): 617-640. DOI:10.1111/j.1096-3642.2008.00495.x
- Ferreira, A.L., Coutinho, B.R., Pinheiro, H.T., Thomaz, L.D. 2007. Composição florística e formações vegetais da Ilha dos Franceses, Espírito Santo. Bol. Mus. Biol. Mello Leitão, 22: 25-44.
- Fontenele, R.S., Lacorte, C., Lamas, N.S., Schmidlin, K., Varsani, A., Ribeiro, S.G. 2019. Single Stranded DNA Viruses Associated with Capybara Faeces Sampled in Brazil. Viruses, 11(8): 710. doi: 10.3390/v11080710

- Fraile, A., McLeish, M.J., Pagán, I., González-Jara, P., Piñero, D., García-Arenal, F. 2017. Environmental heterogeneity and the evolution of plant-virus interactions: Viruses in wild pepper populations. *Virus Research*, 241: 68-76. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.virusres.2017.05.015>
- Furtado, M.F.D. 2007. Aspectos sistemáticos e biológicos que atuam na diversidade da composição de venenos em serpentes peçonhentas brasileiras. in L.B. Nascimento and M.E. Oliveira (Eds.), *Herpetologia no Brasil II*. Sociedade Brasileira de Herpetologia, Belo Horizonte, 183-200.
- Gaborieau, B. & Debarbieux, L. 2023. The role of the animal host in the management of bacteriophage resistance during phage therapy. *Current Opinion in Virology*, 58:101290. doi: 10.1016/j.coviro.2022.101290.
- Gauch, H.G. & Whittaker, R.H. 1972. Comparison of Ordination Techniques. *Ecology*, 53(5): 868-875. <https://doi.org/10.2307/1934302>
- Gebhardt, L.P. & Hill, D.W. 1960. Overwintering of Western Equine Encephalitis Virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 104: 695-698. DOI: 10.3181/00379727-104-25955
- Geoghegan, J.L., Di Giallonardo, F., Wille, M., Ortiz-Baez, A.S., Costa, V.A., Ghaly, T., Mifsud, J.C.O., Turnbull, O.M.H., Bellwood, D.R., Williamson, J.E., Holmes, E.C. 2021. Virome composition in marine fish revealed by meta-transcriptomics. *Virus Evolution*, 7(1): veab005. doi: 10.1093/ve/veab005
- Gilbert, M., Miquelle, D.G., Goodrich, J.M., Reeve, R., Cleaveland, S., Matthews, L., Joly, D.O. 2014. Estimating the Potential Impact of Canine Distemper Virus on the Amur Tiger Population (*Panthera tigris altaica*) in Russia. *PLoS ONE*, 9(10): e110811. doi:10.1371/journal.pone.0110811
- Gindin, M., Febvre, H.P., Rao, S., Wallace, T.C., Weir, T.L. 2018. Bacteriophage for Gastrointestinal Health (PHAGE) Study: Evaluating the Safety and Tolerability of Supplemental Bacteriophage Consumption. *Journal of the American College, OF Nutrition*, 38(1): 1-8. DOI: 10.1080/07315724.2018.1483783
- Gleason, H.A. 1926. The individualistic concept of the plant association. *Bulletin of*

- the Torrey Botanical Club, 53, 7-26.
- Golkar, Z., Bagasra, O., Pace, D., G. 2014. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *J. Infect. Dev. Ctries.*, 8(2):129-36. doi: 10.3855/jidc.3573.
- Goodman, R.M., Hargadon, K.M., Carter, E.D. 2018. Detection of Ranavirus in Eastern Fence Lizards and Eastern Box Turtles in Central Virginia. *Northeastern Naturalist*, 25(3): 391-398. <https://doi.org/10.1656/045.025.0306>
- Govett, P.D., Harms, C.A., Johnson, A.J., Latimer, K.S., Wellehan Jr., J.F.X *et al.* 2005. Lymphoid Follicular Cloacal Inflammation Associated with a Novel Herpesvirus in Juvenile Alligators (*Alligator Mississippiensis*). *J Vet Diagn Invest*, 17: 474-479. doi: 10.1177/104063870501700513.
- Grazziotin, F.G., Monzel, M., Echeverrigary, S., Bonatto, S.L. 2006. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology*, 15: 3969- 3982. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03057.
- Greenblatt, R.J., Quackenbush, S.L., Casey, R.N., Rovnak, J. *et al.* 2005. Genomic Variation of the Fibropapilloma-Associated Marine Turtle Herpesvirus across Seven Geographic Areas and Three Host Species. *J. Virol.*, 79(2): 1125-1132. doi: 10.1128/JVI.79.2.1125-1132.2005
- Greene, W., Chan, B., Bromage, E., Grose, J.H., Walsh, C., Kortright, K. *et al.* 2021. The Use of Bacteriophages and Immunological Monitoring for the Treatment of a Case of Chronic Septicemic Cutaneous Ulcerative Disease in a Loggerhead Sea Turtle *Caretta caretta*. *Journal of Aquatic Animal Health* 33:139–154. DOI: 10.1002/aah.10130
- Grozinger, C.M. & Flenniken, M.L. 2019. Bee viruses: Ecology, Pathogenicity, and Impacts. *Annu. Rev. Entomol.*, 64: 205-226. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011118-111942>
- Guedes, T.B., Entiauspe-Neto, O.M., Costa, H.C. 2023. Lista de répteis do Brasil: padrões e tendências. *Herpetologia Brasileira*. DOI 10.5281/zenodo.7829012
- Guo, Y., Li, Z., Dong, S., Si, X., Ta, N., Liang, H., Xu, L. 2023. Multiple infections of

- zoonotic pathogens in wild Brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*). *Vet Med Sci.*, 9(5): 2201-2211. DOI: 10.1002/vms3.1214
- Gutiérrez, B. & Domingo-Calap, P. 2020. Phage Therapy in Gastrointestinal Diseases. *Microorganisms*, 8(9): 1420. doi: 10.3390/microorganisms8091420
- Haagmans, B.L., Andeweg, A.C., Osterhaus, A.D.M.E. 2009. The Application of Genomics to Emerging Zoonotic Viral Diseases. *PLoS Pathogens*, 5(10): e1000557. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000557>
- Handelsman, J. 2004 Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4): 669-685. DOI: 10.1128/MBR.68.4.669-685.2004
- Hartmann, P.A., Hartmann, M.T., Giasson, L.O.M. 2003. Uso do hábitat e alimentação em juvenis de *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae) na Mata Atlântica do sudeste do Brasil. *Phyllomedusa*, 2(1): 35-41. DOI: 10.11606/issn.2316-9079.v2i1p35-41
- Harvey, E. & Holmes, E.C. 2022. Diversity and evolution of the animal virome. *Nature Reviews Microbiology*, 20: 321-334. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00665-x>
- Hasegawa, M. 2003. Ecological Diversification of Insular Terrestrial Reptiles: A Review of the Studies on the Lizard and Snakes of the Izu Islands. *Global Environmental Research*, 7(1): 59-67.
- Hauser, B., Mettler, F., Rubel, A. 1983. Herpesvirus-like infection in two young boas. *J. Comp. Path.*, 93(4): 515-9. doi: 10.1016/0021-9975(83)90057-9.
- Hepojoki, J., Salmenperä, P., Sironen, T., Hetzel, U., Korzyukov, Y., Kipar, A., Vapalahti, O. 2015. Arenavirus Coinfections Are Common in Snakes with Boid Inclusion Body Disease. *Journal of Virology*, 89(16): 8657-8660. doi:10.1128/JVI.01112-15.
- Hoon-Hanks, L.L., Stöhr, A.C., Anderson, A.J., Evans, D.E., Nevarez, J.G., Díaz, R.E., Rodgers, C.P., Cross, S.T., Steiner, H.R., Parker, R.R., Stenglein, M.D. 2020. Serpentovirus (Nidovirus) and Orthoreovirus Coinfection in Captive Veiled Chameleons (*Chamaeleo calyptratus*) with Respiratory Disease.

- Viruses, 12(11): 1329. <https://doi.org/10.3390/v12111329>
- Hughes-Hanks, J.M., Schommer, S.K., Mitchell, W.J., Shaw, D.P. 2010. Hepatitis and enteritis caused by a novel herpesvirus in two monitor lizards (*Varanus spp.*). J. Vet. Diagn. Invest., 22: 295-299. doi: 10.1177/104063871002200224
- Hyatt, A.D., Williamson, M., Coupar, B.E.H., Middleton, D., Hengstberger, S.G., Gould, A.R., Selleck, P., Wise, T.G., Kattenbelt, J., Cunningham, A.A., Lee, J. 2002. First identification of a ranavirus from green pythons (*Chondropython viridis*). Journal of Wildlife Diseases, 38(2): 239-252. DOI: 10.7589/0090-3558-38.2.239
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2023. Taxonomy. Disponível em: <https://ictv.global/taxonomy>
- Jaccard, P. 1901. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et du Jura. Bull. Soc. Vaud. Sc. Nat., XXXVII: 142. DOI: 10.5169/seals-266450
- Jacobson, E.R., Gaskin, J.M., Page, D., Iverson, W.O., Johnson, J.W. 1981. Illness Associated with Paramyxo-like Virus Infection in a Zoologic Collection of Snakes. Journal of American Veterinary Medical Association, 179(11): 1227-1230.
- Jacobson, E.R., Gaskin, J.M. Wells, S., Bowler, K., Schumacher, J. 1992. Epizootic of Ophidian Paramyxovirus in a Zoological Collection: Pathological, Microbiological and Sorological Findings. Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 23(3): 318-327.
- Jakobsen, R.R., Haahr, T., Humaidan, P., Jensen, J.S., Kot, W.P., Castro-Mejia, J.L., Deng, L., Leser, T.D., Nielsen, D.S. 2020. Characterization of the Vaginal DNA Virome in Health and Dysbiosis. Viruses, 12(10): 1143. DOI: 10.3390/v12101143
- Johnson, P.T.J. & Thieltges, D.W. 2010. Diversity, decoys and the dilution effect: how ecological communities affect disease risk. The Journal of Experimental Biology, 213: 961-970. doi:10.1242/jeb.037721
- Johnson, P.T.J., Preston, D.L., Hoverman, J.T., Richgels, K.L.D. 2013. Biodiversity



- decreases disease through predictable changes in host community competence. *Nature*, 494(7436): 230-233. doi: 10.1038/nature11883
- Johnsrude, J.D., Raskin, R.E., Hoge, A.Y.A., Erdos, G.W. 1997. Intraerythrocytic Inclusions Associated with Iridoviral Infection in a Fer de Lance (*Bothrops moojeni*) Snake. *Veterinary Pathology*, 34(3): 235-238. DOI: 10.1177/030098589703400311
- Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., Daszak, P. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451: 990-993. DOI: 10.1038/nature06536
- Judson, J.M., Reding, D.M., Bronikowski, A.M. 2020. Immunosenescence and its influence on reproduction in a long-lived vertebrate. *Journal of Experimental Biology*, 223: jeb.223057. DOI: 10.1242/jeb.223057
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A. 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12): 1647-1649. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts199
- Kemenesi, G., Kutucz, K., Zana, B., Földes, F., Urbán, P., Vlaschenko, A., Kravchenko, A., Budinski, I., Szodoray-Parádi, F., Bücs, S., Jére, C., Csősz, I., Szodoray-Parádi, A., Estók, P., Görföl, T., Boldogh, S., Jakab, F. 2018. Diverse replication-associated protein encoding circular DNA viruses in guano samples of Central-Eastern European bats. *Archives of Virology*, 163: 671-678. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3678-5>
- Khalfi, P., Denis, Z., McKeller, J., Merolla, G., Chavey, C., Ursic-Bedoya, J., Soppa, L., Szirovicza, L., Hetzel, U., Dufourt, J., Leyrat, C., Goldmann, N., Goto, K., Verrier, E., Baumert, T.F., Glebe, D., Courgnaud, V., Gregoire, D., Hepojoki, J., Majzoub, K. 2024. Comparative analysis of human, rodent and snake deltavirus replication. *PLoS Pathog*, 20(3): e1012060. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012060>
- Klukowski, N., Eden, P., Uddin, M.J., Sarker, S. 2024. Virome of Australia's most

- endangered parrot in captivity evidenced of harboring hitherto unknown viruses. *Microbiology Spectrum*, 12(1). DOI: 10.1128/spectrum.03052-23
- König, M-T., Fux, R., Link, E., Sutter, G., Märtlbauer, E., Didier, A. 2021. Identification and Characterization of Circular Single-Stranded DNA Genomes in Sheep and Goat Milk. *Viruses*, 13(11): 2176. doi: 10.3390/v13112176.
- Kumar, K.R., Cowley, M.J., Davis, R.L. 2019. Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies. *Semin Thromb Hemost.*, 45(7): 661-673. DOI: 10.1055/s-0039-1688446
- Kolesnikovas, C.K.M., Grego, K.F., Albuquerque, LC.R., Jacobson, E.R., Monzei, T.A., Mehnert, D.U., Catão-Dias, J.L. 2006. Ophidian paramyxovirus in Brazilian vipers (*Bothrops alternatus*). *Veterinary Record*, 159(12): 390-392. DOI: 10.1136/vr.159.12.390
- Leão, S.M., Pelegrin, N., Nogueira, C.C., Brandão, R.A. 2014. Natural History of *Bothrops itapetiningae* Boulenger, 1907 (Serpentes: Viperidae: Crotalinae), an Endemic Species of the Brazilian Cerrado. *Journal of Herpetology*, 48(3): 324-331. <http://dx.doi.org/10.1670/12-191>
- Leibold, M.A. & Mikkelsen, G.M. 2002. Coherence, species *turnover*, and boundary clumping: elements of meta-community structure. *Oikos*, 97(2): 237-250. DOI: 10.1034/j.1600-0706.2002.970210.x
- Leineweber, C., Müller, E., Marschang, R.E. 2021. Herpesviruses in Captive Chelonians in Europe Between 2016 and 2020. *Front. Vet. Sci.*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.733299>
- Leineweber, C. & Marschang, R.E. 2023. Detection of nidoviruses in samples collected from captive snakes in Europe between 2016 and 2021. *The veterinary record*, 1912(1): e2588. DOI: 10.1002/vetr.2588
- Li, L., Victoria, J.G., Wang, C., Jones, M., Fellers, G.M., Kunz, T.H., Delwart, E. 2010. Bat Guano Virome: Predominance of Dietary Viruses from Insects and Plants plus Novel Mammalian Viruses. *Journal of Virology*, 84(14): 6955-6965. doi:10.1128/JVI.00501-10
- Li, H., Mendelsohn, E., Zong, C., Zhang, W., Hagan, E., Wang, N., Li, S., Yan, H.,

- Huang, H., Zhu, G., Ross, N., Chmura, A., Terry, P., Fielder, M., Miller, M., Shi, Z., Daszak, P. 2019. Human-animal interactions and bat coronavirus spillover potential among rural residents in Southern China. *Biosafety and Health*, 1(2): 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2019.10.004>
- Lillywhite, H.B. & Henderson, R.W. 1993. Behavioral and Functional Ecology of Arboreal Snakes. *In*: Seigel, R.A. e Collins, J.T. *Snakes: Ecology and Behavior*, 1: 1-48.
- Liu, P.C., Lin, C.C., Lin, S.L., Chen, M.H., Lee, L.H., Chen, Y.K., Chang, C.H., Tung, K.C., Chen, Y.P., Tu, C.Y., Hung, S.W., Wang, W.S. 2011. Vesicular diseases associated with poxvirus-like infection in cultured soft shell turtles (*Pelodiscus sinensis*) in Taiwan. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 31(2): 73-80.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., Law, M. 2012. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012(7): 251364. DOI: 10.1155/2012/251364
- Liu, S., Xie, J., Cheng, J., Li, B., Chen, T., Fu, Y., Li, G., Wang, M., Jin, H., Wan, H., Jiang, D. 2016. Fungal DNA virus infects a mycophagous insect and utilizes it as a transmission vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 113(45): 12803-12808. doi: 10.1073/pnas.1608013113
- Liu, A., Tian, Z., Yin, C., Zou, J., Wu, S., Luo, Y., Chen, Y., Dai, Y., Yang, S., Li, Y., Li, T., Guo, P., Hu, X. 2023. The Analysis of Oral and Fecal Virome Detects Multiple Novel Emerging Viruses in Snakes. *Transboundary and Emerging Diseases*, (5): 1-13. DOI: 10.1155/2023/4214812
- Lovstad, J.N., Ossiboff, R.J., Kinsel, M.J., Gamble, K.C. 2019. Novel Herpesvirus Associated With Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma in Smooth Green Snakes (*Opheodrys vernalis*). *Veterinary Pathology*, 56(4): 630-635. DOI: 10.1177/0300985819837722
- Lo, M.Y., Ngan, W.Y., Tsun, S.M., Hsing, H-L., Lau, K.T., Hung, H.P., Chan, S.L., Lai, Y.Y., Yao, Y., Pu, Y., Habimana, O. 2019. A Field Study Into Hong Kong's Wet Markets: Raised Questions Into the Hygienic Maintenance of Meat Contact Surfaces and the Dissemination of Microorganisms Associated with Nosocomial Infections. *Front. Microbiol.*, 10: 2618. doi:

10.3389/fmicb.2019.02618

Lu, J., Yang, S., Wang, C., Wang, H., Gong, G., Xi, Y., Pan, J., Wang, X., Zeng, J., Zhang, J., Li, P., Shen, Q., Shan, T., Zhang, W. 2022. Gut virome of the World's Highest-Elevation Lizard Species (*Phrynocephalus erythrurus* and *Phrynocephalus theobaldi*) Reveals Versatile Commensal Viruses. *Microbiol Spectr.*, 10(1): e0187221. doi: 10.1128/spectrum.01872-21

Lunger, P.D., Hardy, W.D., Clark, H.F. 1974. C-Type Virus Particles in a Reptilian Tumor. *Journal of the National Cancer Institute*, 52(4): 1231-1235. doi:10.1093/jnci/52.4.1231

MacLachlan, N.J & Dubovi, E.J. 2016. Poxviridae. *In: Fenner's Veterinary Virology*, Fifth Edition, 7: 158-174. doi:10.1016/b978-0-12-800946-8.00008-8

Maganga, G.D., Bourgarel, M., Vallo, P., Dallo, T.D., Ngoagouni, Drexler, J.F., Drosten, C., Nakouné, E.R., Leroy, E.M., Morand, S. Bat Distribution Size or Shape as Determinant of Viral Richness in African Bats. *PLoS ONE*, 9(6): e100172. doi: 10.1371/journal.pone.0100172

Malaque, C.M.S & Gutiérrez. 2016. Snakebite Envenomation in Central and South America. *Critical Care Toxicology*, 1-22. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-20790-2\\_146-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-20790-2_146-1)

Mann, H.B. & Whitney, D.R. 1947. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *Ann. Math. Statist*, 18(1): 50-60. DOI: 10.1214/aoms/1177730491

Marques, O.A.V. 2021. A Ilha das Cobras: biologia, evolução e conservação da jararaca-ilhoa na Queimada Grande. Cotia: Ponto A Editora.

Marques, O.A.V., Martins, M., Sazima, I. 2002a. A jararaca da Ilha da Queimada Grande. *Ciência Hoje*, 31(186): 56-59.

Marques, O.A.V., Martins, M., Sazima, I. 2002b. A New Insular Species of Pitviper from Brazil, with Comments on Evolutionary Biology and Conservation of the *Bothrops jararaca* Group (Serpentes, Viperidae). *Herpetologica*, 58(3): 302-312. doi:10.1655/0018-0831(2002)058[0303:ANISOP]2.0.CO;2

- Marschang, R.E. 2011. Viruses Infecting Reptiles. *Viruses*, 3(11): 2087-2124. doi:10.3390/v3112087
- Marschang, R.E., Meddings, J.I., Ariel, E. 2021. Viruses of Reptiles. *Studies in Viral Ecology*, 2ed(13): 449-510. DOI:10.1002/9781119608370.ch13
- Martins, M., Araujo, M.S., Sawaya, R.J., Nunes, R. 2001. Diversity and evolution of macrohabitat use, body size and morphology in a monophyletic group of Neotropical pitvipers (*Bothrops*). *J. Zool. Lond.*, 254: 529-538. doi:10.1017/s0952836901001030
- Martins, M., Marques, O.A.V., Sazima, I. 2002. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. In: *Biology of the vipers*. Schuett, G.W., Hoggren, M., Douglas, M.E., Greene, H.W. (Eds). Eagle Mountain Publishing, L.C, 307-328.
- Mbanzulu, K.M., Mboera, L.E.G., Luzolo, F.K., Wumba, R., Misinzo, G., Kimera, S.I. 2020. Mosquito-borne viral diseases in the Democratic Republic of the Congo: a review. *Parasites Vectors*, 13(1): 103. doi: 10.1186/s13071-020-3985-7
- McInnes, C.J., Damon, J.K., Smith, G.L., McFadden, G., Isaacs, S.N. *et al.* 2023. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Poxviridae* 2023. *Journal of General Virology*, 104: 001849. DOI 10.1099/jgv.0.001849
- Miller, D.L. Mauel, M.J., Baldwin, C., Burtle, G., Ingram, D., Hines II, M.E., Frazier, K.S. 2003. West Nile Virus in Farmed Alligators. *Emerging Infectious Diseases*, 9(7): 794-799. doi: 10.3201/eid0907.030085
- Mishra, J., Mishra, P., Arora, N.K. 2021. Linkages between environmental issues and zoonotic diseases: with reference to COVID-19 pandemic. *Environmental Sustainability*, 4: 455-467. <https://doi.org/10.1007/s42398-021-00165-x>
- Men, A.E., Wilson, P., Siemering, K., Forrest, S. 2008. The Basics of Sanger Sequencing. Sanger DNA Sequencing. *In: Next Generation Genome Sequencing: Towards Personalized Medicine*, 1: 3-11. <https://doi.org/10.1002/9783527625130.ch1>
- Melgarejo-Giménez, A.R. 2006. Criação e manejo de serpentes. *In: Animais de*

- Laboratório: criação e experimentação. DOI: 10.7476/9788575413869.0025
- Ng, T.F.F., Mesquita, J.R., Nascimento, S.J., Kondov, N.O., Wong, W., Reuter, G., Knowles, N.J., Vega, E., Esona, M.D., Deng, X., Vinjé, J., Delwart, E. 2014. Feline fecal virome reveals novel and prevalent enteric viruses. *Veterinary Microbiology*, 171(1-2): 102-111. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.04.005
- Oliveira, T.F.P. 2019. Desenvolvimento e padronização de PCR digital e metagenômica viral para avaliação do *Senecavirus A* em surtos de doenças vesiculares ocorridos em suínos no Brasil. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2019.
- Oldstone, M.B.A. 2014. History of Virology. *Encyclopedia of Microbiology*, 608-612. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.00078-7
- Ondov, B.D., Bergman, N.H., Phillippy, A.M. 2011. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics*, 12(1): 385. DOI:10.1186/1471-2105-12-385
- Oriá, A.P., Silva, D.N., Raposo, A.C., Estrela-Lima, A., Pires, T.T., Gattamorta, M.A., Zamana, R.R., Matushima, E.R., Ofri, R. 2020. Atypical ocular Chelonoid herpesvirus manifestations in a captive Loggerhead turtle (*Caretta caretta*). *Veterinary Ophtalmology*, 24(1): 97-102. doi: 10.1111/vop.12837
- Origgi, F.C., Tecilla, M., Pilo, P., Aloisio, F., Otten, P. et al. 2015. A Genomic Approach to Unravel Host Pathogen Interaction in Chelonians: The Example of *Testudinid Herpesvirus 3*. *PLoS ONE*, 10(8): e0134897. doi:10.1371/journal.pone.0134897
- Orós, J., Lorenzo, H., Andrada, M., Recuero, J. 2004. Type A-like Retroviral Particles in a Metastatic Intestinal Adenocarcinoma in an Emerald Tree Boa (*Corallus caninus*). *Vet. Pathol.*, 41(5): 515-518. DOI: 10.1354/vp.41-5-515
- Papaix, J., Burdon, J.J., Zhan, J., Thrall, P.H. 2015. Crop pathogen emergence and evolution in agro-ecological landscapes. *Evolutionary Applications*, 8(4): 385-402. doi: 10.1111/eva.12251
- Park, A.W. 2019. Phylogenetic aggregation increases zoonotic potential of

- mammalian viruses. *Biology Letters*, 15: 20190668. DOI: 10.1098/rsbl.2019.0668
- Parker, S., Oliveira, L.C., Lefkowitz, E.J., Hendrickson, R.C., Bonjardim, C.A., Wold, W.S.M., Hartzler, H., Crump, R., Buller, R.M. 2018. The Virology of Taterapox Virus In Vitro. *Viruses*, 10(9): 463. DOI: 10.3390/v10090463
- Parrat, S.R., Numminen, E., Laine, AL. 2016. Infectious Disease Dynamics in Heterogeneous Landscapes. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 47: 283-306. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-121415-032321
- Parrish, C.R., Holmes, E.C., Morens, D.M., Park, E-C., Burke, D.S., Calisher, C.H., Laughlin, C.A., Saif, L.J., Daszak, P. 2008. Cross-Species Virus Transmission and the Emergence of New Epidemic Diseases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 72(3): 457-470. doi:10.1128/MMBR.00004-08
- Patterson, B.D. & Atmar, W. 1986. Nested subsets and the structure of insular mammalian faunas and archipelagos. *Biological Journal of the Linnean Society*, 28: 65-82. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1986.tb01749.x>
- Peck, K.M. & Luring, A.S. 2018. Complexities of Viral Mutation Rates. *Journal of Virology*, 92(14): e01031-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01031-17>.
- Pilorz, V., Jackel, M., Knudsen, K., Trillmich, F. 2005. The cost of a specific immune response in young guinea pigs. *Physiology & Behavior*, 85: 205-211. doi:10.1016/j.physbeh.2005.04.008
- Piskurek, O. & Okada, N. 2007. Poxviruses as possible vectors for horizontal transfer of retroposons from reptiles to mammals. *PNAS*, 104(29): 12046-12051. doi: 10.1073/pnas.0700531104.
- Potgieter, L.N.D., Sigier, R.E., Russell, R.G. 1987. Pneumonia in Ottoman Vipers (*Vipera Xanthena Xanthena*) associated with a parainfluenza 2-like virus. *Journal of Wildlife Diseases*, 23(3): 355-360. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-23.3.355>
- Presley, S. J., Higgins, C. L., Willig, M. R. 2010. A comprehensive framework for the evaluation of metacommunity structure. *Oikos*, 119(6): 908-917. DOI: 10.1111/j.1600-0706.2010.18544.x

- Pruvot, M., Fine, A.E., Hollinger, C., Strindberg, S., Damdinjav, B., Buuveibaatar, B., Chimeddorj, B., Bayandonoi, G., Khishgee, B., Sandag, B., Narmandakh, J., Jargalsaikhan, T., Bataa, B., McAloose, D., Shatar, M., Basan, G., Mahapatra, M., Selvaraj, M., Parida, S., Njeumi, F., Kock, R., Shiilegdamba, E. 2020. Outbreak of Peste des Petits Ruminants Virus among Critically Endangered Mongolian Saiga and Other Wild Ungulates, Mongolia, 2016–2017. *Emerging Infectious Diseases*, 26(1): 51-62. doi: 10.3201/eid2601.181998
- Ramírez-Martínez, L.A., Loza-Rubio, E., Mosqueda, J., González-Garay, M.L., García-Espinosa, G. 2018. Fecal virome composition of migratory wild duck species. *PloS ONE*, 13(11): e0206970. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206970>
- Reyes, A., Semenkovich, N.P., Whiteson, K., Rohwer, F., Gordon, J.I. 2012. Going viral: next generation sequencing applied to human gut phage populations. *Nat. Rev. Microbiol.*: 10(9): 607-617. doi:10.1038/nrmicro2853.
- Rice, P., Longden, I., Bleasby, A. 2000. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics*. 16(6): 276-277. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(00\)00204-2](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(00)00204-2)
- Riesenfeld, C.S., Schloss, P.D., Handelsman, J. 2004. Metagenomics: Genomic Analysis of Microbial Communities. *Annu. Rev. Genet.*, 38: 525-552. doi: 10.1146/annurev.genet.38.072902.091216
- Rose, R., Constantinides, B., Tapinos, A., Robertson, D.L., Prosperi, M. 2016. Challenges in the analysis of viral metagenomes. *Virus Evolution*, 2(2): vew022. doi: 10.1093/ve/vew022
- Roux, S., Adrianssens, E.M., Dutilh, B.E., Koonin, E.V., Kropinski, A.M., Krupovic, M., Kuhn, J.H., Lavigne, R., Brister, J.R., Varsani, A., Amid, C., Aziz, R.K., Bordenstein, S.R., Bork, P., Breitbart, M., Cochrane, G.R., Daly, R.A., Desnues, C., Duhaime, M.B., Emerson, J.B., Enault, F., Fuhrman, J., Hingamp, P., Hugenholtz, P., Hurwitz, B.L., Ivanova, N.N., Labonté, J.M., Lee, K.B., Malmstrom, R.R., Martinez-Garcia, M.M., Mizrachi, I.K., Ogata, H., Páez-Espino, D., Petit, M.A., Putonti, C., Rattei, T., Reyes, A., Rodriguez-Valera, F.,



- Rosario, K., Schriml, L., Schulz, F., Steward, G.F., Sullivan, M.B., Sunagawa, S., Suttle, C.A., Temperton, B., Tringe, S.G., Thurber, R.V., Webster, N.S., Whiteson, K.L., Wilhelm, S.W., Wommack, K.E., Woyke, T., Wrighton, K.C., Yilmaz, P., Yoshida, T., Young, M.J., Yutin, N., Allen, L.Z., Kyrpides, N.C., Eloe-Fadrosh, E.A. 2019. Minimum Information about an Uncultivated Virus Genome (MIUViG). *Nat. Biotechnol.*, 37(1): 29-37. doi: 10.1038/nbt.4306
- Salmier, A., Tirera, S., Thoisy, B., Franc, A., Darcissac, E., Donato, D., Bouchier, C., Lacoste, V., Lavergne, A. 2017. Virome analysis of two sympatric bat species (*Desmodus rotundus* and *Molossus molossus*) in French Guiana. *PloS ONE*, 12(11): e0186943. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186943>
- Salomão, M.G., Wüster, W., Thorpe, R.S., Touzet, J., BBBSP. 1997. DNA evolution of South American pitvipers of the genus *Bothrops* (Reptilia: Serpentes: Viperidae). *Venomous Snakes: Ecology, Evolution and Snakebite*. Clarendon Press, Uk, 89-98.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74(12): 5463-5467. doi:10.1073/pnas.74.12.5463
- Santana, C. 2020. COVID-19, other zoonotic diseases and wildlife conservation. *HPLS*, 42(4): 45. <https://doi.org/10.1007/s40656-020-00345-8>
- Santiago-Rodriguez, T.M. & Hollister, E.B. 2019. Human Virome and Disease: High- Throughput Sequencing for Virus Discovery, Identification of Phage-Bacteria Dysbiosis and Development of Therapeutic Approaches with Emphasis on the Human Gut. *Viruses*, 11(7): 656. doi: 10.3390/v11070656
- Sarker, S., Isberg, S.R., Moran, J.L., Araujo, R., Elliot, N., Melville, L., Beddoe, T., Helbig, K.J. 2019. Crocodilepox Virus Evolutionary Genomics Supports Observed Poxvirus Infection Dynamics on Saltwater Crocodile (*Crocodylus porosus*). *Viruses*, 11: 1116. doi:10.3390/v11121116
- Sarker, S., Hannon, C., Athukorala, A., Bielefeldt-Ohmann. 2021. Emergence of a Novel Pathogenic Poxvirus Infection in the Endangered Green Sea Turtle (*Chelonia mydas*) Highlights a Key Threatening Process. *Viruses*, 13(2): 219. doi: 10.3390/v13020219

- Sazima, I. 1992. Natural history of the jararaca pitviper, *Bothrops jararaca*, in Southeastern Brazil. *Biology of the pitvipers*, 1ed(14): 199-216.
- Sazima, I. & Haddad, C. 1992. Répteis da Serra do Japi: notas sobre história natural. In: L.P.C. Morellato (Ed.), *História natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil*. Ed. Unicamp e FAPESP, Campinas, 212-236.
- Schmidlin, K., Sepp, T., Khalifeh, A., Smith, K., Fontenele, R.S., McGraw, K.J., Varsani, A. 2019. Diverse genomoviruses representing eight new and one known species identified in feces and nests of house finches (*Haemorrhous mexicanus*). *Archives of Virology*, 164: 2345-2350. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04318-6>
- Schrago, C.G. & Barzilai, L.P. 2021. Challenges in estimating virus divergence times in short epidemic timescales with special reference to the evolution of SARS-Cov-2 pandemic. *Genetics and Molecular Biology*, 44(1). <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2020-0254>
- Seitz, K., Kubber-Heiss, A., Auer, A., Dinhopf, N., Posautz, A. *et al.* 2021. Discovery of a phylogenetically distinct poxvirus in diseased *Crocodilurus amazonicus* (family Teiidae). *Archives of Virology*. 166: 1183–1191. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-04975-6>
- Sendell-Price, A.T., Ruegg, K.C., Robertson, B.C., Clegg, S.M. 2021. An island-hopping bird reveals how founder events shape genome-wide divergence. *Molecular Ecology*, 30(11): 2495-2510. doi: 10.1111/mec.15898
- Shan, T., Yang, S., Wang, H., Wang, H., Zhang, J., Gong, G., Xiao, Y., Yang, J., Wang, X., Lu, J., Zhao, M., Yang, Z., Lu, Y., Dai, Z., He, Y., Chen, X., Zhou, R., Yao, Y., Kong, N., Zeng, J., Ullah, K., Wang, X., Shen, Q., Deng, X., Zhang, J., Delwart, E., Tong, G., Zhang, W. 2022. Virome in the cloaca of wild and breeding birds revealed a diversity of significant viruses. *Microbiome*, 10(1): 60. DOI: 10.1186/s40168-022-01246-7
- Sharma, A.K., Nayakwadi, S., Chandratre, G.A., Saini, M., Das, A., Raut, S.S., Swarup, D., Somvanshi, R. 2014. Prevalence of Pathological Conditions in Zoo/Wild Animals in India: A Retrospective Study Based on Necropsy. *Proc.*

- Natl, Acad. Sci., 84(4): 937-946. DOI: 10.1007/s40011-014-0308-9
- Shi, Y., Tao, J., Li, B., Shen, X., Cheng, J., Liu, H. 2021a. The Gut Viral Metagenome Analysis of Domestic Dogs Captures Snapshot of Viral Diversity and Potential Risk of Coronavirus. *Front. Vet. Sci.*, 8:695088. doi: 10.3389/fvets.2021.695088
- Shi, Z., Liu, C., Yang, H., Chen, Y., Liu, H., Wei, L., Liu, Z., Jiang, Y., He, X., Wang, J. 2021b. Fur Seal Feces-Associated Circular DNA Virus Identified in Pigs in Anhui, China. *Virologica Sinica*, 36: 25-32. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00232-3>
- Silva, K.M.P., Almeida-Santos, S.M., Bertani, R. 2017. Hundred legs good, two fangs better: adult centipede (Scolopendridae) devoured by a juvenile Amazon lancehead, *Bothrops atrox* (Viperidae). *ACTA Amazonica*, 47(2): 171-174. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201601884>
- Silva, M.S. 2021. Aplicações de Metagenômica Viral em Medicina Veterinária: Análise de Viromas. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2021.
- Simmonds, P., Adriaenssens, E.M., Zerbini, F.M., Abrescia, N.G.A., Aiewsakun, P., Alfenas-Zerbini, P. *et al.* 2023. Four principles to establish a universal virus taxonomy. *PLoS*, 21(2): e3001922. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001922>
- Simon, C. & Daniel, R. 2011. Metagenomic Analyses: Past and Future Trends. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4): 1153-1161. doi:10.1128/AEM.02345-10
- Simpson, C.F., Jacobson, E.R., Gaskin, J.M. 1979. Herpesvirus-like Infection of the Venom Gland of Siamese Cobras. *J Am Vet Med Assoc.*, 175(9): 941-943.
- Slingenbergh, J., Gilbert, M., de Balogh, K., Wint, W. 2004. Ecological sources of zoonotic diseases. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 23(2): 467-484. DOI: 10.20506/rst.23.2.1492
- Smits, S.L & Osterhaus, A.D.M.E. 2013. Virus discovery: one step beyond. *Current Opinion in Virology*, 3(2): e1-e6. doi:10.1016/j.coviro.2013.03.007

- Smol'ak, D., Salamúnová, S., Jacková, A., Haršányová, M., Budiš, J., Szemes, T., Vilček, S. 2022. Analysis of RNA virome in rectal swabs of healthy and diarrheic pigs of different age. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, 90-91: 101892. doi: 10.1016/j.cimid.2022.101892.
- Souza, W.M., Fumagalli, M.J., Araujo, J., Ometto, T., Modha, S., Thomazelli, L.M., Durigon, E.L., Murcia, P.R., Figueiredo, L.T.M. 2019. Discovery of novel astrovirus and calicivirus identified in ruddy turnstones in Brazil. *Sci. Rep.*, 9(1): 5556. doi: 10.1038/s41598-019-42110-3
- Spearman, C. 1904. The proof and measurement of association between two things. *The American Journal of Psychology*, 15(1): 72-101. <https://doi.org/10.2307/1412159>
- Stenglein, M.D., Jacobson, E.R., Wozniak, E.J., Wellehan, J.F.X., Kincaid, A., Gordon, M., Porter, B.F., Baumgartner, W., Stahl, S., Kelley, K., Towner, J.S., DeRisi, J.L. 2014. Ball Python Nidovirus: a Candidate Etiologic Agent for Severe Respiratory Disease in *Python regius*. *mBio*, 5(5): e01484-14. doi: 10.1128/mBio.01484-14
- Stern, A. & Andino, R. 2016. Viral Evolution: It Is All About Mutations. *In*: Katze, M.G., Law, G.L., Korth, M.J., Nathanson, N. 3 (17): 233-240. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-18782-X>
- Stromsland, K. & Zimmerman, L.M. 2017. Relationships between parasitic infection and natural antibodies, age, and sex in a long-lived vertebrate. *J. Exp. Zool*, 327: 407-412. DOI: 10.1002/jez.2111
- Stumpf, R.M., Gomez, A., Amator, K.R., Yeoman, C.J., Polk, J.D., Nelson, K.E., White, B.A., Leigh, S.R. 2016. Microbiomes, metagenomics and primate conservation: New strategies, tools, and applications. *Biological Conservation*, 199: 56-66. 10.1016/j.biocon.2016.03.035
- Sun, Y., Sun, L., Sun, S., Tu, Z., Liu, Y., Tu, C., He, B. 2023. Virome Profiling of an Eastern Roe Deer Reveals Spillover of Viruses from Domestic Animals to Wildlife. *Pathogens*, 12(2): 156. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020156>
- Susi, H. & Laine, AL. 2020. Agricultural land use disrupts biodiversity mediation of

- virus infections in wild plant populations. *New Phytologist*, 230: 2447-2458. doi: 10.1111/nph.17156
- Taverne, M., Fabre, A.C., King-Gillies, N., Krajnovic, M., Lisicic, D., Martin, L., Michal, L., Petricoli, D., Stambuk, A., Tadic, Z., Vigliotti, C., Wehrle, B.A., Herrel, A. 2019. Diet variability among insular populations of *Podarcis* lizards reveals diverse strategies to face resource-limited environments. *Ecology and Evolution*, 9: 12408-12420. DOI: 10.1002/ece3.5626
- Teacher, A.G.F., Cunningham, A.A., Garner, T.W.J. 2010. Assessing the long-term impact of Ranavirus infection in wild common frog populations. *Animal Conservation*, 13(5): 514-522. doi:10.1111/j.1469-1795.2010.00373.x
- Terrible, L.C., Diniz-Filho, J.A.F., Rodríguez, M.A., Rangel, T.F.L.V.B. 2009. Richness patterns, species distributions and the principle of extreme deconstruction. *Global Ecology and Biogeography*, 18: 123-136. DOI: 10.1111/j.1466-8238.2008.00440.x
- Tiamani, K., Luo, S., Schulz, S., Xue, J., Costa, R., Mirzaei, M.K., Deng, L. 2022. The role virome in the gastrointestinal tract and beyond. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(6): 1-12. DOI: 10.1093/femsre/fuac027
- Thurber, R.V., Haynes, M., Breitbart, M., Wegley, L., Rohwer, F. 2009. Laboratory procedures to generate viral metagenomes. *Nature Protocols*, 4(4): 470-483. DOI: 10.1038/nprot.2009.10
- Tilman, D. 1981. Resource competition and community structure. *Monographs in Population Biology*, 17, 1-296. DOI: 10.7861/clinmedicine.14-3-000
- Truchado, D.A., Llanos-Garrido, A., Oropesa-Olmedo, D.A., Cerrada, B., Cea, P., Moens, M.A.J., Gomez-Lucia, E., Doménech, A., Milá, B., Pérez-Tris, Cadar, D., Benítez, L. 2020. Comparative Metagenomics of Palearctic and Neotropical Avian Cloacal Viromes Reveal Geographic Bias in Virus Discovery. *Microorganisms*, 8(12): 1869. doi:10.3390/microorganisms8121869
- Tucker, T., Marra, M., Friedman, J.M. 2009. Massively Parallel Sequencing: The Next Big Thing in Genetic Medicine. *The American Journal of Human Genetics*, 85(2): 142-154. DOI: 10.1016/j.ajhg.2009.06.022

- Uetz, P., Freed, P., Aguilar, R., Reyes, F., Kudera, J., Hošek, J. 2024. The Reptile Database, <http://www.reptile-database.org>, acessado em 12 de junho de 2024.
- Ujvari, B. & Madsen, T. 2011. Do natural antibodies compensate for humoral immunosenescence in tropical pythons? *Functional Ecology*, 25: 813-817. doi: 10.1111/j.1365-2435.2011.01860.x
- Vale, F.F., Correia, A.C., Matos, B., Nunes, J.F.M., Matos, A. 2010. Applications of transmission electron microscopy to virus detection and identification. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*, 128-136.
- Varga-Kugler, R., Ihász, K., Marton, S., Kaszab, E., Marschang, R.E., Farkas, S., Bányai, K. 2023. Genetic diversity among reptilian orthoreoviruses isolated from pet snakes and lizards. *Front Vet Sci*, 10:1058133. doi: 10.3389/fvets.2023.1058133
- Virgin, H.W. 2014. The Virome in Mammalian Physiology and Disease. *Cell*, 157(1): 142-150. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.032
- Walker, J.W., Han, B.A., Ott, I.M., Drake, J.M. 2018. Transmissibility of emerging viral zoonoses. *PLoS ONE*, 13(11): : e0206926. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206926>
- Waller, S.J., Lamar, S., Perry, B.J., Grimwood, R.M., Holmes, E.C., Geoghegan, J.L. 2022. Cloacal virome of an ancient host lineage – The tuatara (*Sphenodon punctatus*) – Reveals abundant and diverse diet-related viruses. *Virology*, 575: 43-53. DOI: 10.1016/j.virol.2022.08.012
- Waltzek, T.B., Kelley, G.O., Alfaro, M.E., Kurobe, T., Davison, A.J., Hedrick, R.P. 2009. Phylogenetic relationships in the family *Alloherpesviridae*. *Dis Aquat Org*, 84: 179-194. doi: 10.3354/dao02023
- Weinbauer, M.G. & Suttle, C.A. 1997. Comparision of epifluorescence and transmission electron microscopy for counting viruses in natural marine waters. *Aquatic Microbial Ecology*, 13: 225-232. DOI: 10.3354/ame013225
- Weldon, P.V., Georoff, T.A., Hall, N., Ossiboff, R.J., Childress, A.L., Wellehan, Jr., J.F.X. 2023. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 35(5): 554-558. DOI: 10.1177/10406387231186135

- Wellehan Jr., J.F.X., Strik, N.I., Stacy, B.A., Childress, A.L., Jacobson, E.R., Telford Jr., S.R. 2008. Characterization of an erythrocytic virus in the family Iridoviridae from a peninsula ribbon snake (*Thamnophis sauritus sackenii*). *Veterinary Microbiology*, 131(1-2): 115-122. DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.03.003
- Wiens, B.J., Combe, F.J., Dickerson, B., Divine, L.M., Padula, V.M., Sage, G.K., Talbot, S.L., Hope, A.G. 2022. Genetic drift drives rapid speciation of an Arctic insular endemic shrew (*Sorex pribilofensis*). *Molecular Ecology*, 31(20): 5231-5248. doi: 10.1111/mec.16658
- Wille, M., Harvey, E., Shi, M., Gonzalez-Acuña, D., Holmes, E.C., Hurt, A.C. 2020. Sustained RNA virome diversity in Antarctic penguins and their ticks. *ISME Journal*, 14(7): 1768-1782. doi: 10.1038/s41396-020-0643-1.
- Winzeler, M., LaGrange, S., Hoverman, J. 2014. *Ranaviruses: Emerging Threat to Amphibians*. Forestry and Natural Resources.
- Wood, D.E., Lu, J., Langmead, B. 2019. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*, 20: 257. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>
- Wüster, W., Salomão, M.G., Quijada-Mascareñas, J.A., Thorpe, R.S., BBBSP. 2002. Origins and Evolution of the South American Pitviper Fauna: Evidence From Mitochondrial DNA Sequence Analysis. *Biology of the Vipers*, 111-128.
- Zerbini, F.M., Siddell, S.G., Lefkowitz, E.J., Mushegian, A.R., Adriaenssens, E.M., Alfenas-Zerbini, P., Dempsey, D.M., Dutilh, B.E., García, M.L., Hendrickson, R.C., Junglen, S., Krupovic, M., Kuhn, J.H., Lambert, A.J., Łobocka, M., Oksanen, H.M., Robertson, D.L., Rubino, L., Sabanadzovic, S., Simmonds, P., Smith, D.B., Suzuki, N., Van Doorslaer, K., Vandamme, A.M., Varsani, A. 2023. Changes to virus taxonomy and the ICTV Statutes ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2023). *Archives of Virology*, 168:175. <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05797-4>
- Zhang, W., Yang, S., Shan, T., Hou, R., Liu, Z., Li, W., Guo, L., Wang, Y., Chen, P., Wang, X., Feng, F., Wang, H., Chen, C., Shen, Q., Zhou, C., Hua, X., Cui, L., Deng, X., Zhang, Z., Qi, D., Delwart, E. 2017. Virome comparisons in wild-diseased and healthy captive giant pandas. *Microbiome*, 5(1): 90. DOI:

10.1186/s40168-017-0308-0

Zhang, J., Finlaison, D., Frost, M.J., Gestier, S., Gu, X., Hall, J., Jenkins, C., Parrish, K., Read, A.J., Srivastava, M., Rose, K., Kirkland, P.D. 2018. Identification of a novel nidovirus as a potential cause of large scale mortalities in the endangered Bellinger River snapping turtle (*Myuchelys georgesii*). PLoS ONE, 13(10): e0205209. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205209>

Zucherato, V.S., Giovanetti, M., Costa, L.O.A., Krause, L.M.F., Alves, D.C.C.A., Moreira, R.M.A., Pimentel, B.M.S., Haddad, R., Bitencourt, H.T., Ciccozzi, M., Alcantara, L.C.J., Kashima, S., Covas, D.T., Slavov, S.N. 2023. Molecular identification of the emerging Human Gemykibivirus-2 (HuGkV-2) among Brazilian blood donors. Transfus Apher Sci., 62(1): 103516. DOI: 10.1016/j.transci.2022.103516

Łusiak-Szelachowska, M., Weber-Dąbrowska, B., Jończyk-Matysiak, E., Wojciechowska, R., Górski, A. 2017. Bacteriophages in the gastrointestinal tract and their implications. Gut. Pathog., 9:44. DOI 10.1186/s13099-017-0196-7



## ANEXOS

**ANEXO A.** Número de *reads* classificadas e não classificadas (*No hits*) pelo *Kraken2*, em cada uma das bibliotecas.

