

INVESTIGAÇÃO DO VIROMA DE MARSUPIAIS DA SUB-FAMÍLIA DIDELPHINEA (MARSUPIALIA: DIDELPHINAE) EM REGIÃO DE MATA-ATLÂNTICA

Palavras-Chave: **ONE HEALTH** (SAÚDE ÚNICA), **DIDELPHINEA**, **VIROLOGIA**

Autores(as):

Lucas Bibiano de Oliveira Souza, IB – UNICAMP
Michael Edward Miller, IB - UNICAMP
Letícia Michelle Fernandes, IB - UNICAMP
Thalya Fujii Martinez, IB - UNICAMP
Rhubia Martins Silveira Rosa, IB - UNICAMP
André Schwambach Vieira, IB - UNICAMP
Soledad Palameta Miller, FEA - UNICAMP
Prof^{ra}. Dr^a. Clarice Weis Arns, IB - UNICAMP

1. INTRODUÇÃO

Entender a microbiota patogênica das espécies que convivem com seres humanos é parte importante da abordagem *One Health* (Saúde Única), isto é, uma abordagem multidisciplinar que trabalha nos níveis local, nacional e global para alcançar o equilíbrio e a saúde ideal para a tríade pessoas, animais e meio ambiente. Esse entendimento se faz necessário para que possa ser feito o controle e a prevenção de potenciais surtos zoonóticos ligados a animais sabidamente reservatórios de patógenos de risco humano (1).

Mamíferos da subfamília Didelphinae constituem a classe dos marsupiais didelfídeos (Marsupialia: Didelphidae) que habitam a América do Sul. Eles estão distribuídos entre as tribos Monodelphini, das cuícas e Didelphini, dos gambás sul-americanos (2) e, apesar de possuírem menor diversidade e riqueza de espécies se comparadas a outras ordens de mamíferos neotropicais de ampla distribuição, possuem elevado potencial zoonótico dado ao possível hábito sinantrópico de seus integrantes e microbiota desconhecida (3). Aliado ao baixo número de estudos quanto ao hábito e o viroma desses animais, em especial das cuícas, nota-se um claro vácuo no conhecimento e, portanto, na capacidade de preparo para eventuais surtos de doenças transmitidas por esses animais.

Um segundo agravante para os riscos de zoonoses associados a hospedeiros desse gênero é o constante aumento de processos de degradação de habitat, como o aumento da atividade humana em áreas anteriormente protegidas, o aumento exponencial do desmatamento e o agravamento das mudanças climáticas (3). Esses processos aumentam a possibilidade de animais, particularmente de animais sinantrópicos, adentrarem áreas humanas e, conseqüentemente, de seres humanos serem expostos aos patógenos que esses animais possam carregar (4).

Fatores de coevolução de espécies na relação parasita-hospedeiro também apresentam grande relevância para o entendimento da microbiota de qualquer organismo, podendo indicar formas pelas quais determinadas

espécies podem apresentar uma microbiota altamente variada e potencialmente zoonótica sem necessariamente apresentar sintomas de infecção (5, 6). Desde o advento da pandemia de Sars-CoV-2 iniciada em 2020, os morcegos (Mammalia: Chiroptera) e sua microbiota potencialmente zoonótica ganharam protagonismo e hoje são melhor compreendidos e considerados de alta relevância para estudos *One Health* (7, 8). No entanto, os morcegos pertencem a um grupo filogenético diferenciado há aproximadamente 59.1 Ma (9, 10), ao passo que o grupo dos Didelfídeos é filogeneticamente mais antigo, divergindo dos demais a 160 Ma. (11) Esses fatos os torna objetos de importância expressiva para uma análise mais aprofundada de coevolução da microbiota associada a eles e seu potencial patogênico.

As famílias de vírus que devem ser foco deste estudo são as famílias *paramyxoviridae*, *coronaviridae*, *hantaviridae* e *arenaviridae*, que são compostas por vírus de RNA (12,13). Elas apresentam, individualmente e em conjunto, um grande potencial zoonótico (14) e já foram encontradas em diferentes mamíferos circulantes na América do Sul. (16-17).

Este estudo permanece em linha com o padrão de atenção aumentada às novas zoonoses, após a pandemia do SARS-CoV-2, que demonstrou a importância urgente com que se deve levar projetos de abordagem *One Health* (18). Leva ainda em consideração um trabalho recente do nosso grupo, que relatou o microbioma e a identificação de diferentes verminoses, bacterioses e outros patógenos, incluindo vírus, potencialmente zoonóticos em espécies de gambás *Didelphis* (19).

O estudo tem como objetivo geral, investigar e descrever a presença de marsupiais sul-americanos (sub-família Didephinae) e relacionar os achados com diferentes níveis de sinantropia, bem como relacioná-los com características fisiológicas e particularidades de espécies desses animais.

2. METODOLOGIA

A metodologia do estudo iniciou com a coleta de amostras de swabs oral e retal de gambás e cuícas de vida livre em diferentes regiões do estado de São Paulo, utilizando armadilhas do tipo *Tomahawk*. Durante o processo, foram anotadas informações individuais dos animais, como local de captura, espécie, sexo, idade, estado reprodutivo e presença de patologias. As amostras foram transportadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer de temperatura ultrabaixa.

Para a análise laboratorial, o RNA viral foi extraído a partir das amostras por meio de homogeneização e centrifugação, utilizando protocolo específico. O RNA obtido foi então convertido em DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa, sendo posteriormente armazenado sob refrigeração.

A triagem para identificação de vírus foi realizada por PCR convencional, utilizando primers degenerados voltados para as famílias Coronaviridae, Paramyxoviridae, Hantaviridae e Arenaviridae. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel para verificar a presença de bandas compatíveis com o tamanho esperado.

As amostras que apresentaram amplificação positiva foram selecionadas para sequenciamento de nova geração, com o objetivo de aprofundar a caracterização viral. Para isso, foi realizada nova extração de RNA, seguida de síntese de cDNA e preparo das bibliotecas para sequenciamento em plataforma apropriada.

3. RESULTADOS E CONCLUSÕES

Foram coletadas e analisadas amostras de 52 didelfídeos. Destas, em de PCR convencional, 14 amostras (26,9%) indicaram positividade para um vírus potencialmente zoonótico: 10 (19,2%) foram positivas para Arenaviridae e 6 (11,5%) para Coronaviridae, com uma taxa de coinfeção entre essas famílias de 3,85%. Nenhum resultado positivo foi obtido nessa triagem inicial para as famílias Paramyxoviridae e Hantaviridae.

As amostras positivas foram submetidas à sequenciamento de nova geração e, das 6 amostras que apresentaram reatividade inicial para Coronaviridae 5 demonstraram alinhamento com sequências de *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*. com semelhança de até 97.88% nas sequências. Um total de 3 amostras demonstraram alinhamento com sequências de paramixovírus aviários (família Paramyxoviridae) com semelhança de 88.24% nas sequências. Há evidência de coinfeção em duas das 3 amostras de paramyxovirus com SarsCov-2. A presença de beta coronavírus humanos nos didelfídeos poderiam indicar a possibilidade de eventos de *spillover*, no qual eventuais exposições entre humanos doentes e os animais podem fazer com que o animal se torna veículo de transmissão do vírus.

Uma amostra apresentou semelhança de 97.33% com sequências de um isolado de *Dandong mammarenavirus* (família Arenaviridae). Uma amostra apresentou alinhamento de 78.18% com isolado de *Longquan Niviventer niviventer orthohantavirus 1*. Esses resultados em particular indicam a possibilidade dos didelfídeos transportarem e de eventualmente exporem seres humanos a vírus zoonóticos de alta patogenicidade. Até o momento, não haviam sido reportados achados do tipo em didelfídeos.

Os resultados e as análises deste estudo indicam um potencial que os didelfídeos possuem significativa capacidade de transportar vírus com potencial zoonótico, sendo mais importantes para os estudos *One Health* do que anteriormente pensado, fazendo-se necessário um estado de atenção para a possibilidade de eventos de *spillover* e *spillback* entre didelfídeos e seres humanos expostos a áreas de circulação desses animais. Ainda, fica evidenciado a necessidade de estudos epidemiológicos mais amplos e robustos, a fim de aprofundar a compreensão sobre o potencial zoonótico envolvido.

4. BIBLIOGRAFIA

1. One Health Initiative. (s.d.). One Health Initiative. <https://onehealthinitiative.com/>
2. McKenna, M. C., & Bell, S. K. (1997). *Classification of mammals: above the species level*. Columbia University Press.
3. Bitencourt, M. & Bezerra, A. (2022). Infection agents of Didelphidae (Didelphimorphia) of Brazil: an underestimated matter in zoonoses research. *Mammalia*, 86(2), 105-122. <https://doi.org/10.1515/mammalia-2021-0134>
4. Lindahl, J., & Magnusson, U. (2020). Zoonotic pathogens in urban animals: Enough research to protect the health of the urban population? *Animal Health Research Reviews*, 21(1), 50–60. doi:10.1017/S1466252319000100
5. Fraile, A., & García-Arenal, F. (2010). The coevolution of plants and viruses: resistance and pathogenicity. *Advances in virus research*, 76, 1-32.
6. Duxbury, E. M., Day, J. P., Maria Vespasiani, D., Thüringer, Y., Tolosana, I., Smith, S. C., ... & Longdon, B. (2019). Host-pathogen coevolution increases genetic variation in susceptibility to infection. *Elife*, 8, e46440.
7. Jones, J. V., Eads, R. B., Grimes, J. E., & Conklin, A. (1957). The public health importance of bats.
8. Lu, H., McComas, K. A., Buttke, D. E., Roh, S., & Wild, M. A. (2016). A one health message about bats increases intentions to follow public health guidance on bat rabies. *PLoS One*, 11(5), e0156205.
9. Simmons, N. B., & Geisler, J. H. (1998). Phylogenetic relationships of Icaronycteris, Archaeonycteris, Hassianycteris, and Palaeochiropteryx to extant bat lineages, with comments on the evolution of echolocation and foraging strategies in Microchiroptera.
10. Brown, E. E., Cashmore, D. D., Simmons, N. B., & Butler, R. J. (2019). Quantifying the completeness of the bat fossil record. *Palaeontology*, 62(5), 757-776.
11. Beck, R. M., Godthelp, H., Weisbecker, V., Archer, M., & Hand, S. J. (2008). Australia's oldest marsupial fossils and their biogeographical implications. *PloS one*, 3(3), e1858. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001858>
12. Louten, J. (2016). Virus structure and classification. *Essential human virology*, 19, 13.
13. Park, G. Y. S., & Tishkowsky, K. (2021). Paramyxovirus.
14. Reed, K. D. (2018). Viral zoonoses. Reference module in biomedical sciences.
15. Jansen, A. M. marsupiais didelídeos: gambás e cuícas. in Andrade, A., Pinto, S.C., Oliveira, R.S., animais de laboratório: criação e experimentação [online]. rio de janeiro: editora fiocruz, (2002). 388 p. isbn: 85-7541-015-6.
16. de Araujo, J., Thomazelli, L. M., Henriques, D. A., Lautenschlager, D., Ometto, T., Dutra, L. M., ... & Durigon, E. L. (2012). Detection of hantavirus in bats from remaining rain forest in São Paulo, Brazil. *BMC research notes*, 5, 1-5.
17. Lavorente, F. L. P., de Matos, A. M. R. N., Lorenzetti, E., Oliveira, M. V., Pinto-Ferreira, F., Michelazzo, M. D. M. Z., ... & Alfieri, A. F. (2022). First detection of Feline morbillivirus infection in white-eared opossums (*Didelphis albiventris*, Lund, 1840), a non-feline host. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(3), 1426-1437.
18. Lefrançois, T., Malvy, D., Atlani-Duault, L., Benamouzig, D., Druais, P. L., Yazdanpanah, Y., Delfraissy, J. F., & Lina, B. (2023). After 2 years of the COVID-19 pandemic, translating One Health into action is urgent. *Lancet* (London, England), 401(10378), 789–794. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)01840-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01840-2)
19. Cardia Caserta, L., Mansano do Nascimento, G., Joshi, L. R., Mausbach Simão, R., Miller, M. E., Nunes Felipe, P. A., ... & Weis Arns, C. (2023). Bacterial and Viral Diversity of Didelphid Opossums from Brazil. *EcoHealth*, 20(4), 362-369.