

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CATARINA MARCON CHIAPPETTA

PESQUISA E CARACTERIZAÇÃO DE AGENTES VIRAIS EM AVES ANTÁRTICAS
POR MEIO DE TÉCNICAS MOLECULARES

PORTO ALEGRE

2018

CATARINA MARCON CHIAPPETTA

PESQUISA E CARACTERIZAÇÃO DE AGENTES VIRAIS EM AVES ANTÁRTICAS
POR MEIO DE TÉCNICAS MOLECULARES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias na área de Virologia.

Orientador: Dr. David Driemeier

PORTO ALEGRE

2018

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Chiappetta, Catarina Marcon
PESQUISA E CARACTERIZAÇÃO DE AGENTES VIRAIS EM
AVES ANTÁRTICAS POR MEIO DE TÉCNICAS MOLECULARES /
Catarina Marcon Chiappetta. -- 2018.
82 f.
Orientador: David Driemeier.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Metagenômica. 2. Viroma. 3. Vírus. 4. Avifauna.
5. Antártica. I. Driemeier, David, orient. II.
Título.

CATARINA MARCON CHIAPPETTA

PESQUISA E CARACTERIZAÇÃO DE AGENTES VIRAIS EM AVES ANTÁRTICAS
POR MEIO DE TÉCNICAS MOLECULARES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias na área de Virologia.

Aprovada em: 09 de julho de 2018.

David Driemeier, Dr. (Orientador)

UFRGS

Samuel Paulo Cibulski, Dr.

UFRGS

Fernando Rosado Spilki, Dr.

FEEVALE

Helton Fernandes dos Santos, Dr.

UFRGS

À pequena que veio dar significado às minhas ações...

À miúda cujos olhinhos iluminam minha existência...

À minha filha, Maria.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de coração aberto pela oportunidade de realizar este trabalho a todos que, em uma atitude de genuíno profissionalismo ou de franca amizade, me estenderam a mão e compartilharam seu saber. Por todo o apoio, também agradeço à minha família e a aos meus amigos.

Muito obrigada.

“Nós escutamos o barulho do carvalho que cai, mas não escutamos o barulho da floresta que cresce. Hoje, fala-se muito das coisas que estão desmoronando, que fazem barulho, mas o mais importante é aquilo que não se ouve; é preciso prestar atenção às sementes de consciência que estão brotando” (Jean-Yves Leloup).

RESUMO

Apesar de sua distribuição geográfica remota, as aves do continente antártico não estão protegidas dos efeitos de inúmeros patógenos, inclusive dos vírus. No entanto, pouco se sabe sobre tais patógenos, bem como sobre suas potenciais consequências ecológicas para as populações de aves antárticas. Diante disso, o presente estudo propõe-se a investigar a presença de agentes virais em amostras de aves antárticas de três espécies de *Sphenisciformes* (pinguins), duas de *Procellariiformes* (petréis), uma de *Charadriiformes* (mandrião) e uma de *Pelecaniformes* (cormorão). Para tanto, empregaram-se diferentes técnicas moleculares. Técnicas de PCR e RT-qPCR de amplo espectro foram adotadas para investigar a presença de vírus minimamente relacionados com patógenos virais sabidamente capazes de infectar aves. Dentre eles, o vírus da influenza A pôde ser identificado em duas espécies, uma residente e uma migratória. Com base nos resultados obtidos por meio dessas técnicas moleculares, foi realizado um sequenciamento de alto desempenho para análise do viroma das espécies consideradas mais suscetíveis. Tal abordagem possibilitou entrever possíveis novas variantes tanto de vírus tipicamente infectantes de aves quanto de vírus infectantes de seres humanos, evocando a variabilidade desses vírus como importantes indicadores da dinâmica e da ecologia viral em espécies selvagens.

Palavras-chave: Metagenômica. Viroma. Vírus. Avifauna. Antártica.

ABSTRACT

Despite their remote geographic distribution, birds in Antarctic continent are not beyond the effects of numerous pathogens, including viruses. However, little is known about such pathogens, as well as about their potential ecological consequences for Antarctic bird populations. The present study aims to investigate the presence of viral agents in samples of Antarctic birds, including three species of *Sphenisciformes* (penguins), two of *Procellariiformes* (petrels), one of *Charadriiformes* (skua) and one of *Pelecaniformes* (cormorant). For that, different molecular techniques were performed. Broad-spectrum PCR and RT-qPCR techniques were used to investigate the presence of important viral pathogens known to infect birds. Among them, influenza A virus could be identified in two species, one resident and one migratory. Based on the results obtained through these molecular techniques, high performance sequencing was performed for virome analysis of the species considered more susceptible. This approach made possible to glimpse both birds and human viruses possibly circulating amid these species, evoking the variability of viruses as important indicator of viral dynamics and ecology in wild species.

Keywords: Metagenomics. Virome. Virus. Seabirds. Antarctica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Últimos membros da comitiva de Scott antes de perecerem diante do frio e da fome	16
Figura 2 – Imagem da Península Antártica, com destaque às Ilhas Elefante e Rei George, onde as amostras foram colhidas.....	19
Figura 3 – Petrel-gigante (<i>Macronectes giganteus</i>) na Ilha Elefante	23
Figura 4 – Pomba-do-cabo (<i>Daption capense</i>) sobrevoando embarcação	24
Figura 5 – Cormorão-imperial (<i>Phalacrocorax atriceps</i>)	25
Figura 6 – Mandriões-antárticos (<i>Catharacta antarctica</i>) pousados em parte da embarcação	26
Figura 7 – a) Pinguim-antártico (<i>Pygoscelis antarcticus</i>), b) pinguim-papua (<i>Pygoscelis papua</i>) e c) pinguim-macaroni (<i>Eudyptes chrysolophus</i>).....	27
Figura 8 – Curvas de dissociação indicando a amplificação do gene constitutivo em todas as amostras analisadas por qPCR.....	41
Figura 9 – Curvas de dissociação indicando a amplificação do material genético do vírus influenza em duas amostras analisadas por qPCR.....	43
Figura 10 – Eletroforese dos oito fragmentos virais amplificados indicando a presença de influenza	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Espécies de aves nativas da Antártica	20
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de indivíduos coletados por espécie e local.....	35
Tabela 2 – Matriz de identidade da sequência de nucleotídeos referente ao gene <i>Rep</i> , obtida a partir de <i>swab</i> traqueal de um cormorão-imperial e comparada com sequências de referência do banco de dados.....	42
Tabela 3 – Número de resultados positivos em relação ao total amostrado.....	44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 A ANTÁRTICA	15
2.1.1 História	15
2.1.2 Situação atual	17
2.1.3 O Brasil na Antártica	17
2.1.4 Regiões de amostragem	18
2.2 AVIFAUNA NATIVA DA ANTÁRTICA	19
2.2.1 Espécies migratórias	22
2.2.2 Espécies residentes	26
2.3 PRINCIPAIS VIROSES DE AVES ANTÁRTICAS	27
2.3.1 Paramixovírus	28
2.3.2 Ortomixovírus	29
2.3.3 Coronavírus	31
2.3.4 Circovírus	32
3 OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 METODOLOGIA	34
4.1 COLETA DE AMOSTRAS	34
4.2 EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO	35
4.3 GENE CONSTITUTIVO	36
4.4 PESQUISA DOS PRINCIPAIS VÍRUS DE AVES	36
4.5 PESQUISA DO VÍRUS DA INFLUENZA A	38
4.6 METAGENÔMICA VIRAL	39
5 RESULTADOS INICIAIS	41
6 ARTIGO CIENTÍFICO	45
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

O poder destrutivo das doenças infecciosas, especialmente virais, em organismos vivos é descrito desde a metade do século XIX (HALDANE, 1949). Em se tratando de animais silvestres, um único surto de uma doença viral pode dizimar uma população. Alguns exemplos clássicos disso incluem a morte de 18 mil focas no norte da Europa, evento associado ao vírus da *Cinomose focina* no início dos anos 2000 (JENSEN et al., 2002), e o significativo declínio da população de sapos na Austrália, ocasionado pela infecção por *Ranavirus* na década de noventa (LAURANCE; MCDONALD; SPEARE, 1996).

Apesar de seu isolamento geográfico, os ecossistemas do continente antártico não estão protegidos do risco representado pelas infecções virais, em especial as consideradas emergentes. Em aves, surtos de doenças infecciosas têm sido descritos tanto na Antártica quanto em Ilhas da Convergência (WEIMERSKIRCH, 2004). No entanto, existem poucos estudos sobre a presença de vírus em aves antárticas e um número ainda menor de pesquisas associando tais agentes infecciosos a seus possíveis efeitos nessas populações (BARBOSA; PALACIOS, 2009).

Tendo em vista a necessidade eminente de saber mais a respeito da presença de vírus em animais antárticos, é preciso levar em conta a existência de fatores como o aquecimento global, que cada vez mais evidenciam a importância de estudos de detecção e caracterização desses agentes. O aumento das temperaturas em todo o continente pode tornar a sobrevivência de patógenos e a ocorrência de surtos em larga escala ainda mais prováveis (STEIG et al., 2009). Por isso, há pelo menos duas décadas, o assunto “doenças em animais silvestres da Antártica” é uma das principais pautas em reuniões consultivas do Tratado Antártico (KERRY; RIDDLE; CLARKE, 1999).

Em uma dessas reuniões, realizada em 1998, uma série de recomendações foram feitas para o correto monitoramento e a prevenção de patógenos na fauna antártica. Uma das recomendações foi estabelecer um programa estruturado de pesquisa para fornecer informações sobre o que é tido como “normal” e “anormal” na saúde das espécies antárticas (KERRY; RIDDLE; CLARKE, 1999). Sendo assim, todos os trabalhos voltados à detecção e caracterização de agentes potencialmente patogênicos são de fundamental relevância para a real compreensão de tais conceitos.

Informações sobre a presença de vírus em espécies de aves antárticas, tanto nas migratórias quanto nas residentes, principalmente se há contato direto entre estas duas, revelam aspectos fulcrais acerca da saúde do ecossistema. Qualquer variação na prevalência

de determinado agente viral nessas espécies pode ser um sinal de “síndrome do desconforto ecossistêmico” (RAPPORT, 2007).

Mudanças nas condições climáticas globais e nas atividades humanas são os principais fatores que afetam a saúde dos ecossistemas, influenciando o aumento da área de distribuição, abundância e/ou virulência de agentes patogênicos (DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2000; EPSTEIN, 2001; HARVELL et al., 2002; SUTHERST, 2001). Na Antártica, especialmente na Península Antártica e na Antártica Ocidental, as temperaturas subiram consideravelmente nas últimas décadas (STEIG et al., 2009). Além disso, as atividades humanas, tanto nas estações de pesquisa quanto nas crescentes incursões turísticas, que são realizadas anualmente na Antártica podem facilitar a propagação de doenças entre humanos e animais selvagens (CURRY et al., 2002).

Finalmente, cabe ressaltar a importância das espécies migratórias na disseminação de patógenos em nível global. Dentre os principais vírus de aves cuja ecologia está intimamente relacionada ao comportamento migratório, pode-se citar o vírus influenza e o vírus da doença de Newcastle, ambos apresentando potencial zoonótico e relevante risco já reconhecido para populações de aves antárticas (HUBÁLEK, 2004; KERRY; RIDDLE; CLARKE, 1999).

Portanto, o presente trabalho propõe-se a investigar a presença de diferentes agentes virais e a caracterizá-los molecularmente, por meio de amostras de *swabs* cloacais e traqueais de aves antárticas. As aves analisadas, tanto migratórias quanto residentes, incluem três espécies da ordem Sphenisciforme (pinguins), duas da ordem Procellariiforme (petréis), uma da ordem Charadriiforme (mandrião) e uma da ordem Pelecaniformes (cormorão). Neste estudo, técnicas de PCR e sequenciamento foram utilizadas para investigar a presença de famílias ou gêneros virais já sabidamente capazes de infectar tais espécies. Além disso, a exploração do viroma de algumas espécies foi feita mediante o sequenciamento de alto desempenho e análises filogenéticas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A ANTÁRTICA

2.1.1 História

A Antártica possui cerca de quatorze milhões de quilômetros quadrados, sendo o mais meridional dos continentes. Encontra-se em quase sua totalidade dentro do Círculo Polar Antártico, o que torna os meses de verão um dia permanente e o inverno uma longa noite. Devido a sua localização, a Antártica possui temperaturas extremamente baixas, ocasionando em sua superfície a formação de uma camada de gelo de aproximadamente dois quilômetros de espessura (SCAR, 2018).

As temperaturas na Antártica variam de 0° C a -29° C nas zonas costeiras e de -40° C a -68° C no interior do continente. O frio, somado aos fortes ventos e às demais características que a tornam o lugar mais inóspito do planeta, foram determinantes para que não existissem povos nativos na região. O primeiro contato do homem com o continente gelado ocorreu por volta dos anos 600 d.C., segundo registros dos povos Aush, antigos habitantes da Terra do Fogo (IZAGUIRRE; MATALONI, 2000).

Após, a ideia da existência de um continente ao sul da Europa foi atribuída a Aristóteles e Ptolomeu. Havia uma crença de que o oceano Índico fosse limitado por terras ao sul, pois deveria haver um penso nessa região para contrabalançar o peso existente nas terras ao norte do globo (Europa, Ásia e norte da África). Acreditava-se que tal lugar fosse uma terra muito próspera, gigantesca, fértil e populosa, onde as possibilidades de comércio se expandiriam, o chamado “Eldorado Austral” (GURNEY, 2001).

Entre os séculos XV e XVIII, surgiu a ideia da *Terra Australis Incognita*, representada nos mapas com diferentes tamanhos e formas, ora isolada, ora unida à América ou à Austrália. Foi a primeira circum-navegação de James Cook, em 1772, constatando que a Nova Zelândia não estava ligada às terras ao sul do planeta, que deu início às desmistificações a respeito da então desconhecida Antártica. Posteriormente, Cook chegou à latitude mais ao sul já alcançada até então (70°10’S), sendo o primeiro a cruzar o Círculo Polar Antártico. O navegador não teve contato com o continente antártico, mas constatou que os boatos sobre as terras férteis e prósperas não poderiam ser verdadeiros devido ao clima rigoroso (GURNEY, 2001).

Mesmo tendo fim a teoria de a Antártica ser um local de grande prosperidade, as incursões de navegadores mais audaciosos relatavam a abundância de animais marinhos nos mares do sul. O grande número de focas e baleias avistadas na região chamou atenção para a exploração do óleo combustível proveniente desses animais. Do final do século XVIII até meados do século XIX, a indústria baleeira foi a propulsora de uma verdadeira “corrida rumo ao sul” (FERREIRA, 2007).

No começo do século XX, a exploração baleeira havia levado à beira da extinção diversas espécies marinhas. Além disso, a ausência de mapas fidedignos da região ocasionou um verdadeiro caos topográfico devido às omissões de sítios considerados secretos pelos pescadores. Deu-se, então, início à “Era Heroica” da exploração polar. Nesse período, as nações buscavam desbravar, com intuítos menos vis, os recônditos do planeta, e, por isso, diferentes expedições aos polos foram realizadas (GURNEY, 2001).

Em 1902, Robert Falcon Scott alcançou a latitude $82^{\circ}16'S$, e, logo após, em 1909, Ernest Henry Shackleton, bateu esse recorde alcançando $88^{\circ}23'S$ (MILLS, 1999). Em 1920, o norueguês Roald Amundsen partiu em uma expedição rumo ao Polo Sul no mesmo momento em que Scott organizava mais uma expedição com o mesmo objetivo. Amundsen, não sem grandes perdas, chegou ao Polo Sul semanas antes de Scott (Figura 1), cuja comitiva pereceu diante do frio e da fome juntamente com seu idealizador (SIMPSON-HOUSLEY, 2002).

Figura 1 – Últimos membros da comitiva de Scott antes de perecerem diante do frio e da fome



Fonte: Herbert George Ponting ©Scott Polar Research Institute, University of Cambridge.

2.1.2 Situação atual

A imagem da Antártica como o continente mais remoto e o símbolo do último ambiente selvagem e, de certa maneira, primitivo do planeta Terra mudou consideravelmente nas últimas duas décadas. Problemas ambientais, como o aparecimento recorrente do “buraco na camada de ozônio” e o desmembramento das plataformas de gelo da Península Antártica, demonstraram que o continente está indissociavelmente ligado aos processos atmosféricos, oceanográficos, climáticos e comportamentais que ocorrem ao redor do mundo (BARGAGLI et al., 2005).

Embora a Antártica ainda seja considerada a última região “inexplorada” do planeta e um símbolo de conservação global, o seu ambiente não é intocado, especialmente no que concerne às regiões próximas de estações científicas, às áreas de turismo e às áreas afetadas por derrames de petróleo (BARGAGLI et al., 2005). Um dos reflexos mais significativos, se não o mais significativo, das mudanças ambientais que têm se intensificado nas últimas décadas sobre a fauna local é justamente o surgimento de condições propícias para a emergência de novos agentes potencialmente patogênicos (BARBOSA; PALACIOS, 2009).

Agentes infecciosos desempenham um papel importante na regulação e evolução das populações animais, incluindo os seres humanos (MAY, 1988; STEARNS, 1999). De modo geral, os agentes infecciosos, especialmente os vírus, têm potencial para causar declínios rápidos e até levar à extinção de populações de vertebrados (GRENFELL; DOBSON, 1995). Tal papel foi atribuído de maneira segura a esses agentes, especialmente no que tange aos principais problemas de conservação da vida selvagem que eles podem representar. Em populações de animais selvagens, agentes infecciosos estão emergindo em uma taxa “anormalmente” elevada, fato diretamente relacionado às mudanças no clima, nas atividades humanas e na exploração dos recursos naturais e do meio ambiente em todo o mundo (EPSTEIN, 2001; HARVELL et al., 1999, 2002).

2.1.3 O Brasil na Antártica

O Tratado da Antártica consiste em um documento assinado em 1959 pelos países que reivindicaram uma parcela do território da Antártica. Esse tratado teve como propósito balizar as atividades na Antártica. Além disso, configurou um novo semblante a tais atividades, que, a partir de 1961, passaram a ter como finalidade a pesquisa científica. Desde então, o Tratado recebeu novos signatários e ampliou as suas proporções, agregando protocolos, convenções e

decisões que acabaram por criar um sistema que trata de todas as questões relacionadas ao continente antártico, considerando-o como patrimônio da humanidade até 2041 (FERREIRA, 2007).

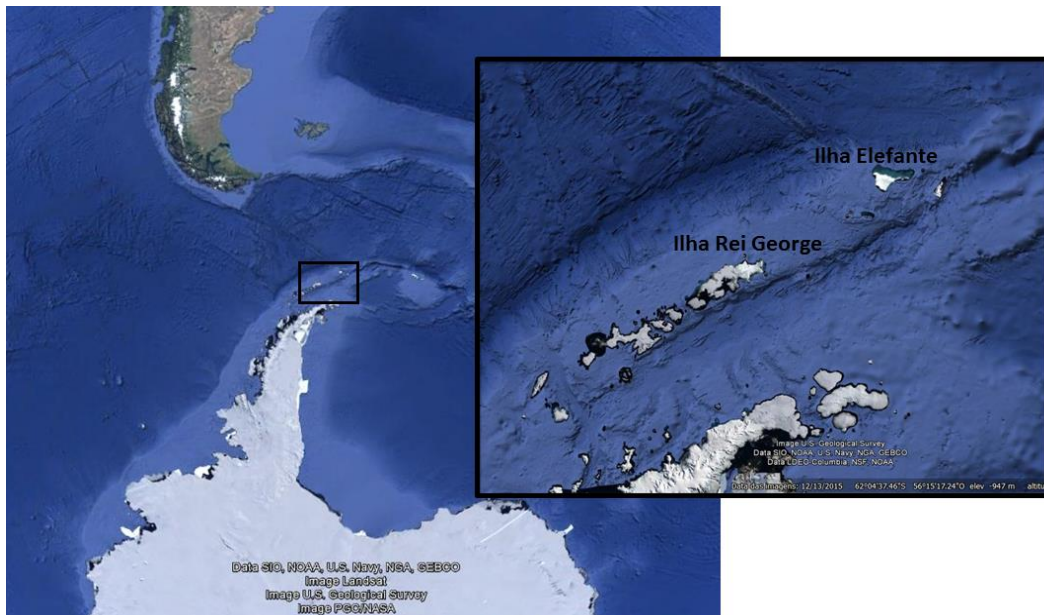
O primeiro momento em que o governo brasileiro se deparou com o tema foi em 1956, durante a Assembleia Geral das Nações Unidas. Nessa ocasião, ressaltou sua posição estratégica em relação à Antártica, mas teve suas reivindicações vetadas. Foi apenas em 1975 que o Brasil aderiu ao Tratado da Antártica. Em 1982, deu-se início ao Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR), sob o comando da Comissão Interministerial para os Recursos do Mar (CIRM), quando o Brasil enviou uma equipe de militares acompanhados de alguns pesquisadores a bordo de dois navios oceanográficos com a finalidade de fazer um reconhecimento da região e demarcação de um local apropriado para a instalação da Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF) na Ilha Rei George. Em complemento a esse Tratado, em 1995, o Brasil assinou o Protocolo de Madri, que determina que as terras ao sul do paralelo 60°S são consideradas “reserva natural dedicada à paz e à ciência”. Atualmente, durante os meses de verão, o PROANTAR envia equipes de pesquisa para a Antártica nas chamadas Operações Antárticas (OPERANTAR) (FREITAS, 2012).

2.1.4 Regiões de amostragem

A Ilha Elefante (61°07'31”S/55°19'26”W) (Figura 2), onde a maioria das amostras deste estudo foi colhida, é, dentre as ilhas que compõem o arquipélago das Ilhas Shetland do Sul, a mais exposta às frentes polares que surgem das proximidades dos campos de gelo do Mar de Weddell. Por isso, possui condições climáticas bem peculiares e distintas das demais ilhas da região. Stinker Point é uma área que normalmente se encontra livre de gelo durante o verão, com aproximadamente cinco quilômetros de extensão de praia, constituindo, assim, um ponto importante para a reprodução de várias espécies de aves (HARRIS et al., 2011).

Por sua vez, a Ilha Rei George (62°05'00”S/57°55'00”W) (Figura 2), outro local de coleta de amostras, é a maior da região, distante 120 km da costa da Antártica e 900 km do continente americano. Talvez por isso, a ocupação humana nessa Ilha seja uma das mais proeminentes da Antártica, possuindo estações de pesquisa pertencentes à Argentina, ao Brasil, ao Chile, à China, à Coreia do Sul, ao Peru, à Polônia, à Rússia e ao Uruguai. A maioria das estações é permanente, ou seja, desenvolve atividades durante todo o ano (SCAR, 2018).

Figura 2 – Imagem da Península Antártica, com destaque às Ilhas Elefante e Rei George, onde as amostras foram colhidas



Fonte: Google Earth (2016).

2.2 AVIFAUNA NATIVA DA ANTÁRTICA

O continente antártico abriga uma rica avifauna, que compreende 59 espécies nativas (Quadro 1) (CLEMENTS, 2014). Devido ao isolamento geográfico e às condições de pesquisa, muitos aspectos sobre a ecologia e biologia dessas espécies, consideradas importantes bioindicadores ambientais, ainda permanecem desconhecidos (MICOL; JOUVENTIN, 2001). No entanto, ainda menos conhecidos são eventos efêmeros, intermitentes e pontuais, como é o caso da maioria das infecções virais a que essas populações estão suscetíveis. A escassez de dados a respeito dos níveis “normais” de incidência e ocorrência de determinados vírus, assim como a respeito de sua caracterização, são fatores limitantes para que se possa estabelecer as bases epidemiológicas e a importância relativa da presença e/ou do aumento da transmissão de determinado patógeno (HARVELL et al., 1999).

As aves marinhas representam cerca de 300 espécies que se alimentam majoritariamente nos oceanos e mares do mundo (HARRISON, 1983). No continente antártico, a maioria das espécies de aves é marinha. Das 59 espécies que nidificam ao sul da Convergência Antártica, somente o pinguim-imperador (*Aptenodytes forsteri*) é considerado endêmico (CLEMENTS, 2014). Normalmente, apenas 2% do território da Antártica se encontra descoberto de gelo durante a estação reprodutiva das aves. Por tal razão, esses

animais possuem um espaço limitado para nidificar, o que, juntamente com a ausência de predadores terrestres, faz com que haja uma importante aglomeração de centenas de indivíduos em um pequeno espaço de terra descoberta de gelo, fenômeno que ocorre anualmente. Essa condição facilita ainda mais a disseminação de inúmeros agentes infecciosos entre as espécies e suas proles (WOODS et al., 2009).

Quadro 1 – Espécies de aves nativas da Antártica

(continua)

ORDEM	FAMÍLIA	ESPÉCIE
Anseriformes	Anatidae	<i>Anas georgica</i>
Sphenisciformes	Spheniscidae	<i>Aptenodytes patagonicus</i>
		<i>Aptenodytes forsteri</i>
		<i>Pygoscelis adeliae</i>
		<i>Pygoscelis papua</i> *
		<i>Pygoscelis antarcticus</i> *
		<i>Eudyptes chrysolophus</i> *
		<i>Eudyptes chrysocome</i>
Procellariiformes	Diomedidae	<i>Thalassarche chrysostoma</i>
		<i>Thalassarche cauta</i>
		<i>Thalassarche salvini</i>
		<i>Thalassarche melanophris</i>
		<i>Phoebetria fusca</i>
		<i>Phoebetria palpebrate</i>
		<i>Diomedea epomophora</i>
		<i>Diomedea exulans</i>
	Procellariidae	<i>Macronectes giganteus</i> *
		<i>Macronectes halli</i>
		<i>Fulmarus glacialisoides</i>
		<i>Thalassoica antarctica</i>
		<i>Daption capense</i> *
		<i>Pagodroma nivea</i>
		<i>Aphrodroma brevirostris</i>
		<i>Pterodroma mollis</i>
		<i>Pterodroma lessonii</i>
		<i>Pterodroma inexpectata</i>
		<i>Pterodroma incerta</i>
		<i>Halobaena caerulea</i>

Quadro 2 – Espécies de aves nativas da Antártica

(conclusão)

ORDEM	FAMÍLIA	ESPÉCIE
		<i>Halobaena caerulea</i>
		<i>Pachyptila turtur</i>
		<i>Pachyptila vittata</i>
		<i>Pachyptila salvini</i>
		<i>Pachyptila desolata</i>
		<i>Pachyptila belcheri</i>
		<i>Procellaria cinérea</i>
		<i>Procellaria aequinoctialis</i>
		<i>Ardena grisea</i>
		<i>Ardena tenuirostris</i>
		<i>Pelecanoides urinatrix</i>
	<i>Pelecanoides georgicus</i>	
		Hydrobatidae
<i>Garrodia nereis</i>		
<i>Fregatta tropica</i>		
Pelecaniformes	Phalacrocoracidae	<i>Phalacrocorax georgianus</i>
		<i>Phalacrocorax atriceps*</i>
		<i>Phalacrocorax bransfieldensis</i>
		<i>Phalacrocorax melanogenis</i>
	Ardeidae	<i>Bubulcus ibis</i>
Charadriiformes	Chionidae	<i>Chionis albus</i>
	Scolopacidae	<i>Bartramia longicauda</i>
	Stercorariidae	<i>Stercorarius chilensis</i>
		<i>Stercorarius maccormicki*</i>
		<i>Stercorarius antarcticus</i>
		<i>Stercorarius pomarinus</i>
		<i>Stercorarius parasiticus</i>
		<i>Stercorarius longicaudus</i>
	Laridae	<i>Xema sabini</i>
		<i>Larus dominicanus</i>
		<i>Sterna paradisaea</i>
<i>Sterna vittata</i>		

Fonte: <http://www.birds.cornell.edu/clementschecklist/download/> (2018).

Legenda: *Espécies contempladas no presente estudo.

2.2.1 Espécies migratórias

De modo geral, a migração é compreendida como um fenômeno com um amplo e contínuo espectro de movimentos realizados pelos animais de uma espécie (por populações, e não indivíduos), que inclui desde invasões esporádicas a viagens anuais de longa distância, envolvendo ida e volta para sítios de reprodução e alimentação (ABLE, 1999; NEWTON, 2008). No presente estudo, foram consideradas migratórias as espécies que ocorrem além dos limites da Convergência Antártica.

O petrel-gigante (*Macronectes giganteus*) é uma ave Procellariiforme da família Procellariidae (Figura 3). Essa espécie apresenta notável polimorfismo na coloração da plumagem, passando por complexas mudanças à medida que envelhece. Os machos são significativamente maiores que as fêmeas. Possui envergadura de até 2,4 m e pesa em média 4 kg. É a única espécie da ordem dos Procellariiformes a ocupar preferencialmente o nicho de predador e necrófago de mamíferos e aves e uma das poucas a mostrar agilidade em terra. Sendo animais oportunistas, possuem a característica de acompanhar em sobrevoo embarcações. Durante a estação reprodutiva, a base de sua alimentação são pinguins (62 a 89% da massa consumida). A nidificação ocorre durante o verão austral, nas ilhas da Convergência Antártica. Formam colônias dispersas de até 300 casais, normalmente próximas a colônias de pinguins, as chamadas “pinguineiras”. A incubação de seu único ovo dura de 55 a 66 dias, e os filhotes deixam o ninho com 104 a 132 dias, quando pesam 1,3 vezes mais que um adulto. A maturidade sexual é atingida aos seis ou sete anos de idade, e a expectativa de vida é de mais 9,5 anos. São encontrados em toda a região circumpolar antártica. Durante o inverno austral, alcançam a costa brasileira até o Trópico de Capricórnio, sendo comuns no Rio Grande do Sul, mas podendo chegar até São Paulo e Rio de Janeiro (CARLOS; VOISIN, 2008; HARPER; KINSKY, 1978; SICK, 1997; SIGRIST, 2009; VAN PERLO, 2009).

Figura 3 – Petrel-gigante (*Macronectes giganteus*) na Ilha Elefante



Fonte: Julia Finger.

A pomba-do-cabo (*Daption capense*) também é uma ave Procellariiforme da família Procellariidae (Figura 4). Considerada de tamanho médio quando comparada aos demais petréis, mede cerca de 40 cm, com 91 cm de envergadura, e pesa aproximadamente 480 g. Apresenta cabeça, nuca e pescoço pretos, dorso com plumagem de coloração preta e branca (em forma de xadrez) e região ventral predominantemente branca, com bordas pretas nas asas e na cauda. Alimenta-se de crustáceos (*krill*) e peixes, aproveitando-se também de carcaças. Nidifica no continente antártico e nas Ilhas da Convergência de novembro a março, fazendo seu ninho entre as rochas, nas saliências das escarpas à beira-mar. Põe apenas um ovo de cor branca, que tem um período de incubação de 45 dias. Seus filhotes deixam os ninhos em torno de 45 dias após a eclosão dos ovos. Essa espécie pode ser encontrada nos oceanos circumpolares austrais, na Antártica e em suas ilhas, nas ilhas subantárticas e nas ilhas ao redor da Nova Zelândia. No inverno, pode chegar até Angola, Austrália e Ilhas Galápagos, atingindo a costa brasileira do Rio Grande do Sul ao Rio de Janeiro entre maio e novembro (CLEMENTS, 2014; SICK, 1997; SIGRIST, 2004).

Figura 4 – Pomba-do-cabo (*Daption capense*) sobrevoando embarcação



Fonte: Julia Finger.

O cormorão-imperial, também conhecido como biguá-de-olhos-azuis (*Phalacrocorax atriceps*), é uma ave da ordem Pelecaniforme da família Phalacrocoracidae (Figura 5). Mede 72 cm de comprimento e tem uma envergadura de asa de 124 cm. São exímios mergulhadores, alimentando-se principalmente de peixes e invertebrados bentônicos, incluindo crustáceos e cefalópodes. Durante o período reprodutivo, a cor dos olhos dos machos fica mais intensa para chamar a atenção das fêmeas. Têm como hábito formar suas colônias de reprodução em regiões rochosas e penhascos das Ilhas da Convergência antártica. No final do período reprodutivo, migram em direção ao norte, fugindo do frio intenso do inverno austral. A espécie é encontrada em regiões costeiras na América do Sul como Ilhas Falkland, Terra do Fogo, norte do cabo de Horn, sul do Chile e da Argentina e Austrália (PEREIRA; SOUZA; COSTA, 2011).

Figura 5 – Cormorão-imperial (*Phalacrocorax atriceps*)



Fonte: Jaap Vink.

O mandrião-antártico ou skua-antártica (Figura 6) foi recentemente reclassificado e renomeado, deixando de ser denominado *Stercorarius antarcticus* e passando a ser chamado de *Catharacta antarctica*. É uma ave da ordem Charadriiforme da família Stercorariidae, com envergadura média de 147 cm (64 cm de comprimento) e peso média de 1,7 kg. Apresenta hábitos altamente predatórios e oportunistas, o que motivou o nome “Stercorarius”, já que busca seu alimento atacando outras aves até elas regurgitarem. Durante a estação reprodutiva, diferentemente da maioria das espécies que nidificam ao sul da convergência, procura áreas com cobertura de neve para realizar a postura. Durante o inverno austral, atinge altas latitudes, tendo sido registrada no litoral da Bahia (BARBRAUD et al., 1999; DEL HOYO; COLLAR, 2014; MAXSON; BERNSTEIN, 1982; OLSEN; LARSSON, 1997).

Figura 6 – Mandriões-antárticos (*Catharacta antarctica*) pousados em parte da embarcação



Fonte: acervo pessoal.

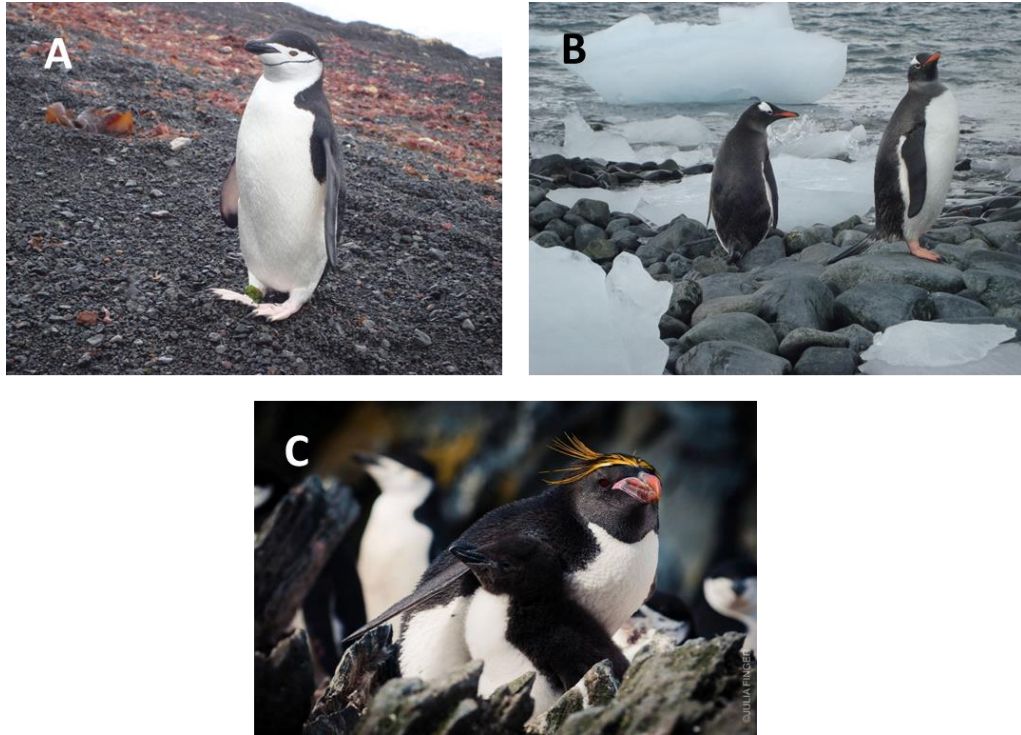
2.2.2 Espécies residentes

Para o presente estudo, foram consideradas residentes as espécies que ocorrem fundamentalmente dentro dos limites da Convergência Antártica, ou seja, que possuem seu centro de distribuição e abundância abaixo do paralelo 60°S. Os pinguins, aves da ordem Sphenisciforme, família Spheniscidae, compõem 90% do total de biomassa da avifauna antártica. Estão entre as espécies de aves com maior representatividade ecológica, sendo considerados sentinelas para estudos de mudanças ambientais e ecossistêmicas na Antártica (Figura 7) (CROXALL; TRATHAN; MURPHY, 2002).

Ao contrário das demais aves descritas até agora, as espécies de pinguins permanecem durante o ano inteiro em uma faixa mais restrita, próxima às áreas de nidificação. O pinguim-de-barbicha ou pinguim-antártico (*Pygoscelis antarcticus*) apresenta distribuição circumpolar e alimenta-se basicamente de *krill*. Mede cerca de 79 cm e possui uma listra característica abaixo da mandíbula que lhe confere o nome. O pinguim-papua ou pinguim-gentoo (*Pygoscelis papua*), por sua vez, possui o mesmo nicho trófico do pinguim-antártico, podendo medir até 90 cm e sendo facilmente reconhecido pela mancha branca que lhe percorre a cabeça e pelo bico de cor laranja vivo. Já o pinguim-macaroni (*Eudyptes chrysolophus*), embora possua o mesmo nicho trófico dos demais, apresenta uma estratégia de alimentação diferente pelo fato de mergulhar a profundidades maiores (até 70 m), sendo também uma

espécie menos abundante na região. Mede até 60 cm e possui uma crista amarelo-ouro no topo da cabeça (KOKUBUN et al., 2010; WILSON, 2010).

Figura 7 – a) Pinguim-antártico (*Pygoscelis antarcticus*), b) pinguim-papua (*Pygoscelis papua*) e c) pinguim-macaroni (*Eudyptes chrysolophus*)



Fonte: acervo pessoal (fotos a e b) e Julia Finger (foto c).

2.3 PRINCIPAIS VIROSES DE AVES ANTÁRTICAS

Apenas um pequeno número de agentes virais já foi descrito em aves antárticas. Inicialmente, os estudos a respeito de vírus em aves antárticas orbitaram em torno da detecção de vírus da influenza A, paramixovírus, birnavírus e arbovírus (WOODS et al., 2009). Na maioria dos casos, tais estudos são baseados em evidências sorológicas, cujo real significado é sempre difícil de inferir (VOGELNEST, 2000; WALLENSTEN et al., 2006).

Técnicas moleculares, tais como PCR de amplo espectro e sequenciamento de alto desempenho, têm permitido um maior aprofundamento no conhecimento sobre a verdadeira diversidade viral em algumas espécies de animais selvagens. Isso se deve ao fato dessas abordagens possibilitarem não apenas a descrição molecular mais aprofundada dos vírus, mas também a detecção e caracterização de vírus ainda não relacionados com famílias virais previamente descritas (DELWART, 2007; EDWARDS; ROHWER, 2005).

2.3.1 Paramixovírus

A subfamília Paramyxovirinae, pertencente à família Paramyxoviridae, inclui sete gêneros: *Aquaparamyxovirus*, *Avulavirus*, *Ferlavirus*, *Henipavirus*, *Morbillivirus*, *Respirovirus* e *Rubulavirus* (ICTV, 2015). A classificação dos paramixovírus é baseada em diferenças na organização do genoma viral, nas proteínas por ele codificadas, na atividade biológica dessas proteínas e nas características morfológicas.

Os vírions dessa família são envelopados, pleomórficos, com genoma de RNA de cadeia simples, não segmentado, de polaridade negativa, variando de 13 a 19 kb. O genoma possui de seis a dez genes ligados em *tandem*, dos quais três formam o complexo da polimerase – nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P) e proteína grande da polimerase (L). O genoma dos paramixovírus codifica também as proteínas da matriz (M) e de fusão (F) e, dependendo do gênero, glicoproteínas de superfície, tais como a proteína de ligação (G), a hemaglutinina ou hemaglutinina-neuraminidase (H, HN), a proteína curta-hidrofóbica (SH), e proteínas reguladoras, tais como a proteína não estrutural 1 e 2 (NS1, NS2), a proteína de matriz 2 (M2.1, M2.2) e proteínas C e V (FAUQUET et al., 2005; LAMB; KRUG, 2007).

A família Paramyxoviridae dentro da ordem de Mononegavirales inclui um grande número de vírus que infectam humanos e animais, responsáveis por um amplo espectro de doenças (LAMB; KRUG, 2007). Os membros dessa família, também conhecidos como paramixovírus, possuem a capacidade de transpor a barreira interespecífica em uma taxa mais elevada do que maioria das outras famílias virais, além de ser capaz de infectar uma ampla gama de espécies. Em populações animais, o vírus da doença de Newcastle (*Newcastle disease virus* – NDV) é considerado um dos paramixovírus de maior impacto (FAUQUET et al., 2005; KITCHEN; SHACKELTON; HOLMES, 2011).

Os paramixovírus aviários são ubíquos em aves selvagens do mundo todo. Sua virulência varia de acordo com a cepa viral, sendo as cepas mais virulentas pertencentes ao gênero *Avulavirus*, espécie *Avian avulavirus 1*, também conhecido como vírus da doença de Newcastle. Essa doença é altamente contagiosa e potencialmente devastadora e provoca graves sintomas respiratórios e nervosos em aves domésticas e selvagens (LAMB et al., 2000; MAYO, 2002).

Em aves antárticas, evidências de infecções por paramixovírus já vêm sendo descritas há mais de trinta anos. A maioria dessas evidências foi descrita em diferentes espécies de pinguins. Seis isolados de avulavírus foram obtidos de cinco pinguins reais (*Eudyptes*

schlegeli) e de um pinguim-rei (*Aptenodytes patagonicus*) da Ilha de Macquarie (MORGAN et al., 1981). Isolados de avulavírus de pinguins-de-adélia (*Pygoscelis adeliae*) foram obtidos de diferentes localidades: das proximidades da estação de Casey e de Vestfold Hills (MORGAN; WESTBURY, 1981, 1988). Igualmente em pomba-do-cabo (*Daption capense*) da Ilha de Ross (AUSTIN; WEBSTER, 1993) foi isolada uma cepa de avulavírus. Além disso, anticorpos contra NDV foram detectados em *Pygoscelis adeliae* da Ilha Béchervaise e da estação Casey, bem como em *Eudyptes schlegeli* da Ilha Macquarie e em skuas (*Catharacta Antarctica*) de Vestfold Hills (MILLER; WATTS; SHELLAM, 2008; MORGAN; WESTBURY, 1981).

Diante desses achados, torna-se evidente a ocorrência desses vírus, inclusive de NDV, em diversas localidades da Antártica. Além disso, por meio de tais estudos, nota-se que a distribuição desses vírus é irregular e imprevisível. No entanto, com relação à manifestação clínica da doença de Newcastle, apesar de já ter sido relatada em *Aptenodytes patagonicus* e em *Pygoscelis adeliae*, ambos em condições de cativeiro, não há nenhuma evidência de doença em populações de aves marinhas da Antártica (PIERSON; PFOW, 1975).

2.3.2 Ortomixovírus

À família Orthomyxoviridae, além do *Alphainfluenzavirus* (*Influenza A virus*), pertencem mais seis gêneros: *Betainfluenzavirus* (*Influenza B virus*), *Deltainfluenzavirus* (*Influenza D virus*), *Gammainfluenzavirus* (*Influenza C virus*), *Isavirus*, *Quaranjavirus* e *Thogotovirus* (ICTV, 2015). Os vírions dessa família são envelopados, pleomórficos e com genoma de RNA de sentido negativo, composto de oito segmentos. Diferentes cepas possuem uma alta variabilidade antigênica nas glicoproteínas de superfície, permitindo a adaptação e a persistência do vírus nas diferentes populações hospedeiras.

O AIV é tipificado de acordo com a hemaglutinina (HA) e com a neuraminidase (NA), apresentando 18 diferentes tipos de HA e 11 de NA já descritos (OLSEN, 2002). Enquanto que a HA é responsável pela adesão e penetração do vírus na célula do hospedeiro, a NA é responsável pela liberação do vírus da célula infectada e pela disseminação para outras células do trato respiratório. Além disso, o vírus contém proteínas envolvidas no complexo de replicação – polimerase básica 1 (PB1), polimerase básica 2 (PB2), polimerase ácida (PA) e nucleoproteína (NP). A proteína da matriz M1 participa da morfogênese viral, mediando a interação entre o envelope e o nucleocapsídeo. Já a M2 é uma proteína integral do envelope, essencial para o desnudamento viral (OLSEN, 2002).

O vírus da influenza tipo A, ou *Alphainfluenzavirus*, já foi isolado de pelo menos 105 espécies de aves selvagens de 26 famílias diferentes. Entretanto, as aves pertencentes a ordens Anseriformes e Charadriiformes são consideradas reservatórios naturais do vírus (OLSEN et al., 2006; WEBSTER et al., 1992). O potencial zoonótico desse vírus e seu efeito devastador sobre a saúde e o bem-estar de aves domésticas e selvagens ao redor do mundo são motivos de grande preocupação (OLSEN et al., 2006).

Após um surto de gripe aviária que ocorreu no lago Qinghai, na China, resultando na morte de milhares de aves selvagens, essas espécies aquáticas e migratórias passaram a ser consideradas as principais responsáveis pelo transporte desses agentes por longas distâncias (CHEN et al., 2005; NORMILE, 2005). Estudos demonstraram que algumas espécies de aves migratórias são capazes de sobreviver a infecções por cepas altamente patogênicas, servindo como disseminadoras do vírus durante algum tempo (KEAWCHAROEN et al., 2008).

Entretanto, o verdadeiro papel das aves aquáticas na propagação e na ecologia do vírus da influenza permanece obscuro. Por isso, a investigação da presença desse vírus em populações de aves selvagens tornou-se de suma importância, principalmente no que diz respeito à compreensão da ecologia do vírus nessas populações (CLARK; HALL, 2006).

Evidências sorológicas de vírus da influenza foram encontradas em mandriões (*Catharacta Antarctica*) do Mar de Ross e da Península Antártica (AUSTIN; WEBSTER, 1993; BAUMEISTER et al., 2004). Anticorpos também foram detectados em pinguins-de-adélia (*Pygoscelis adeliae*) originários da porção leste do continente Antártico, do Mar de Ross e da Península Antártica (AUSTIN; WEBSTER, 1993; BAUMEISTER et al., 2004; MORGAN; WESTBURY, 1981), assim como em pinguins-papua (*Pygoscelis papua*) das Ilhas Shetland do Sul e da Geórgia do Sul (BAUMEISTER et al., 2004; WALLENSTEN et al., 2006), em pinguins-de-barbicha (*Pygoscelis antarcticus*) e em petréis-gigantes (*Macronectes giganteus*) das Ilhas Shetland do Sul (BAUMEISTER et al., 2004).

Esses resultados indicam que o vírus da gripe aviária ou é endêmico na Antártica ou é introduzido repetidamente ao longo do ano por aves migratórias (WALLENSTEN et al., 2006). Não foi observada qualquer evidência de doença clínica até a data de elaboração deste estudo, embora tenha sido observada uma maior taxa de mortalidade em filhotes de pinguins-de-adélia (*Pygoscelis adeliae*) do mesmo local onde foi feito um estudo sorológico demonstrando que alguns animais apresentavam anticorpos (MORGAN; WESTBURY, 1981). Apesar das extensas tentativas de isolamento, nenhum vírus foi isolado de aves marinhas da Antártica (WALLENSTEN et al., 2006).

2.3.3 Coronavírus

Os vírus pertencentes à família Coronaviridae são divididos em duas subfamílias: Coronavirinae e Torovirinae. A subfamília Coronavirinae é representada por quatro gêneros, *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* e *Gammacoronavirus*. Já a subfamília *Torovirinae* é representada por dois gêneros, *Bafinivirus* e *Torovirus*, além de três espécies de nidovírus que ainda não foram classificadas genericamente (BREITBART et al., 2017).

Os vírions dessa família são envelopados e possuem genoma de RNA de polaridade positiva, variando de 27 a 30 kb (CAVANAGH, 2007). Os gêneros *Alpha* e *Betacoronavirus* têm sido isolados fundamentalmente de mamíferos. Já o gênero *Gammacoronavírus*, apesar de ter como principal representante o *Avian coronavirus*, agente causador da bronquite infecciosa das aves, também abriga uma espécie identificada em baleias beluga (*Beluga whale coronavirus*), além de ter sido identificado em leopardo asiático e em inúmeras espécies das aves. Os vírus do gênero *Deltacoronavirus* foram detectados em mamíferos e em aves terrestres e aquáticas selvagens (CHU et al., 2011; DONG et al., 2007;; HUGHES et al., 2009; JONASSEN et al., 2005; MIHINDUKULASURIYA et al., 2008; MURADRASOLI et al., 2010; WOO et al., 2009).

Em animais, os membros dessa família, também conhecidos como coronavírus (CoVs), estão associados a doenças respiratórias e intestinais, bem como a doenças hepáticas, renais e neurológicas (CAVANAGH, 2005). Infecções por coronavírus humanos estiveram durante muito tempo relacionadas com resfriados comuns. No entanto, o surgimento do risco potencial de pandemia da síndrome respiratória aguda grave (SARS) em 2003 e da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS) em 2012, ambas causadas por um betacoronavírus, levou à descoberta de vários CoVs capazes de infectar tanto seres humanos quanto animais (HILGENFELD; PEIRIS, 2013).

Nos últimos anos, a vida selvagem tem estado sob vigilância epidemiológica, visto que inúmeras espécies podem desempenhar importante papel como reservatório de vírus emergentes, como é o caso dos CoVs. Até o presente momento, não existem estudos descrevendo a presença desses vírus em aves antárticas. Porém, visto que aves selvagens são conhecidas como importantes reservatórios de coronavírus aviário e que este foi descrito em uma ampla gama de hospedeiros com vasta distribuição geográfica, o estudo da diversidade de coronavírus aviários torna-se eminente em todos os continentes, inclusive no antártico (CAVANAGH; GELB JÚNIOR, 2008; DE SALES LIMA et al., 2015).

2.3.4 Circovírus

A família Circoviridae é representada atualmente por dois gêneros, *Circovirus* e *Cyclovirus*. Apesar de os ciclovírus terem sido descritos apenas com base em informações moleculares a respeito do seu genoma, os circovírus já foram descritos de acordo com sua morfologia. Os vírions desse gênero são pequenos (15-25 nm) e icosaédricos e não possuem envelope (BREITBART et al., 2017). Essa família apresenta genoma de DNA circular de fita simples, cujo tamanho varia de 1,7 a 2,1 kb e contém duas fases abertas de leitura (*open reading frame* – ORF) principais. Essas ORFs codificam os genes da proteína iniciadora da replicação (*rep*) e da proteína do capsídeo (*cap*) (TODD et al., 2005). Membros do gênero *Circovirus* e *Cyclovirus* distinguem-se pela localização das origens de replicação (*ori*) relativas às regiões codificantes, bem como pelo comprimento das regiões intergênicas (ROSARIO et al., 2017).

Nos circovírus, uma estrutura em alça, localizada entre as duas extremidades 5' de cada ORF, apresenta um motivo conservado de nove bases, que está ligado fundamentalmente com a iniciação da replicação do genoma viral. Após a infecção na célula hospedeira, um molde do DNA viral é gerado pela DNA-polimerase celular. Posteriormente, as proteínas *rep* ligam-se à estrutura em alça e, após uma pequena clivagem na fita de polaridade positiva, iniciam a replicação da fita complementar, por meio do mecanismo de círculo rolante (FAUREZ et al., 2009; STEINFELDT; FINSTERBUSCH; MANKERTZ, 2001, 2007).

Os membros do gênero *Circovirus* têm sido identificados apenas em espécies de vertebrados, enquanto os membros do gênero *Cyclovirus* foram identificados em vertebrados e invertebrados (ROSARIO; DUFFY; BREITBART, 2012). Em aves, são conhecidos por serem capazes de infectar as mais variadas espécies, incluindo papagaios, pombos, gaivotas, patos, gansos, cisnes, corvos, canários, pintassilgos, estorninhos e galinhas (HALAMI et al., 2008; HATTERMANN et al., 2003; JOHNE et al., 2006; LI et al., 2010; MANKERTZ et al., 2000; NIAGRO et al., 1998; STEWART; PERRY; RAIDAL, 2006; TODD et al., 2001, 2007). No entanto, apesar da ubiquidade e ampla diversidade genética dos circovírus já observados, nenhum exemplar foi descrito até agora em aves antárticas (BARBOSA; PALACIOS, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo consiste em detectar e caracterizar agentes virais que possam estar presentes em sete espécies de aves antárticas migratórias e residentes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Já os objetivos específicos são:

- a) investigar a presença de sequências virais relacionadas com vírus das famílias Paramyxoviridae, Coronaviridae e Circoviridae por meio de PCR convencional de amplo espectro;
- b) avaliar a presença de influenza A por intermédio de *real-time* PCR;
- c) caracterizar as sequências obtidas via sequenciamento convencional (Sanger) ou de alto desempenho (Illumina) e análises filogenéticas;
- d) analisar o viroma das espécies cuja incidência de vírus já conhecidos se revelar maior pelas demais abordagens utilizadas, com base no sequenciamento alto desempenho.

4 METODOLOGIA

4.1 COLETA DE AMOSTRAS

As coletas foram realizadas em conformidade com o Anexo I ao Protocolo do Tratado da Antártica sobre Proteção ao Meio Ambiente, o Grupo de Avaliação Ambiental do Programa Antártico Brasileiro (GAAM/PROANTAR) realizou avaliação de impacto ambiental com base nas informações fornecidas no Formulário Logístico-Ambiental do projeto e considerou as atividades como de impacto inferior a menor ou transitório. Portanto, de novembro de 2014 a fevereiro de 2015, durante a trigésima terceira Operação Antártica (OPERANTAR XXXIII), chefiada pelo Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR) e pela Secretaria da Comissão Interministerial para os Recursos do Mar (SECIRM), foi realizada a coleta de amostras de aves antárticas para pesquisa virológica. Ao longo de três meses de expedição, foram colhidos *swabs* cloacal e traqueal de indivíduos de sete espécies de aves. Dentre as espécies de aves amostradas, três são consideradas residentes (ordem Sphenisciforme), e quatro, migratórias (ordens Procellariiforme, Charadriiforme e Pelecaniforme).

Dentre as espécies residentes, foram capturados e amostrados 23 pinguins-antárticos (*Pygoscelis antarcticus*), 15 pinguins-papua (*Pygoscelis papua*) e 15 pinguins-macaroni (*Eudyptes chrysolophus*). Dos 23 indivíduos da espécie *P. antarcticus*, 15 indivíduos são provenientes da Ilha Elefante, e oito, da Ilha Rei George. Todos os indivíduos das espécies *P. papua* e *E. chrysolophus* são provenientes da Ilha Elefante. Dentre as espécies migratórias, foram capturados e amostrados 28 petréis-gigantes (*Macronectes giganteus*), 15 pombas-do-cabo (*Daption capense*), que também são uma espécie de petrel, 15 mandriões-antárticos (*Catharacta antarctica*) e 15 cormorões-imperiais (*Phalacrocorax atriceps*). Dos 28 indivíduos da espécie *M. giganteus*, 15 são provenientes da Ilha Elefante, e 13, da Ilha Rei George. Todos os indivíduos das espécies *D. capense*, *C. antarctica* e *P. atriceps* são provenientes da Ilha Elefante (Tabela 1).

Tabela 1 – Número de indivíduos coletados por espécie e local

ESPÉCIE/LOCAL DE COLHEITA	ILHA ELEFANTE (61°07'31"S/55°19'26"W)	ILHA REI GEORGE (62°05'00"S/57°55'00"W)	TOTAL
<i>Pygoscelis papua</i>	15	-	15
<i>Pygoscelis antarcticus</i>	15	8	23
<i>Eudyptes chrysolophus</i>	15	-	15
<i>Macronectes giganteus</i>	15	13	28
<i>Daption capense</i>	15	-	15
<i>Phalacrocorax atriceps</i>	15	-	15
<i>Catharacta antarctica</i>	15	-	15

Fonte: elaboração própria.

4.2 EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO

Após a colheita, os *swabs* foram armazenados em 500 µL de solução tampão RNAlater® (Ambion) e mantidos sob refrigeração ($\leq 4^{\circ}$ C) durante o transporte até o laboratório de Virologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Uma vez no laboratório, os *swabs* foram mantidos a -80° C até o seu processamento.

Do volume total da amostra, 100 µL foram utilizados para a extração de DNA, e 250, para a extração de RNA. O DNA foi extraído pelo método de sílica (BOOM et al., 1990), eluído em 50 µL de água ultrapura e armazenado a -20° C. Já o RNA foi extraído com base no protocolo de TRIzol® adaptado por Spackman (USDA-ARS, SOP Version 03192007), sendo então eluído em 30 µL de água ultrapura livre de endonucleases e armazenado a -80° C até o momento da síntese do DNA complementar (cDNA). O cDNA foi obtido por intermédio da utilização da enzima transcriptase reversa GoScript® (Promega) e de oligonucleotídeos randômicos.

4.3 GENE CONSTITUTIVO

A fim de verificar a viabilidade do material genético obtido após os procedimentos de extração e purificação, muitas vezes emprega-se a amplificação de um gene constitutivo da amostra em questão. Tal verificação se tornou especialmente importante no caso deste estudo, em que as amostras foram transportadas por longas distâncias e submetidas a diferentes temperaturas de refrigeração ao longo do processo de transporte até o laboratório.

Um dos requisitos mais importantes para a escolha de um gene candidato a controle endógeno é a sua presença constante em todas as amostras testadas com pouca variação na expressão por influência de estímulos externos ou mudanças no metabolismo celular (OLIAS et al., 2014). Atualmente, a PCR quantitativa (qPCR) constitui o método mais econômico, eficiente e confiável para medir os níveis de expressão de genes encontrados em baixas quantidades, além de ser sensível, específica e reprodutível (BUSTIN, 2000). Seguindo esse raciocínio, foi escolhido o gene 18s, codificante para RNA ribossomal e referência em estudos genômicos de diversas espécies de aves, inclusive pinguins, para estabelecer um protocolo de qPCR com a finalidade de controle endógeno (OLIAS et al., 2014). Sendo assim, apenas foram analisadas quanto à presença de genomas virais as amostras a partir das quais foi possível amplificar o gene constitutivo.

A qPCR, cujo alvo é um fragmento de 98 a 99 pb do gene 18s, foi realizada no equipamento StepOne® Plus (Applied Biosystems). De cada amostra, foram utilizados 2 µL de ambos os materiais genéticos – DNA e cDNA (obtido por transcrição reversa com oligonucleotídeos randômicos). O restante do mix de amplificação continha: 5 µL de Fast EvaGreen® qPCR Master Mix (Biotium), 200 µM de cada oligonucleotídeo (PF 5'-CGA AAG CAT TTG CCA AGA AT-3' e PR 5'-GGC ATC GTT TAT GGT CGG-3') (OLIAS et al., 2014), 1 µM de ROX® Reference Dye (Invitrogen) e água ultrapura para totalizar um volume final de 10 µL de reação. As condições de amplificação foram: 95 °C por 2 minutos, mais 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 30 segundos. Ao final, foi realizada uma curva de desnaturação para verificar a especificidade dos produtos de amplificação (*melting curve*).

4.4 PESQUISA DOS PRINCIPAIS VÍRUS DE AVES

Para verificar a presença de material genético de vírus minimamente relacionados com gêneros conhecidos das famílias Paramyxoviridae, Coronaviridae e Circoviridae, foram

utilizadas técnicas de PCR consideradas de amplo espectro. Os principais táxons virais com possíveis impactos sobre as espécies de aves analisadas foram alvo de tais técnicas, e, para isso, oligonucleotídeos degenerados previamente descritos na literatura foram selecionados.

Para a verificação da presença de RNA de paramixovírus, foi utilizado um protocolo de PCR *hemi-nested* descrito por Tong et al. (2008). Tal protocolo possibilita a detecção de um fragmento de aproximadamente 250 pb do genoma de todos *Avulavirus*, gênero ao qual pertence o NDV. Foram utilizados os oligonucleotídeos AVU-RUB-F1 (5'-GGT TAT CCT CAT TTI TTY GAR TGG ATH CA-3') e AVU-RUB-R (5'-GCA ATT GCT TGA TTI TCI CCY TG NAC-3') na primeira reação da PCR e AVU-RUB-F2 (5'-ACA CTC TAT GTI GGI GAI CCN TTY AAY CC-3') e AVU-RUB-R (5'-GCA ATT GCT TGA TTI TCI CCY TG NAC-3') na segunda. As condições de ciclagem da primeira reação foram as seguintes: 94 °C por 5 minutos, mais 40 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 48 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e extensão final de 72 °C por 7 minutos. As condições de ciclagem da segunda reação foram: 94 °C por 5 minutos, mais 40 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 50 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e extensão final de 72 °C por 7 minutos. Como controle positivo das reações, foi utilizado o material genético obtido da cepa vacinal *La Sota* do NDV (Biovet).

O alvo de detecção no caso dos coronavírus foi um fragmento de 440 pb do gene *RdRp*, conservado em teoricamente todos os membros da família Coronaviridae. O protocolo eleito foi o descrito por Chu et al. (2011) – uma PCR *nested* para a qual foram projetados os seguintes oligonucleotídeos: CoV-F1 (5'-GGK TGG GAY TAY CCK AAR TG-3') e CoV-R1 (5'-TGY TGT SWR CAR AAY TCR TG-3') para a primeira reação e CoV-F2 (5'-GGT TGG GAC TAT CCT AAG TGT GA-3') e CoV-R2 (5'-CCA TCA TCA GAT AGA ATC ATC ATA-3') para a segunda. As condições de ciclagem em ambas as reações foram as seguintes: 94 °C por 5 minutos, mais 40 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 48 °C por 30 segundos, 72 °C por 50 segundos e extensão final de 72 °C por 7 minutos. O material genético de uma cepa vacinal do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (Nobilis® IB H-120) foi utilizado como controle positivo das reações.

A família dos circovírus, por sua vez, teve como alvo de detecção um fragmento de 400 pb do gene *Rep*, consenso dentre todas as espécies virais de Circoviridae. Uma PCR *nested* descrita por Li et al. (2010) foi utilizada. Na primeira reação, foram utilizados os oligonucleotídeos CV-F1 (5'-GGI AYI CCI CAY YTI CAR GG-3') e CV-R1 (5'-AWC CAI CCR TAR AAR TCR TC-3') e as seguintes condições de ciclagem: 95 °C por 5 minutos, mais 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 52 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e extensão

final de 72 °C por 10 minutos. Na segunda, foram utilizados os oligonucleotídeos CV-F2 (5'-GGI AYI CCI CAY YTI CAR GGI TT-3') e CV-R2 (5'-TGY TGY TCR TAI CCR TCC CAC CA-3') e as seguintes condições de ciclagem: 95 °C por 5 minutos, mais 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 56 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e extensão final de 72 °C por 10 minutos. Como controle positivo das reações, foi utilizado DNA obtido de uma amostra positiva para circovírus suíno tipo 2 (*Porcine circovirus 2* - PCV-2).

A sensibilidade analítica das técnicas utilizadas sob as condições laboratoriais foi de 10 a 100 moléculas por reação. Todos os produtos foram corados com BlueGreen® Loading Dye (LGC Biotecnologia), observados sob luz UV em gel de agarose a 2%. As bandas positivas foram quantificadas, excisadas e purificadas com o kit PureLink® (Invitrogen) e, em seguida, encaminhadas para o sequenciamento pelo método de Sanger.

4.5 PESQUISA DO VÍRUS DA INFLUENZA A

Para a verificação da presença de material genético de vírus influenza A, optou-se por utilizar um protocolo de RT-qPCR com oligonucleotídeos descritos por Zou et al. (2007), cujo alvo é um fragmento conservado em todos os vírus influenza tipo A. A reação foi realizada no equipamento StepOne® Plus (Applied Biosystems) utilizando o kit SuperScript® III One-Step de RT-PCR (Thermo Fisher Scientific) com os oligonucleotídeos InfAF (5'-GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C-3') e InfAR (5'-AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA-3') e sonda TaqMan® (5'-TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG-3') (Integrated DNA Technologies). O RNA purificado de uma cepa viral de H₁N₁-A/Virginia/2/2009 (ATCC) foi usado como controle positivo.

As amostras cujo resultado da RT-qPCR foi positivo para a presença de RNA viral foram submetidas a uma segunda amplificação a partir do cDNA sintetizado com oligonucleotídeos randômicos. Tal amplificação teve como finalidade a amplificação dos oito segmentos genômicos virais por meio da utilização do kit PathAmp® FluA (Thermo Fisher Scientific). O produto dessa amplificação foi observado sob luz UV em gel de agarose de alta definição TopVision® (Fermentas) a uma concentração de 0,8%.

4.6 METAGENÔMICA VIRAL

As espécies de aves com maior incidência de detecção pelas demais técnicas (petrel-gigante, pinguim-antártico e cormorão-imperial) foram submetidas à análise completa dos vírus presentes por meio da técnica de metagenômica viral. As amostras de *swab* cloacal e traqueal de todos os indivíduos de cada espécie foram reunidas em *pools*. Os *pools*, por sua vez, foram ressuspensos em 10 volumes de PBS (pH 7,2), centrifugados a 3.000 g por 30 minutos a 4 °C e filtrados através de membrana de 0,45 µm (Millipore) para remoção de restos celulares. Os sobrenadantes foram centrifugados sobre sacarose a 25% a 150.000 g, durante 4,5 horas a 4 °C (em um rotor Sorvall AH629), e o sedimento contendo partículas virais foi tratado com uma mistura de 2 µL de DNase (2 U µL⁻¹, Turbo DNase; Ambion), 5 µL de RNase A (20 mg/mL⁻¹; Invitrogen) e 0,5 µL de benzonase (25 U µL⁻¹; Novagen) a 37 °C por 2 horas para digestão de ácidos nucleicos suscetíveis (SHAN et al., 2011).

A extração do DNA viral foi realizada utilizando um protocolo padrão de fenol-clorofórmio (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). O RNA viral foi extraído com TRIzol LS (Ambion) seguindo as instruções do fabricante. O DNA viral foi enriquecido por meio do método de amplificação de DNA por múltiplo deslocamento (*multiple displacement amplification* – MDA) utilizando a enzima Φ29 (DEAN et al., 2002). O RNA viral foi convertido em bibliotecas de cDNA utilizando um kit de amplificação de RNA SeqPlex (Sigma Aldrich) (NAKAMURA et al., 2009). O material resultante foi então purificado (Zymo Research), e a qualidade e quantidade do DNA foram avaliadas por espectrofotometria (L-Quant; Loccus Biotechnology) e fluorometria (Qubit; Invitrogen), respectivamente. As bibliotecas de DNA foram preparadas com 50 ng de DNA MDA/SeqPlex purificado – utilizando um kit de preparação de amostras Nextera DNA – e encaminhadas para o sequenciamento de alto desempenho na plataforma MiSeq® (Illumina) (2 × 50 *paired-end reads* com o kit de reagentes Illumina v2).

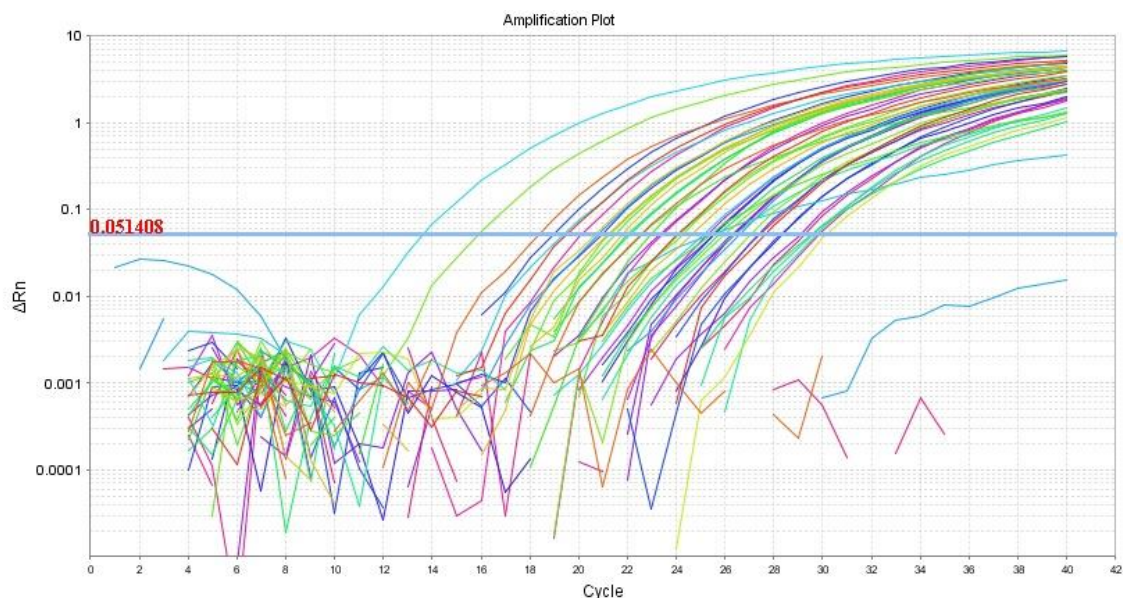
A qualidade das sequências foi avaliada utilizando o programa FastQC. As sequências com índice de qualidade Phred <20 foram editadas com o auxílio do programa Geneious (versão 8.1.7). Os *contigs* foram montados com o programa SPAdes 3.5 (BANKEVICH et al., 2012) e analisados utilizando o programa BLASTx – as sequências com *E values* ≤10⁻³ foram classificadas como prováveis vírus eucarióticos, bactérias, fagos, eucariotos ou desconhecidos. Já as comparações entre genes e proteínas foram realizadas com os programas BLASTn e BLASTp.

As sequências identificadas no presente estudo como vírus eucarióticos foram alinhadas com sequências representativas obtidas no GenBank utilizando o programa ClustalX versão 2.0 (THOMPSON et al., 1997). Além disso, árvores filogenéticas foram geradas pelo método *neighbor-joining* com um modelo de *p-distance* e *bootstrap* de 500 réplicas. As análises foram feitas com auxílio do programa MEGA-X (TAMURA et al., 2013).

5 RESULTADOS INICIAIS

Como controle endógeno, a qPCR para detecção do gene constitutivo de aves 18s demonstrou que, apesar de todos os procedimentos de transporte e armazenamento desde o momento da colheita até o processamento das amostras, o material genético permaneceu viável. Os 252 *swabs* dos 126 animais capturados possibilitou recuperar tanto o DNA quanto o RNA dos espécimes (Figura 8).

Figura 8 – Curvas de dissociação indicando a amplificação do gene constitutivo em todas as amostras analisadas por qPCR



Fonte: elaboração própria.

A partir desses resultados, foi possível dar sequência aos experimentos. A etapa seguinte consistiu em realizar a busca de material genético dos principais vírus que acometem aves. Após a padronização das reações, as PCRs de amplo espectro para paramixovírus e coronavírus resultaram no aparecimento de inúmeras bandas correspondentes ao tamanho esperado quando visualizados sob luz UV em gel de agarose. No entanto, depois do sequenciamento desses fragmentos, não foi possível verificar nenhuma correspondência com outras sequências virais já descritas no GenBank por meio do BLASTx.

Com relação às pesquisas de circovírus, o resultado não foi diferente, já que muitas bandas inespecíficas foram observadas. Entretanto, uma amostra de *swab* traqueal de um

indivíduo da espécie *Phalacrocorax atriceps* originou banda correspondente ao tamanho esperado, a qual, ao ser submetida ao BLASTx, apresentou semelhança com outras sequências referentes ao gene *Rep* de outros circovírus. A sequência de aminoácidos deduzida a partir desse fragmento foi alinhada com algumas sequências disponíveis no GenBank com a utilização do ClustalX (LARKIN et al., 2007). O fragmento obtido da traqueia do cormorão-imperial apresentou cerca de 40% de identidade com sequências de circovírus obtidas de amostras de carne bovina (Circoviridae PKbeef21) e de circovírus de pombos (Circoviridae PKbeef21) (Tabela 2).

Tabela 2 – Matriz de identidade da sequência de nucleotídeos referente ao gene *Rep*, obtida a partir de *swab* traqueal de um cormorão-imperial e comparada com sequências de referência do banco de dados

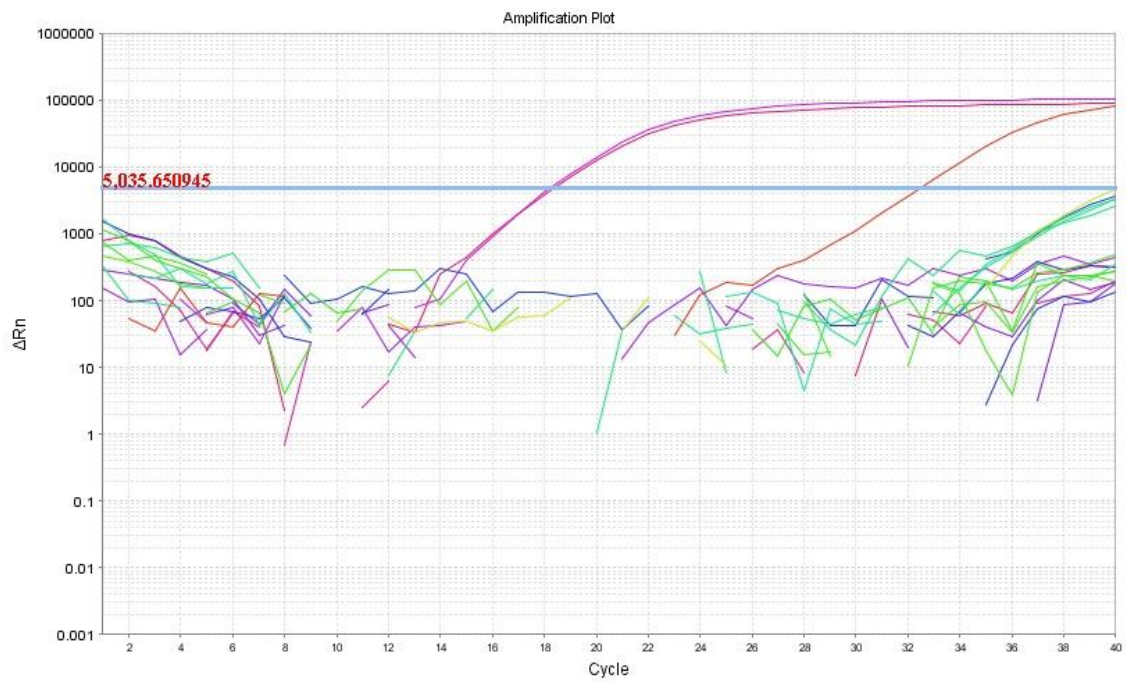
Sequências	Circoviridae PKbeef21 (ADF80792.1*)	Columbid circovirus (AHH31418.1*)	cormorão- imperial
Circoviridae PKbeef21 (ADF80792.1*)	ID	0,488	0,386
Columbid circovirus (AHH31418.1*)	0,488	ID	0,390
cormorão-imperial	0,386	0,390	ID

Legenda: *Número de acesso no GenBank®.

Fonte: elaboração própria.

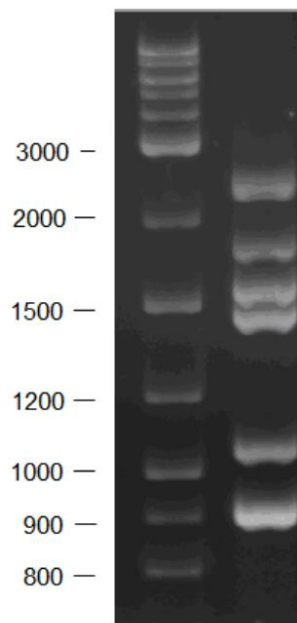
Quanto à investigação de fragmentos de influenza A por RT-qPCR, duas amostras apresentaram resultado positivo, uma delas obtida por meio de *swab* cloacal de um pinguim-de-barbicha (*Pygoscelis antarcticus*), e outra, de *swab* traqueal de um petrel-gigante (*Macronectes giganteus*) (Figura 9). Ambas as amostras, quando submetidas à nova amplificação por intermédio da utilização do kit PathAmp® FluA (Thermo Fisher Scientific) apresentaram as bandas correspondentes aos oito segmentos do genoma viral (Figura 10).

Figura 9 – Curvas de dissociação indicando a amplificação do material genético do vírus influenza em duas amostras analisadas por qPCR



Fonte: elaboração própria.

Figura 10 – Eletroforese dos oito fragmentos virais amplificados indicando a presença de influenza



Fonte: elaboração própria.

Os experimentos voltados à investigação das famílias virais foram cruciais para um melhor aproveitamento dos recursos nas análises seguintes. A presença de material genético sugestivo de coronavírus, paramixovírus e circovírus representa uma maior suscetibilidade de resultados positivos na análise do viroma, cuja confirmação pôde ser realizada apenas após sequenciamento. Além disso, a confirmação da presença do vírus da influenza foi feita mediante a amplificação dos oito segmentos do genoma viral. Por isso, as espécies em que a presença de algum desses vírus pôde ser confirmada foram selecionadas e submetidas à metagenômica viral (*Pygoscelis antarcticus*, *Macronectes giganteus* e *Phalacrocorax atriceps*) (Tabela 3).

Tabela 3 – Número de resultados positivos em relação ao total amostrado

ESPÉCIE/VÍRUS	CORONAVÍRUS	CIRCOVÍRUS	PARAMIXOVÍRUS	INFLUENZA
<i>Pygoscelis papua</i>	0/15	0/15	0/15	0/15
<i>Pygoscelis antarcticus</i>	0/23	0/23	0/23	1/23**
<i>Eudyptes chrysolophus</i>	0/15	0/15	0/15	0/15
<i>Macronectes giganteus</i>	0/28	0/28	0/28	1/28***
<i>Daption capense</i>	0/15	0/15	0/15	0/15
<i>Phalacrocorax atriceps</i>	0/15	1/15*	0/15	0/15
<i>Catharacta antarctica</i>	0/15	0/15	0/15	0/15

Legenda: *Material genético de circovírus detectado a partir de *swab* traqueal; **Material genético de influenza detectado a partir de *swab* cloacal; ***Material genético de influenza detectado a partir de *swab* traqueal.

Fonte: elaboração própria.

6 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados do experimento seguinte estão descritos sob a forma de artigo científico a que foi submetido para a revista *EcoHealth*.

Exploring the Virome of Antarctic birds

Catarina Marcon Chiappetta¹; Samuel Paulo Cibulski¹; Renata da Fontoura Budaszewski¹; Júlia Victória Grohmann Finger²; Gustavo Francisco Aver²; André Felipe Streck¹; Maria Virginia Petry²; Cláudio Wageck Canal^{1*}

1- Laboratório de Virologia Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, zip code 91540--000, Rio Grande do Sul (RS), Brazil.

2- Laboratório de Ornitologia e Animais Marinhos, Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), Av. Unisinos 950, São Leopoldo, zip code 93022-750, Rio Grande do Sul (RS), Brazil.

Running Head: Exploring the Virome of Antarctic birds.

Keywords: Metagenomics. Virome. Virus. Seabird. Antarctic.

Word Count: 3.053

Corresponding author:

Canal, C.W., Laboratório de Virologia Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, Zip code 91540-000, Rio Grande do Sul (RS), Brazil: tel +55 51 3308 6926. E-mail: claudio.canal@ufrgs.br

Acknowledgments:

We would like to thank the government agencies FAPERGS, Propesq/UFRGS, CNPq and CAPES. This study was developed while CMC had a financial grant from CNPq. We are very grateful to the National Institute of Science and Technology - Antarctic Environmental Research (INCT-APA, CNPq process: No. 574018/2008-5) and to the Carlos Chagas Research Support Foundation of Rio de Janeiro (FAPERJ No. E-16/170.023/2008) funded by the Brazilian Antarctic Program (PROANTAR) for their financial support. Logistical support was provided by the Brazilian Secretary of the Inter-Ministry on Marine Resources (SECIRM). A special thanks to Rafael Redaelli for helping with sample collection.

Exploring the Virome of Antarctic birds

Abstract:

Despite their remote geographic distribution, birds in the Antarctic continent are not beyond the effects of numerous pathogens, including viruses. However, little is known about such pathogens, as well as about their potential ecological consequences for Antarctic bird populations. Furthermore, understanding the viruses commonly circulating amongst species considered sentinels is crucial for environmental monitoring in this increasingly explored continent. It is only during the last decade or so that polymerase chain reaction-based assays have been used to characterize viruses associated with Antarctic animals. Furthermore, it was only during the last five years that genomes of viruses have been described using sequencing approaches. The present study aims to investigate the virome of three seabird species of Antarctica, including two migratory (Southern giant petrels and imperial cormorants) and one resident (chinstrap penguins), through high-throughput sequencing. Circovirus sequences were detected in all three species, as well papillomavirus and adenovirus sequences. Phylogenetic analysis demonstrated that some of these viruses were similar to viruses that infect humans. This approach made possible to glimpse the variability of viruses as an important indicator of viral dynamics and ecology in wild species of Antarctica.

Introduction

An understanding of virus diversity in wildlife provides epidemiological and ecological information on potential pathogens and may lead to the identification of newly emerging microbial threats. Likewise, climate changes and human actions, such as research stations and tourism activities, can facilitate the spread, abundance and/or virulence of viral agents (Barbosa and Palacios, 2009). This information is important in terms of ecosystem health, as any variation in the prevalence of an agent may be a sign of “ecosystem distress syndrome” (Rapport, 2007).

A previous study reported that there is an amount of Antarctic avifauna infected with various viruses, which may have been spread by Antarctic birds (Austin and Webster, 1993; Stannard et al., 1998). Genetic elements of a few viruses have been identified in some penguin species. These include avian poxvirus in an African penguin (*Spheniscus demersus*) (Carulei et al., 2009) from South Africa and in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) (Kane et al., 2012) from Argentina, and Newcastle disease virus (NDV) in Adélie penguins (*Pygoscelis adeliae*) from King George Island (Thomazelli et al., 2010). However, the majority of research on viruses in Antarctic birds has used serological detection method. These works have substantially suggested the circulation of paramyxoviruses and orthomyxoviruses (Austin and Webster, 1993; Baumeister et al., 2004). Some serology work has also indicated that there may be flavivirus-like infections in Blue penguins at Port Campbell and Phillip Islands and in Royal, King and Rockhopper penguins in Macquarie Island (Morgan and Westbury, 1981, 1988). Gardner et al. (1997) provided some serological evidence of infectious bursal disease virus in Adélie and Emperor (*Aptenodytes forsteri*) penguins around Mawson Station in Antarctica.

High-throughput sequencing analysis has allowed unprecedented advances in the characterization of complex microbial communities (Rosario and Breitbart, 2011; Mokili et al., 2012). That technology, allied to constantly improving methods of metagenomic analysis, has the potential to circumvent the limitations of conventional virological methods, such as the limited ability to replicate most viruses in vitro, unsuccessful polymerase chain reaction (PCR) amplification of viral genomes or failure of antibodies to recognize unknown viruses (Victoria et al., 2009). Hence, the aim of this paper is to provide a glimpse of the viruses circulating in three bird species of Antarctica through high-throughput sequencing analysis.

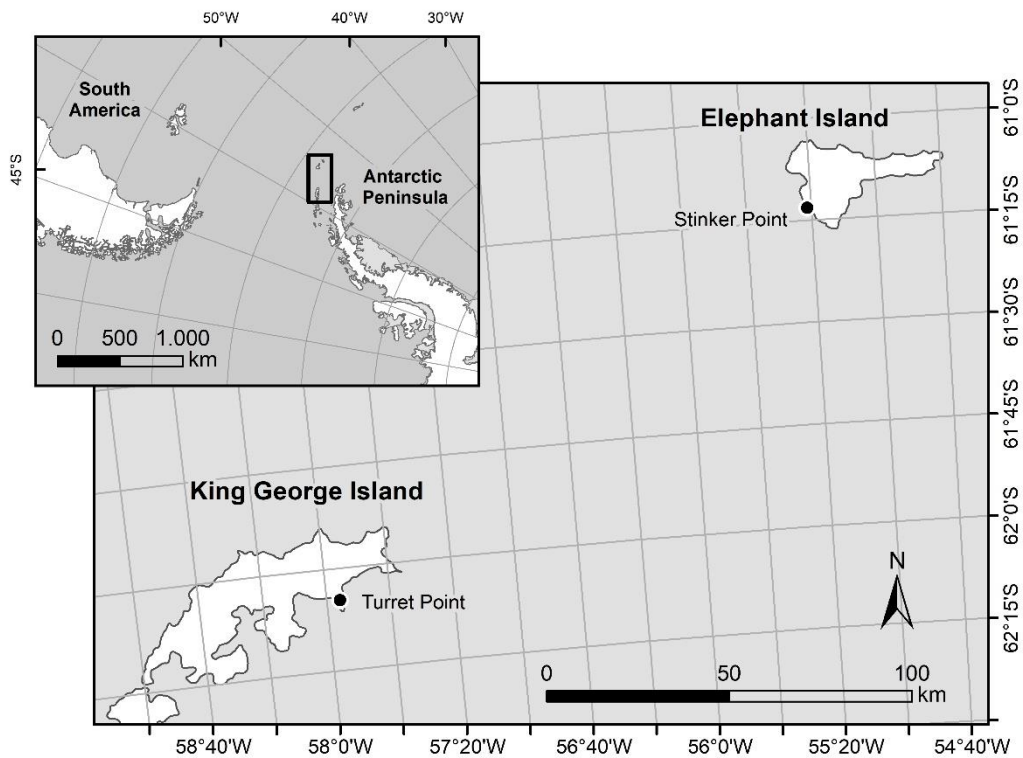
Material and methods

Sample collection

From November 2014 to February 2015, during the thirty-third Antarctic Operation (OPERANTAR XXXIII), headed by the Brazilian Antarctic Program (PROANTAR), samples for virological research from Antarctic seabirds were collected. Samples consisted of cloacal and tracheal swabs from two migratory species, the Southern giant petrel *Macronectes giganteus* and the imperial cormorant *Phalacrocorax atriceps*, and one resident species, the chinstrap penguin *Pygoscelis antarcticus*. Samples were collected in two different islands, which belong to the South Shetland Archipelago: Elephant Island (Stinker Point; 61°13'S/55°21'W) and King George Island (Turret Point; 62°08'S/57°95'W) (Fig. 1). All together, twenty-three chinstrap penguins were captured and sampled, fifteen from Elephant Island and eight from King George Island. Twenty-eight Southern giant petrels were sampled, fifteen from Elephant Island and thirteen from King George Island. Fifteen imperial cormorants were captured and sampled at Elephant Island.

Cloacal and tracheal swabs were stored in 500 µL of RNAlater™ Stabilization Solution (Ambion) and kept under refrigeration during transport. Cold chain was maintained until samples arrived at the laboratory in Porto Alegre, Brazil, where they were kept at -80°C until their processing.

Fig. 1. Study area: in detail, the South Shetland Islands region where Elephant Island and King George Island are located.



Viral nucleic acid purification and Illumina sequencing

Samples were pooled per host species starting with 250 μL of each cloacal and tracheal swab suspension after vigorously vortexing for 5 min. Subsequently, they were centrifuged at 3,000 \times g for 30 min at 4°C and filtered through a 0.45 μm filter (Millipore) to remove bacterial cell-sized particles and other particulate debris. The supernatants were centrifuged on a 25% sucrose cushion at 150,000 \times g for 4.5 h at 4°C (in a Sorvall AH-629 rotor). The pellets containing viral particles were treated with a mixture of 2 μL DNase (2 U μL^{-1} , Turbo DNase; Ambion), 5 μL RNase A (20 mg/mL^{-1} ; Invitrogen) and 0.5 μL benzonase (25 U μL^{-1} ; Novagen) at 37 °C for 2 h to digest susceptible nucleic acids (Shan et al., 2011). Viral DNA was then extracted using a standard phenol–chloroform protocol (Sambrook and Russel, 2001) and viral RNA was extracted with TRIzol[®] LS Reagent (Ambion) following manufacturer’s instructions.

Circular viral DNA was enriched by multiple displacement amplification using Φ 29 DNA polymerase (Dean et al., 2002), while viral RNA was converted in cDNA libraries using SeqPlex RNA amplification kit (Sigma Aldrich). The DNA products resulting from such enrichment protocols were pooled in equimolar amounts and purified using a Genomic DNA Clean and Concentrator kit (Zymo Research). The quality and quantity of the DNA were assessed by spectrophotometry (L-Quant; Loccus Biotechnology) and fluorometry (Qubit; Invitrogen), respectively. The DNA libraries were further prepared with one ng of purified MDA/SeqPlex DNA using Nextera XT DNA sample preparation kit and sequenced using Illumina MiSeq instrument (2×150 paired-end reads with Illumina v2 reagent kit).

Data assembly and processing

The quality of generated sequences was evaluated using FastQC. The sequences whose bases presented Phred quality score <20 were trimmed with the aid of Geneious software (version 8.1.7). The paired-end sequence reads were assembled into contigs with SPAdes 3.5 (Bankevich et al., 2012). All assemblies were confirmed by mapping reads to contigs generated by SPAdes using Geneious software (version 8.1.7). The assembled contigs were examined in order to search for similarities compared to known sequences with BLASTx software. Sequences with E-values of $\leq 10^{-3}$ were classified as likely originating from eukaryotic virus, bacteria, bacteriophages, eukaryotes or unknown, based on the taxonomic origin of the sequence with the best E-value. Gene and protein comparisons were performed with BLASTn and BLASTp programs.

Reconstruction of phylogenetic trees

Sequences representative of known adeno, astro, circo, CRESS ssDNA, gyro and papilloma viruses were obtained from GenBank and aligned with the sequences identified

in the present study with CLUSTALX software version 2.0 (Thompson et al., 1997). Phylogenetic trees were generated by the neighbour-joining method with a p-distance model. The confidence levels of the tree branch nodes were obtained by analysis of 500 bootstrap replicates. Analyses were performed with MEGA-X (Tamura et al., 2013). The GenBank accession numbers of the viral sequences used in phylogenetic analyses are shown in tree figures.

Results and discussion

Overview of sequence data

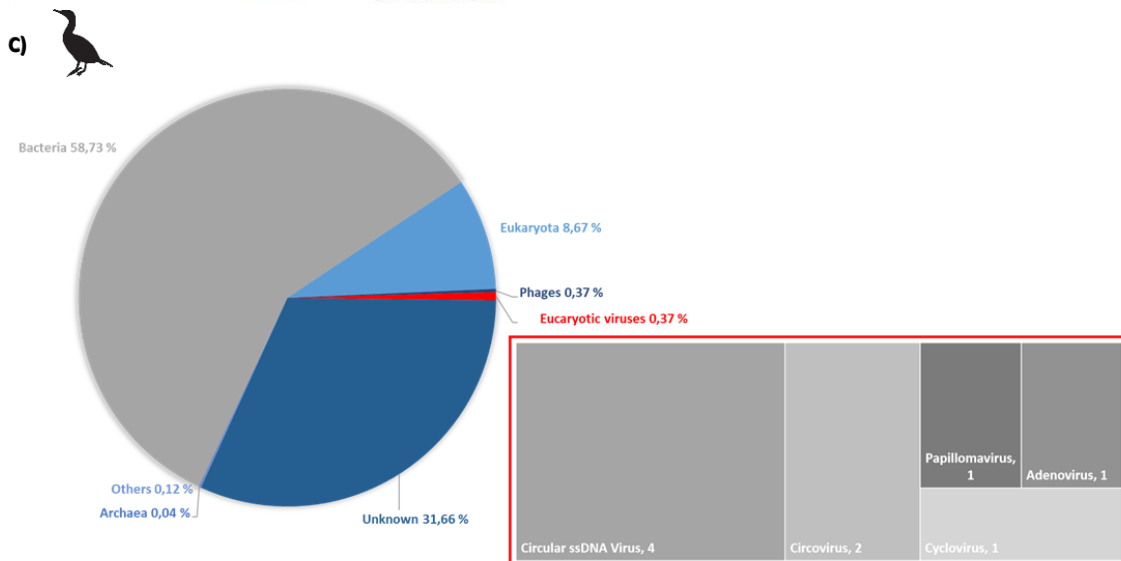
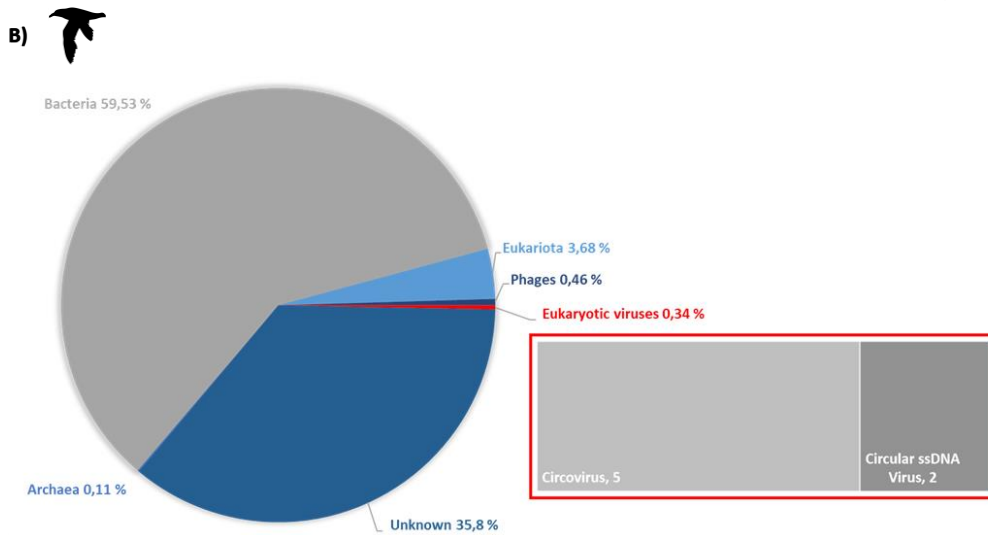
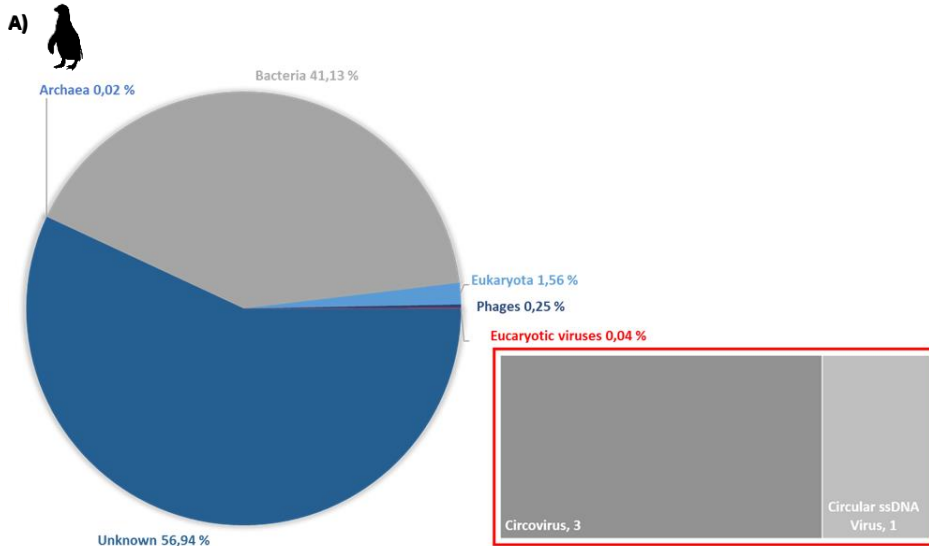
Sequence reads were *de novo* assembled and compared with a non-redundant database using BLASTx and BLASTn programs. Among 16,533 assembled contigs obtained from **chinstrap penguin** pooled samples, 56.9% had no similarity to any sequences in GenBank. Approximately 0.02% (4) of the sequences showed similarity to known eukaryotic viral sequences with an E-value cut-off of 10^{-3} . Fig. 2a presents the taxonomic classification and the relative amount of the putative viral genomes assembled from the samples examined. All sequences with best BLASTx hits corresponding to eukaryotic viruses were related to DNA viruses of the family *Circoviridae* being three circoviruses and one circular ssDNA virus (as shown in the detail of the figure).

Among 2,575 assembled contigs obtained from **Southern giant petrel** pooled samples, 35.8% had no similarity to any sequences in GenBank. Approximately 0.31% (8) of the sequences showed similarity to known eukaryotic viral sequences with an E-value cut-off of 10^{-3} . Fig. 2b presents the taxonomic classification and the relative amount of the putative viral genomes assembled from the samples examined. Sequences with best BLASTx hits corresponding to eukaryotic viruses were related to DNA viruses of family *Circoviridae* being five circoviruses and two circular ssDNA viruses (as shown in the detail of the figure).

Among 2,375 assembled contigs obtained from **imperial cormorant** pooled samples, 31.6% had no similarity to any sequences in GenBank. Approximately 0.63% (9) of the sequences showed similarity to known eukaryotic viral sequences with an E-value cut-off of 10^{-3} . Fig. 2c presents the taxonomic classification and the relative amount of the putative viral genomes assembled from the samples examined. Sequences with best BLASTx hits

corresponding to eukaryotic viruses were related to DNA viruses of families *Circoviridae*, *Adenoviridae* and *Papillomaviridae* (as shown in the detail of the figure).

Fig. 2. Overview of the *de novo* assembled Illumina contigs per species. **A)** Putative classification of viral genome sequences detected in pooled swab samples of **chinstrap penguins** where three sequences related to circoviruses and one, to other circular ssDNA viruses could be identified; **B)** Putative classification of viral genome sequences detected in pooled swab samples of **Southern giant petrels** where five sequences related to circoviruses and two to other circular ssDNA viruses could be identified; **C)** Putative classification of viral genome sequences detected in pooled swab samples of **imperial cormorants** where sequences related to circoviruses (2), cycloviruses (1), other circular ssDNA viruses (4), papillomaviruses (1) and adenoviruses (1) could be identified.

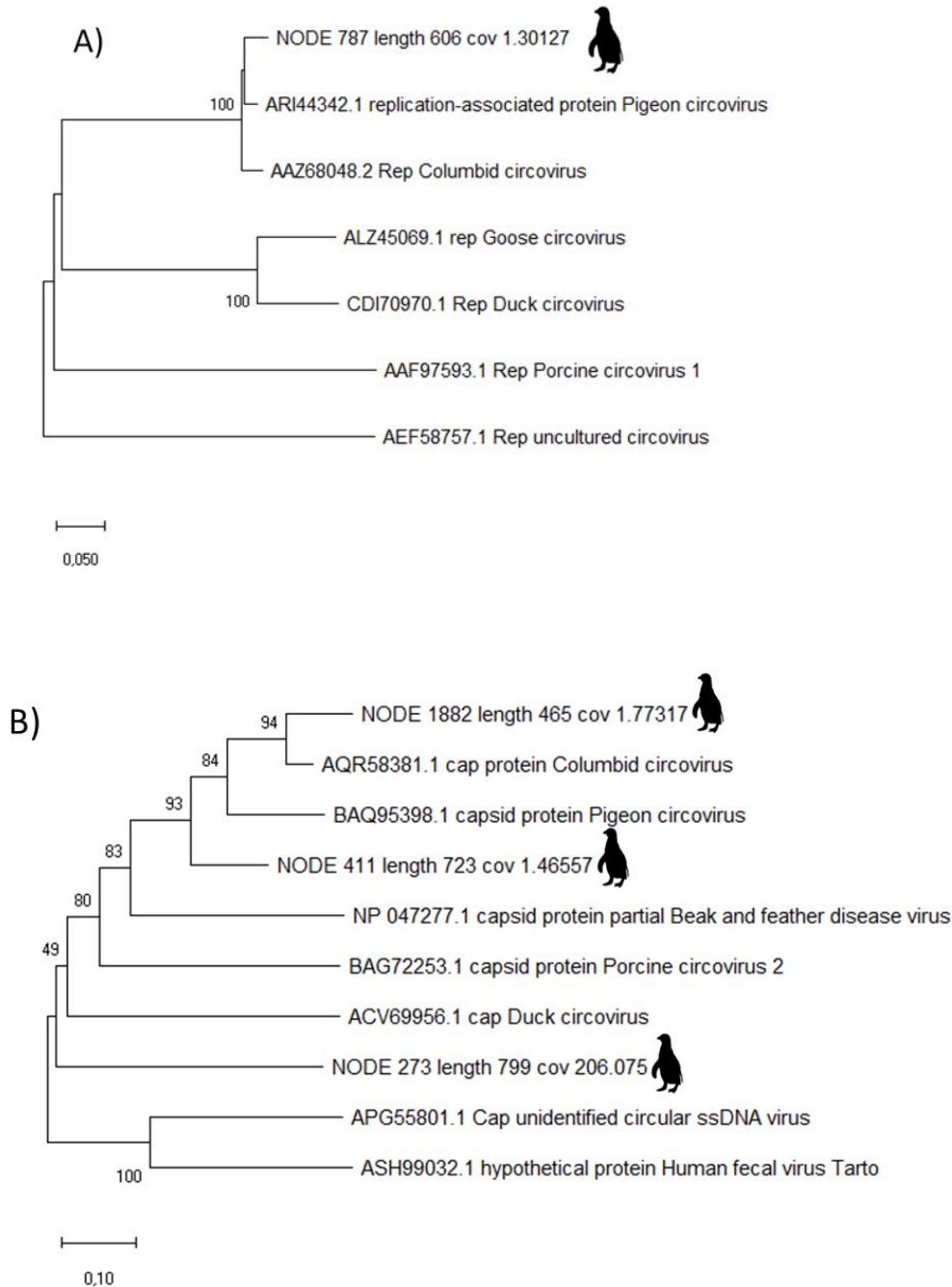


Circoviridae

The family *Circoviridae* includes two genera, i.e., *Circovirus* and *Cyclovirus* (Rosario et al., 2017). Members of the genus *Circovirus* have been identified in a wide range of vertebrates, whereas members of the genus *Cyclovirus* have been identified in both vertebrates and invertebrates (Rosario et al., 2012). The virions consist of naked nucleocapsids of about 20 nm in diameter, with a circular single-stranded DNA (ssDNA) genome of approximately 2.0 kb (King et al., 2012). They have an ambisense genome organization containing two major open reading frames (ORFs) inversely arranged, responsible for encoding the replicase (*Rep*) and capsid (*Cap*) proteins, and are separated by a 3' intergenic region (IGR) between the stop codons and a 5' IGR between the start codons (Li. et al., 2010a). Recent metagenomic approaches, high-throughput sequencing techniques and degenerate PCRs have led to the identification of small circular DNA genomes in fecal samples of wild mammals, in insects and in environmental samples (Blinkova et al., 2009; Li et al., 2010a, b; Ge et al., 2011).

In chinstrap penguins, four *Circoviridae* sequences were identified in the present study. Both *Rep* and *Cap* sequences were detected. The only *Rep* sequence, with length of 606 nucleotides, showed high similarity with pigeon and columbid circoviruses in phylogenetic analysis (Fig. 3a). Two of three *Cap* sequences, Node 411 (723 nucleotides) and Node 1883 (465 nucleotides), also presented high similarity with pigeon and columbid circoviruses (Fig. 3b). Another *Cap* sequence, Node 273 (799 nucleotides), demonstrated similarity with duck circovirus and an unidentified ssDNA virus sequences deposited in GenBank under accession numbers APG55801 and ASH99032, respectively.

Fig. 3. Phylogenetic inferences with the deduced amino acid sequences of the partial *Rep* and *Cap* sequence of *Circoviridae* members using Neighbor-Joining method, bootstrap test (500 replicates), evolutionary distances were computed using p-distance method. Sequences detected in this study are indicated by a penguin silhouette. A) Inference based on partial *Rep* amino acid sequences; B) Inference based on partial *Cap* amino acid sequences.



In Southern giant petrels, three *Rep* and four *Cap* sequences were detected among seven *Circoviridae* sequences. All *Rep* fragments had similarity with columbid circovirus. However, Node 1113 and Node 1637 (240 and 273 nucleotides, respectively) were

highly distinct from each other and aligned with different regions of the same reference sequence (Fig. 4) as well as with Node 832 (305 nucleotides). Hence, two phylogenetic analyses were carried out with each one of these two sequences showing the same result (Fig. 5). That indicates the possibility of Node 1113 and Node 1637 being fragments of the same virus genome.

Fig. 4. Alignment of two sequences obtained from Southern giant petrels (Node 1113 and Node 1637), demonstrating correspondence with different regions of the reference sequence (Columbid circovirus, accession number DQ090945).

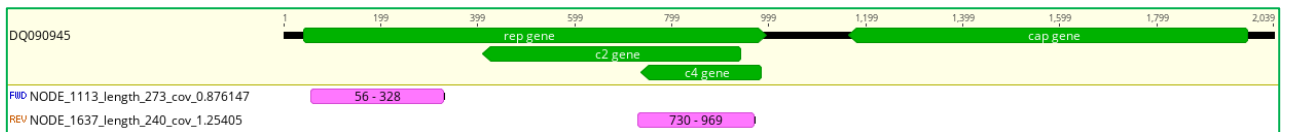
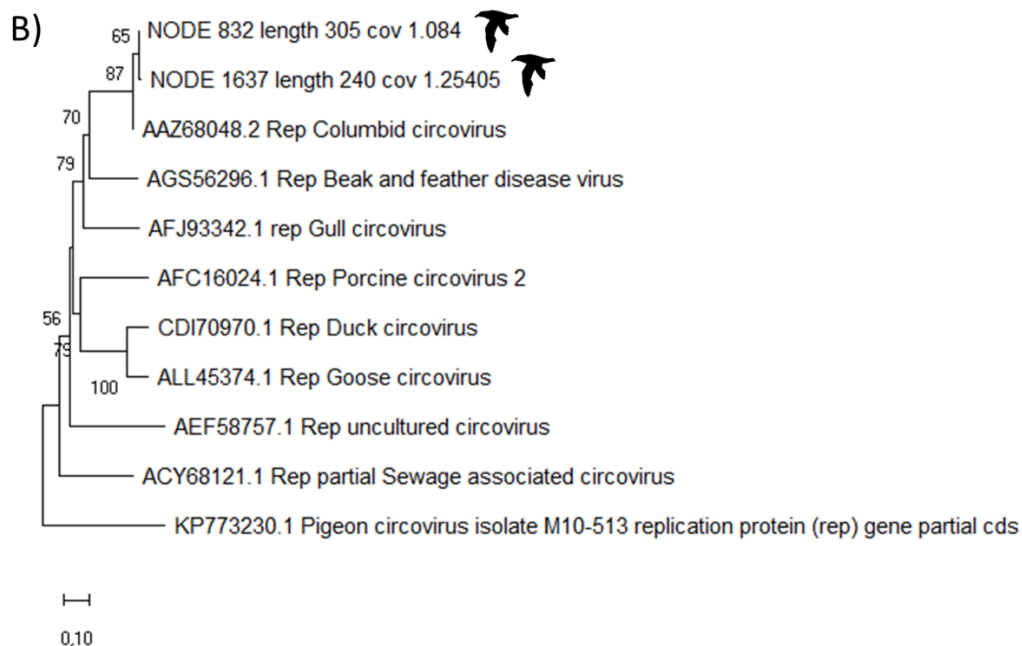
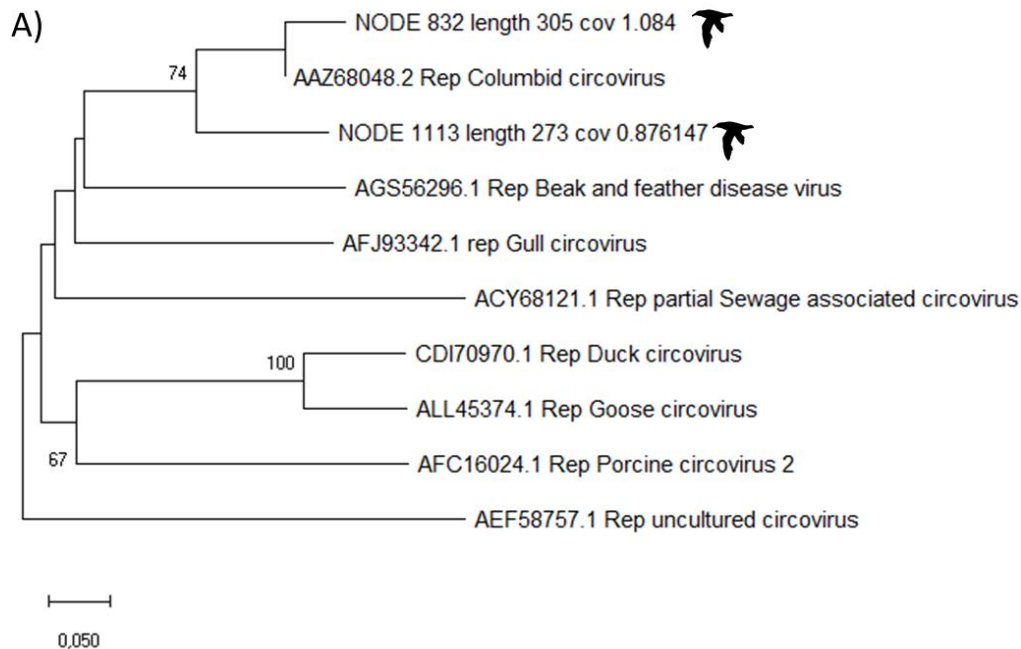
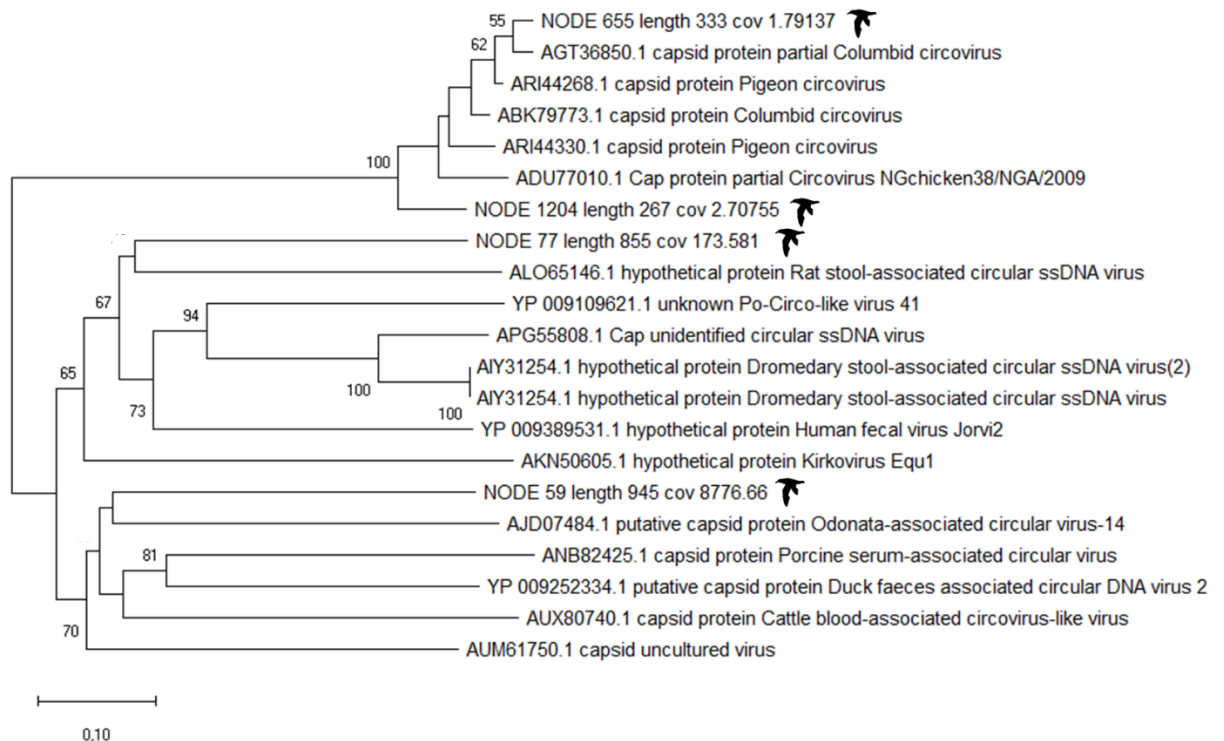


Fig. 5. Phylogenetic inferences with the deduced amino acid sequences of the partial *Rep* sequence of *Circoviridae* members using Neighbor-Joining method, bootstrap test (500 replicates), evolutionary distances were computed using p-distance method. Sequences detected in this study are indicated by a petrel silhouette. A) Inference based on partial *Rep* amino acid sequences, containing nodes 832 and 1113 B) Inference based on *Rep* amino acid sequences, containing nodes 832 and 1637.



Phylogenetic analysis of *Cap* sequences obtained from Southern giant petrel samples showed a higher diversity among *Circoviridae* reference sequences. Sequences named Node 59 (945 nucleotides) and Node 77 (855 nucleotides) formed two clusters among a diversity of ssDNA viruses from different origins. Meanwhile, Nodes 655 and 1204 (333 and 267 nucleotides, respectively) clustered together with pigeon and columbid circoviruses (Fig. 6).

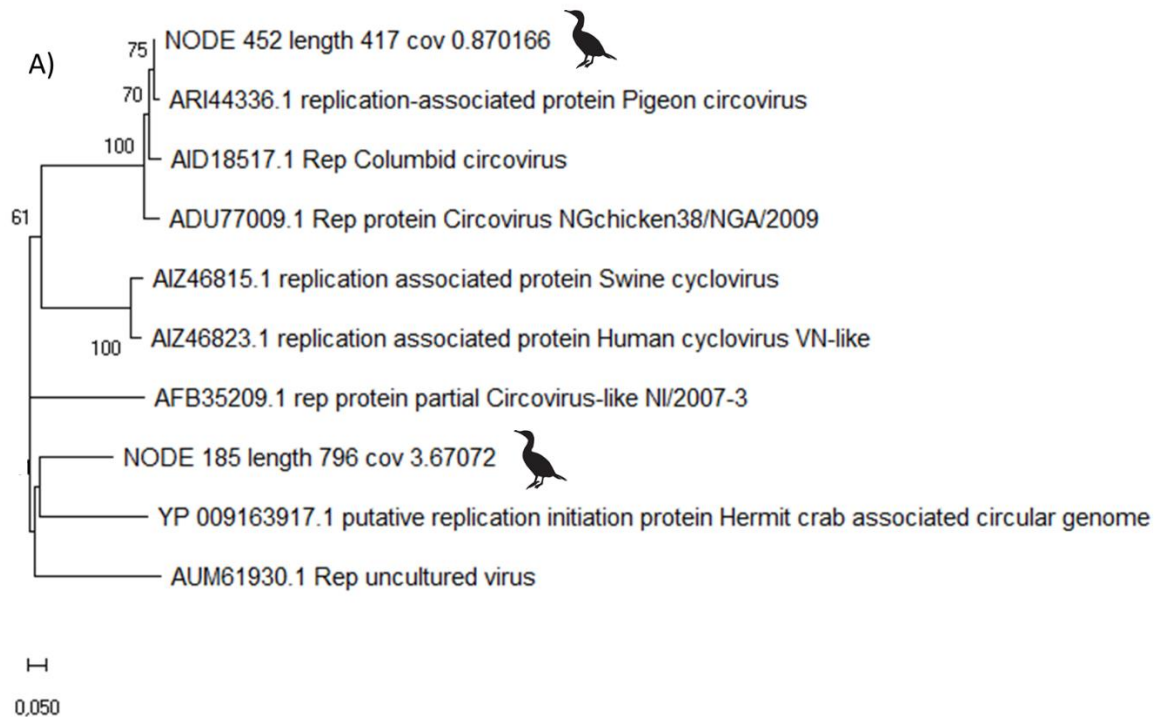
Fig. 6. Phylogenetic inference with the deduced amino acid sequences of the partial *Cap* sequence of *Circoviridae* members using Neighbor-Joining method, bootstrap test (500 replicates), evolutionary distances were computed using p-distance method. Sequences detected in this study are indicated by a petrel silhouette.

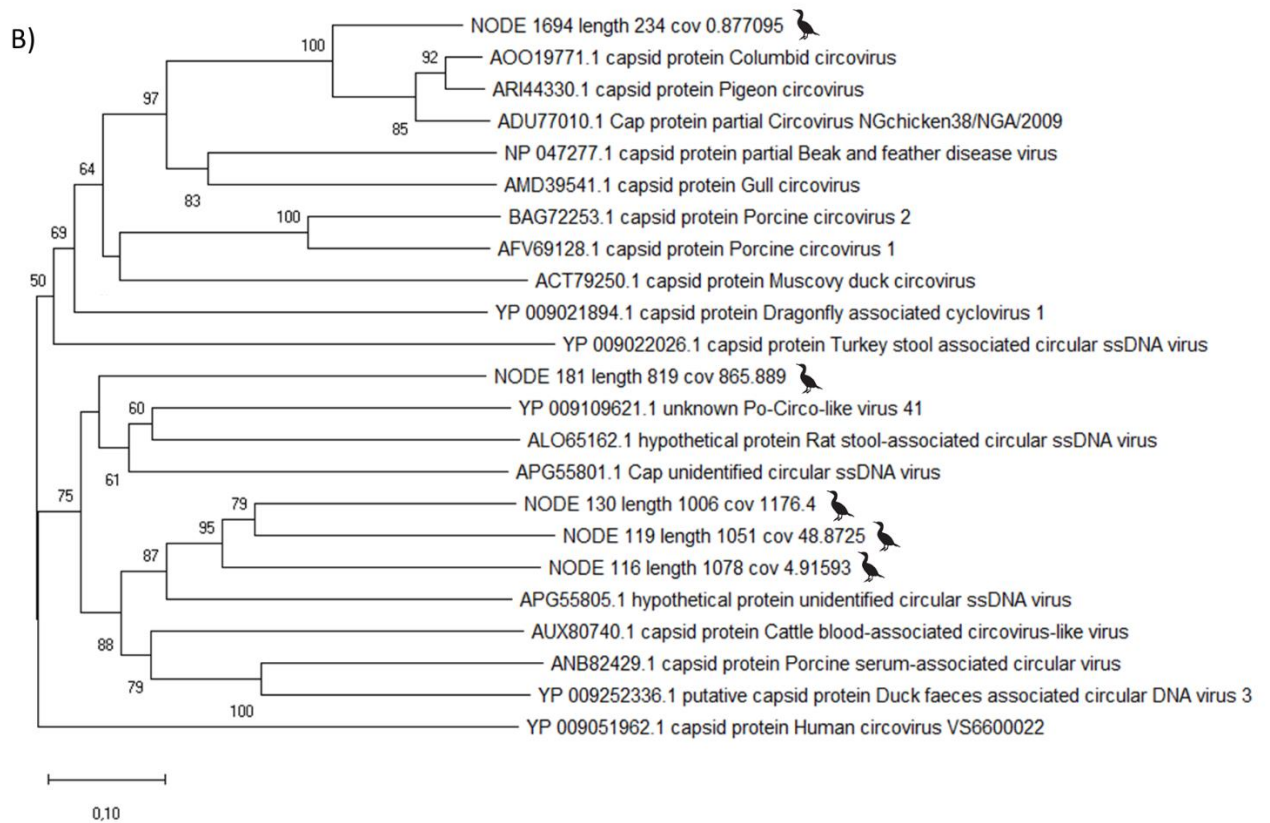


From imperial cormorant samples, two *Rep* and five *Cap* sequences were detected among seven *Circoviridae* sequences. Among *Rep* sequences identified, Node 452 (417 nucleotides) clustered with pigeon and columbid circoviruses, but also presented

similarity with human and swine cycloviruses (AIZ46823 and AIZ46815). Meanwhile, Node 185 (796 nucleotides) was divergent and clustered with hermit crab associated ssDNA circular virus (YP009163917) (Fig. 7a). Among *Cap* sequences, Nodes 116, 119 and 130 clustered with circular ssDNA viruses, as well as Node 181, but in another branch. Node 1694 showed similarity to pigeon and columbid circoviruses (Fig. 7b)

Fig. 7. Phylogenetic inferences with the deduced amino acid sequences of the partial *Rep* and *Cap* sequence of *Circoviridae* members using Neighbor-Joining method, bootstrap test (500 replicates), evolutionary distances were computed using p-distance method. Sequences detected in this study are indicated by a cormorant silhouette. A) Inference based on partial *Rep* amino acid sequences. B) Inference based on partial *Cap* amino acid sequences.





Adenoviridae

Adenoviruses are linear, double-stranded DNA viruses, with a genome ranging from 26 to 45 kb and an icosahedral capsid (Davison et al., 2003). Adenoviruses, which can infect the respiratory and gastrointestinal tracts, eyes and other organs, cause gastroenteritis and respiratory disease in many species (David et al., 2001). The family *Adenoviridae* comprises five genera: *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Siadenovirus* and *Ichtadenovirus* (Harrach et al., 2011). Mastadenoviruses infect a wide range of mammalian species, including human, monkey, dog, cattle, swine, mouse and bat (Morrison et al., 1997; Aggarwal and Mittal, 2000; Rusvai et al., 2000; Kovács et al., 2004; Maeda et al., 2008; Klempa et al., 2009; Sonntag et al., 2009). Aviadenovirus has been identified in birds (Chiocca et al., 1996; Schrenzel et al., 2005), and atadenovirus has been isolated from reptiles, birds and mammals (Hess et al., 1997; Dán et al., 1998; Farkas et al.,

2008). Siadenovirus has been detected in birds, frogs and tortoises (Pitcoviski et al., 1998; Davison et al., 2000; Kovács et al., 2010; Kovács and Benkő, 2011), while ichtadenovirus has only been found in fish (Kovács et al., 2003).

Previously, adenoviruses had been isolated from various vertebrate species on all continents, except Antarctica. Recently, the South Polar skua adenovirus 1 (SPSAdV-1), the single known member of the species *Skua siadenovirus A*, was discovered in carcasses of South Polar skua (*Catharacta maccormicki*) collected near the King Sejong Station, and in chinstrap penguins (*Pygoscelis antarcticus*) collected at King George Island in Antarctica (Park et al., 2012).

In this study, the phylogenetic analysis based on the capsid protein (pIIa) revealed similarity of one sequence obtained from imperial cormorant samples (bigua 8 pIIa) with a human mastadenovirus strain (Fig. 8). BLASTX analysis and global alignment indicated that the 10,085 nucleotides sequence “bigua 8 pIIa” is closely related to the pIIa sequence of human adenovirus C (HAdV-C). When the nucleotide sequences were analyzed, the cormorant sequence presented 98 % of identity with HAdV-C (Table 1). This finding may be suggestive of a possible interspecific contamination.

Fig. 8. Phylogenetic inference with the deduced amino acid sequences of the partial *plla* gene sequence of *Adenoviridae* members using Neighbor-Joining method, bootstrap test (500 replicates), evolutionary distances were computed using p-distance method. Sequence detected in this study is indicated by a cormorant silhouette.

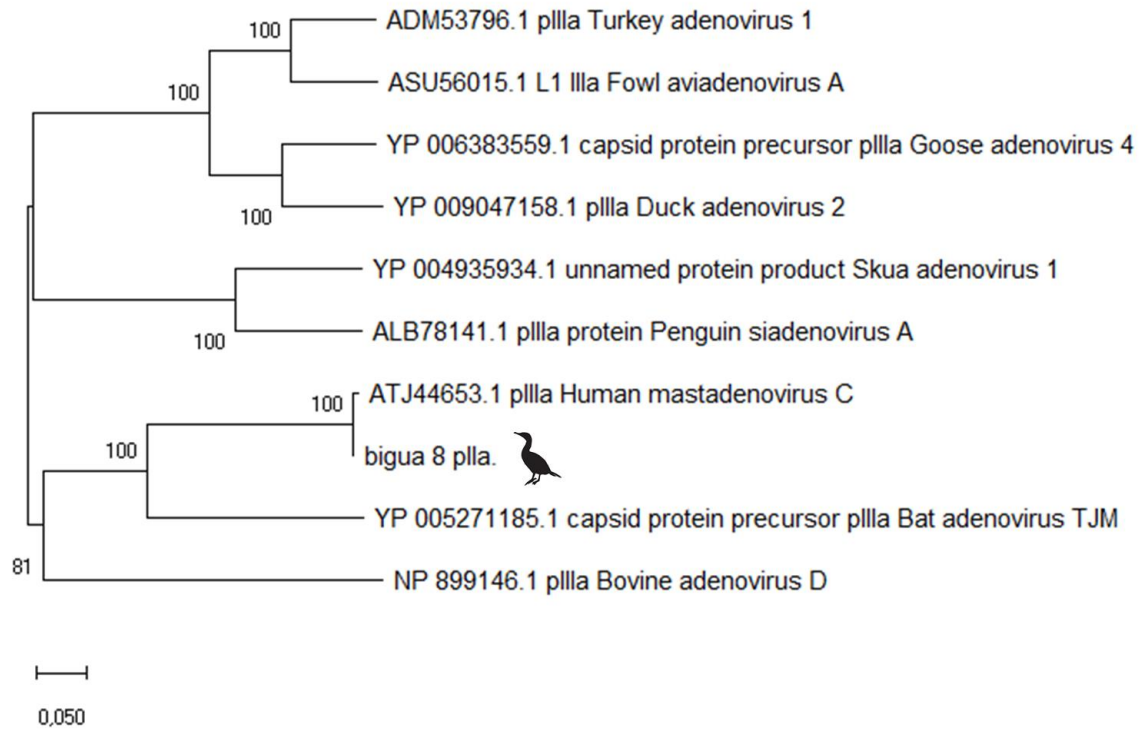


Table 1. Comparison between partial sequences of adenovirus *plla* gene (261 nt) identified in cormorant samples (bigua 8 *plla*) and human adenovirus type C (HAdV-C) and bat adenovirus (accession numbers MF681662 and NC016895 respectively).

Sequences	bigua 8 <i>plla</i>	HAdV-C	Bat adenovirus
bigua 8 <i>plla</i>	ID	98.92 %	59.64 %
HAdV-C	98.92 %	ID	59.85 %
Bat adenovirus	59.64 %	59.85 %	ID

*Nucleotide sequence identity matrix.

Papillomaviridae

The family *Papillomaviridae* is a large family with over 270 distinct types of papillomaviruses classified into two subfamilies, *Firstpapillomavirinae* and *Secondpapillomavirinae*, each one represented by 52 genera and one genus respectively

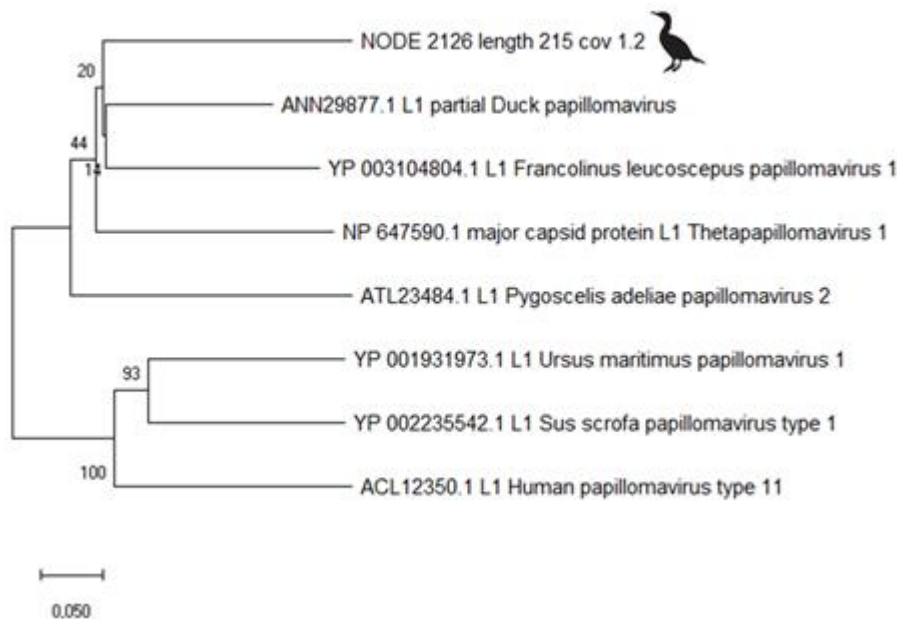
(Breitbart et al., 2017). A large proportion (~160) of the established papillomavirus types are human isolates, but a significant number of non-human papillomaviruses (113) have been identified in 54 different host species spanning 16 taxonomic orders (Bernard et al., 2010; Bernard, 2013a; Rector and Van Ranst, 2013). Papillomaviruses have circular dsDNA genomes of ~8 kb that encode at least six conserved ORFs. The E1 and E2 genes encode regulators of replication and transcription, E6 and E7 encode the transforming proteins, whilst L1 and L2 encode the major and minor capsid proteins, respectively. L1 and L2 assemble into ~60 nm T57 icosahedral virions (Baker et al., 1991; Trus et al., 2005). Papillomaviruses were identified initially as the aetiological agent of skin warts in various animals (Shope and Hurst, 1933; Zur Hausen, 2009a, b). As such, papillomaviruses exclusively infect skin and squamous mucosa, although not all types induce neoplastic growth. However, many papillomaviruses have also been detected in apparently healthy skin, in both humans and other vertebrates (Antonsson et al., 2000; Savini et al., 2016), and they are currently considered to be part of the microbiota of normal skin (Antonsson and Hansson, 2002; Foulongne et al., 2012).

In comparison to mammals, the number of papillomaviruses found in other vertebrate groups is low. However, the number of papillomaviruses described in birds is growing. This has been driven by the advent of new molecular tools such as rolling-circle amplification and next-generation sequencing technology (Varsani et al., 2014). Seven complete genomes have been described and named according to host species of origin: mallard (*Anas platyrhynchos*), chaffinch (*Fringilla coelebs*), northern fulmar (*Fulmarus glacialis*), yellow-throated francolin (*Francolinus leucoscepus*), Adélie penguin (*Pygoscelis adeliae*), African grey parrot (*Psittacus erithacus*) and canary (*Serinus canaria*) (Fawaz et al., 2016; Terai et al., 2002; Gaynor et al., 2015; Van Doorslaer et al., 2009; Varsani et al., 2014; Tachezy et al., 2002; Dom et al., 1993). Although seven different papillomavirus types

corresponding to five papillomavirus genera have been described in birds, the majority of reported cases correspond to chaffinch papillomas (Truchado et al., 2018).

The classification of papillomaviruses is based on the sequence analysis of the major capsid protein L1, i.e. pairwise identity coupled with phylogenetic support (Bernard, 2013b). In this study, phylogenetic analysis of partial L1 sequence revealed that the 215 nucleotides sequence obtained from imperial cormorant samples (Node 2126) is part of an avian papillomavirus clade with francolin and penguin papillomaviruses (YP003104804 and ATL23484), but is phylogenetically most closely related to a duck papillomavirus sequence (ANN29877) (Fig. 9).

Fig. 9. Phylogenetic inference with the deduced amino acid sequences of the partial *L1* gene sequence of *Papillomaviridae* members using Neighbor-Joining method, bootstrap test (500 replicates), evolutionary distances were computed using p-distance method. Sequence detected in this study is indicated by a cormorant silhouette.



These results provide an insight into the major circulating viruses in three Antarctic bird species. Nevertheless, possible limitations inherent to the elected methodologies should be mentioned. The multiple displacement amplification (MDA) technique used to enrich viral DNA is more effective to enrich circular genomes. This may have caused a bias in which viral genomes were detected. Finally, even if some fragments found in this study can be considered small, like the papillomavirus's, such findings are still considered important for the follow-up of viral ecology studies in Antarctic bird populations.

Concluding remarks

Utilizing culture-independent methods, metagenomics has provided relevant information on the composition and diversity of viral communities in hosts. In this study, metagenomic analysis of cloacal and tracheal swabs pooled samples of chinstrap penguins, Southern giant petrels and imperial cormorants indicated circovirus widespread occurrence in these species. A brief description of a possible new papillomavirus infecting imperial cormorant provides baseline for future studies describing that agent. Detection of viruses commonly known to infect humans raises a demand of better understanding of viral agent flow and the increased risk of disease at the interface between wildlife and humans. Finally, through these analyses, it was possible to notice that, when comparing the viral diversity present in imperial cormorants with the other species, this, a migratory species, was more susceptible to different viral infections.

Acknowledgements

We would like to thank the government agencies FAPERGS, Propesq/UFRGS, CNPq and CAPES. This study was developed while CMC had a financial grant from CNPq. We are very grateful to the National Institute of Science and Technology -

Antarctic Environmental Research (INCT-APA, CNPq process: No. 574018/2008-5) and to the Carlos Chagas Research Support Foundation of Rio de Janeiro (FAPERJ No. E-16/170.023/2008) funded by the Brazilian Antarctic Program (PROANTAR) for their financial support. Logistical support was provided by the Brazilian Secretary of the Inter-Ministry on Marine Resources (SECIRM). A special thanks to Rafael Redaelli for helping with sample collection.

Compliance with ethical standards

This study was carried out in accordance with Annex I to the Protocol of the Antarctic Treaty on Environmental Protection, the Environmental Assessment Group of the Brazilian Antarctic Program (GAAM / PROANTAR) that considers the activities such as less than minor or transitory impact.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Aggarwal N, Mittal SK (2000) Sequence analysis of porcine adenovirus type 3 E1 region, pIX and pIVa2 genes, and two novel open reading frames. *Intervirology* 43:6–12
- Antonsson A, Forslund O, Ekberg H, Sterner G, Ran Hansson BG (2000) The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. *J Virol* 74:11636–11641
- Antonsson A, Hansson BG, (2002) Healthy skin of many animal species harbors papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. *J Virol* 76:12537–12542
- Austin FJ, Webster RG (1993) Evidence of ortho -and paramyxoviruses in fauna from Antarctica. *Journal of wildlife diseases* 29:568–571
- Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C, Brow JC (1991) Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J* 60:1445–1456
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology* 19:455–477
- Barbosa A, Palacios MJ (2009) Health of Antarctic birds: a review of their parasites, pathogens and diseases. *Polar Biology* 32:1095–1115
- Baumeister E, Leotta G, Pontoriero A, Campos A, Montalti D, Vigo G, et al. (2004) Serological evidences of influenza A virus infection in Antarctica migratory birds. *International Congress Series* 1263:737–740; DOI: 10.1016/j.ics.2004.02.099
- Bernard HU (2013a) Taxonomy and phylogeny of papillomaviruses: an overview and recent developments. *Infection, Genetics and Evolution* 18:357–361.
- Bernard HU (2013b) Regulatory elements in the viral genome. *Virology* 445:197–204.
- Bernard H-U, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Zur Hausen H, Villiers E-M (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401:70–79
- Blinkova O, Rosario K, Li L, Kapoor A, Slikas B, Bernardin F, et al. (2009) Frequent detection of highly diverse variants of cardiopox, cosavirus, bocavirus, and circovirus in sewage samples collected in the United approach. *PLoS One* 4:e4219
- Breitbart M, Delwart E, Rosario K, Segalés J, Varsani A (2017) ICTV Virus Taxonomy Profile: *Circoviridae*. *Journal of General Virology*, 98:1997–1998
- Carulei O, Douglass N, Williamson AL (2009). Phylogenetic analysis of three genes of Penguinpox virus corresponding to Vaccinia virus G8R (VLTF-1), A3L (P4b) and H3L reveals that it is most closely related to Turkeypox virus, Ostrichpox virus and Pigeonpox virus. *Virology Journal* 6:52; DOI: 10.1186/1743-422X-6-5

- Chiocca S, Kurzbauer R, Schaffner G, Baker A, Mautner V, Cotton M (1996) The complete DNA sequence and genomic organization of the avian adenovirus CELO. *Journal of virology* 70:2939–2949
- Dán A, Ruzsics Z, Russell WC, Benkő M, Harrach B (1998) Analysis of the hexon gene sequence of bovine adenovirus type 4 provides further support for a new adenovirus genus (Atadenovirus). *Journal of General Virology* 79:1453–1460
- David MK, Peter MH, Diane EG, Robert AL, Malcolm AM, Bernard R, et al. (2001) Adenoviruses. In: *Fields Virology*, David MK, Peter MH (editors), Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, pp 2404–2408
- Davison AJ, Benkő M, Harrach B (2003) Genetic content and evolution of adenoviruses. *Journal of General Virology* 84:2895–2908
- Davison AJ, Wright KM, Harrach B (2000) DNA sequence of frog adenovirus. *Journal of General Virology* 81:2431–2439
- Dean FB, Hosono S, Fang L, Wu X, Faruqi AF, Bray-Ward P, et al. (2002) Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:5261–5266
- Dom P, Ducatelle R, Charlier G, de Groot P (1993) Papillomavirus-like infections in canaries (*Serinus canarius*). *Avian Pathol* 22:797–803
- Farkas SL, Harrach B, Benkő M (2008) Completion of the genome analysis of snake adenovirus type 1, a representative of the reptilian lineage within the novel genus Atadenovirus. *Virus Research* 132:132–139
- Fawaz M, Vijayakumar P, Mishra A, Gandhale PN, Dutta R, Kamble NM, Sudhakar SB, Roychoudhary P, Kumar H, Kulkarni DD, Raut AA (2016) Duck gut viral metagenome analysis captures snapshot of viral diversity. *Gut Pathog* 8:30
- Foulongne V, Sauvage V, Hebert C, Dereure O, Cheval J, Gouilh MA, Pariente K, Segondy M, Burguière A, Manuguerra JC, Caro V, Eloit M (2012) Human skin Microbiota: High diversity of DNA viruses identified on the human skin by high throughput sequencing. *PLoS One* 7(6):e38499
- Gardner H, Kerry K, Riddle M, Brouwer S, Gleeson L (1997) Poultry virus infection in Antarctic penguins. *Nature* 387:245; DOI: 10.1038/387245a0
- Gaynor AM, Fish S, Duerr RS, Dela Cruz FN, Pesavento PA (2015) Identification of a novel papillomavirus in a northern fulmar (*Fulmarus glacialis*) with viral production in cartilage. *Vet Pathol* 52:1–9
- Ge X, Li J, Peng C, Wu L, Yang X, Wu Y, et al. (2011) Genetic diversity of novel circular ssDNA viruses in bats in China. *Journal of General Virology* 92: 2646–2653; DOI: 10.1099/vir.0.034108-0. PMID: 21795473
- Harrach B, Benkő M, Both GW, Brown M, Davison AJ, Echavarría M, et al. (2011) Family adenoviridae. In: *Virus Taxonomy: IXth Report of the International Committee on Taxonomy*

of Viruses, King AMQ, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB (editors), New York, NY: Elsevier, 2011, pp 125–141

Hess M, Blöcker H, Brandt P (1997) The complete nucleotide sequence of the egg drop syndrome virus: An intermediate between mastadenoviruses and aviadenoviruses. *Virology* 238:145–156

Kane OJ, Uhart MM, Rago V, Pereda AJ, SmithJR, Van Buren A, et al. (2012) Avian pox in Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*). *Journal of wildlife diseases* 48:790–794

King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (2012) *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. USA: Elsevier; DOI: 10.1016/j.mjafi.2012.08.017. PMID: 25609874

Klempa B, Krüger DH, Auste B, Stanko M, Krawczyk A, Nickel KF, et al. (2009) A novel cardiotropic murine adenovirus representing a distinct species of mastadenoviruses. *Journal of Virology* 83:5749–5759

Kovács ER, Benkő M (2011) Complete sequence of raptor adenovirus 1 confirms the characteristic genome organization of siadenoviruses. *Infection, Genetics and Evolution* 5:1058–1065

Kovács ER, Jánoska M, Harrach B, Benkő M (2010). Recognition and partial genome characterization by non-specific DNA amplification and PCR of a new siadenovirus species in a sample originating from *Parus major*, a great tit. *Journal of Virology Methods* 163:262–268

Kovács GM, Davison AJ, Zakhartchouk AN, Harrach B (2004) Analysis of the first complete genome sequence of an old world monkey adenovirus reveals a lineage distinct from the six human adenovirus species. *Journal of General Virology* 85:2799–2807

Kovács GM, LaPatra SE, D’Halluin JC, Benkő M (2003) Phylogenetic analysis of the hexon and protease genes of a fish adenovirus isolated from white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) supports the proposal for a new adenovirus genus. *Virus Research* 98:27–34

Li L, Kapoor A, Slikas B, Bamidele OS, Wang C, Shaukat S, et al. (2010a) Multiple diverse circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces. *Journal of Virology* 84:1674–1682; DOI: 10.1128/JVI.02109-09. PMID: 20007276

Li L, Victoria JG, Wang C, Jones M, Fellers GM, Kunz TH, et al. (2010b) Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. *Journal of Virology* 84:6955–6965; DOI: 10.1128/JVI.00501-10. PMID: 20463061

Maeda K, Hondo E, Terakawa J, Kiso Y, Nakaichi N, Endoh D, et al. (2008) Isolation of novel adenovirus from fruit bat (*Pteropus dasymallus yayeyamae*). *Emerging Infectious Diseases* 14:347–249

Mokili JL, Rohwer F, Dutilh BE (2012) Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Current Opinion in Virology* 2:63–77

Morgan IR, Westbury HA (1981) Virological studies of Adélie penguins (*Pygoscelis adeliae*) in Antarctica. *Avian Diseases* 25:1019–1027

- Morgan IR, Westbury HA (1988) Studies of viruses in penguins in the Vestfold Hills, Antarctica. *Hydrobiologica* 165:262–269
- Morrison MD, Onions DE, Nicolson L (1997) Complete DNA sequence of canine adenovirus type 1. *Journal of General Virology* 78:873–878
- Nakamura S, Yang CS, Sakon N, Ueda M, Tougan T, Yamashita A, et al. (2009) Direct Metagenomic Detection of Viral Pathogens in Nasal and Fecal Specimens Using an Unbiased High-Throughput Sequencing Approach. *PLoS One* 4(1): e4219
- Park YM, Kim JH, Gu SH, Lee SY, Lee MG, Kang YK, et al. (2012) Full genome analysis of a novel adenovirus from the South Polar skua (*Catharacta maccormicki*) in Antarctica. *Virology* 422:144–150
- Pitcovski J, Mualem M, Rei-Koren Z, Krispel S, Shmueli E, Peretz Y, et al. (1998) The complete DNA sequence and genome organization of the avian adenovirus, hemorrhagic enteritis virus. *Virology* 249:307–315
- Rapport DJ (2007) Sustainability science: an ecohealth perspective. *Sustain Science* 2:77–84; DOI: 10.1007/s11625-006-0016-3
- Rector A, Van Ranst M (2013). Animal papillomaviruses. *Virology* 445:213–223
- Rosario K, Breitbart M (2011) Exploring the viral world through metagenomics. *Current Opinion in Virology* 1:289–297
- Rosario K, Breitbart M, Harrach B, Segales J, Delwart E, Biagini P, et al. (2017) Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus *Cyclovirus* and removal of the genus *Gyrovirus*. *Archives of Virology* 162:1447–1463
- Rosario K, Duffy S, Breitbart M (2012) A field guide to eukaryotic circular single-stranded DNA viruses: insights gained from metagenomics. *Archives of Virology* 157:1851–1871
- Rusvai M, Harrach B, Bánrévi A, Evans PS, Benkö M (2000) Identification and sequence analysis of the core protein genes of bovine adenovirus 2. *Virus Research* 70:25–30
- Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor
- Savini F, Dal Molin E, Gallina L, Casà G, Scagliarini A (2016) Papillomavirus in healthy skin and mucosa of wild ruminants in the Italian Alps. *J Wildl Dis* 52(1):82-87
- Schrenzel M, Oaks JL, Rotstein D, Maalouf G, Snook E, Sandfort C, et al. (2005) Characterization of a new species of adenovirus in falcons. *Journal of Clinical Microbiology* 43:3402–3412
- Shan T, Li L, Simmonds P, Wang C, Moeser A, Delwart E (2011) The fecal virome of pigs on a high-density farm. *Journal of Virology* 85:11697–11708
- Shope RE, Hurst EW (1933) Infectious papillomatosis of rabbits: with a note on the histopathology. *Journal of Experimental Medicine* 58:607–624

- Sonntag M, Mühldorfer K, Speck S, Wibbelt G, Kurth A (2009) New adenovirus in bats, Germany. *Emerging Infectious Diseases* 15:2052–2055
- Stannard LM, Marais D, Kow D, Dumbell KR (1998) Evidence for incomplete replication of a penguin poxvirus in cells of mammalian origin. *Journal of General Virology* 79:1637–1646
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725–2729
- Terai M, DeSalle R, Burk RD (2002) Lack of canonical E6 and E7 open reading frames in bird papillomaviruses: *Fringilla coelebs* papillomavirus and *Psittacus erithacus timneh* papillomavirus. *Journal of Virology* 76: 10020–10023
- Tachezy R, Rector A, Havelkova M, Wollants E, Fiten P, Opdenakker G, Jenson B, Sundberg J, Van Ranst M (2002) Avian papillomaviruses: the parrot *Psittacus erithacus* papillomavirus (PePV) genome has a unique organization of the early protein region and is phylogenetically related to the chaffinch papillomavirus. *BMC Microbiol* 2:19
- Thomazelli LM, Araujo J, Oliveira DB, Sanfilippo L, Ferreira CS, Brentano L, et al. (2010) Newcastle disease virus in penguins from King George Island on the Antarctic region. *Veterinary Microbiology* 146:155–160
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25:4876–4882
- Truchado DA, Williams RAJ, Benítez L (2018) Natural history of avian papillomaviruses. *V Research* 252:58–67
- Trus BL, Buck CB, Cheng N, Lowy DR, Steven AC, Schiller JT (2005) Localization of the HPV-16 minor capsid protein L2 by difference imaging. *Microscopy and Microanalysis* 11(Suppl. 2): 642–643
- Van Doorslaer K, Ould M'hamed Ould Sidi A, Zanier K, Rybin V, Deryckère F, Rector A, et al. (2009) Identification of unusual E6 and E7 proteins within avian papillomaviruses: cellular localization, biophysical characterization, and phylogenetic analysis. *Journal of Virology* 83:8759–8770
- Varsani A, Kraberger S, Jennings S, Porzig EL, Julian L, Massaro M, Pollard A, Ballard G, Ainley DG (2014) A novel papillomavirus in Adélie penguin (*Pygoscelis adeliae*) faeces sampled at the Cape Crozier colony, Antarctica. *J Gen Virol* 95:1352–1365.
- Victoria JG, Kapoor A, Li L, Blinkova O, Slikas B, Wang C, et al. (2009) Metagenomic analyses of viruses in stool samples from children with acute flaccid paralysis. *Journal of Virology* 83:4642–4651
- Zur Hausen H (2009a) Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. *Virology* 384:260–265. Zur Hausen H (2009b) The search for infectious causes of human cancers: where and why. *Virology* 392:1–10

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido à intensificação das ações antrópicas e das mudanças climáticas, torna-se maior a necessidade de monitoramento e conservação do continente antártico. A análise do viroma de espécies-chave desse local não só possibilita um maior controle sobre tais agentes, mas também funciona como indicador da chamada “síndrome do desconforto ambiental”. Nesse contexto, a metagenômica viral surge como uma importante ferramenta de estudo, visto que permite aplicar métodos de amplo alcance para a detecção e identificação dos vírus emergentes.

A maioria das técnicas convencionais, como PCR e qPCR, é projetada para ser específica ou direcionada a um grupo limitado de vírus, o que as torna inadequadas para a detecção de vírus inesperados e/ou completamente novos e de novas variantes virais. Em combinação com técnicas moleculares clássicas, que proporcionam meios rápidos e práticos de detecção e identificação de vírus, as abordagens metagenômicas permitem detecção imparcial de uma gama muito mais ampla de vírus, sendo independente de conhecimento prévio. Tendo isso em vista, o presente estudo cumpre seu papel no que diz respeito à busca dos agentes mais prováveis de serem encontrados em aves antárticas, bem como à análise do viroma em algumas dessas espécies.

Uma possível nova variante de papilomavírus foi encontrada em cormorões-imperiais, espécie que apresentou maior número e maior diversidade de vírus detectados. Além disso, a detecção de mastadeno e mamastrovírus, vírus altamente similar a variantes conhecidas por infectar fundamentalmente humanos, levanta a desconfortante hipótese de contaminação ou até mesmo transmissão interespecífica.

Por fim, a presença de vírus da família Circoviridae em todas as espécies submetidas à análise do viroma demonstra que estudos mais detalhados a respeito de sua caracterização e prevalência podem vir a ser úteis para o monitoramento global de indicadores. Por essa razão, o produto de PCR de aproximadamente 400 pb, correspondente ao fragmento do genoma de circovírus obtido a partir de uma amostra de cormorão-imperial, foi purificado e sequenciado diretamente por meio do oligonucleotídeo CV-R2. Para confirmação do resultado obtido, o produto foi sequenciado três vezes, e as sequências, similares às de genes *Rep* de circovírus, foram alinhadas com vistas à concepção de novos conjuntos de oligonucleotídeos para serem utilizados em uma PCR inversa (iPCR). Os produtos de amplificação de iPCR com tamanhos correspondentes aos esperados serão purificados e, posteriormente, clonados e sequenciados

com iniciadores M13 – a partir disso, a sequência completa de genoma será construída pela técnica de *genome walking*.

Com relação à análise feita a partir dos achados em aves migratórias e residentes, foi possível concluir que as migratórias apresentaram maior quantidade e diversidade de vírus. Tal fato pode ser atribuído não só às características migratórias, mas também às diferenças quanto aos hábitos alimentares dessas espécies. Enquanto pinguins-antárticos se alimentam fundamentalmente de *krill*, petréis-gigantes são substancialmente oportunistas. No entanto, o fato de ambas coabitarem restritas áreas de terra descoberta durante a estação reprodutiva pode levar a um aumento das chances de transmissão de patógenos, tornando os achados deste estudo um forte embasamento para pesquisas futuras de monitoramento desse fluxo. Além disso, o fato de ter sido encontrado o vírus da influenza A em ambas as espécies revela a necessidade de uma melhor caracterização dos genomas virais para uma compreensão mais adequada do viroma comparado das duas espécies.

REFERÊNCIAS

- ABLE, K. P. **Gatherings of angels: migrating birds and their ecology**. Ithaca: Cornell University Press, 1999.
- AUSTIN, F.; WEBSTER, R. Evidence of ortho- and paramyxoviruses in fauna from Antarctica. **Journal of wildlife diseases**, v. 29, n. 4, p. 568-571, 1993.
- BANKEVICH, A. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of computational biology**, v. 19, p. 455-477, 2012.
- BARBOSA, A.; PALACIOS, M. J. Health of Antarctic birds: a review of their parasites, pathogens and diseases. **Polar biology**, v. 32, n. 8, p. 1095-1115, 2009.
- BARBRAUD, C. et al. First census of breeding seabirds between Cap Bienvenue (Terre Adélie) and Moyes Islands (King George V Land), Antarctica: new records for Antarctic seabird populations. **Polar biology**, v. 21, n. 3, p. 146-150, 1999.
- BARGAGLI, R. et al. Enhanced deposition and bioaccumulation of mercury in Antarctic terrestrial ecosystems facing a coastal polynya. **Environmental science & technology**, v. 39, n. 21, p. 8150-8155, 2005.
- BAUMEISTER, E. et al. Serological evidences of influenza A virus infection in Antarctica migratory birds. **International congress series**, v. 1263, p. 737-740, 2004.
- BOOM, R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of clinical microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.
- BREITBART, M. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Circoviridae*. **Journal of general virology**, v. 98, p. 1997-1998, 2017.
- BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of molecular endocrinology**, v. 25, n. 2, p. 169-193, 2000.
- CARLOS, C.; VOISIN, J. Identifying giant petrels, *Macronectes giganteus* and *M. halli*, in the field and in the hand. **Seabird**, v. 21, p. 1-15, 2008.
- CAVANAGH, D. Coronaviruses in poultry and other birds. **Avian pathology**, v. 34, n. 6, p. 439-448, 2005.
- _____. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Veterinary research**, v. 38, n. 2, p. 281-297, 2007.
- CAVANAGH, D.; GELB JÚNIOR, J. Infectious bronchitis. In: SAIF, Y. M. (Ed.). **Diseases of poultry**. Ames: Wiley-Blackwell Publishing, 2008. p. 117-135.
- CHEN, H. et al. Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. **Nature**, v. 436, n. 7048, p. 191-192, 2005.

- CHU, D. K. et al. Avian coronavirus in wild aquatic birds. **Journal of virology**, v. 85, n. 23, p. 12815-12820, 2011.
- CLARK, L.; HALL, J. Avian influenza in wild birds: status as reservoirs, and risks to humans and agriculture. **Ornithological monographs**, n. 60, p. 3-29, 2006.
- CLEMENTS, J. F. et al. **The eBird/Clements checklist of birds of the world**: version 6.9. Ithaca: Cornell University Press, 2014.
- CROXALL, J. P.; TRATHAN, P.; MURPHY, E. Environmental change and Antarctic seabird populations. **Science**, v. 297, n. 5586, p. 1510-1514, 2002.
- CURRY, C. et al. Could tourist boots act as vectors for disease transmission in Antarctica? **Journal of travel medicine**, v. 9, n. 4, p. 190-193, 2002.
- DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. **Science**, v. 287, n. 5452, p. 443-449, 2000.
- DE SALES LIMA, F. E. et al. Diverse gammacoronaviruses detected in wild birds from Madagascar. **European journal of wildlife research**, v. 61, n. 4, p. 635-639, 2015.
- DEAN, F. B. et al. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 5261-5266, 2002.
- DEL HOYO, J. D.; COLLAR, N. **HBW and BirdLife International Illustrated Checklist of the Birds of the World**. Barcelona: Lynx Edicions, 2014. v. 1.
- DELWART, E. L. Viral metagenomics. **Reviews in medical virology**, v. 17, n. 2, p. 115-131, 2007.
- DONG, B. et al. Detection of a novel and highly divergent coronavirus from Asian leopard cats and Chinese ferret badgers in Southern China. **Journal of virology**, v. 81, n. 13, p. 6920-6926, 2007.
- EDWARDS, R. A.; ROHWER, F. Viral metagenomics. **Nature reviews microbiology**, v. 3, n. 6, p. 504-510, 2005.
- EPSTEIN, P. R. Climate change and emerging infectious diseases. **Microbes and infection**, v. 3, n. 9, p. 747-754, 2001.
- FAUQUET, C. M. et al. **Virus taxonomy**: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2005.
- FAUREZ, F. et al. Replication of porcine circoviruses. **Virology journal**, v. 6, n. 1, p. 60, 2009.
- FERREIRA, F. R. G. **O sistema do Tratado da Antártica**: evolução do regime e seu impacto na política externa brasileira. Brasília: Fundação Alexandre de Gusmão, 2007.
- FREITAS, M. E. D. Lições organizacionais vindas da Antártica. **Revista de administração pública**, v. 46, n. 4, p. 915-937, 2012.

GRENFELL, B. T.; DOBSON, A. P. **Ecology of infectious diseases in natural populations**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

GURNEY, A. **Abaixo da Convergência**. São Paulo: Companhia das Letras, 2001.

HALAMI, M. et al. Detection of a novel circovirus in mute swans (*Cygnus olor*) by using nested broad-spectrum PCR. **Virus research**, v. 132, n. 1-2, p. 208-212, 2008.

HALDANE, J. B. S. Disease and evolution. **Ricerca Scientifica**, v. 19, p. 68-76, 1949.

HARPER, P. C.; KINSKY, F. **Southern albatrosses and petrels: an identification guide**. Wellington: Price Milburn & Co., 1978.

HARRIS, C. et al. **Important bird areas in Antarctica: Antarctic Peninsula, South Shetland Islands, South Orkney Islands—Final Report**. Prepared for BirdLife International and the Polar Regions Unit of the UK Foreign & Commonwealth Office. Cambridge: Environmental Research & Assessment Ltd., 2011.

HARRISON P. **Seabirds: an identification guide**. Beckenham: Croom Helm, 1983.

HARVELL, C. D. et al. Emerging marine diseases--climate links and anthropogenic factors. **Science**, v. 285, n. 5433, p. 1505-1510, 1999.

_____. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. **Science**, v. 296, n. 5576, p. 2158-2162, 2002.

HATTERMANN, K. et al. Cloning and sequencing of Duck circovirus (DuCV). **Archives of virology**, v. 148, p. 2471-2480, 2003.

HILGENFELD, R.; PEIRIS, M. From SARS to MERS: 10 years of research on highly pathogenic human coronaviruses. **Antiviral research**, v. 100, n. 1, p. 286-295, 2013.

HUBÁLEK, Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. **Journal of wildlife diseases**, v. 40, n. 4, p. 639-659, 2004.

HUGHES, L. A. et al. Genetically diverse coronaviruses in wild bird populations of northern England. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 7, p. 1091-1094, 2009.

IZAGUIRRE, I.; MATALONI, G. **Antártida, descubriendo el continente blanco**. Buenos Aires: Editorial Del Nuevo Extremo, 2000.

JENSEN, T. et al. Another phocine distemper outbreak in Europe. **Science**, v. 297, n. 5579, p. 209-209, 2002.

JOHNE, R. et al. Genome of a novel circovirus of starlings, amplified by multiply primed rolling-circle amplification. **Journal of general virology**, v. 87, n. 5, p. 1189-1195, 2006.

JONASSEN, C. M. et al. Molecular identification and characterization of novel coronaviruses infecting graylag geese (*Anser anser*), feral pigeons (*Columbia livia*) and mallards (*Anas platyrhynchos*). **Journal of general virology**, v. 86, n. 6, p. 1597-1607, 2005.

- KEAWCHAROEN, J. et al. Wild ducks as long-distance vectors of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 4, p. 600-607, 2008.
- KERRY, K.; RIDDLE, M.; CLARKE, J. **Diseases of Antarctic wildlife**. A report for SCAR and COMNAP. Kingston: SCAR, 1999.
- KITCHEN, A.; SHACKELTON, L. A.; HOLMES, E. C. Family level phylogenies reveal modes of macroevolution in RNA viruses. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 108, n. 1, p. 238-243, 2011.
- KOKUBUN, N. et al. Comparison of diving behavior and foraging habitat use between chinstrap and gentoo penguins breeding in the South Shetland Islands, Antarctica. **Marine biology**, v. 157, n. 4, p. 811-825, 2010.
- LAMB, R. A. et al. Family Paramyxoviridae. In: REGENMORTEL, M. V. H. V. (Ed.). **Virus Taxonomy**. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. New York: Academic Press, 2000. p. 549-561.
- LAMB, R.; KRUG, R. Orthomyxoviridae. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1449-1496.
- LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.
- LAURANCE, W. F.; MCDONALD, K. R.; SPEARE, R. Epidemic disease and the catastrophic decline of Australian rain forest frogs. **Conservation Biology**, v. 10, n. 2, p. 406-413, 1996.
- LI, L. et al. Multiple diverse circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces. **Journal of virology**, v. 84, n. 4, p. 1674-1682, 2010.
- MANKERTZ, A. et al. Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons. **Archives of virology**, v. 145, n. 12, p. 2469-2479, 2000.
- MAXSON, S. J.; BERNSTEIN, N. P. Kleptoparasitism by south polar skuas on blue-eyed shags in Antarctica. **The Wilson Bulletin**, v. 94, p. 269-281, 1982.
- MAY, R. M. Conservation and disease. **Conservation biology**, v. 2, p. 28-30, 1988.
- MAYO, M. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. **Archives of virology**, v. 147, n. 8, p. 1655-1656, 2002.
- MICOL, T.; JOUVENTIN, P. Long-term population trends in seven Antarctic seabirds at Pointe Géologie (Terre Adélie) Human impact compared with environmental change. **Polar biology**, v. 24, n. 3, p. 175-185, 2001.
- MIHINDUKULASURIYA, K. A. et al. Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray. **Journal of virology**, v. 82, n. 10, p. 5084-5088, 2008.
- MILLER, G. D.; WATTS, J. M.; SHELLAM, G. R. Viral antibodies in south polar skuas around Davis Station, Antarctica. **Antarctic Science**, v. 20, n. 5, p. 455-461, 2008.

MILLS, L. **Frank Wild**. Whitby: Caedmon of Whitby, 1999.

MORGAN, I. et al. A survey of virus infection in sub-antarctic penguins on Macquarie Island, **Southern Ocean Australian Veterinary Journal**, v. 57, n. 7, p. 333-335, 1981.

MORGAN, I.; WESTBURY, H. Virological studies of Adelie penguins (*Pygoscelis adeliae*) in Antarctica. **Avian diseases**, n. 25, p. 1019-1026, 1981.

_____. Studies of viruses in penguins in the Vestfold Hills. **Hydrobiologia**, v. 165, n. 1, p. 263-269, 1988.

MURADRASOLI, S. et al. Prevalence and phylogeny of coronaviruses in wild birds from the Bering Strait area (Beringia). **PLoS One**, v. 5, n. 10, p. e13640, 2010.

NAKAMURA, S. et al. Direct metagenomic detection of viral pathogens in nasal and fecal specimens using an unbiased high-throughput sequencing approach. **PLoS One**, v. 4, n. 1, e4219, 2009.

NEWTON, I. **The migration ecology of birds**. London: Academic Press, 2008.

NIAGRO, F. et al. Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. **Archives of virology**, v. 143, n. 9, p. 1723-1744, 1998.

NORMILE, D. Are wild birds to blame? **Science**, v. 310, n. 5747, p. 426, 2005.

OLIAS, P. et al. Reference genes for quantitative gene expression studies in multiple avian species. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e99678, 2014.

OLSEN, B. et al. Global patterns of influenza A virus in wild birds. **Science**, v. 312, n. 5772, p. 384-388, 2006.

OLSEN, C. W. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. **Virus research**, v. 85, n. 2, p. 199-210, 2002.

OLSEN, K. M.; LARSSON, H. **Skuas and jaegers** – a guide to the skuas and jaegers of the world. Sussex: Pica Press, 1997.

PEREIRA, L. E. P.; SOUZA, J. S.; COSTA, E. S. **Biguá-de-olhos-azuis** (*Phalacrocorax atriceps*). 2011. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/245023329_Bigua-de-olhos-azuis_Phalacrocorax_atriceps>. Acesso em: 17 set. 2018.

PIERSON, G.; PFOW, C. Newcastle disease surveillance in the United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association (EUA)**, v. 167, p. 801-803, 1975.

RAPPORT, D. J. Sustainability science: an ecohealth perspective. **Sustainability science**, v. 2, n. 1, p. 77-84, 2007.

ROSARIO, K. et al. Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. **Archives of virology**, v. 162, p. 1447-1463, 2017.

- ROSARIO, K.; DUFFY, S.; BREITBART, M. A field guide to eukaryotic circular single-stranded DNA viruses: insights gained from metagenomics. **Archives of virology**, v. 157, p. 1851-1871, 2012.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001.
- SCIENTIFIC COMMITTEE ON ANTARCTIC RESEARCH (SCAR). **The Antarctic Treaty System**. Cambridge, 2018. Disponível em: <<http://www.scar.org/antarctic-treaty>>. Acesso em: 17 set. 2018.
- SHAN, T. et al. The fecal virome of pigs on a high-density farm. **Journal of virology**, v. 85, p. 11697-11708, 2011.
- SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.
- SIGRIST, T. **Aves do Brasil**: uma visão artística. São Paulo: Editora Avis Brasilis, 2004.
- _____. **Guia de campo avis brasilis avifauna brasileira**: descrição das espécies. São Paulo: Avis Brasilis Editora, 2009.
- SIMPSON-HOUSLEY, P. **Antarctica**: exploration, perception and metaphor. London: Routledge, 2002.
- STEARNS, S. C. **Evolution in health and disease**. Oxford: Oxford University Press, 1999.
- STEIG, E. J. et al. Warming of the Antarctic ice-sheet surface since the 1957 International Geophysical Year. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 459-463, 2009.
- STEINFELDT, T.; FINSTERBUSCH, T.; MANKERTZ, A. Rep and Rep' protein of porcine circovirus type 1 bind to the origin of replication in vitro. **Virology**, v. 291, n. 1, p. 152-160, 2001.
- _____. Functional analysis of cis- and trans-acting replication factors of porcine circovirus type 1. **Journal of virology**, v. 81, n. 11, p. 5696-5704, 2007.
- STEWART, M. E.; PERRY, R.; RAIDAL, S. R. Identification of a novel circovirus in Australian ravens (*Corvus coronoides*) with feather disease. **Avian Pathology**, v. 35, p. 86-92, 2006.
- SUTHERST, R. W. The vulnerability of animal and human health to parasites under global change. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 9, p. 933-948, 2001.
- TAMURA, K. et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.
- THOMPSON, J. D. et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.
- TODD, D. et al. Animal circoviruses. **Advances in Virus Research**, v. 57, p. 1-70, 2001.

TODD, D. et al. Circoviridae. In: FAUQUET, C. M. et al. (Eds.). **Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p. 327-334.

TODD, D. et al. Molecular characterization of novel circoviruses from finch and gull. **Avian pathology**, v. 36, n. 1, p. 75-81, 2007.

TONG, S. et al. Sensitive and broadly reactive reverse transcription-PCR assays to detect novel paramyxoviruses. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2652-2658, 2008.

VAN PERLO, B. **A field guide to the birds of Brazil**. Nova York: Oxford University Press, 2009.

VOGELNEST, L. Veterinary management of seabirds. In: HOWEY, W. P. (Ed.). **Marine Wildlife**. Sydney: University of Sydney, 2000. p. 199-235.

WALLENSTEN, A. et al. Mounting evidence for the presence of influenza A virus in the avifauna of the Antarctic region. **Antarctic science**, v. 18, n. 3, p. 353-356, 2006.

WEBSTER, R. G. et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. **Microbiological reviews**, v. 56, n. 1, p. 152-179, 1992.

WEIMERSKIRCH, H. Diseases threaten southern ocean albatrosses. **Polar biology**, v. 27, n. 6, p. 374-379, 2004.

WILSON, R. P. Resource partitioning and niche hyper-volume overlap in free-living Pygoscelid penguins. **Functional ecology**, v. 24, n. 3, p. 646-657, 2010.

WOO, P. C. et al. Comparative analysis of complete genome sequences of three avian coronaviruses reveals a novel group 3c coronavirus. **Journal of virology**, v. 83, n. 2, p. 908-917, 2009.

WOODS, R. et al. **Diseases of Antarctic seabirds**. In: KERRY, K. R.; RIDDLE, M. J. (Eds.). **Health of Antarctic Wildlife: a challenge for science and policy**. Berlin: Springer, 2009. p. 35-55.

ZOU, S. et al. Human influenza A virus (H5N1) detection by a novel multiplex PCR typing method. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1889-1892, 2007.