



Uema
UNIVERSIDADE ESTADUAL
DO MARANHÃO

**CAMPUS CAXIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS LICENCIATURA**

MARXO SANTANA GUIMARÃES MORAIS

**INVESTIGAÇÃO DE *Flavivirus* EM MORCEGOS NO MUNICÍPIO DE CAXIAS -
MA**

**CAXIAS – MA
2023**



Uema

UNIVERSIDADE ESTADUAL
DO MARANHÃO

**CAMPUS CAXIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS LICENCIATURA**

MARXO SANTANA GUIMARÃES MORAIS

**INVESTIGAÇÃO DE *Flavivirus* EM MORCEGOS NO MUNICÍPIO DE CAXIAS -
MA**

Monografia apresentada ao Colegiado do Curso de Ciências Biológicas Licenciatura, UEMA Campus Caxias, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cleoneide da Silva
Coorientadora: Profa Dra. Maria Claudene Barros

**CAXIAS – MA
2023**

M828i Morais, Marxo Santana Guimarães

Investigação de flavivírus em morcegos no município de Caxias-
MA / Marxo Santana Guimarães Morais. __ Caxias: Campus Caxias, 2023.

43f.

Monografia (Graduação) – Universidade Estadual do Maranhão –
Campus Caxias, Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^ª. Dra. Maria Cleoneide da Silva.
Coorientadora: Prof^ª. Dra. Maria Claudene Barros.

1. Quiroptera. 2. Arbovírus. 3. RT-PCR. 4. Dengue. I. Título.

CDU 599.4


MARXO SANTANA GUIMARÃES MORAIS

**INVESTIGAÇÃO DE *Flavivirus* EM MORCEGOS NO MUNICÍPIO DE CAXIAS -
MA**


Monografia apresentada ao Colegiado do Curso de Ciências Biológicas Licenciatura, UEMA Campus Caxias, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Aprovada em: ___/___/___.

BANCA EXAMINADORA

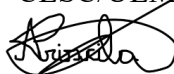
Documento assinado digitalmente
 MARIA CLEONEIDE DA SILVA
Data: 27/07/2023 15:08:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^ª. Dra. Maria Cleoneide (Orientadora)

 Documento assinado digitalmente
MARIA HISTELLE SOUSA DO NASCIMENTO
Data: 27/07/2023 16:17:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^ª. M. Sc. Maria Histelle Sousa do Nascimento (Membro)

CECSC/UEMA



Prof^ª. M. Sc. Ana Priscila Medeiros Olímpio (Membro)

CECSC/UEMA

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha família, principalmente aos meus pais Francinaldo de Jesus Moraes e Solange Santana Guimarães Moraes por toda educação que me deram ao longo da vida, por me apoiarem em minhas escolhas como de me formar no curso de Ciências Biológicas, sem o apoio deles não estaria aqui.

Agradeço a todos os meus professores, pelo ensinamento adquirido, em especial à minha orientadora, professora doutora Maria Cleoneide da Silva, que acompanhou a minha jornada na pesquisa Científica, que me deu a chance de realizar em 2019 a primeira iniciação científica sendo também a orientadora desta conclusão de TCC, enfim, agradeço pela constante orientação, pela paciência em me ajudar a entender diferentes questões necessárias para esse estudo, além de ajudar a melhorar a minha escrita para futuros trabalhos acadêmicos. Agradeço também minha coorientadora, professora doutora Maria Claudene Barros, por todo o ensinamento genético.

Agradeço aos colegas e amigos da turma de Ciências Biológicas 2019.1, ao qual faço parte, em especial para o meu grupo de amigos composto por Ana Beatriz, Ana Clara, Luenne Vitoria, Nayarte Carvalho, Rodrigo Furtado pelas horas de estudos, trabalhos, seminários, provas, e por me auxiliarem no caminho da amizade e conhecimento. Destes, agradeço em especial para Ana Beatriz e Nayarte Carvalho, pelos momentos de confiança, apoio, amizade entre tantas outras coisas que elas propiciaram.

Agradeço aos colegas de laboratório do BEMMOL (Laboratório de bactérias enteropatogênicas) e GEMBIMOL (Laboratório de genética e biologia molecular) por todo o entendimento científico, em especial para a minha amiga querida Alessandra Vidigal, por me ouvir, aconselhar e ser parte importante durante os momentos finais da pesquisa, fazendo às vezes do impossível algo possível.

Agradeço também aos amigos do grupo de coleta de morcegos do Maranhão, por todas as oportunidades de viagens, pelas várias horas que passamos no campo, pelos conhecimentos adquiridos, por todas as risadas e por todo o trabalho duro, que me levaram a entender a importância desses animais espetaculares, os morcegos, para o meio ambiente.

À UEMA (Universidade Estadual do Maranhão) pela formação Acadêmica e bolsas concedidas. À FAPEMA (Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão) pelo financiamento dos projetos e bolsas concedidas.

A todos que fazem parte direta ou indiretamente para o meu crescimento pessoal e educacional, meu muito obrigado!

RESUMO

No Brasil, os arbovírus apresentam-se amplamente distribuídos devido às condições ecológicas adequadas. Dentre as várias arboviroses que o Brasil tem enfrentado, destacam-se a dengue, zika e febre amarela. O mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus (1762) (Diptera: Culicidae) é vetor dessas arboviroses, sendo os arbovírus pertencentes ao gênero *Flavivirus*, da família Flaviviridae. O principal ciclo replicativo desses vírus envolve somente os seres humanos e mosquitos nos grandes centros urbanos. No entanto, outro ciclo, envolvendo morcego e flavivírus tem sido bastante discutido. Várias pesquisas, utilizando a técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), têm mostrado a presença do gênero *Flavivirus* em morcegos, no entanto, no Brasil poucos estudos têm investigado a presença do vírus flavivírus em morcegos. A presente pesquisa, além de produzir um rico conhecimento sobre a biodiversidade de morcegos do Maranhão, tem seu foco no monitoramento do *Flavivirus* em morcegos, do município de Caxias (MA). Assim, este trabalho tem como objetivo investigar o potencial dos morcegos da cidade de Caxias como hospedeiros do *Flavivirus*. Para tanto, morcegos foram capturados no município de Caxias, nos turnos diurnos e noturnos. Amostras de sangue, fígado, intestino, rins e coração foram coletadas assepticamente e armazenadas em tubos contendo RNA later e acondicionadas a -80 °C para uso posterior. A identificação morfológica dos espécimes foi feita com auxílio de bibliografia especializada. A identificação de flavivírus nas amostras dos morcegos foi realizada, com a extração do RNA total, seguindo o protocolo SV Total RNA Isolation System DA Promega Corporation, fez-se a RT-PCR seguida de *nested*-PCR a partir de iniciadores específicos de cada sorotipo para caracterizar o tipo de vírus infectante. Durante as nove expedições, nos anos de 2019, 2020 e 2021, foram capturados 77 espécimes de morcegos no município de Caxias e foram identificados dentro de quatro famílias e dez espécies, sendo a família Molossidae a mais abundante com 64,93% dos espécimes amostrados. *Molossus molossus* foi a espécie mais abundante com 42,86% desse gênero. Das amostras biológicas utilizadas, 23 amostras apontaram resultado positivo na detecção de RNA viral de flavivírus sendo encontrado nas espécies *Carollia perspicillata*, *Glossophaga soricina*, *Pteronotus gymnotus*, *Anoura caudifer*, *Rhynchonycteris naso*, *Phyllostomus hastus*, *Molossus molossus* mais precisamente para o genoma viral da dengue sendo o sorotipo 2 (DENV-2) o mais detectado. Contudo, é importante não esquecer do papel essencial que os morcegos desempenham no ecossistema. A detecção viral em morcegos não implica necessariamente que eles sejam hospedeiros dos vírus, mas sim que possam estar em possível contato com os agentes infecciosos. Por fim, a pesquisa deve ser continuada, para um constante monitoramento, pois os flavivírus de importância médica representam um desafio global significativo devido às epidemias recorrentes que ocorrem em diversas regiões do mundo.

Palavras-chave: Quiroptera; Arbovírus; RT-PCR; Dengue; Maranhão.

ABSTRACT

In Brazil, arboviruses are widely distributed due to suitable ecological conditions. Among the various arboviruses that Brazil has faced, dengue, zika and yellow fever stand out. The mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus (1762) (Diptera: Culicidae) is the vector of these arboviruses, and these arboviruses belong to the genus *Flavivirus*, of the Flaviviridae family. The main replicative cycle of these viruses involves only humans and mosquitoes in large urban centers. However, another cycle involving bats and flaviviruses has been much discussed. Several studies, using the reverse transcription technique followed by polymerase chain reaction (RT-PCR), have shown the presence of the *Flavivirus* genus in bats, however, in Brazil few studies have investigated the presence of flavivirus in bats. The present research, in addition to producing a rich knowledge about the biodiversity of bats in Maranhão, focuses on the monitoring of *Flavivirus* in bats in the municipality of Caxias (MA). Thus, that work aims to investigate the potential of bats in the city of Caxias as hosts of *Flavivirus*. To this end, bats were captured in the municipality of Caxias, in the day and night shifts. Blood, liver, intestine, kidney and heart samples were collected aseptically and stored in tubes containing RNAlater and conditioned at -80 °C for later use. The morphological identification of the specimens was made with the aid of specialized bibliography. The identification of flaviviruses in bat samples was performed with the extraction of total RNA, following the SV Total RNA Isolation System DA Promega Corporation protocol, RT-PCR followed by nested-PCR from specific primers of each serotype to characterize the type of infecting virus. During the nine expeditions, in the years 2019, 2020 and 2021, 77 bat specimens were captured in the municipality of Caxias and were identified within four families and ten species, with the Molossidae family being the most abundant with 64.93% of the specimens sampled. *Molossus molossus* was the most abundant species with 42.86% of this genus. Of the biological samples used, 23 samples were positive for the detection of flavivirus viral RNA being found in the species *Carollia perspicillata*, *Glossophaga soricina*, *Pteronotus gymnonotus*, *Anoura caudifer*, *Rhynchonycteris naso*, *Phyllostomus hastus*, *Molossus molossus* more precisely for the dengue viral genome being serotype 2 (DENV-2) the most detected. However, it is important not to forget the essential role that bats play in the ecosystem. Viral detection in bats does not necessarily imply that they are hosts of the viruses, but rather that they may be in possible contact with the infectious agents. Finally, research should be continued, for constant monitoring, as flaviviruses of medical importance represent a significant global challenge due to the recurrent epidemics that occur in several regions of the world.

Keywords: Chiroptera; Arboviruses; RT-PCR; Dengue; Maranhão.

RESUMO

1	INTRODUÇÃO	9
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
2.1	<i>Flavivirus</i>	11
2.2	Aspectos gerais dos morcegos	13
2.3	Morcegos como hospedeiros de Flavivirus.....	14
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	Locais e períodos de captura dos morcegos	17
3.2	Identificação morfológica dos morcegos	18
3.3	Caracterização e identificação de flavivírus.....	18
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1	Dados morfológicos	21
4.2	Caracterização e identificação de flavivírus.....	25
4.3	Avaliação dos achados epidemiológicos em morcegos	30
5	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

No Brasil os arbovírus apresentam-se amplamente distribuídos devido às condições ecológicas adequadas que o país possui com uma ampla diversidade de fauna e flora, o qual mantém os arbovírus em condições ideais dentro dos seus ciclos zoonóticos. Dessa maneira, o surgimento e reaparecimento das arboviroses acontecem de forma natural e pertinente, com a evolução e adaptação das espécies relacionadas, direta ou indiretamente com ações humanas (FIGUEIREDO, 2007; HOLLIDGE *et al.*, 2011; MAYER *et al.*, 2017).

Dentre as várias arboviroses que o Brasil tem enfrentado, destacam-se: a dengue, que é a infecção humana mais prevalente no país, com mais de 2.000 óbitos, nesses últimos anos (BRASIL, 2018; 2020a; 2020b; 2021; 2022a; 2023); a doença causada pelo vírus Zika, que provoca a síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika caracterizada por um conjunto de anomalias congênitas, estruturais e funcionais, com repercussões no crescimento e desenvolvimento dos embriões ou fetos expostos ao vírus durante a gestação, teve quase 2.000 casos confirmados desde 2015, quando essa doença foi notificada pela primeira vez no Brasil (HEUKELBACH *et al.*, 2016; DEL CAMPO *et al.*, 2017; MENESES *et al.*, 2017; BRASIL, 2022b); e a febre amarela, que em 2017 proporcionou o pior surto desde 1980, sendo confirmados 1.376 casos de febre amarela no país e 483 óbitos, no período de 2017 e 2018 (BRASIL, 2017; OPAS/OMS, 2022; 2023).

Esses arbovírus pertencem ao gênero *Flavivirus*, da família Flaviviridae (COOK; HOLMES, 2006; NENE *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2014). O principal ciclo replicativo desses vírus envolve somente os seres humanos e mosquitos, sendo o mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (1762) (Diptera: Culicidae) o principal vetor dessas arboviroses (HUANG *et al.*, 2014; LOPES *et al.*, 2014; ABUNDES-GALLEGOS *et al.*, 2017; FIGUEIREDO, 2019). No entanto, outro ciclo, envolvendo morcego e flavivírus tem sido bastante discutido visto que mudanças no ambiente, como desmatamento, urbanização e mudanças climáticas podem ter um impacto significativo na ecologia e comportamento dos morcegos, bem como na dinâmica da transmissão e circulação dos vírus (ZHANG *et al.*, 1998; de THOISY *et al.*, 2009; ABUNDES-GALLEGOS *et al.*, 2017).

Os morcegos são os únicos mamíferos verdadeiramente voadores, com mais de 1.456 espécies, sendo a segunda ordem de mamífero mais variável numericamente (SIMMONS; CIRRANELLO, 2022). Esses animais abrigam uma grande variedade de vírus, dentre eles os do gênero *Flavivirus* (CALISHER *et al.*, 2006; O'SHEA *et al.*, 2014; MOLLENTZE; STREICKER, 2020).

Várias pesquisas, utilizando a técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), têm mostrado a presença do gênero *Flavivirus* em morcegos, em vários países do mundo (ZHANG *et al.*, 1998; de THOISY *et al.*, 2009; ABUNDESGALLEGOS *et al.*, 2017; CALDERÓN *et al.*, 2019). A RT-PCR ocorre na amplificação e multiplicação em milhões a bilhões de cópias de um segmento do material genético alvo, com o objetivo de facilitar a detecção deste por eletroforese. Desta forma, esse procedimento, verifica-se a presença ou não do RNA do vírus pelo uso da enzima transcriptase reversa que produz cópias de cDNA a partir do RNA alvo (ROEHE, 2017).

O conhecimento da associação mosquito-morcego-vírus será importante para dar continuidade acerca da compreensão da transmissão e da história natural das doenças transmitidas pelo *Ae. aegypti* nas Américas. No Brasil, a investigação da presença do vírus flavivírus em morcegos ainda é incipiente (BITTAR *et al.*, 2018; FRANCO-FILHO *et al.*, 2023). Portanto, a intensificação no monitoramento desses vírus é necessária para entender melhor o possível papel dos morcegos de Caxias -Maranhão no ciclo dessas arboviroses.

Com base nestas informações, a relevância dessa pesquisa está, principalmente, na investigação da circulação de flavivírus em morcegos no município de Caxias, Maranhão, com o intuito de produzir informações para a saúde pública, o que consequentemente poderá reduzir o risco de infecção, ajudar a prever a localização e a gravidade dos futuros surtos das doenças causadas por esses vírus, bem como, subsidiar pesquisas futuras no que se refere ao manejo integrado dessas doenças e conservação dos morcegos. Além de produzir conhecimento sobre a biodiversidade de morcegos do Maranhão. Nesse sentido, o principal objetivo dessa pesquisa foi investigar morcegos de Caxias como potenciais hospedeiros de *Flavivirus*.

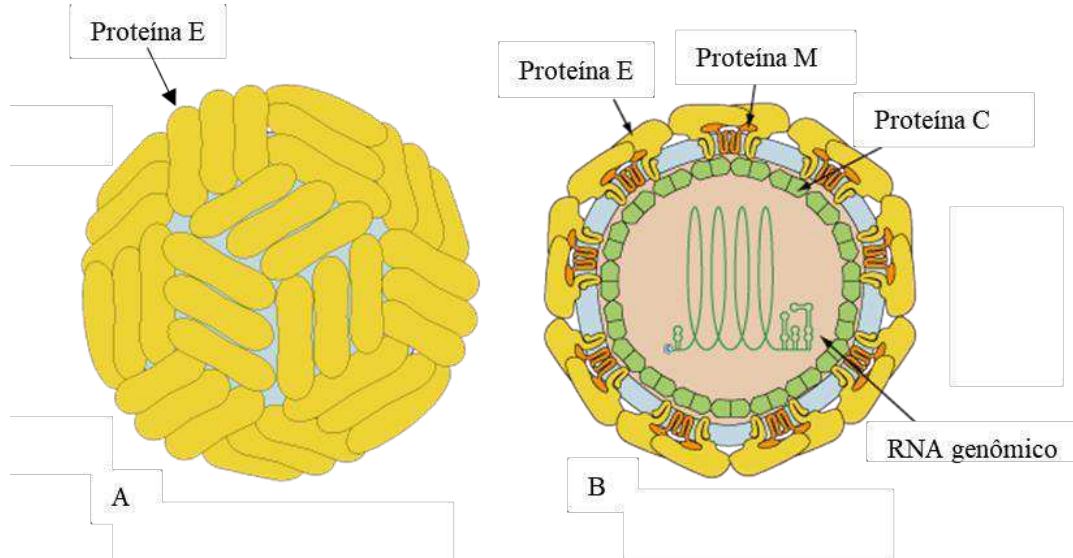
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 *Flavivirus*

O gênero *Flavivirus*, pertencente à família *Flaviviridae*, é composto por diversas espécies de vírus que causam doenças de importância para a saúde pública, como a dengue (DENV), febre amarela (YFV), a doença causada pelo vírus Zika (ZIKV), febre do Nilo Ocidental (WNV), febre Oropouche (OROV) e encefalites causadas pelo vírus St. Louis (SLEV) e Rocio (ROCV) que são transmitidas pela picada de artrópodes hematófagos, denominadas de arboviroses (GAUNT *et al.*, 2001; GOULD *et al.*, 2001; HUHTAMO *et al.*, 2009; COOK *et al.*, 2012; COFFEY *et al.*, 2013; KOLODZIEJEK *et al.*, 2013; HUHTAMO *et al.*, 2014; MOUREAU *et al.*, 2015).

O nucleocapsídeo dos *Flavivirus* é esférico, de simetria icosaédrica e com projeções em superfície. A partícula viral é circundada por envelope lipoprotéico e mede entre 40 e 60 nm de diâmetro. O genoma viral é constituído por RNA de fita simples de polaridade positiva, possuindo aproximadamente 11.000 nucleotídeos (Figura 1) (ZHANG *et al.*, 2003; LINDENBACH; LINDENBACH, 2007).

Figura 1. Representação estrutural dos *Flavivirus*. A - Organização das proteínas do Envelope (E), na superfície do vírus. B – As glicoproteínas do capsídeo (C), Membrana (M), Envelope (E) e o RNA genômico (11.000 nucleotídeos).

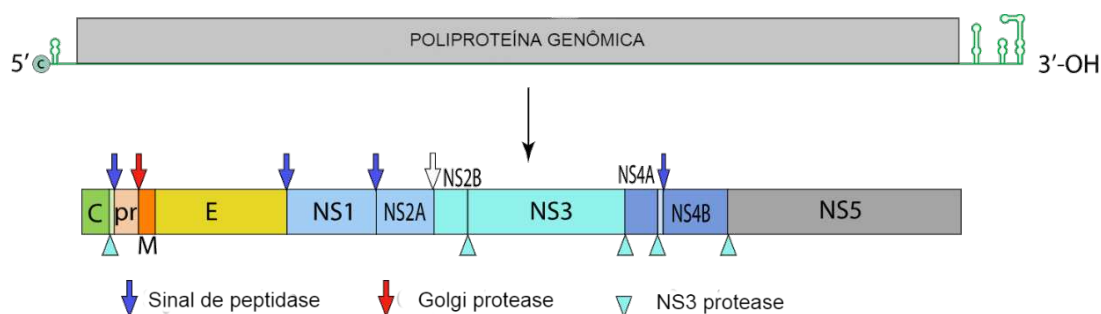


Fonte: Hulo *et al.* (2011), com modificações pelo autor

Esse genoma inclui uma pequena região 5', não-codificadora, uma cadeia aberta de leitura (ORF) e um terminal 3', não-codificadora. A ORF codifica as proteínas Envelope (E), pré-membrana (prM/M) e Capsídeo (C), que são as proteínas estruturais e codifica sete

proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), responsáveis pelas atividades reguladoras e de expressão do vírus, incluindo replicação, virulência e patogenicidade (Figura 2) (CHAMBERS *et al.*, 1990; RICE, 1996; ALCON *et al.*, 2002; LINDENBACH, 2007; RICE, 2007).

Figura 2. Representação do genoma dos *Flavivirus*.

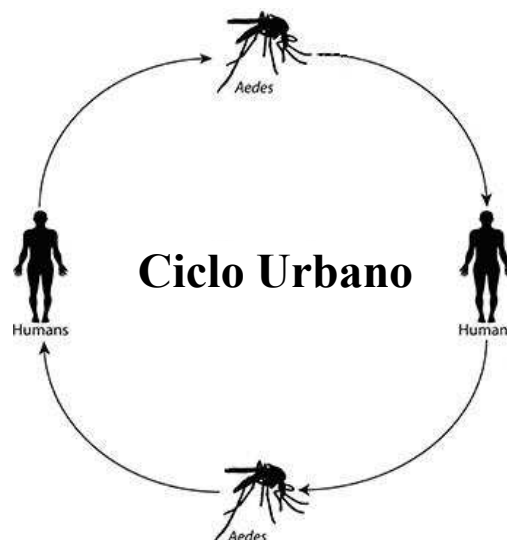


Fonte: Hulo *et al.* (2011), com modificações pelo autor

Análises filogenéticas dividiram robustamente, os arbovírus do gênero *Flavivirus* em dois grupos filoepidemiológicos: O grupo dos flavivírus transmitidos por mosquitos associados ao *Aedes* (vírus da dengue e o vírus da febre amarela) e o grupo dos flavivírus transmitidos por mosquitos associados ao *Culex* (vírus da encefalite japonesa, vírus da encefalite de Saint Louis, vírus do Nilo Ocidental e vírus Rocio) (GAUNT *et al.*, 2001; GOULD *et al.*, 2001; HUHTAMO *et al.*, 2009; COOK *et al.*, 2012; KOLODZIEJEK *et al.*, 2013; HUHTAMO *et al.*, 2014; MOUREAU *et al.*, 2015; GAUNT *et al.*, 2022). Já no caso do genoma do vírus Zika foi verificado que é um híbrido que representa incongruência filogenética entre esses dois grupos (GAUNT *et al.*, 2020).

Dentre esses arbovírus, o vírus da dengue, da febre amarela e Zika têm grande importância epidemiológica, por sua gravidade clínica e elevado potencial de disseminação sendo principalmente transmitidos pela espécie de mosquito antropofílico *Ae. aegypti* que atuam como vetores e são frequentemente encontrados em áreas urbanas, transmitindo doenças para o homem que atua como o principal hospedeiro amplificador participando da manutenção do ciclo (Figura 3), nos trópicos e subtropicais (KRAEMER *et al.*, 2015; MAYER *et al.*, 2017; BOYER *et al.*, 2018; FIGUEIREDO *et al.*, 2019).

Figura 3. Ciclo urbano do *Aedes aegypti*: ciclo de transmissão humano-mosquito-humano.



Fonte: Figueiredo (2019), com modificações pelo autor

O vírus da dengue inclui quatro tipos imunológicos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, todos presentes no Brasil (ARAÚJO *et al.*, 2003; FIGUEIREDO *et al.*, 2004, 2008; COSTA *et al.*, 2009). Até o momento, o vírus Zika apresenta um único sorotipo, no entanto, o risco de surgir, num futuro breve, sorotipos diferentes desse vírus, tem sido uma grande preocupação entre os virologistas, devido à alta taxa de mutação desse vírus (FAPESP, 2017). Em relação à febre amarela, que até o momento foi identificado, apenas um único sorotipo: o vírus amarílico (VASCONCELOS, 2003).

Esses vírus, por serem organismos intracelulares obrigatórios, evoluem à medida que todos os organismos evoluem, resultando em uma coevolução dependente. Neste contexto, os vírus emergentes que acometem os humanos geralmente possuem um hospedeiro-reservatório não-humano (ESTEBAN, 2007).

2.2 Aspectos gerais dos morcegos

Os morcegos pertencem à ordem Chiroptera, segunda maior em diversidade de espécies entre os mamíferos, sendo estes os únicos capazes de realizar o voo de forma verdadeira (NOGUEIRA *et al.*, 2018). São encontrados em diversos biomas e apresentam uma ampla variedade de hábitos alimentares, desde frugívoros até carnívoros, além de desempenharem importantes funções ecológicas, sejam como polinizadores, dispersores de sementes ou controladores de pragas agrícolas (SIMMONS, 2005; BERNARD, 2012).

Atualmente, há cerca de 18 famílias, 202 gêneros e 1.456 espécies de morcegos

conhecidas no mundo (SIMMONS; CIRRANELLO, 2022) e para o Brasil há registros de nove famílias, 68 gêneros e 181 espécies (GARBINO *et al.*, 2022). A família Phyllostomidae, é a mais diversificada da região neotropical e é exclusiva do continente americano (REIS *et al.*, 2017), sendo registrados 93 espécies, 43 gêneros e 10 subfamílias: *Carollinae*, *Desmodontinae*, *Glossophaginae*, *Glyphonycterinae*, *Lonchophyllinae*, *Lonchorhininae*, *Micronycterinae*, *Phyllostominae*, *Rhinophyllinae* e *Stenodermatinae* (GARBINO *et al.*, 2020).

No Brasil, encontram-se morcegos representantes de todos os hábitos, ocupando uma ampla diversidade de nichos, entretanto a maioria destes apresenta uma alimentação predominantemente insetívora (REIS *et al.*, 2017). Em ambientes urbanos a predominância pelo hábito insetívoro é favorecida pela abundância de alimentos atraídos pela iluminação artificial das cidades (RYDELL; RACEY, 1995; MOUTINHO *et al.*, 2020; MELO *et al.*, 2021).

Por conta de sua ampla presença nas regiões tropicais, adaptabilidade morfológica versátil, diversidade de espécies e ampla gama de dietas, os morcegos são de grande importância para pesquisas ecológicas (MOUTINHO *et al.*, 2020; MELO *et al.*, 2021), pesquisas de variações genéticas (PAVAN; MARROIG 2016) como também pesquisas de importância sanitária (THOISY *et al.*, 2009; SOTOMAYOR-BONILLA *et al.*, 2014; ABUNDES-GALLEGOS *et al.*, 2017; MOUTINHO *et al.*, 2020; MELO *et al.*, 2021).

2.3 Morcegos como hospedeiros de Flavivirus

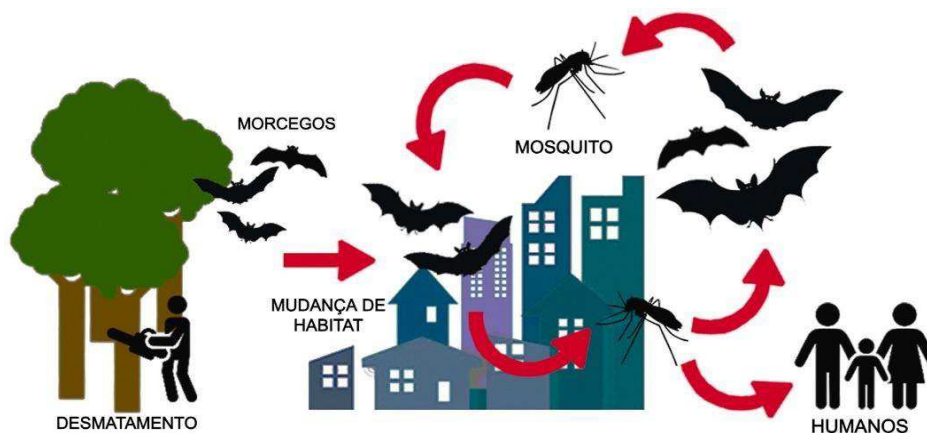
Os morcegos (Mammalia, Chiroptera) constituem cerca de 22% da fauna de mamíferos do planeta (VOIGT; KINGSTON, 2016). Esses animais têm desempenhando papéis essenciais no surgimento e reaparecimento de vírus de importância veterinária e de saúde pública (O'SHEA *et al.*, 2014, GOÉS *et al.*, 2016), mais de 200 vírus foram isolados ou detectados em morcegos (MORATELLI; CALISHER, 2015), como os da família Flaviviridae, do gênero *Flavivirus* (CALISHER *et al.*, 2006; ALLOCATI *et al.*, 2016).

Devido ao grande impacto na saúde pública ocasionado pelos surtos desses vírus, como o vírus da dengue que infecta centenas de milhões de pessoas em todo o mundo, o ciclo envolvendo morcego e flavivírus (Figura 4) tem sido bastante discutido pois estes atuam como reservatórios de uma grande diversidade de vírus (ZHANG *et al.*, 1998; de THOISY *et al.*, 2009; ABUNDES-GALLEGOS *et al.*, 2017).

Com desmatamentos e a expansão urbana, a proximidade entre as cidades e as áreas de preservação diminuiu, alterando as relações tróficas dos morcegos gerando impactos na diversidade biológica. Contudo, com sua alta adaptabilidade e habilidade de dispersão, são capazes de se ajustarem a esses ambientes, beneficiando-se dessa transformação, encontrando

abrigo em áreas de vegetação preservada ou em estruturas urbanas, provocando a sua entrada no ciclo de transmissão urbano de flavivírus (Figura 4) (BREDT *et al.*, 1996; PACHECO, 2010; DIPTYANUSA, 2021).

Figura 4. Possível ciclo do *Flavivirus* em mosquito e morcego.



Fonte: DIPTYANUSA *et al.* (2021), com modificações.

Visto isso, várias pesquisas, utilizando a técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), têm-se demonstrado como método eficaz na detecção da presença do gênero *Flavivirus* em morcegos (ZHANG *et al.*, 1998; THOISY *et al.* 2009, ABUNDES-GALLEGOS *et al.* 2017).

Em áreas endêmicas do Pacífico e do Golfo do México quatro espécimes de três espécies de morcegos, *Artibeus jamaicensis*, *Carollia brevicauda* e *Myotis nigricansnm* foram detectados com o sorotipo 2 do vírus da dengue (AGUILAR-SETIÉN *et al.*, 2008).

Na Guiana Francesa, de Thoisy *et al.* (2009) obtiveram uma prevalência de RNAs dos sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, em 19 espécimes de morcegos de 152 testados. As espécies *A. planirostris* e *C. perspicillata*, ambas frugívoras, foram as que apresentaram uma maior variedade de sorotipos.

No sul do México Sotomayor-Bonilla *et al.* (2014) capturaram 146 morcegos, pertencentes a 16 espécies. Seis morcegos (4,1%) foram positivos para DENV-2, sendo dois da espécie *Glossophaga soricina*, um *A. jamaicensis* e três *A. lituratus*. Abundes-Gallegos *et al.* (2017), em Hidalgo, México, capturaram 160 *Desmodus rotundus*. Sequências de *Flavivirus* foram encontradas em oito amostras de tecido de *D. rotundus*.

Vicente-Santos *et al.* (2017), analisando amostras provenientes da Costa Rica de 318 morcegos por PCR, verificaram que 28 destes foram positivos para os sorotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, sendo as espécies *Eumops glaucinus*, *G. soricina*, *Molossus*

pretiosus, *M. rufus*, *M. sinaloae* e *Rhogeessa bickhami*, com indivíduos apresentando esses sorotipos individualmente ou em conjunto. Amostras do tecido do intestino de 11 morcegos, desses 28, foram submetidas a RT-PCR e duas amostras foram positivas para os mesmos sorotipos de dengue detectados no sangue.

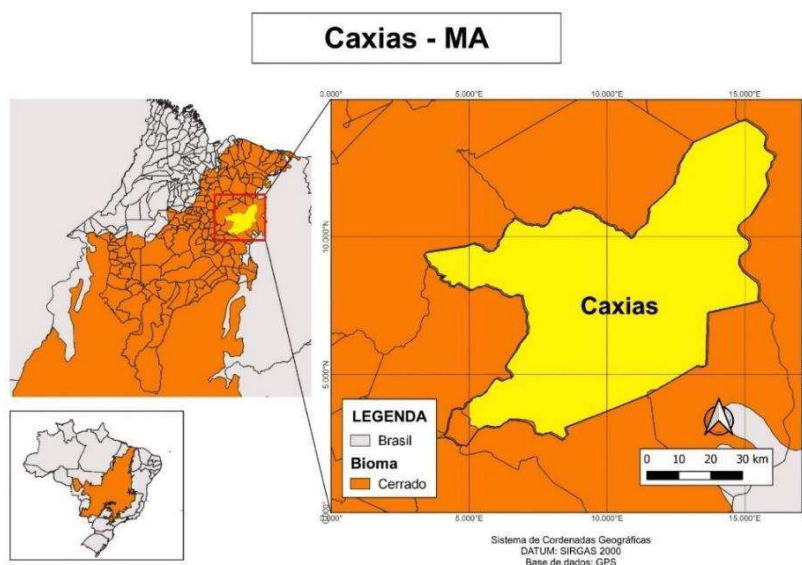
Calderón *et al.* (2019) capturaram 286 morcegos, em vários locais da Colômbia, e utilizando a técnica de RT-PCR detectaram em morcegos não hematófagos *C. perspicillata* e *Phyllostomus discolor* o sorotipo DENV-2.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Locais e períodos de captura dos morcegos

Os morcegos foram capturados no município de Caxias (Figura 5), que pertencem à Zona Fisiográfica do Itapecuru, situado na mesorregião do Leste Maranhense, com área de 5.313,2 km²; possui o clima subúmido seco, a sua fitofisionomia predominante é de Floresta Estacional Semidecidual com presença de babaçuais, com áreas onde predominam Cerrado e o cerrado (CONCEIÇÃO *et al.*, 2012).

Figura 5. Mapa do município de Caxias, Maranhão, onde foram realizadas as coletas de morcegos.



Fonte: GENBIMOL

A coleta, preparação e identificação do material biológico ocorreram como descritas por Brasil (2018). Foram realizadas nove expedições, com duração de três noites consecutivas, em pontos específicos, com durações de seis horas diárias de esforço (das 18h00min às 00h00min horas), onde as redes foram dispostas perto de abrigos (árvores, trilhas, na área externa, próximo a casas e prédios). A rede de neblina tem medidas de 3m de altura 6 a 12m de comprimento e malha de 25 mm.

As coletas noturnas foram realizadas de acordo com Greenhall e Paradiso (1968), obedecendo à fase lunar de pouca iluminação, fora de locais com muita iluminação artificial e com exposição de redes de neblina. As coletas diurnas foram realizadas de acordo com Bredt e Uieda (1996), onde foram visitados locais como forros de casas, forros de prédio e juntas de dilatação. A captura de morcegos em edificações aconteceu de forma manual, com auxílio de pinça de 30 cm, luvas de raspa de couro ou puçás.

Os morcegos foram acondicionados em sacos de panos e transportados ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular do CESC/UEMA (GENBIMOL) onde foram fotografados, medidos com o auxílio de paquímetro digital (300 mm-12'') e manual, identificados, pesados, sexados, verificados quanto à condição reprodutiva. Em seguida, foram ortotansados, com pentobarbital (Dolethal[®], Vetoquinol, Lure, França) após anestesia química (cetamina 10mg/kg de xilazina 1mg/kg) sob supervisão veterinária. Amostras de sangue, fígado, intestino, rins e coração foram coletadas assepticamente e armazenadas em tubos contendo RNAlater (Thermo Fisher Scientific, São Paulo, SP, Brasil) e acondicionadas a -80 °C para uso posterior. As coletas de morcegos foram realizadas mediante a autorização e licença concedida pelo ICMBIO/SISBIO (Número: 64666-1).

3.2 Identificação morfológica dos morcegos

Para identificação morfológica, visando destacar os caracteres diagnósticos taxonômicos das espécies, levaram-se em consideração sete caracteres externos, que foram plotados e analisados em uma planilha no EXCEL, a saber: coloração da pelagem, peso, medidas dos antebraços direito (AD), trago (T), orelha (O), pé (P), Cauda (C). As espécies foram identificadas com auxílio de bibliografia especializada (GREGORIN; TADDEI, 2002; REIS *et al.*, 2017), chaves restritas às famílias e gêneros e confirmada por especialistas.

3.3 Caracterização e identificação de flavivírus

As etapas de extração do RNA e da PCR foram realizadas no Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas e Marcadores Moleculares do CESC/UEMA (BEMMOL). O RNA total extraído do sangue, intestino, fígado, rins e coração dos morcegos usando o SV Total RNA Isolation System (Promega, São Paulo, Brasil) seguindo o protocolo do fabricante. O RNA viral foi transcrito em cDNA (RT-PCR), utilizando as sequências de *primers* (Tabela 1) e o reagentes da tabela 2. Os cDNA's, então, utilizados para a reação de amplificação por *nested*-PCR com as sequências dos primers da tabela 1 e os reagentes da tabela 2, para detectar flavivírus.

Tabela 1. Primers para amplificar sequências de flavivírus.

Primer	Sequência	pb	Referência
D1	5'-TCAATATGCTGAAACGCGGAGAAACCG-3'	511	
D2	5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-3'	511	
TS1	5'-CGTCTCAGTGATCCGGGGG-3'	482 (D1/TS1)	Lanciotti <i>et al.</i> (1992)
TS2	5'-CGCCACAAGGGGCCATGAACAG-3'	119 (D1/TS2)	
TS3	5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'	290 (D1/TS3)	
TS4	5'-CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA-3'	392 (D1/TS4)	
D1L	5'-TAGGTCATTGTGTCCTCACATAACTCTCC-3'	457 (D1/D1L)	
D2L	5'-CTTGTACGTGATTGTATCTTCACACA-3'	461 (D1/D2L)	de Thoisy <i>et al.</i> (2009)
D3L	5'-TTGTAAGTGACCGTGTGCATCACACAT-3'	460 (D1/D3L)	
D4L	5'-TCCATGGCAATGAGAGTGCATTTGTTGA-3'	424 (D1/D4L)	
cFD2	5'-GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC-3''	220	Kuno <i>et al.</i> (1998)
MA	5'-CATGATGGGRAARAGRARRAG-3'		
DJA	5'-TCCATCCCATACCTGCA-3'	413	Meiyu <i>et al.</i>
DJS	5'-GACATGGGGTATTGGAT-3'	413	(1997)

D1/D2 – Transcrição do RNA em cDNA, D1/TS1, D1/TS2, D1/TS3 e D1/TS4 - detecta os sorotipos da dengue DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, respectivamente. D1/D1L, D1/D2L, D1/D3L e D1/D4L - confirma os sorotipos da dengue, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, respectivamente. DJA/DJS e cFD2/MA - amplifica as regiões NS1 e NS5 (proteínas não-estruturais que estão correlacionadas com a infecção e replicação do flavivírus da dengue, febre amarela e zika), respectivamente.

Tabela 2. Reagentes utilizados na transcrição reversa do RNA viral para cDNA e na reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para detecção dos sorotipos da dengue e das regiões NS1 e NS5.

Reagentes	RT-PCR (volume/reacção)	<i>nested</i> -PCR (volume/reacção)
Água livre de nucleases	8µL	6,25µL
Iniciador (100µM)	0,75µL	0,75µL
Iniciador (100µM)	0,75 µL	---
Iniciador (100µM)	---	0,75µL
GoScript™ Reverse Transcriptase ¹	0,5µL	---
PCR Master Mix ¹ 2x	12,5µL	12,5µL
RNA viral	2,5µL	---
cDNA da RT-PCR	---	2,5µL

¹Promega, São Paulo, SP, Brasil

A Transcrição Reversa para obtenção do cDNA e em seguida a reação de *nested*-PCR para detecção do genoma viral foi adaptada de Lanciotti *et al.* (1992), na qual primeira etapa de RT-PCR, objetivando conversão em cDNA e a amplificação do material genético, foram levados para o Termociclador automático e submetidos a seguinte ciclagem: um ciclo inicial de 45 °C, durante 45 min; seguido de um ciclo de 92 °C - para inativação da enzima de transcriptase, em seguida 30 ciclos de 94 °C/35 seg, 56 °C/1 min, 72 °C/2 min e extensão final de 72 °C/10 min, com redução de temperatura para 4 °C ao final da reação. Posteriormente se deu o processo de *nested*- PCR, no qual, os tubos foram levados ao Termociclador e a reação ocorreu nas seguintes condições: 20 ciclos de 94 °C/30 seg, 55 °C/1 min, 72 °C/2 min e extensão final de 72 °C/10 min, com redução de temperatura para 4 °C ao final da reação.

Os amplicons formados foram observados por meio de eletroforese em gel de agarose a 3% em tampão TBE 0,5X (Tris-borato-EDTA - [100mM Tris-base; 2,0 mM desolução 0,5 EDTA (pH 8,0) e 50 mM ácido bórico]) a 90 Volts durante 1h e 30 min. Paravisualização do DNA foi adicionado corante de Brilliant Green Plus, NEOBIO ao gel de agarose. Um total de 7 μ L de *nested*-PCR foi adicionada ao gel na presença de 5 μ L de tampão (Blue/Orange 6X LoadingDye). A comparação do tamanho do amplicon foi realizada mediante marcador de 50pb DNA Ladder, PROMEGA, a observação dos resultados foi realizada no Transiluminador UVTrans, e fotografado para a documentação dos resultados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Dados morfológicos

Durante as nove expedições, nos anos de 2019, 2020 e 2021, foram capturados 77 espécimes de morcegos no município de Caxias, nos Bairros Centro (quatro coletas), Caldeirões (uma coleta), Três Corações (duas coletas), Cangalheiro (uma coleta) e Inhamun (uma coleta). Os 77 espécimes de morcegos capturados foram identificados dentro de quatro famílias e dez espécies: família Molossidae, *Molossus rufus* (E. Geoffroy, 1805) e *M. molossus* (Pallas, 1766); família Phyllostomidae, *Glossophaga soricina* (Pallas, 1766); *Carollia perspicillata* (Linnaeus, 1758), *Anoura caudifer* (E. Geoffroy, 1805); *Phyllostomus hastus* (Pallas, 1767); *Artibeus cinereus* (Gervais, 1856); *Micronycteris minuta* (Gervais, 1856); família Emballonuridae, *Rhynchonycteris naso* (Wied-Neuwied, 1820); e a família Mormoopidae, *Pteronotus gymnonotus* (Natterer, 1843) (Tabela 3).

Tabela 3. Código dos espécimes, espécies, hábitos alimentares e locais de coleta dos morcegos capturados em áreas do município de Caxias, Maranhão.

Nº	CÓDIGO DOS ESPÉCIMES DE MORCEGOS	ESPÉCIES	HÁBITOS ALIMENTARES	LOCAL DE COLETA
1	IIPCD 1 ¹	<i>Carollia perspicillata</i>	Frugívora	APA do Inhamun
2	IIPCD 2	<i>C. perspicillata</i>	Frugívora	APA do Inhamun
3	IIPCD 3	<i>C. perspicillata</i>	Frugívora	APA do Inhamun
4	IIPCD 4	<i>C. perspicillata</i>	Frugívora	APA do Inhamun
5	IIPCD 5	<i>C. perspicillata</i>	Frugívora	APA do Inhamun
6	IIPCD 6	<i>Glossophaga soricina</i>	Nectarívora	APA do Inhamun
7	IIPCD 7	<i>C. perspicillata</i>	Frugívora	APA do Inhamun
8	IIPCD 8	<i>C. perspicillata</i>	Frugívora	APA do Inhamun
9	IIPCD 9	<i>C. perspicillata</i>	Frugívora	APA do Inhamun
10	IIPCD 10	<i>C. perspicillata</i>	Frugívora	APA do Inhamun
11	IIPCD 11	<i>Pteronotus gymnonotus</i>	Insetívoro	APA do Inhamun
12	IIPCD 12	<i>Anoura caudifer</i>	Nectarívora	APA do Inhamun
13	IIPCD 13	<i>G. soricina</i>	Nectarívora	APA do Inhamun
14	IIPCD 22	<i>Rhynchonycteris naso</i>	Insetívoro	Caldeirões
15	IIPCD 23	<i>R. naso</i>	Insetívoro	Caldeirões
16	IIPCD 24	<i>Micronycteris minuta</i>	Insetívoro	Caldeirões
17	IIPCD 25	<i>Phyllostomus hastus</i>	Insetívoro	Caldeirões
18	IIPCD 26	<i>C. perspicillata</i>	Frugívora	Caldeirões
19	IIPCD 27	<i>P. hastus</i>	Insetívoro	Caldeirões
20	IIPCD 28	<i>Artibeus cinereus</i>	Frugívora	Caldeirões
21	IIPCD 29	<i>P. hastus</i>	Insetívoro	Caldeirões
22	IIPCD 30	<i>C. perspicillata</i>	Frugívora	Caldeirões
23	IIPCD 31	<i>C. perspicillata</i>	Frugívora	Caldeirões
24	IIPCD 32	<i>C. perspicillata</i>	Frugívora	Caldeirões
25	IIPCD 38	<i>Molossus molossus</i>	Insetívoro	Centro
26	IIPCD 39	<i>R. naso</i>	Insetívoro	Caldeirões
27	IIPCD 45	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Centro
28	IIPCD 53	<i>Molossus rufus</i>	Insetívoro	Centro

29	IIPCD 64	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Centro
30	CUMA01 ²	<i>M. rufus</i>	Insetívoro	Centro
31	CUMA 02	<i>M. rufus</i>	Insetívoro	Centro
32	CUMA 05	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Três Corações
33	CUMA 06	<i>M. rufus</i>	Insetívoro	Três Corações
34	CUMA 07	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Três Corações
35	CUMA 08	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Três Corações
36	CUMA 09	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Três Corações
37	CUMA 10	<i>M. rufus</i>	Insetívoro	Três Corações
38	CUMA 11	<i>M. rufus</i>	Insetívoro	Três Corações
39	CUMA 24	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Centro
40	CUMA 25	<i>M. rufus</i>	Insetívoro	Centro
41	CUMA 26	<i>M. rufus</i>	Insetívoro	Centro
42	CUMA27	<i>M. rufus</i>	Insetívoro	Centro
43	CUMA 28	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Centro
44	CUMA29	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Centro
45	CUMA30	<i>M. rufus</i>	Insetívoro	Centro
46	CUMA31	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Centro
47	CUMA 32	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Centro
48	CUMA33	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Centro
49	CUMA 34	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Centro
50	CUMA35	<i>M. rufus</i>	Insetívoro	Centro
51	CUMA36	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Centro
52	CUMA37	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Centro
53	CUMA 38	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Centro
54	CUMA 39	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Centro
55	CUMA40	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Centro
56	CUMA 41	<i>M. rufus</i>	Insetívoro	Centro
57	CUMA 42	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Centro
58	CUMA 44	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Três Corações
59	CUMA 45	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Três Corações
60	CUMA 46	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Três Corações
61	CUMA 47	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Três Corações
62	CUMA 48	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Três Corações
63	CUMA 49	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Três Corações
64	CUMA 50	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Três Corações
65	CUMA51	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Centro
66	CUMA 132	<i>G. soricina</i>	Nectarívora	Centro
67	CUMA 133	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Caldeirões
68	CUMA 134	<i>M. rufus</i>	Insetívoro	Caldeirões
69	CUMA 135	<i>M. rufus</i>	Insetívoro	Caldeirões
70	CUMA 136	<i>M. rufus</i>	Insetívoro	Caldeirões
71	CUMA 137	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Caldeirões
72	CUMA 138	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Caldeirões
73	CUMA 139	<i>M. rufus</i>	Insetívoro	Caldeirões
74	CUMA 140	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Caldeirões
75	CUMA 141	<i>M. molossus</i>	Insetívoro	Caldeirões
76	CUMA 142	<i>M. rufus</i>	Insetívoro	Caldeirões
77	CUMA 143	<i>G. soricina</i>	Nectarívora	Centro

¹IIPCD (Segunda Coleta PROCAD) e numeração do armazenamento no GENBIMOL.

²CUMA (Morcego Coletado em Área Urbana do Maranhão) e numeração do armazenamento no GENBIMOL.

As características morfológicas dos morcegos coletados estão de acordo com a descrição na literatura para todas as espécies coletadas (FREEMAN, 1981; FABIÁN; MARQUES, 1989; GREGORIN, 2009; REIS *et al.*, 2017) (Tabela 4 e Figura 6).

Tabela 4. Características identificadas nas espécies de morcegos de ocorrência no município de Caxias Maranhão e comparadas com bibliografia especializada.

Espécies	Antebraço (mm)	Orelha (mm)	Cauda (mm)	Trago (mm)	Pé (mm)	Peso (g)	Coloração
<i>M. molossus</i>	46 - 52	12 - 13	31 - 38	4,0 - 5,0	10 - 11	27 - 30	*1
<i>M. rufus</i>	40 - 49	11 - 14	6,29 - 8	5,0 - 6,0	10 - 12	32,5 - 34,5	*2
<i>C. perspicillata</i>	39 - 40	17 - 19	7 - 14,5	5,5 - 7,0	10 - 12	10 - 15	*2
<i>G. soricina</i>	29 - 34	12-12,5	7	4 - 4,5	8 - 10	4 - 5	*3
<i>A. caudifer</i>	36	12	7	4	10	7	*3
<i>P. hastus</i>	81 -84	21 -27	16 - 20	9 - 10	21 - 22	82 - 88	*1
<i>A. cinereus</i>	42	14	Ausente	4	10	9	*3
<i>M. minuta</i>	35	20	12	5	9	5	*1
<i>R. naso</i>	37 - 39	11 - 13	11	3	7	3	*3
<i>P. gymnonotus</i>	51	15	20	4	11	10	*2

*1 Castanho escuro com dorso marrom avermelhado; *2 Castanho escuro com dorso preto ou castanho avermelhado; *3 Marrom acinzentado com a região ventral mais clara.

Figura 6. Espécies de morcegos capturados no município de Caxias, Maranhão. *M. rufus* (A), *M. molossus* (B), *G. soricina* (C), *R. naso* (D), *P. gymnonotus* (E), *P. hastatus* (F), *C. perspicillata* (G), *A. cinereus* (H) e *M. minuta* (I).



Fonte: Acervo GENBIMOL

A família Molossidae foi a mais abundante com 64,93% dos espécimes amostrados. *M. molossus* foi a espécie mais abundante com 42,86% desse gênero (Tabela5). Os espécimes *M. rufus* apresentaram uma coloração negra, a base do uropatágio recoberta de pelos, orelhas arredondadas e unidas na linha média sobre a cabeça, enquanto, à espécie *M. molossus*, sua pelagem apresentou coloração de castanho escuro, as orelhas arredondadas e unidas em uma linha média sobre a cabeça, corroborando com Freeman (1981) e Gregorin (2009).

Tabela 5. Espécies de morcegos de ocorrência no município de Caxias, Maranhão.

Família	Espécies	¹ N ^o	Abundância (%)
Molossidae	<i>M. molossus</i>	33	42,86
	<i>M. rufus</i>	17	22,07
Phyllostomidae	<i>C. perspicillata</i>	13	16,88
	<i>G. soricina</i>	4	5,19
	<i>A. caudifer</i>	1	1,29
	<i>P. hastus</i>	3	3,89
	<i>A. cinereus</i>	1	1,29
	<i>M. minuta</i>	1	1,29
Emballonuridae	<i>R. naso</i>	3	3,89
Mormoopidae	<i>P. gymnonotus</i>	1	1,29

¹N^o = número amostra

Os Molossideos têm demonstrado bastante sucesso quanto à adaptação em ambientes urbanos, devido à grande abundância de alimentos encontrados, pois a uma facilidade dos insetívoros na captura de seu alimento que são facilmente atraídos pelas iluminações públicas, como também, a sua grandeversatilidade no uso de abrigo, podendo ser encontrados em ocos de árvores de parques urbanos que possuem uma grande variedade de plantas, como também em casas abandonadas, sob pontes, telhas e forros (SCHOEMAN, 2015; REIS *et al.*, 2017; MELO *et al.*, 2021).

Nos estudos de Pacheco *et al.* (2010) e Carvalho *et al.* (2011) foi registrado a família Molossidae com maior abundância em ambientes urbanos. Carvalho *et al.* (2011) e Freitas *et al.* (2011), reforçam a predominância de espécies de morcegos insetívoros em ambientes urbanos devido a abundância de alimentos que são atraídos pela iluminação artificial, como também os que mais utilizam forro de casas como abrigo.

A família Phyllostomidae foi a mais rica em espécies, com 60% amostrados, sendo a espécie *C. perspicillata* a mais abundante com 16,88% (Tabela 5). Vários estudos vêm demonstrando a prevalência da família Phyllostomidae sobre as demais, pois essa família se destaca por ser a mais rica e diversa em espécies, e também pelo fato da urbanização aproximar a cidade à áreas de floresta, alterando a dinâmica de como os morcegos atuam com as suas interações tróficas (MELO *et al.*, 2021; CORREIA, 2021; BENVINDO-SOUZA *et al.*, 2021).

A abundância da espécie *C. perspicillata* é verificada em vários estudos, sendo uma das espécies de morcegos mais capturadas no Brasil, possivelmente devido a diversidade de recursos alimentares, principalmente os vegetais do gênero *Piper* ssp., por estes predominarem em sua dieta e pela abundância de insetos utilizados na sua complementação alimentar

(BERNARD, 2002; MARTINS *et al.*, 2014; REIS *et al.*, 2017; TORRES, 2018; LEAL, 2019).

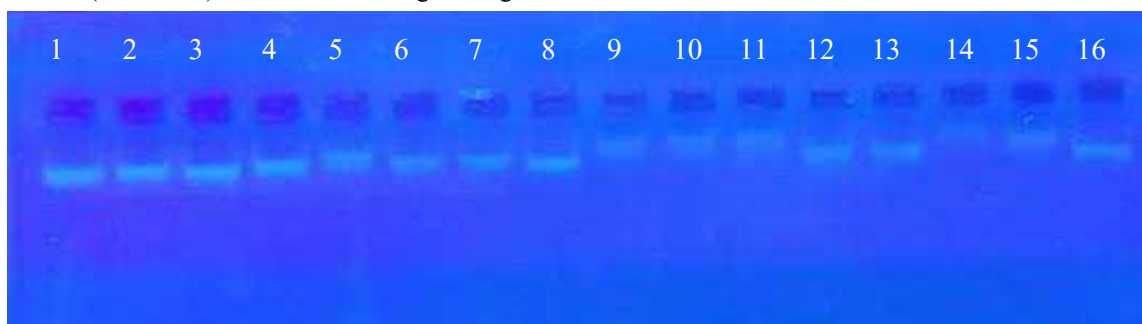
As espécies das famílias Emballonuridae e Mormoopidae são raramente encontradas em áreas urbanas (PACHECO *et al.*, 2010; REIS *et al.*, 2017; MELO *et al.*, 2021). A espécie *R. naso* é exclusivamente amostrada sobre cursos d'água, utilizando abrigos naturais, troncos secos, cascas de árvores, como também abrigos artificiais, pontes de madeira e pontes de metal (NOGUEIRA; POL, 1998; BORGES-JESÚS *et al.*, 2021). Já as espécies da família Mormoopidae se abrigam exclusivamente em cavernas, mantendo hábitos de seus ancestrais, ou seja, a falta desses abrigos pode ter influenciado a limitação da dispersão da espécie *P. gymnonotus* (BREDT *et al.*, 1999; MORGAN; CZAPLEWSKI, 2012; PAVAN; TAVARES, 2020).

4.2 Caracterização e identificação de flavivírus

No presente estudo, foram utilizadas as amostras biológicas de sangue, intestino, fígado, rins e coração de 77 espécimes de morcegos (totalizando 385 amostras biológicas).

Para alcançar os objetivos, primeiramente, avaliou-se a qualidade do RNA das amostras extraídas, devido a extração do RNA apresentar desafios para conservar a qualidade das suas moléculas e por ser de fácil degradação desde as etapas iniciais até sua quantificação (HOUSELEY; TOLLERVEY, 2009). Sendo assim, como método padrão de avaliação de qualidade, o RNA extraído, foi submetido a eletroforese submersa, em gel de agarose 1% (ASIF *et al.*, 2006; DASH, 2013; AHMAD, 2017), onde foi possível observar uma banda intacta e brilhante, o que demonstra que o RNA não sofreu degradação (Figura 7).

Figura 7. RNA total de amostras de fígado de 16 espécimes de morcegos capturados na área urbana de Caxias (Maranhão) e visualizadas em gel de agarose a 1%.



Todavia, das 385 amostras biológicas utilizadas apenas 23 amostras biológicas (5,97%) apontaram resultado positivo na detecção de RNA viral de flavivírus, mais precisamente para o genoma viral da dengue, sendo possível observar os respectivos tamanhos dos pares de bases associados a cada sorotipo dessa arbovirose, que foram obtidos com sequências de primers diferentes, sendo oito amostras positivadas para dengue com os respectivos D1-TS1, D1-TS2, D1-TS3 e D1-TS4 (Figura 8) e 15 amostras positivas para dengue com D1-D1L, D1-D2L, D1-D3L e D1-D4L (Figura 9, 10 e 11), em contrapartida com as outras sequências de primers não se obteve êxito na detecção das estruturas conservadas dos flavivirus NS1 e NS5 diferente do que foi experimentado por Scaramozzino *et al.* (2001), que em sua pesquisa, em amostras *in vitro*, obteve êxito na detecção destas.

Figura 8. Eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos de amplificação da *nested*-PCR dos *primers* D1-TS1, D1-TS2, D1-TS3 e D1-TS4 com amostras biológicas de morcegos capturados na área urbana de Caxias (Maranhão). Da esquerda para a direita: PM – Peso Molecular; 1 – IIPCD 01, 2 – IIPCD 03, 3 – IIPCD 04 e 4 – IIPCD 05 em vermelho com tamanhos próximos ao esperado entre 100 e 150 pb (DENV-2), 5 – IIPCD 06, 6 – IIPCD 06, 7 – IIPCD 07 e 8 – IIPCD 08 em amarelo com tamanhos próximos ao esperado entre 200 e 290 pb (DENV-3), 7 – IIPCD 07 e 8 – IIPCD 08 em branco com tamanhos próximos ao esperado entre 300 e 392 pb (DENV-4) e CN – Controle negativo.

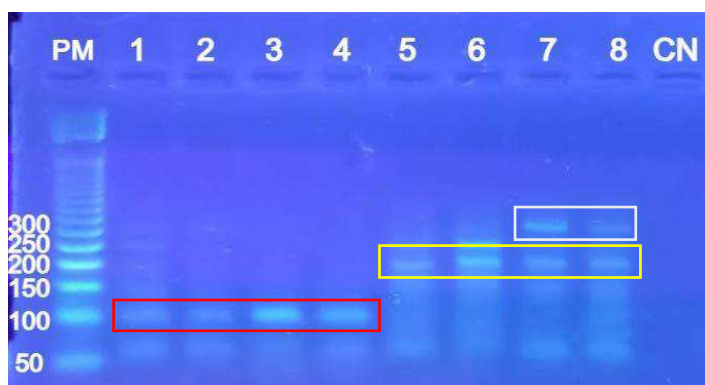


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos de amplificação da *nested*-PCR dos primers D1-D1L, D1-D2L, D1-D3L e D1-D4L com amostras biológicas de morcegos capturados na área urbana de Caxias (Maranhão). Da esquerda para a direita: PM – Peso Molecular; 1 – IIPCD 01, 3 – IIPCD 04 e 4 – IIPCD 05 em vermelho com tamanhos próximos ao esperado entre 100 e 150 pb (DENV-2), 5 – IIPCD 06, 6 – IIPCD 06, 7 – IIPCD 07 e 8 – IIPCD 08 em amarelo com tamanhos próximos ao esperado entre 200 e 290 pb (DENV-3).

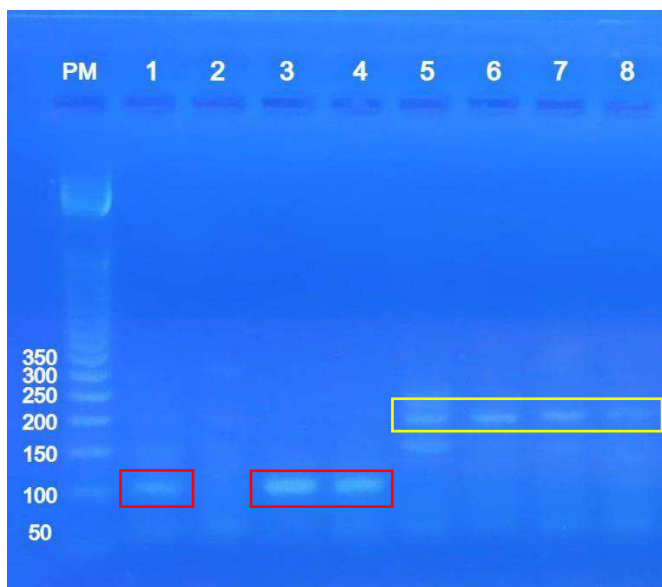


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos de amplificação da *nested*-PCR dos primers D1-D1L, D1-D2L, D1-D3L e D1-D4L com amostras biológicas de morcegos capturados na área urbana de Caxias (Maranhão). Da esquerda para a direita: 11 – IIPCD 11, 12 – IIPCD 11, 13 – IIPCD 12 e 14 – IIPCD 22 em vermelho com tamanhos próximos ao esperado entre 100 e 150 pb (DENV-2), 14 – IIPCD 22, 15 – IIPCD 23 em amarelo com tamanhos próximos ao esperado entre 200 e 290 pb (DENV-3), CN – Controle negativo, PM – Peso Molecular.

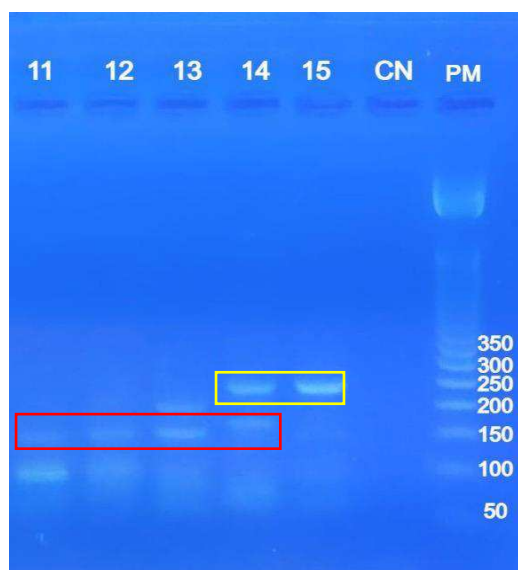
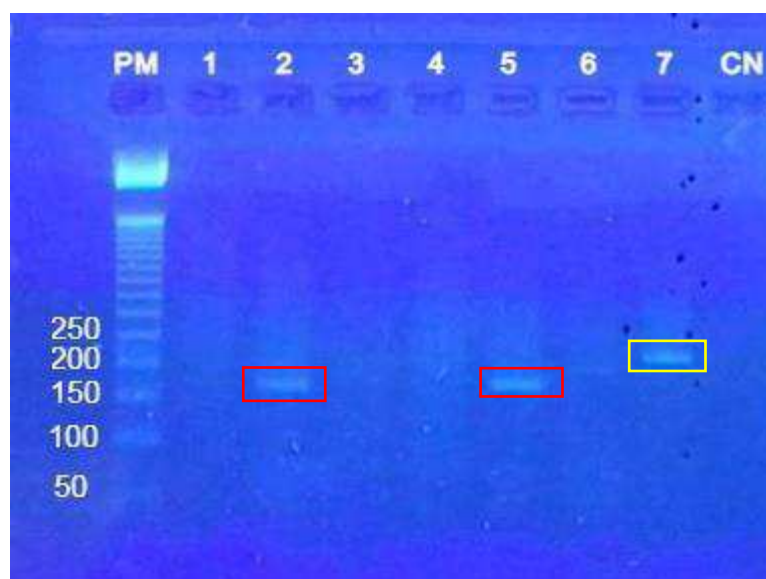


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos de amplificação da *nested*-PCR dos primers D1-D1L, D1-D2L, D1-D3L e D1-D4L com amostras biológicas de morcegos capturados na área urbana de Caxias (Maranhão). Da esquerda para a direita: PM – Peso Molecular, 2 – IIPCD 27, 5 – IIPCD 29 em vermelho com tamanhos próximos ao esperado entre 100 e 150 pb (DENV-2), 7 – IIPCD 38 em amarelo com tamanhos próximos ao esperado entre 200 e 290 pb (DENV-3), CN – Controle negativo.



A detecção viral com ambas as sequências de *primers* se mostrou promissor nos resultados e fortalece a evidência da presença desse vírus nas amostras de morcegos analisadas, pois estas visavam detectar o genoma viral da dengue. Portanto, o teste de RT-PCR desenvolvido por Lanciotti *et al.* (1992) pode ser considerado eficaz e específico para detecção da dengue, comotambém a sequência de *primers* desenvolvida por de Thoisy *et al.* (2009) em seu estudo, que testou em soros de animais capturados na Guiana Francesa durante vários períodos entre 2001 e 2007, e detectou RNAs virais dos quatro sorotipos de DENV.

Corroborando com vários estudo que já identificaram a presença do vírusda dengue em morcegos especificamente o sorotipo 2 (AGUILAR-SETIÉN *et al.*, 2008; THOISY *et al.*, 2009; SOTOMAYOR-BONILLA *et al.*, 2014; CALDERÓN *et al.*, 2019), como também a presença de mais de um sorotipo em um único espécime (VICENTE- SANTOS *et al.*, 2017) (Tabela 6). Entretanto mesmo com esses relatos da presença de dengue nos morcegos o seu potencial papel na circulação da infecção precisa ser completamente avaliado, pois com a possibilidade de transmissão do vírus entre ciclos silvestres e urbanos, acabam representando uma ameaça tanto para as populações humanas quanto para as de morcegos (COFFEY *et al.*, 2013).

Tabela 6. Sorotipos de *Flavivirus* encontrados em amostras biológicas de morcegos capturados no município de Caxias (MA).

ESPÉCIE	CÓDIGO	AMOSTRA	<i>Flavivirus</i>			
			DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4
<i>Carollia perspicillata</i>	IIPCD 01	Intestino	- ¹	x ²	-	-
	IIPCD 03	Intestino	-	x	-	-
	IIPCD 04	Fígado	-	x	-	-
	IIPCD 05	Fígado	-	x	-	-
	IIPCD 07	Coração	-	-	x	x
	IIPCD 08	Rim	-	-	x	x
<i>Glossophaga soricina</i>	IIPCD 06	Rim	-	-	x	-
		Fígado	-	-	x	-
<i>Pteronotus gymnotus</i>	IIPCD 11	Intestino	-	x	-	-
		Fígado	-	x	-	-
<i>Anoura caudifer</i>	IIPCD 12	Fígado	-	x	-	-
<i>Rhynchonycteris naso</i>	IIPCD 22	Fígado	-	x	x	-
	IIPCD 23	Fígado	-	-	x	-
<i>Phyllostomus hastus</i>	IIPCD 27	Fígado	-	x	-	-
	IIPCD 29	Fígado	-	x	-	-
<i>Molossus molossus</i>	IIPCD 38	Intestino	-	-	x	-

¹Amostra negativa para o sorotipo; ²Amostra positiva para o sorotipo

Devido ao aumento no tamanho efetivo da população, o DENV-2 é o genótipo mais relevante em termos epidemiológicos globais, seguido por DENV-3, DENV-1 e DENV-4 (COSTA; VOLOCH; SCHRAGO, 2012). Em um estudo realizado por Nunes *et al.* (2019) no Brasil o sorotipo predominante é o DENV-2, o que pode ser alarmante, tendo em vista que os mesmos autores relataram que a relação entre sorotipo e casos fatais em humanos também está relacionado a esse genótipo, DENV-2.

Na região Nordeste do Brasil, onde o clima é tropical, com temperaturas elevadas e chuvas propícias para a proliferação do vetor, a incidência da dengue é alta. Durante o período de 2002 a 2013, na capital São Luís, o DENV-2 esteve frequentemente associado a casos graves da doença e ao aumento das taxas de letalidade, e para Caxias, já se tem registro da circulação desse sorotipo (RODRIGUES *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2017; SOUSA *et al.*, 2021).

O resultado negativo para a detecção do vírus da febre amarela no presente estudo está corroborado por vários estudos nos quais os autores ainda não encontraram a partícula viral através de técnicas moleculares (FAGRE; KADING, 2019), porém no estudo de Kading *et al.* (2018), foi detectado anticorpos para a febre amarela. Este resultado pode ser explicado pelo fato de no Brasil possuir baixos níveis de transmissão dessa doença, onde no período de monitoramento

2022/2023 (julho a junho) 158 casos humanos suspeitos foram notificados e nenhum foi confirmado (BRASIL, 2023).

Com relação aos dados da Zika, ocorreram 9.204 casos prováveis no período de monitoramento 2022/2023 (julho a junho), destes, apenas 249 para o Maranhão (BRASIL, 2023). Estes dados indicam que o estado não está em um momento de surto para esta doença, dificultando uma possível infecção acidental dos morcegos próximos aos ciclos mosquito-homem em ambientes urbanos, em contrapartida, esse vírus já foi detectado em dois morcegos de Mérida, Yucatán, no México, quando foram submetidos à técnica de RT-PCR (TORRES-CASTRO *et al.*, 2021).

4.3 Avaliação dos achados epidemiológicos em morcegos

Os flavivírus de importância médica apresentam um desafio global devido às epidemias recorrentes, como por exemplo, do vírus da dengue (DENV), vírus da febre amarela (YFV), e o vírus Zika (ZIKV) (ONG, 2006; MENESES *et al.*, 2017; CARABALI *et al.*, 2018; RIBEIRO JUNIOR *et al.*, 2018), e diante disso o papel dos morcegos como hospedeiros e reservatórios de flavivírus é bastante estudado, devido a preocupações significativas em relação à transmissão e ao controle dessas doenças para populações humanas (SILVA *et al.*, 2022)

Somado a isso, os morcegos, por possuírem uma ampla distribuição geográfica e ecológica além de compartilharem uma série de características fisiológicas e imunológicas com os seres humanos, pertencentes à classe Mammalia, estão presentes em áreas onde os flavivírus são endêmicos, tornando-os possivelmente suscetíveis à infecção e disseminação do vírus para vetores artrópodes o que se faz notório o interesse em elucidar o seu papel como reservatório de doenças entre elas virais (MORATELLI; CALISHER, 2015).

Entender como os morcegos lidam com a infecção viral e como acontece a persistência e transmissão destas, podem trazer informações valiosas para o desenvolvimento de estratégias de controle e prevenção, pois os morcegos por possuírem características únicas, como a capacidade de voar, que é uma característica que tem sido relacionada à resposta imune dos morcegos, uma vez que o voo é uma atividade que gera altas temperaturas corporais, as quais podem se assemelhar aos efeitos adversos causados pelas infecções virais, como a febre. Essa característica tornaria os morcegos mais tolerantes a essas infecções em comparação com outros mamíferos (WEINBERG; YOVEL, 2022).

Nesse sentido, para Fagre e Kading (2019), mesmo com a detecção de RNA viralem morcegos não necessariamente implica que estes estejam de fato servindo como reservatório, mas que possa funcionar ocasionalmente como um hospedeiro acidental, mesmo com proposições os colocando como reservatórios naturais de vírus que causam doenças graves em humanos, como o Nipah (NiV) e o Hendra (HeV) no Sudeste Asiático e Austrália, os vírus Ebola e Marburg na África, o SARS-CoV na Ásia e o MERS-CoV no Oriente Médio (HAN *et al.*, 2015). Identificar a viremia envolve desafios consideráveis.

A metodologia utilizada para detectar o genoma do flavivírus nos morcegos, a técnica de RT-PCR, possui várias vantagens em comparação com outras técnicas, como técnicas sorológicas, pois ela permite a identificação e diferenciação dos sorotipos presentes em um determinado foco de infecção, sendo amplamente utilizada, reconhecida e validada, tornando-se uma ferramenta bastante útil na Vigilância Epidemiológica no caso do diagnóstico de doenças causadas por vírus de RNA (ZHANG *et al.*, 1998, de THOISY *et al.*, 2009, ABUNDES-GALLEGOS *et al.*, 2017, CALDERÓN *et al.*, 2019). Nessa perspectiva, os resultados positivos coincidem com o relatado por esses pesquisadores.

A circulação das espécies de flavivírus em morcegos no país possui poucas evidências, onde no estudo de Franco filho *et al.* (2023), 40 morcegos testados foram detectados DENV-4 em 4 amostras, diferente do estudo realizado por Bittar *et al.* (2018), que de 103 morcegos testados, todos foram negativos. Assim, o presente achado vem a colaborar com essas possíveis lacunas de conhecimento que ainda existem em relação à detecção do genoma do flavivírus em morcegos.

5 CONCLUSÃO

Os dados morfológicos registraram para áreas urbanas do município de Caxias uma grande diversidade de quirópteros, sendo a família Molossidae com maior número de espécimes e espécie, com destaque para a espécie *M. molossus* que foi a mais abundante.

Na detecção de RNA viral, foram identificados resultados positivos para flavivírus em morcegos. Especificamente, 23 amostras apresentaram resultado positivo para o genoma viral da dengue, sendo o sorotipo 2 (DENV-2) o mais detectado, corroborando com diversos estudos que têm relatado a detecção do vírus da dengue em morcegos, especialmente do sorotipo 2.

Assim, a pesquisa deve ser continuada, para um constante monitoramento, pois os flavivírus de importância médica representam um desafio global significativo devido às epidemias recorrentes que ocorrem em diversas regiões do mundo além da capacidade desses vírus de se espalharem rapidamente e se adaptarem a diferentes ambientes e hospedeiros tornando o controle e prevenção dessas doenças um desafio complexo e continuado.

Contudo, é importante não esquecer do papel essencial que os morcegos desempenham no ecossistema. A detecção viral em morcegos não implica necessariamente que eles sejam hospedeiros dos vírus, mas sim que possam estar em possível contato com os agentes infecciosos. Portanto, é crucial adotar abordagens científicas com uma visão abrangente para melhor compreender essa relação entre morcegos e vírus, levando em consideração não apenas o risco de transmissão, mas também os benefícios que esses animais oferecem para o meio ambiente.

REFERÊNCIAS

- ABUNDES-GALLEGOS, J.; SALAS-ROJAS, M.; GALVEZ-ROMERO, G.; PEREA-MARTÍNEZ, L. *et al.* Detection of dengue virus in batflies (Diptera: Streblidae) of common vampire bats, *Desmodus rotundus*, in Progreso, Hidalgo, Mexico. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 18, p. 70-73, 2017.
- AGUILAR-SETIÉN, Á.; ROMERO-ALMARAZ, M. L.; SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, C.; FIGUEROA, R. *et al.*, Dengue virus in Mexican bats. **Epidemiology and Infection**, v. 136, p. 1678–1683, 2008.
- AHMAD, J.; BAIG, MA.; ALI AA.; AL-HUQAIL, A. *et al.* Comparative assessment of four RNA extraction methods and modification to obtain high-quality RNA from *Parthenium hysterophorus* leaf. **3 Biotech**, v. 373, p. 7, 2017.
- ALCON, S.; TALARMIN, A.; DEBRUYNE, M.; FALCONAR, A. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent Assay specific to dengue virus type 1 non-structural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 376–381, 2002.
- ALLOCATI, N.; PETRUCCI, A. G.; DIGIOVANNI, P.; MASULLI, M. *et al.* Bat–man disease transmission: zoonotic pathogens from wild life reservoirs to human populations. **Cell Death Discov**, v. 2, p. 1-8, 2016.
- ARAÚJO, G. C. A.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; VASCONCELOS, H. B.; NUNES, M. R. T. *et al.* Sorotipos de dengue isolados no Instituto Evandro Chagas no ano de 2002. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 36, (supl.1), 2003.
- ASIF, M.; TRIVEDI, P.; SOLOMOS, T. *et al.* Isolation of high-quality RNA from apple (*Malus domestica*) fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54, p. 5227–5229, 2006.
- BENVINDO-SOUZA, M.; SANTOS, L. R. de S.; BORGES, R. E.; ASSIS, R. A. de. *et al.* Thousands of bats: A portrait of the chiropteran fauna of Palmas city, Central Brazil. **Austral Ecology**, v. 46, p. 876-879, 2021.
- BERNARD, E. Diet, activity and reproduction of bat species (Mammalia, Chiroptera) in Central Amazonia, Brazil. **Revista brasileira de zoologia**, v. 19, p. 173-188, 2002.
- BERNARD, E. **Uma análise de horizontes sobre a conservação de morcegos no Brasil. Mamíferos do Brasil: genética, sistemática, ecologia e conservação**, v. 2, p. 19- 35, 2012.
- BITTAR, C.; MACHADO, R. R. G.; COMELIS, M. T.; BUENO, L. M. *et al.* Lack of serological and molecular evidence of arbovirus infections in bats from Brazil. **PLoS ONE**, v. 13, p. 1-10, 2018.
- BORGES-JESÚS, K. P.; CÚ-VIZCARRA, J. D.; ESCALONA-SEGURA, G.; VARGAS-COENTRAS, J. A. Refugios diurnos del murciélago *Rhynchonycteris naso* (Chiroptera: Emballonuridae) em Laguna de Términos, Campeche, México. **Revista de biología tropical**, v. 69, p. 274-290, 2021.

BOYER, S.; CALVEZ, E.; CHOUIN-CARNEIRO, T.; DIALLO, D. *et al.* An Overview of Mosquito Vectors of Zika Virus. **Microbes and Infection**, v. 20, p. 646–60, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Emergência epidemiológica de febre amarela no Brasil, no período de dezembro de 2016 a julho de 2017. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, p. 1-22, 2017. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/06/2017_027.pdf>. Acesso em: 25 jan. 20.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49 de 2018. **Boletim Epidemiológico**, v. 49, p. 1-14, 2018. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/02/2018-067.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 20.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 52 de 2018a. **Boletim Epidemiológico**, v. 50, p. 1-8, 2019. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/marco/22/2019-001.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 20.

BRASIL. Secretaria estadual de saúde. Centro Estadual de Vigilância em Saúde. **Guia de Manejo e Controle de Morcegos: técnicas de Identificação Capturas e Coletas**. Porto Alegre, CEVS/RS, 2018.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), Semana Epidemiológicas 01 a 34, 2020. **Boletim Epidemiológico**, v. 51, p. 1-17, 2020a. Disponível em: <<https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/September/11/Boletim-epidemiologico-SVS-36.pdf>>. Acesso em: 25 ago. 20.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Tentativas e suicídios na população idosa do Brasil. **Boletim Epidemiológico**, v. 51, p. 1-30, 2020b. Disponível em: <<https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/September/24/Boletim-epidemiologico-SVS-38.pdf>>. Acesso em: 08 fev. 21.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 52, 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no1.pdf/view>>. Acesso em: 14 jan. 22.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 49 de 2022. **Boletim Epidemiológico**, v. 53, p. 1-36, 2022a. Disponível em: [boletim-epidemiologico-vol-53-no43\(www.gov.br\)](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no43). Acesso em: 20 dez. 22.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação

epidemiológica da síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika: Brasil, 2015a 2022, até a SE 31. v. 53, p. 1-14, 2022b. Disponível em: [boletim-epidemiologico-SVS-35-2022.pdf](#) (saude.gov.br). Acesso em: 04 ago 23.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 52 de 2022. **Boletim Epidemiológico**, v. 54, p. 1-14, 2023. Disponível em: www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2023/boletim-epidemiologico-volume-54-no-01/#:~:text=Até a SE 52 de,para o mesmo período analisado.>. Acesso em: 04 jul 23.

BREDT, A.; UIEDA, W. Bats from urban and rural environments of the Distrito Federal, mid-western Brazil. **Chiroptera Neotropical**, v.2, p. 54-57, 1996.

BREDT, A.; ARAUJO, F. A. A.; CAETANO Jr.; RODRIGUES, M. G. R. *et al.* Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle. Brasília. Ministério da Saúde/Fundação nacional de saúde, 117p, 1996.

BREDT, A.; UIEDA, W.; MAGALHÃES, E. D. Morcegos cavernícolas da região do Distrito Federal, centro-oeste do Brasil (Mammalia, Chiroptera). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, p. 731-770, 1999.

CALDERÓN, A.; GUSMÁN, C.; MATTER, S.; RODRIGUEZ, V. *et al.* Dengue virus in bats from Córdoba and Sucre, Colombia. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 19, p. 747-751, 2019.

CALISHER, C. H.; CHILDS J. E.; FIELD H. E.; HOLMES K.V. *et al.* Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, p. 531-545, 2006.

CARABALI, M.; AUSTIN, N.; KING, N. B.; KAUFMAN, J. S. The Zika epidemic and abortion in Latin America: a scoping review. **Global Health Research and Policy**, v. 3, p. 1-9, 2018.

CARVALHO, C. D.; GONÇALES, J. F.; FRANCO, R.; CASAGRANDE, D. K. *et al.* Caracterização da fauna de morcegos (Mammalia, Chiroptera) e ocorrência de vírus rábico na região noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, p. 490-503, 2011.

CHAMBERS, T. J.; HAHN, C.S.; GALLER, R.; RICE, C. M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 649-688, 1990.

COOK, S.; HOLMES, E. C. A multigene analysis of the phylogenetic relationships among the flaviviruses (Family: Flaviviridae) and the evolution of vector transmission. **Archives of Virology**, v.151, p. 309-325, 2006.

COOK, S.; MOUREAU, G.; KITCHEN, A.; GOULD, E. A. *et al.* Molecular Evolution of the Insect-specific Flaviviruses, **Journal of General Virology**, v. 93, p. 223–34, 2012.

COFFEY, L. L.; FORRESTER, N.; TSETSARKIN, K.; VASILAKIS, N. *et al.* Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. **Future microbiology**, v. 8, p. 155-176, 2013.

CONCEIÇÃO, G. M.; RUGGIERI, A. C.; GUIMARÃES, E. R. Melastomataceae da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Revista de Biologia e Farmácia**. v. 4, n. 2, p. 83-88, 2012.

CORREIA, L. L.; ARCANJO, J. A. de.; PALHETA, L. R.; VIEIRA, T. B. The effect of land use on the richness and composition of species and trophic guilds of bats (Mammalia, Chiroptera) in the urban area of Altamira – PA. **Preprints**, v. 1, p. 1-14, 2021

COSTA, C. A.; SANTOS, I. G. C.; BARBOSA, M. G. Detecção e tipagem de vírus dengue em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) na cidade de Manaus, estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 677-681, 2009.

COSTA, R. L.; VOLOCH, C. M.; SCHRAGO, C. G. Comparative evolutionary epidemiology of dengue virus serotypes. **Infect Genet Evol**, v. 12, p. 309-314, 2012.

DASH, P. K. High quality RNA isolation from ployphenol-, polysaccharide- and protein-rich tissues of lentil (*Lens culinaris*). **3 Biotech**. v. 3, p. 109–114, 2013.

DEL CAMPO, M.; FEITOSA, I. M.; RIBEIRO, E. M.; HOROVITZ, D.D.; *et al.* Zika Embryopathy Task Force-Brazilian Society of Medical Genetics ZETF-SBGM. The phenotypic spectrum of congenital Zika syndrome. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 173, p. 841-857, 2017.

de THOISY, B.; LACOSTE V.; GERMAIN, A.; MUÑOZ-JORDÁN, J. *et al.* Dengue infection in neotropical forest mammals. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, p.157-70, 2009.

DIPTYANUSA, A.; HERINI, E. S.; INDARJULIANTO, S.; SATOTO, T. B. T. The detection of Japanese encephalitis virus in Megachiropteran bats in West Kalimantan, Indonesia: A potential enzootic transmission pattern in the absence of pig holdings. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 14, p. 280-286, 2021

ESTEBAN, D. Virus evolution. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY P.M. (Eds.) *Fields virology*, 5 ed., v. 1, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, Cap. 12, p. 389-418, 2007.

FAGRE, A. C.; KADING, R. C. Can Bats Serve as Reservoirs for Arboviruses? **Viruses**, v. 11, p. 1-25, 2019.

FAPESP. **Pesquisador alerta para risco de surgirem novos sorotipos de Zika**. 2017. Disponível Em: <http://agencia.fapesp.br/pesquisador_alerta_para_risco_de_surgirem_novos_sorotipos_de_zika/26054/>. Acesso em: 25 jan. 20.

- FABIÁN, M. E.; MARQUES, R. V. Contribuição ao conhecimento da biologia reprodutiva de *Molossus molossus* (Pallas, 1766) (Chiroptera, Molossidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 6, p. 603 – 610, 1989.
- FRANCO FILHO, L. C.; BARATA, R. R.; COELHO, M. S.; CARDOSO, J. F. *et al.* Genome sequencing of dengue virus serotype 4 in a bat brain sample (*Platyrrhinus helleri*) from the Brazilian Amazon. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 109, 105407, 2023.
- FIGUEIREDO, R. M. P.; THATCHER, B. D.; LIMA, M. L.; ALMEIDA T. C. *et al.* Doenças exantemáticas e primeira epidemia de dengue ocorrida em Manaus, Amazonas, no período de 1998-1999. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 476-479, 2004.
- FIGUEIREDO, L. T. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 224-229, 2007.
- FIGUEIREDO R. M. P. Caracterização molecular e epidemiológica dos vírus dengue no estado do Amazonas, Brasil. 2008. 147f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Human Urban Arboviruses Can Infect Wild Animals and Jump to Sylvatic Maintenance Cycles in South America. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 1-7, 2019.
- FREEMAN, P. W. A multivariate study of the family Molossidae (Mammalia, Chiroptera): morphology, ecology, evolution. **Fieldiana Zoology**, v. 7, p. 1–173, 1981.
- FREITAS, G. P.; COSTA, L. M.; LUZ, J. L.; CARVALHO, W. D. *et al.* Segundo registro de *Molossops neglectus* William & Genoways, 1980 (Molossidae) para o estado do Rio de Janeiro. **Chiroptera Neotropical**, v. 17, p. 989-992, 2011.
- GAUNT, M. W.; PETTERSSON, J. H-O.; KUNO, G.; GAUNT, B. *et al.* Widespread interspecific phylogenetic tree incongruence between mosquito-borne and insect-specific flaviviruses at hotspots originally identified in Zika vírus. **VirusEvolution**, v.8, p. 1-17, 2022.
- GARBINO, G. S. T.; GREGORIN, R.; LIMA, I. P. *et al.* 2020 **Updated checklist of Brazilian bats: versão 2020**. Comitê da Lista de Morcegos do Brasil/Sociedade Brasileira para o Estudo de Quirópteros. Disponível em: [https:// www.sbeq.net/lista-de-especies](https://www.sbeq.net/lista-de-especies). Acesso em: 18 de fevereiro de 2023.
- GARBINO, G. S. T.; GREGORIN, R.; LIMA, I. P. *et al.* 2022. **Updated checklist of Brazilian bats: versão 2020**. Comitê da Lista de Morcegos do Brasil—CLMB. Sociedade Brasileira para o Estudo de Quirópteros (Sbeq). <<https://www.sbeq.net/lista-de-especies>>. Acessado em: 18 de fevereiro de 2023.
- GAUNT, M. W.; GUBLER, D. J.; PETTERSSON, J. H-O.; KUNO, G. *et al.* Recombination of B- and T-cell Epitope-rich Loci from Aedes- and Culex-borne Flaviviruses Shapes Zika Virus Epidemiology, **Antiviral Research**, v. 174, p. 104676, 2020.
- GAUNT, M. W.; SALL, A. A.; LAMBALLERIE, X.; FALCONAR, A. K. I. *et al.* Phylogenetic Relationships of Flaviviruses Correlate with Their Epidemiology, Disease

Association and Biogeography, **Journal of General Virology**, v. 82, p. 1867–76, 2001.

GOES, L. G. B.; CAMPOS, A. C. A.; CARVALHO, C.; AMBAR, G. *et al.* Genetic diversity of bats coronaviruses in the Atlantic Forest hot spot biome, Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 44, p. 510–513, 2016.

GOULD, E. A.; LAMBALLERIE, X.; ZANOTTO, P. M. A.; HOLMES, E. C. Evolution, Epidemiology, and Dispersal of Flaviviruses Revealed by Molecular Phylogenies, **Advances in Virus Research**, v. 57, p. 71–103, 2001.

GREENHALL, A. M.; PARADISO, J. L. **Bats and bat banding**. Washington, DC, Bureau of Spon Fisheries and Wildl, 47p, 1968.

GREGORIN, R.; TADDEI, V. A. Chave artificial para a identificação de molossídeos brasileiros (Mammalia, Chiroptera). **Mastozoologia Neotropical**, v. 9, p. 13-32, 2002.

GREGORIN, R. Phylogeny of *Eumops* Miller, 1906 (Chiroptera: Molossidae) using morphological data. **Acta Chiropterologica**, v. 11, p. 247–258, 2009.

HEUKELBACH, J.; ALENCAR, C. H.; KELVIN, A. A.; OLIVEIRA, W. K. *et al.* Zika virus outbreak in Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, p. 116-120, 2016.

HOLLIDGE, B. S.; WEISS, S. R.; SOLDAN, S. S. The role of interferon antagonist, non-structural proteins in the pathogenesis and emergence of arboviruses. **Viruses**, v. 3, p. 629-658, 2011.

HOUSELEY, J.; TOLLERVEY, D. The Many Pathways of RNA Degradation. *Cell*, v. 136, p. 763-776, 2009.

HUANG, Y. J. S.; HIGGS, S.; HORNE K. M.; VANLANDINGHAM D. L. Flavivirus-Mosquito Interactions. **Viruses**, v. 6, p. 4703-4730, 2014.

HUHTAMO, E.; PUTKURI, N.; KURKELA, S.; MANNI, T. *et al.* Characterization of a Novel Flavivirus from Mosquitoes in Northern Europe that Is Related to Mosquito-borne Flaviviruses of the Tropics, **Journal of Virology**, v. 83, p. 9532–40, 2009.

HUHTAMO, E.; COOK, S.; MOUREAU, G.; UZCÁTEGUI, N. Y. *et al.* Novel flaviviruses from mosquitoes: Mosquito-specific evolutionary lineages within the phylogenetic group of mosquito-borne flaviviruses. **Virology**, v. 464-465, p. 320-329, 2014.

KADING, R. C.; KITYO, R. M.; MOSSEL, E. C.; BORLAND, E. M. *et al.* Neutralizing antibodies against flaviviruses, Babanki virus, and Rift Valley fever virus in Ugandan bats. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 8, p. 1-7, 2018.

- KOŁODZIEJEK, J.; PACHLER, K.; BIN, H.; MELDELSON, E. *et al.* Barkedji Virus, a Novel Mosquito-borne Flavivirus Identified in *Culex Perexiguus* Mosquitoes, Israel, 2011, **Journal of General Virology**, v. 94, p. 2449–57, 2013.
- KRAEMER, M. U. G.; SINKA, M. E.; DUDA, K. A.; MYLNE, A. Q. N. *et al.* The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **elife**, v. 4, p. 1-18, 2015.
- KUNO, G.; CHANG, G. J.; TSUCHIYA, K. R.; KARABATSOS, N. *et al.* Phylogeny of the genus *Flavivirus*. **Journal of Virology**, v. 72, p. 73–83, 1998.
- LANCIOTTI, R. S.; CALISHER, H. C.; GUBLER, D. J.; CHANG, G. J. *et al.* Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcription-polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 545–551, 1992.
- LEAL, E. S. B.; FILHO, D. de Q. G.; RAMALHO, D. de F.; SILVA, J. M. da. *et al.* Fauna de Morcegos (Chiroptera) em ambiente urbano na Floresta Atlântica, Nordeste do Brasil. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 14, p. 55-82, 2019.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advance of Virus Research**, v.59, p. 23-61, 2003.
- LINDENBACH, D. B.; THIEL, H. J.; RICE, C. M. Flaviviridae: The viroses and their Replication. **Fields virology**, Philadelphia, USA, v.1, p. 1101-1152, 2007.
- LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiológicas dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, p. 55-64, 2014.
- MARTINS, M. P. V.; TORRES, J. M.; ANJOS, E. A. C. do. Dieta de morcegos filostomídeos (Mammalia, Chiroptera, (Phyllostomidae) em fragmento urbano do Instituto São Vicente, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 54, p. 299-305, 2014.
- MAYER, S. V.; TESH, R. B.; VASILAKIS, N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. **Acta tropica**, v.166, p. 155-163, 2017.
- MEIYU, F.; HUOSHENG, C.; CUIHUA, C.; XIAODONG, T. *et al.* Detection of flaviviruses by reverse transcriptase-polymerase chain reaction with the universal primerset. **Microbiology and Immunology**, v. 41, p. 209–213, 1997.
- MELO, M. A.; BRAGA, D. de A.; MANSO, W.; CARVALHO, R. R. *et al.* Morcegos urbanos de Guarulhos: alta riqueza de espécies e dominância de espécies ecologicamente flexíveis reveladas a partir de dados de monitoramento da raiva. **Iheringia série Zoologia**, 111, p. 1-10, 2021.

- MENESES, J. A.; ISHIGAMI, A. C.; MELLO, L. M.; ALBUQUERQUE, L. L. *et al.* Lessons Learned at the Epicenter of Brazil's Congenital Zika Epidemic: Evidence From 87 Confirmed Cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, p. 1302-8, 2017.
- MOLLENTZE, N.; STREICKER, D. G. Viral zoonotic risk is homogenous among taxonomic orders of mammalian and avian reservoir hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 1-8, 2020.
- MORATELLI, R.; CALISHER, C. H. Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses?. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 1-22, 2015.
- MORGAN, G. S.; CZAPLEWSKI, N. J. Evolutionary history of the Neotropical Chiroptera: The fossil record. *In*: GUNNELL, G. F.; SIMMONS, N. B. **Evolutionary History of Bats: Fossil, Molecules and Morphology**. New York, USA: Cambridge University Press. 105-161
- MOUREAU, G.; COOK, S.; LEMEY, P.; NOUGAIREDE, A. *et al.* New Insights into Flavivirus Evolution, Taxonomy and Biogeographic History, Extended by Analysis of Canonical and Alternative Coding Sequences, **PLoS One**, v. 10, p. 1-30, 2015.
- MOUTINHO, F. F. B., NUNES, V. M. A., FERNANDES, P. M., BORGES, F. V. B. *et al.* Surto de raiva em morcegos frugívoros no município de Niterói, RJ, 2018. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 14, p. 307-314, 2020
- NENE, V.; WORTMAN, J. R.; LAWSON, D.; HAAS, B. *et al.* Genome Sequence of *Aedes aegypti*, a Major Arbovirus Vector. **Science**, v. 316, p. 1718–1723, 2007.
- NOGUEIRA, M. R.; POL, A. Observações sobre os hábitos de *Rhynchoncteris naso* (Wied-Neuwied, 1820) e *Noctilio albiventris* Desmarest, 1818 (Mammalia, Chiroptera) **Revista brasileira de biologia**, v. 58, p. 473-480, 1998.
- NOGUEIRA, M. R.; LIMA, I. P.; GARBINO, G. S. T.; MORATELLI, R. *et al.* **Updated Check list of Brazilian Bats: version**. Comitê da Lista de Morcegos do Brasil—CLMB. Sociedade Brasileira para o Estudo de Quirópteros (SBEQ). 2018.
- NUNES, P. C. G.; DAUMAS, R. P.; SÁNCHEZ-ARCILA, J. C.; NOGUEIRA, R. M. R. *et al.* 30 years of fatal dengue cases in Brazil: a review. **BioMed Central Public Health**, London, v. 19, n. 329, 2019.
- ONG, A.; SANDAR, M.; CHEN, M. I.; SIN, L. Y. Fatal dengue hemorrhagic fever in adults during a dengue epidemic in Singapore. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 11, p. 263-267, 2006.
- OPAS/OMS. Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde. Alerta Epidemiológico: Febre Amarela. 31 de agosto de 2022, Washington, D.C. 2022.
- _____. Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde. Atualização Epidemiológica de Febre amarela na Região das Américas, 25 de abril de 2023, Washington, D.C. 2023.

O'SHEA, T. J.; CRYAN, P. M.; CUNNINGHAM, A. A.; FOOKS, A.R. *et al.* Bat flight and zoonotic viruses. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, p. 741-745, 2014.

PACHECO, S. M.; SODRÉ, M.; GAMA, A. R.; BREDT, A. *et al.* Morcegos urbanos: Status do conhecimento e plano de ação para a conservação do Brasil. **Chiroptera neotropical**, v. 16, p. 629-647, 2010.

PAVAN, A. C.; MARROIG, G. Integrating multiple evidences in taxonomy: species diversity and phylogeny of mustached bats (Mormoopidae: *Pteronotus*). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 103, p. 184-198, 2016.

PAVAN, A. C.; TAVARES V. da C. *Pteronotus gymnonotus* (Chiroptera: Mormoopidae). **Mammalian Species**, v. 52, p. 40-48, 2020.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; BATISTA, C. B.; LIMA, I. P. DE. *et al.* História Natural dos Morcegos Brasileiros Chave de Identificação de Espécies. 1. ed. Rio de Janeiro: Technical Books Editora Ltda, 2016. v. 1, 416p, 2017.

RIBEIRO JUNIOR, M. A. F.; FENG, C. Y. D.; NGUYEN, A. T. M.; RODRIGUES, V. C. Yellow Fever: a review and the current epidemiological situation in Brazil. **Revista de Medicina**, v. 97, p. 407-14, 2018.

RICE C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Fields B.N., KNIPE D. M.; HOWLEY P. M.; CHANOCK R. M.; MELNICK J. L. *et al.*, (Eds.). **Fields Virology**, 3ed. v. 1, Philadelphia: Lippincott-RavenPublishers, p. 931–959, 1996.

RICE, Charles M. Flaviviruses: thevirusesandtheirreplication. In: KNIPE, D. M. H.; (Ed.)Fields virology. Philadelphia, USA:**WoltersKluwerHelath**, v. 2, 2007.

RODRIGUES, N. C. P.; LINO, V. T. S.; DAUMAS, R. P.; ANDRADE, M. K. N. *et al.* Evolução temporal e espacial da incidência de dengue no Brasil, 2001-2012. **PloSOne**, v. 11, p. 11, 2016.

ROEHE, P. M. Curso de Virologia Básica. UFRGS. Disponível em: Detecção Molecular *Flavivirus*.pdf. Acesso em: 25 mar. 2023.

RYDELL, J. RACEY, P. A. Street lamps and the feeding ecology of insectivorous bats. Zoological Symposium. v.67, p. 291-307, 1995.

SCARAMOZZINO, N.; CRANCE, J.; JOUAN, A.; De BRIEL, D. A. *et al.* Comparison of Flavivirus Universal Primer Pairs and Development of a Rapid, Highly Sensitive Heminested Reverse Transcription-PCR Assay for Detection of Flaviviruses Targeted to a Conserved Region of the NS5 Gene Sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p. 1922–1927, 2001.

SCHOEMAN, M. C. Light pollution at stadiums favors urban exploiter bats. **Animal Conservation**, v. 19, p. 120-130, 2015.

SILVA, M. S.; BRANCO, M. R. F. C.; JUNIOR, J. A.; QUEIROZ, S. C. R. *et al.* Spatial-temporal analysis of dengue deaths: identifying social vulnerabilities. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* v. 50 p. 01, 2017.

SILVA, F. D. L.; FARIAS, F. J. A. S.; ROCHA, R. O.; ARAÚJO, G. R. *et al.* Estudo epidemiológico da dengue entre os anos de 2010 e 2020 no município de Lago da Pedra, estado do Maranhão, Brasil. *Journal of Education, Science and Health*, v.2, p. 1-14, 2022.

SIMMONS, N. B. **Order Chiroptera**. In: WILSON, D. E. e REEDER, D. M. (Eds.) *Mammals species of the world: a taxonomic a geographic reference*. 3^o.ed. v.1. Baltimore: Johns Hopkins University Press. p. 312-529, 2005.

SIMMONS, N. B.; A. L. CIRRANELLO. **Bat Species of the World: A taxonomic and geographic database**. 2022. Disponível em: [https:// www.batnames.org/](https://www.batnames.org/). Acesso em: 18 de fevereiro de 2023.

SOTOMAYOR-BONILLA, J.; CHAVES, A.; RICO-CHÁVEZ, O.; ROSTAL, M. *et al.* Short Report: dengue virus in bats from southeastern Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 91, p. 129–131, 2014.

SOUSA, P. R. S.; VIDIGA, A. M. S.; OLIMPIO, A. P. M.; FRAGA, E. C. *et al.* Caracterizar o vírus da dengue (denv) quanto aos seus sorotipos em populações de Caxias/MA. In: **3^a Reunião Anual da SBPC**, 2021, Juiz de Fora, MG. Anais eletrônicos[...] Juiz de Fora: UFJF, 2021. P. 2354. Disponível em: 1292_1ea359cd31aaba754b41970459fe59cda.pdf (sbpcnet.org.br). Acesso em: 04 jul 23.

TORRES, J. M.; ANJOS, E. A. C. dos.; FERREIRA, C. M. M. Frugivoria por morcegos filostomídeos (Chiroptera, Phyllostomidae) em dois remanescentes urbanos de cerrado em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Iheringia, Série Zoologia*, v. 108: e2018002, 2018.

TORRES-CASTRO, M.; NOH-PECH, H.; HERNÁNDEZ-BETANCOURT, S.; PELÁEZ-SÁNCHEZ, R. *et al.* West Nile and Zika viruses in bats from a suburban area of Merida, Yucatan, Mexico. *Zoonoses Public Health*, v. 00, p. 1-8, 2021.

WEINBERG, M.; YOVEL, Y. Revising the paradigm: Are bats really pathogen reservoirs or do they possess an efficient immune system?. *iScience*, v. 25, p. 1-18, 2022.

VASCONCELOS, P. F. C. Febre amarela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, p. 275-293, 2003.

VICENTE-SANTOS, A.; MOREIRA-SOTO, A.; SOTO-GARITA, C.; CHAVERRI, L. G. *et al.* Neotropical bats that co-habit with humans function as dead-end hosts for dengue virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, p. 1-18, 2017.

HULO, C.; de CASTRO, E.; MASSON, P.; BOUGUELERET, L.; *et al.* ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39: D576±582.

VOIGT, C. C.; KINGSTON, T. Bats in the Anthropocene: conservation of bats in a changing world. **Springer International AG**, Cham. 2016.

ZHANG, W.; CHIPMAN, P. R.; CORVER, J.; JOHNSON, P. R. *et al.* Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nature Struct. Biol.* v. 10, p. 907–912, 2003.

ZHANG, H.; YANG, X.; LI, G. Detection of dengue virus genome RNA in some kinds of animals caught from dengue fever endemic areas in Hainan Island with reverse transcription-polymerase chain reaction. **Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing du Xue za Zhi**, v. 12, p. 226–228, 1998.

