WILLIAN DE OLIVEIRA FAHL

Filogenia de vírus da raiva isolados de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* e relacionados a morcegos hematófagos com base nos genes codificadores da nucleoproteína N e glicoproteína G

São Paulo

2009

WILLIAN DE OLIVEIRA FAHL

Filogenia de vírus da raiva isolados de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* e relacionados a morcegos hematófagos com base nos genes codificadores da nucleoproteína N e glicoproteína G

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão

São Paulo

2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2184
FMVZ

Fahl, Willian de Oliveira
Filogenia de vírus da raiva isolados de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* e relacionados a morcegos hematófagos com base nos genes codificadores da nucleoproteína N e glicoproteína G / Willian de Oliveira Fahl. – 2009.
92 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão.

1. Raiva. 2. Morcego. 3. Filogenia. 4. Epidemiologia. 5. Molecular. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Filogenia de amostras de vírus da raiva isoladas de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* e de amostras relacionadas a morcegos hematófagos com base nos genes codificadores da nucleoproteína N e glicoproteína G.", protocolado sob o nº1253/2007, utilizando amostras do vírus da raiva, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado na reunião do dia 20 de fevereiro de 2008.

We certify that the Research "Phylogeny of rabies virus strains isolated from *Artibeus* sp frugivorous bats and strains related to vampire bats based on nucleoprotein (N) and glycoprotein (G) genes", protocol number 1253/2007, under the responsibility Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved in the meeting of day 02/20/08.

São Paulo, 21 de fevereiro de 2008

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética - FMVZ/USP
SP, ___/___/___

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Univrsitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone/Fax: +55 11 3032-2224
+ 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FAHL, Willian de Oliveira

Título: Filogenia de vírus da raiva isolados de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* e relacionados a morcegos hematófagos com base nos genes codificadores da nucleoproteína N e glicoproteína G

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de mestre em Ciências

Data: ___/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Ao querido Miguel Fahl Oliveira (in memoriam), por me mostrar que até na menor e mais frágil criatura, pode habitar um "gigante guerreiro".
-Obrigado por me ensinar tanto, em tão pouco tempo!

"A água nunca discute com seus obstáculos, mas os contorna"

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Paulo Eduardo Brandão**, pela brilhante orientação e pela amizade.

Ao Prof. Dr. **Silvio Arruda Vasconcellos**, por toda dedicação à Pós-Graduação do VPS.

À Prof. Dra. **Maria Solange Gennari**, pelo empenho com a Pós-Graduação do VPS.

Aos meus pais, **Gentil Fahl** e **Irma de Oliveira Fahl** e meus irmãos, **Andréia Fahl Oliveira**, **Fernando Oliveira Fahl** e **Ronaldo de Oliveira Fahl**, pelo incondicional apoio, incentivo e confiança.

Às grandes amigas **Ana Rita de Toledo Piza**, pelo incentivo, exemplo, torcida e pela ajuda em vários aspectos; e, **Renata Campos Martins**, pelo incentivo e por acreditar em mim, até mais do que eu mesmo.

A todos os **Amigos do VPS**, que "valem ouro", em especial a **Sibele Pinheiro de Souza**, **Vanessa Riesz Salgado**, **Thaisa Lucas Sandri** e **Viviane Rocha Cambuí**, pela pronta acolhida e ajuda em meu ingresso ao departamento.

A todos os meus **Amigos**, que, independente do tempo, participaram de minha vida, me apoiando e favorecendo meu crescimento, tanto pessoal como profissional.

A todos os **funcionários-amigos** do **Instituto Pasteur**, em especial a **Pedro Carnieli Junior**, **Juliana Galera Castilho**, **Carla Isabel Macedo Levi da Silveira**, **Rafael de Noves Oliveira**, **Ekaterina A. Durymanova Ono**, **Keila Iamamoto Nogi**, **Karin Corrêa Scheffer Ferreira**, **Graciane Maria Medeiros Caporale**, **Andréa de Cassia Rodrigues da Silva**, **Luciana Botelho Chaves**, **Zélia Maria Pinheiro Peixoto**, **Samira Maria Achkar**, **Maria Souza Cavalcante –"Fátima"** e **Maria Aparecida da Silva – "Cidoka"**, pelos ensinamentos, acolhimento e disponibilidade, que muito me enriqueceram.

Ao **Instituto Pasteur**, em nome da Sra. Diretora, Dra. **Neide Y. Takaoka**, e da chefia e assistência técnica do laboratório, Dra. **Maria Luiza Carrieri** e Dra. **Ivanete Kotait**, por disponibilizarem tempo e condições para a realização de meu trabalho.

À **CAPES** (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

Ao **Universo**, que sempre conspirou a meu favor.

RESUMO

RESUMO

FAHL, W. O. **Filogenia de vírus da raiva isolados de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* e relacionados a morcegos hematófagos com base nos genes codificadores da nucleoproteína N e glicoproteína G.** [Phylogeny of rabies virus strains from *Artibeus* spp. and *Desmodus rotundus* bats based on the nucleoprotein and glycoprotein genes]. 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Morcegos vêm recebendo crescente importância em Saúde Pública, pois são os principais reservatórios para a raiva em diversas partes do mundo. Estudos filogenéticos baseados no gene *N* demonstraram que os vírus da raiva (RABV) encontrados em morcegos frugívoros *Artibeus* spp. são próximos àqueles associados ao morcego hematófago *Desmodus rotundus*, mas pouco se conhece sobre a diversidade genética do RABV nestes morcegos. Este estudo teve como objetivos avaliar a filogenia de linhagens do RABV variante três (AgV3) relacionadas a morcegos *Artibeus* spp. e *D. rotundus*, com base em sequências do gene *N* e do gene *G*, e a possibilidade de distinção entre isolados de vírus da raiva detectadas em *Artibeus* spp. e *D. rotundus* para a epidemiologia molecular da raiva. Vinte amostras do RABV isoladas de *Artibeus* spp. e 15 obtidas de bovinos e relacionadas ao *D. rotundus*, todos do Estado de São Paulo, Brasil, foram submetidas a RT - PCRs, e os amplicons gerados submetidos ao sequenciamento de DNA, e as sequências alinhadas com sequências homólogas obtidas do GenBank para a construção de árvores *Neighbor-Joining* de nucleotídeos (modelo MCL) e aminoácidos (modelo Poisson), utilizando *European bat lyssavirus* 1 (EBLV1) como outgroup. A árvore filogenética gerada para o gene *N* demonstrou a formação de três grupos apoiados em bootstraps de no mínimo 60%. Estes grupos foram denominados como grupo D, exclusivamente com isolados relacionadas ao *D. rotundus* e A1 e A2 principalmente com isolados de *Artibeus* spp., enquanto que para o gene *G*, segregaram em duas linhagens, ou seja, relacionadas ao *D. rotundus* (grupo D) e relacionadas ao *Artibeus* spp. (grupo A). Para todos os grupos as identidades de aminoácidos foram superiores às de nucleotídeos, uma indicação

da predominância de substituições sinônimas. Concluindo, padrões gênero-específicos para isolados do RABV AgV3 foram detectados em *D. rotundus* e *Artibeus* spp., com uma topologia concordante para linhagens fixas em cada um destes quirópteros. Estes resultados mostram uma intrincada relação com o hospedeiro na história evolutiva do RABV, sob o ponto de vista básico, como também a determinação das fontes de infecções na epidemiologia molecular da raiva.

Palavras-chave: Raiva. Morcego. Filogenia. Epidemiologia. Molecular.

ABSTRACT

ABSTRACT

FAHL, W. O. **Phylogeny of rabies virus strains from *Artibeus* spp. and *Desmodus rotundus* bats based on the nucleoprotein and glycoprotein genes.** [Filogenia de vírus da raiva isolados de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* e relacionados a morcegos hematófagos com base nos genes codificadores da nucleoproteína N e glicoproteína G]. 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Bats have been assigned an increasing importance in Public Health as these are the main rabies reservoirs in many parts of the world. Phylogenetic studies based on the *N* gene have shown that rabies virus (RABV) strains from *Artibeus* spp. frugivorous bats are closely associated to those from the vampire bat *Desmodus rotudus*, but little is known about the genetic diversity of RABV in these bats. This study aimed to assess the phylogeny of RABV strains from the antigenic variant 3 (AgV3) from these bats based on *N* and *G* sequences and to evaluate the possibility of distinction between RABV lineages of these for the molecular epidemiology of rabies. Twenty RABV strains isolated from *Artibeus* spp. bats and 15 obtained from cattle and related to *D. rotundus*, all from Sao Paulo State, Brazil, were submitted to RT-PCRs to the *N* and *G* genes amplifications and the amplicons were submitted to cycle sequencing; the sequences were aligned with homologous sequences retrieved from the Genbank for the construction of *Neighbor-Joining* trees for nucleotides (MCL model) and amino acids (Poisson model) with *European bat lyssavirus* 1 (EBLV1) as outgroup. *N* gene tree showed three major clusters with bootstraps ≥ 60% and named as clusters D, exclusively with strains related to *D. rotundus* and A1 and A2, chiefly with *Artibeus* spp. strains while for the *G* gene only two lineages, i.e., *D. rotundus* related (cluster D) and *Artibeus*-related (cluster A) were formed. For all the groups the amino acids identities were superior to the nucleotides identities, an indication of the predominance of synonymous substitutions. As a conclusion, genus specific lineages of AgV3 RABV have been detected in *D. rotundus* and *Artibeus* spp. bats with a concordant topology for fixed strains for each of these two bat genus. These results not only show an intricate host-relationship of RABV

evolutionary history on the basic point of view, but have an invaluable application for the determination of sources of infections in rabies molecular epidemiology.

Key words: Rabies. Bat. Phylogeny. Epidemiology. Molecular.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Municípios do Estado de São Paulo de onde se originaram as amostras positivas para raiva detectadas em morcegos do gênero *Artibeus* e em bovinos, utilizados neste estudo 44

Figura 2 - Árvore de distância com algoritmo *Neighbor-Joining* e modelo evolutivo MCL para o gene *N* de RABV (nucleotídeo 68 ao 1350 em relação ao vírus fixo CVS - AF406696.1) e os respectivos grupos encontrados no presente estudo. Os valores em cada nó representam os resultados de 1000 repetições de bootstrap - São Paulo - 2009 55

Figura 3 - Árvore de distância com algoritmo *Neighbor-Joining* e modelo evolutivo de Poisson para a proteína N de RABV (aminoácidos 23 ao aminoácido 450 em relação ao vírus fixo CVS - AF406696.1) e os respectivos grupos encontrados no presente estudo. Os valores em cada nó representam os resultados de 1000 repetições de bootstrap - São Paulo - 2009 56

Figura 4 - Árvore de distância com algoritmo *Neighbor-Joining* e modelo evolutivo MCL para o gene *G* de RABV (nucleotídeo 8 ao 1579 em relação ao vírus fixo CVS - FJ979833.1) e os respectivos grupos encontrados no presente estudo. Os valores em cada nó representam os resultados de 1000 repetições de bootstrap - São Paulo - 2009 58

Figura 5 - Árvore de distância com algoritmo *Neighbor-Joining* e modelo evolutivo de Poisson para a proteína G de RABV (aminoácidos 3 ao 524 em relação ao vírus fixo CVS - FJ979833.1) e os respectivos grupos encontrados no presente estudo. Os valores em cada nó representam os resultados de 1000 repetições de bootstrap - São Paulo - 2009 60

LISTA DE QUADROS

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Relação dos isolados de vírus da raiva de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* e relacionadas a morcegos hematófagos para estudo de filogenia com base nos genes codificadores da nucleoproteína N e glicoproteína G, identificando o hospedeiro original, município onde foram encontrados, data de detecção e nomenclatura dos isolados do presente estudo - São Paulo - 2009 43

Quadro 2 - Relação dos *primers* utilizados nas reações de RT-PCR e no sequenciamento das amostras de RABV de morcegos do gênero *Artibeus* spp. e de amostras de bovinos 46

Quadro 3 - Ciclo da reação de PCR para amplificação do gene *N* e *G* do vírus da raiva isolados de *Artibeus* spp. e bovinos utilizados no presente estudo 46

Quadro 4 - Sequências dos genes *N* e *G* do vírus da raiva recuperadas do GenBank utilizadas para a reconstrução da filogenia de RABV de *Artibeus* spp. e relacionadas a *Desmodus rotundus*, segundo o número de acesso do GenBank e nomenclatura do isolado 50

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identidades em porcentagem dos nucleotídeos 68 a 1350 do gene *N* dos grupos presentes na árvore genealógica para este gene para isolados de RABV de morcegos *Artibeus* spp. e bovinos relacionados a *D. rotundus* - São Paulo - 2009 61

Tabela 2 - Identidades em porcentagem dos aminoácidos 23 ao 450 para a proteína putativa N dos grupos presentes na árvore genealógica para este gene, isolados de RABV de morcegos *Artibeus* spp. e bovinos relacionados a *D. rotundus* - São Paulo - 2009 62

Tabela 3 - Identidades em porcentagem dos nucleotídeos 8 ao 1579 do gene *G* dos grupos presentes na árvore genealógica para este gene para isolados de RABV de morcegos *Artibeus* spp. e bovinos relacionados a *D. rotundus* - São Paulo - 2009..... 62

Tabela 4 - Identidades em porcentagem dos aminoácidos 3 ao 524 para a proteína putativa G dos grupos presentes na árvore genealógica para este gene, isolados de RABV de morcegos *Artibeus* spp. e bovinos relacionados a *D. rotundus* - São Paulo - 2009 63

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ABLV	*Australian bat lyssavirus*
AcM	Anticorpos monoclonais
AgV	Variante antigênica
ARAV	*Aravan virus*
BLAST/n	*Basic Local Alignment Search Tool*
cDNA	DNA complementar
CVS	*Challenger Virus Standard*
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAse	Deoxyribonuclease
dNTP	Deoxinucleosídeo-trifosfato
DTT	*Dithiothreitol*
DUVV	*Duvenhage virus*
EBLV1	*European bat lyssavirus 1*
EBLV2	*European bat lyssavirus 2*
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
et al.	E colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
G	Glicoproteína do vírus da raiva
IFD	Imunofluorescência Direta
IRKV	*Irkut virus*
KHUV	*Khujand virus*
L	Proteína L do vírus da raiva
LBV	*Lagos bat virus*
LTD	Limitada
M	Proteína matriz do vírus da raiva
MCL	*Maximum Composite Likelihood*
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
MIT	Inoculação intracerebral em camundongo
MOKV	*Mokola virus*
mRNA	RNA mensageiro
N	Nucleoproteína do vírus da raiva
nt	Nucleotídeos
P	Fosfoproteína do vírus da raiva
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
RABV	*Rabies virus*
RNA	Ácido ribonucléico
RNAse	Ribonuclease
RNAseout	Inibidor de RNAse
RNP	Ribonucleoproteína
RT	Transcrição Reversa
SNC	Sistema nervoso central
SVS/MS	Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde
Taq	*Thermus aquaticus*
TBE	Tampão Tris Borato
U	Unidade internacional
WCBV	*West Caucasian bat virus*

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
©	*Copyright*
®	Marca registrada
µL	Microlitro
µM	Micromolar
g	Aceleração da gravidade terrestre (9,8 m/s^2)
kDa	QuiloDalton
km^2	Quilômetro quadrado
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minuto de hora
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
ºC	Graus Celsius
pmol	Picomol
q.s.p.	Quantidade suficiente para
™	Marca registrada comercial, do inglês trademark
X	Vezes
Ψ	Pseudogene (psi)

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 28
2 OBJETIVOS 40
3 MATERIAL E MÉTODOS 42
3.1 AMOSTRAS 42
3.2 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT-PCR) PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DA NUCLEOPROTEÍNA (*N*) E GLICOPROTEÍNA (*G*) DO RABV 44
3.2.1 Extração de RNA 45
3.2.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) - Transcrição Reversa (RT) e Reação em cadeia pela polimerase (PCR) 45
3.3 SEQUENCIAMENTO DE DNA 47
3.3.1 Purificação dos produtos de PCR 47
3.3.2 Reação de sequenciamento de DNA 47
3.3.3 Edição de sequências 48
3.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA 48
3.5 CÁLCULO DE IDENTIDADES DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS 49
4 RESULTADOS 52
4.1 RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DA NUCLEOPROTEÍNA (N) E GLICOPROTEÍNA (G) VIRAIS 52
4.2. REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DE DNA 52
4.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA 53
4.3.1 Gene *N* 53
4.3.2 Gene *G* 57
4.4 CÁLCULO DE IDENTIDADES DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS 61
4.4.1 Gene *N* 61
4.4.2 Gene *G* 62
5 DISCUSSÃO 65
6 CONCLUSÕES 78
REFERÊNCIAS 80

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma antropozoonose (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1959), caracterizada por uma encefalite aguda e fatal, que acomete um grande número de mamíferos (ACHA; SZYFRES, 2003), e periodicamente se manifesta sob a forma de epizootias, bem como surtos epidêmicos, considerando-se populações humanas (MITCHELL; BURNS; KOLZ, 1973; LORD, 1988).

Definida como uma doença negligenciada no mundo todo (FOOKS et al., 2003; DODET, 2006), apesar de ser uma doença prevenível por meio de vacina (BRIGGS; HANLON, 2007), está entre as dez principais causas de morte humana dentre as doenças infecciosas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000).

A importância da raiva para saúde pública não ocorre apenas pelo número de casos, mas também pela sua alta mortalidade, e pelos custos com tratamentos (KAPLAN; TURNER; WARREL, 1986), diagnósticos e reações adversas às vacinas (WHO EXPERT CONSULTATION ON RABIES, 2005). Em 2004, o Brasil gastou por volta de US$28 milhões na prevenção da raiva (CHILDS; REAL, 2007).

É causada pelo Vírus da Raiva (RABV), que por sua vez pertence ao gênero *Lyssavirus* e família *Rhabdoviridae,* a qual, junto com as Famílias *Paramyxoviridae*, *Filoviridae* e *Bornaviridae*, constitui a Ordem *Mononegavirales,* nas quais todos os membros apresentam genoma de RNA não-segmentado, de sentido negativo e de RNA de fita simples (FENNER et al., 1992; MAYO; PRINGLE, 1997; INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2005).

No gênero *Lyssavirus*, os vírus são envelopados, apresentam um diâmetro que pode variar entre 50 a 100 nanômetros (nm) e comprimento de 100 a 430nm, dependendo da espécie do vírus e da presença de partículas defectivas interferentes (MCCOLL; TORDO; SETIÉN, 2000). Sua morfologia é baciliforme, semelhante à “bala de fuzil”, com uma extremidade arredondada e a outra plana (KAPLAN, 1996). Dividem-se em sete genótipos, contidos em dois filogrupos genética e imunopatologicamente distintos (BADRANE; TORDO, 2001): o filogrupo I inclui o vírus da raiva (RABV, genótipo 1), o vírus Duvenhage (DUVV, genótipo 4), o *European bat lyssavirus* tipos 1 e 2 (EBLV1, genótipo 5 e EBLV2, genótipo 6) e o *Australian bat lyssavirus* (ABLV, genótipo 7) e o filogrupo II inclui o *Lagos bat virus* (LBV, genótipo 2) e o vírus Mokola (MOKV, genótipo 3) (KUZMIN et al., 2003).

O genótipo 1 apresenta maior importância epidemiológica por sua associação com um grande número de casos de raiva em relação aos outros genótipos e por ser mais amplamente distribuído no mundo. Dados epizootiológicos para raiva e os tipos moleculares do vírus têm demonstrado que existem diversos reservatórios para o genótipo 1. Variantes deste genótipo existem na natureza em ciclos independentes, sendo que, dentro de cada ciclo, um diferente reservatório exerce papel fundamental na manutenção de cada uma das variantes do RABV, tais como aquelas relacionadas a morcegos hematófagos, frugívoros, insetívoros, canídeos silvestres, "*raccoons*" e cangambás (VELASCO-VILLA et al., 2002).

O RABV mede, em média, de 100 a 250nm de comprimento e 75nm de diâmetro e possui 11.932 nucleotídeos (nt), os quais codificam as cinco proteínas estruturais N (nucleoproteína), P (fosfoproteína), M (proteína de matriz), G (glicoproteína) e L (RNA polimerase RNA dependente), sendo que os genes para estas proteínas apresentam-se separados por pequenas regiões intergênicas de 2, 2, 5 e 247 nt, respectivamente (TORDO et al., 1986a, b).

O RABV possui envoltório externo (envelope) formado por lipídeos da célula hospedeira, com espículas de 5 a 10nm de comprimento, cerca de 3nm de espessura, distanciadas em 5nm, formadas por trímeros da glicoproteína G (MADORE; ENGLAND, 1977; GAUDIN et al., 1992).

A constituição do envelope é semelhante à da membrana da célula infectada pelo vírus e, normalmente, são detectados fosfolipídeos, lipídeos neutros e glicolipídeos (WUNNER, 1991).

Abaixo do envelope (superfície interna) encontra-se uma camada matriz formada por proteínas M, que une o envelope do vírus à ribonucleoproteína (RNP) interna e está envolvida na montagem e liberação viral (MEBATSION, 2001).

A RNP tem forma de um complexo helicoidal, possuindo 30 a 35 giros, com 50nm de espessura por 170nm de comprimento, em média, e é composta pelo RNA genômico, associado às proteínas RNA polimerase RNA dependente L, fosfoproteína P, nucleoproteína N, além de proteínas M. Tem estrutura lábil e se desenrolada, poderia atingir o comprimento de 0,20 a 0,65nm (KAPLAN; TURNER; WARREL, 1986). Devido à presença de L, a transcrição e a replicação são autônomas e independentes da célula hospedeira (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2005; WUNNER, 2002).

A proteína N e o gene que a codifica são os componentes moleculares mais conservados em termos de identidade de sequência de aa e nt, dentro de cada genótipo, apesar da relativa alta diversidade entre pequenas regiões do gene *N* (ERTL et al., 1989; WUNNER, 2002). A nucleoproteína N é um polipeptídio com 450 aa, de peso molecular de 50,5kDa (TORDO et al., 1986a). O maior grau de similaridade entre sequências de aa (98-99%) ocorre entre diferentes amostras "fixas" de laboratório. Os vírus que apresentam menos que 80% de similaridade na sequência de nt ou menos que 92% na sequência de aa pertencem a diferentes genótipos (KISSI; TORDO; BOURHY, 1995; WUNNER, 2002).

Ainda na proteína N são encontrados quatro sítios antigênicos (I a IV), sendo que os sítios I, III e IV já estão mapeados, e localizados nos segmentos de aa de posições 358-367 (sitio I), 313-337 (sítio III), 359-366 e 375-383 (sítio IV)(TORDO, 1996; WUNNER, 2002).

Por essa razão, para a detecção do RABV por RT-PCR e para sua classificação, o gene *N* tem sido o alvo consensualmente utilizado (KAMOLVARIN et al., 1993; SMITH; ORCIARI; YAGER, 1995; DE MATTOS et al., 1996; ITO et al., 2001; FAVI et al., 2003; SCAGLIARINI et al., 2003; ROMIJN et al., 2003).

A glicoproteína G é uma proteína de membrana que possui 505 aa, traduzidas de um RNA mensageiro (mRNA) que codifica 524 aa. É a proteína de fusão, que permite a entrada do vírus na célula, e essencial para a resposta imune contra o RABV, pois é responsável pela indução de anticorpos neutralizantes, sendo alvo destes e dos linfócitos T *helper* e citotóxicos (WUNNER, 2002).

Oito sítios antigênicos foram identificados no domínio externo da proteína G (I-VI, "a" e G1). Os sítios I, III, VI e "a" envolvem os aa nas posições 231, 330-338, 264 e 342-343, respectivamente. O sítio II é descontínuo e está localizado nas posições 34-42 e 198-200 ligadas por pontes dissulfeto (TORDO, 1996). Além disso, a arginina na posição 333 da glicoproteína G tem sido descrita como responsável pela patogenicidade do RABV (TORDO, 1996; MEBATSION, 2001).

A proteína L é a maior proteína do vírus, com 2.114 aa e peso molecular de 244,2kDa, originando, assim, o nome *"large".* É responsável pelas atividades enzimáticas necessárias à transcrição e replicação do RNA viral (TORDO et al., 1988).

Entre os genes *G* e *L* encontra-se uma região intergênica chamada psi (Ψ) ou G-L, de, em média, 423 nt (TORDO, 1996; FINKE; COX; CONZELMANN, 2000). É

um dos principais alvos para estudo da evolução molecular do RABV, pois é susceptível a mutações, mesmo quando livre de pressões seletivas e, portanto, a mais variável no genoma viral (SACRAMENTO; BOURHY; TORDO, 1991). Sugere-se que esta região representa um gene remanescente, um pseudogene, pois é longa o suficiente para sintetizar um peptídeo e apresenta os sinais clássicos de início e parada de transcrição do vírus (TORDO et al., 1986b). No entanto, até a presente data não há registro de isolamento de nenhuma proteína derivada desta região. Em outros *Rhabdoviridae*, como os *Vesiculovirus*, nesta região há um sexto gene (TORDO, 1996).

A proteína P é um polipeptídeo fosforilado que contém 297 aa e interage com as proteínas N e L e acredita-se que atue como co-fator da RNA polimerase. A proteína P é multifuncional, ligando-se a outras proteínas virais para auxiliar na replicação do genoma viral e também interagir com fatores celulares e, possivelmente, está associada na disseminação e patogênese viral (LAFON; WIKTOR, 1985; MEBATSION, 2001).

Os eventos sequenciais do ciclo do RABV na célula hospedeira são: adsorção, penetração, transcrição, tradução, replicação, maturação e liberação por brotamento; ocorrendo no citoplasma celular (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Na adsorção, o vírus liga-se aos receptores das células, por meio de espículas de glicoproteína G encontradas sobre a superfície do capsídeo viral (SCHLEGEL; WADE, 1985). A penetração do vírus ocorre por endocitose (pinocitose) para a entrada do vírus na célula. No interior da célula ocorre a liberação da RNP, e imediatamente ocorre a transcrição dos cinco RNAm e em seguida a tradução (PRINGLE, 1987). Somente após a tradução das cinco proteínas virais inicia-se a replicação do genoma viral, realizada, pela proteína L. Ocorre de início, a síntese do antigenoma de sentido positivo, a qual servirá de molde para a produção do genoma viral de sentido negativo (TORDO, 1996).

A montagem do vírus no citoplasma da célula hospedeira tem início com a associação das proteínas N, P e L ao RNA genômico recém-sintetizado, formando a RNP. As proteínas M seguem em dois sentidos: uma parte une-se a RNP, e outra parte insere-se na membrana plasmática da célula hospedeira, preparando-a para a liberação dos vírions. A RNP, junto à membrana plasmática, estimula a liberação do vírion por brotamento. Anteriormente ao brotamento do vírion, a transcrição e replicação viral são inibidas pela ação da proteína M, bloqueando a síntese de RNA.

A pressão interna desse aglomerado nucleoprotéico, sobre a membrana plasmática, determina que a região formada destaque-se da célula, ocorrendo o brotamento do RABV (MESLIN; KAPLAN; KOPROWSKI, 1996).

Durante o ciclo do vírus da raiva no interior da célula ocorre a inibição da síntese de RNA, DNA e proteínas celulares. Os principais fatores destas inibições, são os RNAs-líderes de 58 nt formados no início da transcrição. Proteínas M do vírus, encontradas no núcleo das células infectadas, possivelmente, exercem ação sobre a expressão gênica celular (REMENICK; MCGOWAN, 1986; REMENICK; KENNY; MCGOWAN, 1988).

A RNA polimerase viral não tem atividade corretiva de inserção dos nt, levando à produção de populações de genomas virais distintos, que compartilham uma mesma origem. Estas mutações ocorrem em diferentes taxas (entre 10^{-4} e 10^{-5} substituições por base por ciclo), variando conforme a região do genoma viral. Outros fatores podem estar envolvidos na geração de heterogeneidade das sequências de RNA do RABV como, por exemplo, resposta imunológica do hospedeiro, carga viral, interações com proteínas virais e rota de transmissão (KISSI et al., 1999).

A via de eliminação clássica do vírus é a saliva do animal infectado, que transmite o vírus por meio de mordeduras, lambeduras ou arranhaduras (ACHA; SZYFRES, 1986). Há citação de casos em que a transmissão ocorreu de forma iatrogênica, por cirurgias de transplantes de órgãos e, casos de transmissão por aerossóis (GIBBONS, 2002), em cavernas densamente povoadas por morcegos (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDA, 2002).

A raiva está difundida em todos os continentes, com exceção da Antártida. O RABV tem sido isolado da maioria das ordens de mamíferos, principalmente *Carnivora* e *Chiroptera* (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDA, 2002).

Nos continentes europeu, africano e asiático a raiva em canídeos ainda exerce um papel fundamental na disseminação e manutenção da raiva e, assim, do RABV (NIEZGODA; HANLON; RUPPRECHT, 2002). Estima-se que anualmente ocorram em torno de 55.000 óbitos humanos por raiva na Ásia e África. Na América Latina, a incidência anual da raiva por 100.000 habitantes varia entre 0 e 0,09 na América do Sul, 0 e 0,10 na América Central e 0 e 0,06 nas ilhas do Caribe. Na grande maioria dos casos, o cão foi identificado como o animal agressor (CHILDS; REAL, 2007).

No Brasil, entre 1986 e setembro de 2008, ocorreram 761 óbitos por raiva humana, sendo que destes, 516 tiveram o cão como animal agressor, seguido dos quirópteros que foram responsáveis por 135 casos[1].

A raiva canina vem decrescendo a cada ano (DA SILVA et al., 2004; QUEIROZ et al., 2009), e muito se deve às campanhas de vacinação canina (ANDRADE et al., 2008). Segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde do Brasil (SVS/MS) o número de ataques de animais silvestres a humanos notificados em 1999 e 2005 foram, respectivamente, 35 e 16334, e destes, os morcegos foram responsáveis, respectivamente, por 29 e 11811 ataques.

Nos Estados Unidos da América (EUA), espécies silvestres de animais são responsáveis por 93% dos casos de raiva diagnosticados neste país (KREBS; WHEELING; CHILDS, 2003), sendo sua maioria em uma diversidade de espécies de quirópteros, sobretudo insetívoros. Estes são grupos de animais com distribuição e importância nacionais e são considerados como hospedeiros primários de variantes específicas do RABV (KREBS et al., 2003).

Além de seu papel na evolução passada do gênero *Lyssavirus*, os morcegos estão atualmente em evidência no tema raiva. Seis dos sete genótipos clássicos do gênero foram relatados em morcegos, além dos quatro novos genótipos propostos *Aravan virus* (ARAV), *Khujand virus* (KHUV), *Irkut virus* (IRKV) e *West Caucasian bat virus* (WCBV) (BOTVIKIN, 2003; KUZMIN et al., 2003). Do mesmo modo, estudos mostram que todas as linhagens circulantes em carnívoros terrestres são originárias de linhagens específicas associadas a quirópteros (BADRANE; TORDO, 2001).

A raiva em morcegos apresenta um ciclo epidemiológico independente dos ciclos existentes nos mamíferos terrestres, sendo que nos morcegos hematófagos ocorre somente na América Latina e Trinidad e Tobago, devido à regionalidade desta espécie às condições ambientais. Em morcegos não hematófagos, a raiva é registrada sem distinção entre os países desenvolvidos e em desenvolvimento das Américas, que pela expansão das áreas de ocorrência (incluindo áreas urbanas), representa um problema emergente de saúde pública (ACHA; SZYFRES, 2003).

A possibilidade de os morcegos hematófagos desempenharem um papel importante na propagação da raiva foi pela primeira vez levantada em 1911 por Antônio Carini. Este, realizou os primeiros estudos incluindo morcegos (CARINI,

[1] Dados cedidos pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde do Brasil – SVS/MS.

1911), porém esta hipótese não foi prontamente aceita pelos pesquisadores internacionais, tendo sido, então, considerada uma “fantasia tropical”. Carneiro e Freitas Lima (1927) descreveram a mesma situação no Estado do Paraná, mas a aceitação de que os morcegos são também transmissores da raiva somente ocorreu na década de 1930, pela publicação de estudos, semelhantes aos de Carini, na Ilha de Trinidad (PAWAN, 1936).

Os morcegos são animais altamente móveis e a capacidade de certas espécies de se adaptar em ambiente urbano e abrigar-se em residências e edifícios aumenta a probabilidade de contato com humanos e animais domésticos (UIEDA et al., 1996). O número desses animais nas áreas urbanas tem aumentado constantemente (TADDEI, 1983). A adaptação dos morcegos ao meio urbano se deve em grande parte à abundante oferta de alimento e abrigo, associada à ausência de predadores (ALMEIDA et al., 1994).

Ainda, a co-habitação de uma caverna ou de um abrigo por morcegos de diferentes hábitos alimentares (UIEDA, 1996), poderia provocar brigas e mordeduras e disseminar o RABV entre as populações de diferentes espécies de morcegos.

Em função desses fatos, os quirópteros vêm tendo crescente importância em saúde pública em áreas urbanas no que diz respeito à raiva, dada à crescente população e à frequência de ocorrência de raiva (CARNIELI JR. et al., 2005). Além de ser um sério problema de saúde pública na América do Sul, também causa grande prejuízo econômico para a pecuária destes países (DA ROSA et al., 2006; KOTAIT et al., 2007; BARBOSA et al., 2008). Os morcegos hematófagos são os responsáveis pela transmissão, quase total, dos casos de raiva em bovinos e equinos (PAHO, 1995), infectando milhares de animais anualmente (SCHNEIDER et al., 2009).

O reconhecimento dos morcegos como reservatórios do RABV na América do Norte (SCATTERDAY; GALTON, 1954) levou ao relato de inúmeros casos de raiva humana, nos quais foram identificadas variantes próprias de morcegos, sem evidências de mordeduras. Além disso, foram relatados em diversos outros países da Europa e do continente americano (CHILDS; REAL, 2007).

A análise de isolados de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* mostra que existem no mínimo duas variantes antigênicas (AgV), AgV3 e AgV11, na população deste animal no México. Em relação aos morcegos frugívoros, existem

duas variantes do RABV, AgV4 e AgV9, estabelecidas na população de *Tadarida brasiliensis mexicana* (VELLASCO-VILLA et al., 2002, 2006).

O *D. rotundus* é um dos morcegos mais evoluídos, em relação ao sistema nervoso (BHATNAGAR, 2008). Pertencem à família *Phyllostomidae*, subfamília *Desmodontinae*, e da subordem *Microchiroptera* (REIS et al., 2007).

D. rotundus não possui cauda e apresenta redução do apêndice nasal e da dentição, com incisivos e caninos extremamente afiados (GREENHALL, 1988), o que os tornam característicos. Sua coloração, geralmente, é pardo-ferruginoso na parte dorsal do corpo e cinza claro na parte ventral (GREENHALL; JOERMANN; SCHMIDT, 1983). *S*ão noctívagos, normalmente se abrigam em refúgios escuros e úmidos (TADDEI, 1983), vivendo em colônias (entre 10 a 200 indivíduos), refugiando-se em locais de difícil acesso; utilizam muitos tipos de abrigos e podem dividir esse espaço com mais de 40 outras espécies de morcegos (GREENHALL; JOERMANN; SCHMIDT, 1983; ARELLANO-SOTA, 1988). As colônias, geralmente, ocorrem em regiões de serra com muitas cavernas, onde o serviço de vigilância e controle da Secretaria da Agricultura tem dificuldade de acesso aos seus abrigos (UIEDA et al., 1996), o que justifica o complicado controle desses animais.

A espécie *D. rotundus* usualmente utiliza um território de ação de aproximadamente 10 a 20km^2 (FLORES-CRESPO; AREALLANO-SOTA, 1991), alimentando-se à noite (UIEDA, 1992), com diferença sazonal de horários (VILLA, 1966).

Seus comportamentos de interação possibilitam que o RABV seja transmitido de forma intraespecífica (WILKINSON, 1988; LORD, 1992; GOMES; UIEDA; LATORRE, 2005).

Na última década, no Brasil, houve um considerável aumento no número de casos de raiva humana, transmitidos por *D. rotundus*. Entre os anos de 2004 e 2005, dezenas de pessoas contraíram raiva transmitida por estes animais na Região Amazônica brasileira (DA ROSA et al., 2006; BARBOSA et al., 2008). Na América Latina, do ponto de vista epidemiológico, os *D. rotundus* constituem o principal reservatório silvestre do RABV, mas outros quirópteros não hematófagos também têm importância na transmissão do vírus (FAVI et al., 2003).

Na América do Sul, pesquisas mostram que os gêneros de morcegos não hematófagos com maior importância epidemiológica para a raiva são *Artibeus* spp., *Tadarida* sp., *Myotis* sp. e *Lasiurus* sp. Entre as 1113 espécies de quirópteros

existentes no mundo, 167 espécies entre insetívoros, frugívoros e hematófagos são encontrados no Brasil. Destas, 37 espécies já foram diagnosticadas com o RABV (KOTAIT et al., 2007).

Em se tratando de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus*, o primeiro diagnóstico deu-se em Trinidad, em 1931, em um exemplar da espécie *Artibeus planirostris* e, desde então, a raiva já foi relatada nas espécies *A. fimbriatus*, *A. jamaicensis*, *A. lituratus* e *A. planirostris* (UIEDA et al., 1996; CUNHA et al., 2005).

Delpietro et al. (1997) em estudo com anticorpos monoclonais (AcM), relataram que isolados de RABV de morcegos frugívoros *A. lituratus* eram antigenicamente relacionados com a variante de morcegos hematófagos.

Quanto à biologia dos morcegos do gênero *Artibeus*, pertencem à subfamília *Stenodermatinae*, apresentando orelhas bastante desenvolvidas, que auxiliam na ecolocalização e na percepção dos sinais sonoros de suas presas, além de asas largas e curtas que permitem um voo mais lento e manobrável em meio à vegetação. Apresentam, também, folha nasal desenvolvida, de tamanho mediano, o que deve ter importância para a ecolocalização nesse grupo, e não apresentam cauda. Quanto ao hábito alimentar, são predominantemente frugívoros, com complementação de outros itens como recursos florais, insetos e folhas. Pelo fato de levarem o alimento ao abrigo, são considerados excelentes dispersores de sementes de plantas da região Neotropical, efetuando um papel crucial na recuperação de florestas após perturbação (ZORTÉA, 2007).

A espécie *Artibeus lituratus* é largamente distribuída na região Neotropical, ocorrendo desde o México até o norte da Argentina, Bolívia, Trinidad e Tobago, Pequenas Antilhas, Ilhas Três Marias e em todas as regiões do Brasil (SIMMONS, 2005).

É uma das espécies mais conhecidas do Brasil devido a sua abundância em quase toda a área de distribuição, destacando-se pela boa adaptação aos meios urbanos. Apresenta grande porte e peso acima de 75 gramas (VIZOTTO; TADDEI, 1973). A coloração destes animais predomina em marrom-chocolate, ainda que possa ocorrer variação regional com indivíduos mais acinzentados. As listras brancas faciais são bem evidentes. Abriga-se, na natureza, nas copas das árvores, sob palmeiras e outras plantas. Encontra-se em ambientes conservados, embora seja uma das espécies mais bem adaptadas a ambientes alterados e urbanos (BREDT et al., 1996).

Entre os anos de 2003 até setembro de 2008, a Seção de Diagnóstico do Instituto Pasteur recebeu mais de 18500 espécimes de morcegos para o diagnóstico da raiva, como parte do programa de vigilância epidemiológica para a doença. Destes, 18007 foram classificados como não hematófagos e 652 como hematófagos. Entre os morcegos não hematófagos, 252 foram positivas à imunofluorescência direta (IFD) para raiva nas amostras originais e/ou nos isolamentos virais em camundongos e/ou cultivo celular[2].

Da mesma forma, entre os anos de 2005 e 2007, foram diagnosticados com raiva pelo laboratório de diagnóstico do Instituto Pasteur, 160 morcegos não hematófagos, sendo que destes, 56 foram classificados como da espécie *Artibeus lituratus*[2].

Foram estabelecidas quatro variantes antigênicas (AgV) por AcM circulantes no Brasil: AgV2 (cão), AgV3 (*D. rotundus*), AgV4 (*Tadarida brasiliensis*) e AgV6 (*Lasiurus cinereus*). Além destas quatro variantes, outra variante antigênica, AgV5, também foi identificada em *D. rotundus*, porém não é comumente encontrada no país. Além das variantes mencionadas, outros seis perfis antigênicos não determinados foram descritos, uma delas em primatas e outras em morcegos insetívoros. Entre os herbívoros de interesse econômico, foram tipificados antigenicamente como AgV3. Ainda, no Estado de São Paulo, foram tipificados antigenicamente isolados do RABV de morcegos não hematófagos, sendo detectados as variantes antigênicas AgV3 e AgV4, típicas de *D. rotundus* e *T. brasilensis*, respectivamente (ALBAS et al., 2009).

Estudos filogenéticos baseados no gene *N* demonstraram que os RABV encontrados em morcegos do gênero *Artibeus* são próximos àqueles associados ao morcego hematófago *Desmodus rotundus* (SHOJI et al., 2004), sendo todos pertencentes a uma mesma linhagem genética do RABV (KOBAYASHI et al., 2005).

Além disso, Brandão et al. (2004) em um trabalho sobre diversidade genética de RABV de *Artibeus* spp., baseado no gene *N*, falharam em encontrar distinção entre isolados de RABV tanto de *Artibeus* spp. quanto de *D. rotundus*, tendo como objeto de estudo um número restrito de amostras.

Estudos voltados ao entendimento das relações filogenéticas entre isolados de RABV provenientes de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* de áreas urbanas

[2] Dados cedidos pela Seção de Diagnóstico do Instituto Pasteur de São Paulo.

e aquelas relacionadas a morcegos hematófagos como o *D. rotundus* com os quais compartilham *habitats* são fundamentais para um amplo entendimento da cadeia epidemiológica da raiva no Brasil, visto que tornam possível sugerir ou descartar a transmissão continuada entre morcegos de hábitos alimentares tão diversos.

A geração de dados acerca da diversidade genética de linhagens de RABV com base no gene codificador da glicoproteína G é um meio simples de se fazer uma primeira sugestão acerca do compartilhamento de sítios antigênicos entre linhagens circulantes e aquelas presentes em formulações vacinais, sobretudo voltadas ao uso em humanos em esquemas de pré e pós-exposição, contribuindo de modo direto para a predição da efetividade de tais esquemas.

Ainda, a geração de sequências tanto do gene *N* quanto do gene *G* para uma mesma amostra de RABV permitirá um estudo mais aprofundado das linhagens de RABV circulantes em *Artibeus* spp. e de sua relação filogenética com linhagens de *D. rotundus*, contribuindo para um maior conhecimento acerca da evolução dos *Lyssavirus*.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Em vista de se ampliar o conhecimento das relações filogenéticas entre isolados de RABV provenientes de morcegos frugívoros e hematófagos, o presente estudo teve por objetivos:

- Propor uma filogenia para isolados de vírus da raiva relacionados a morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* e morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* com base em sequências parciais do gene *N* e completas do gene *G*.

- Avaliar a possibilidade da distinção entre isolados de vírus da raiva detectadas em morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* e morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* para a epidemiologia molecular da raiva.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização da pesquisa proposta neste trabalho foram utilizados os seguintes materiais e métodos:

3.1 AMOSTRAS

Para o estudo do gene *N* da nucleoproteína e do gene *G* da glicoproteína das linhagens do RABV variante antigênica três (AgV3), foram utilizados 35 isolados de RABV, sendo 20 isolados obtidos a partir de sistema nervoso central (SNC) (primeira passagem) de camundongos inoculados com SNC provenientes de morcegos do gênero *Artibeus*, e 15 isolados de RABV encontrados em SNC de bovinos (Quadro 1).

Foram escolhidos isolados de bovinos como sendo relacionados a morcegos hematófagos, uma vez que, em sua maioria, é o morcego *Desmodus rotundus*, o transmissor do RABV a estes herbívoros e também pela pequena quantidade de morcegos hematófagos recebida pelo laboratório de virologia e diagnosticada com positividade para raiva.

Os isolados, oriundos do Estado de São Paulo (Figura 1), foram enviados ao Laboratório de Diagnóstico da raiva do Instituto Pasteur - Secretaria do Estado da Saúde para vigilância epidemiológica de raiva entre os anos de 2004 e 2005.

Como critério de inclusão de isolados, utilizou-se a positividade para a raiva, tanto pela técnica de IFD (DEAN et al., 1996) como na de inoculação intracerebral em camundongos (MIT) (KOPROWSKI, 1996), para os morcegos do gênero *Artibeus* e de isolados de bovinos relacionadas a *Desmodus rotundus*, sendo os isolados de bovinos de áreas localizadas em municípios próximos à origem dos isolados de morcegos frugívoros, em local e data de detecção. Os isolados em SNC de camundongos e os SNC de bovinos foram armazenados a -80˚C até sua utilização.

Amostra	Hospedeiro original	Origem geográfica	Data de detecção	Nomenclatura do isolado
3250/05	*Artibeus* spp.	Catanduva	abr/05	05/Art3250Catanduva
3598/05	*Artibeus lituratus*	Ribeirão Preto	mai/05	05/Art3598RibeirãoPreto
3738/05	*Artibeus lituratus*	Ribeirão Preto	mai/05	05/Art3738RibeirãoPreto
4578/05	*Artibeus lituratus*	Monte Mor	jun/05	05/Art4578MonteMor
4850/05	*Artibeus* spp.	Ribeirão Preto	jun/05	05/Art4850RibeirãoPreto
4932/05	*Artibeus* spp.	Ribeirão Preto	jun/05	05/Art4932RibeirãoPreto
5459/05	*Artibeus lituratus*	Ribeirão Preto	jun/05	05/Art5459RibeirãoPreto
6734/05	*Artibeus lituratus*	Ribeirão Preto	ago/05	05/Art6734RibeirãoPreto
6956/05	*Artibeus* spp.	Ribeirão Preto	ago/05	05/Art6956RibeirãoPreto
7045/05	*Artibeus* spp.	Ribeirão Preto	ago/05	05/Art7045RibeirãoPreto
7270/05	*Artibeus lituratus*	Paraguaçú Paulista	ago/05	05/Art7270ParaguaçúPaulista
7436/05	*Artibeus lituratus*	Ribeirão Preto	ago/05	05/Art7436RibeirãoPreto
7547/05	*Artibeus lituratus*	Paraguaçú Paulista	set/05	05/Art7547ParaguaçúPaulista
7848/05	*Artibeus* spp.	Marília	set/05	05/Art7848Marília
8456/05	*Artibeus lituratus*	Paraguaçú Paulista	set/05	05/Art8456ParaguaçúPaulista
8639/05	*Artibeus lituratus*	Marília	out/05	05/Art8639Marília
8688/05	*Artibeus lituratus*	Ribeirão Preto	out/05	05/Art8688RibeirãoPreto
8921/05	*Artibeus lituratus*	Ribeirão Preto	out/05	05/Art8921RibeirãoPreto
10509/05	*Artibeus* spp.	Ribeirão Preto	nov/05	05/Art10509RibeirãoPreto
11206/05	*Artibeus lituratus*	Paraguaçú Paulista	dez/05	05/Art11206ParaguaçúPaulista
2196/04	bovino	Altinópolis	set/04	04/Bov2196Altinópolis
3441/04	bovino	Santo Antônio da Alegria	abr/04	04/Bov3441SantoAntôniodaAlegria
3833/04	bovino	Santo Antônio da Alegria	mai/04	04/Bov3833SantoAntôniodaAlegria
4698/04	bovino	Santo Antônio da Alegria	mai/04	04/Bov4698SantoAntôniodaAlegria
6930/04	bovino	Santo Antônio da Alegria	jul/04	04/Bov6930SantoAntôniodaAlegria
8967/04	bovino	Altinópolis	set/04	04/Bov8967Altinópolis
11044/04	bovino	Santo Antônio da Alegria	dez/04	04/Bov11044SantoAntôniodaAlegria
11817/04	bovino	Santo Antônio da Alegria	dez/04	04/Bov11817SantoAntôniodaAlegria
11818/04	bovino	Santo Antônio da Alegria	dez/04	04/Bov11818SantoAntôniodaAlegria
451/05	bovino	Altinópolis	jan/05	05/Bov451Altinópolis
2579/05	bovino	Santo Antônio da Alegria	abr/05	05/Bov2579SantoAntôniodaAlegria
3924/05	bovino	Altinópolis	mai/05	05/Bov3924Altinópolis
6314/05	bovino	Garça	jul/05	05/Bov6314Garça
7535/05	bovino	Platina	ago/05	05/Bov7535Platina
10339/05	bovino	Altinópolis	nov/05	05/Bov10339Altinópolis

Quadro 1 - Relação dos isolados de vírus da raiva de morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* e relacionadas a morcegos hematófagos para estudo de filogenia com base nos genes codificadores da nucleoproteína N e glicoproteína G, identificando o hospedeiro original, município onde foram encontrados, data de detecção e nomenclatura dos isolados do presente estudo - São Paulo - 2009

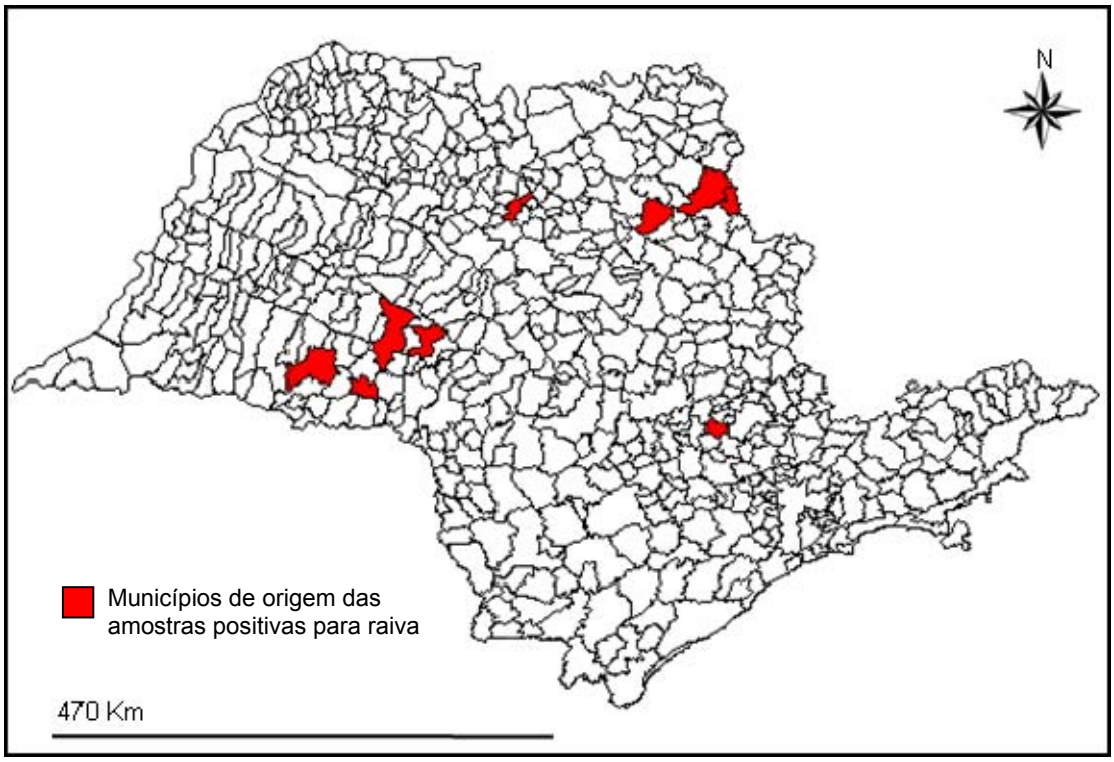

Figura 1 - Municípios do Estado de São Paulo de onde se originaram as amostras positivas para raiva detectadas em morcegos do gênero *Artibeus* e em bovinos, utilizados neste estudo

A classificação dos morcegos estudados foi realizada através das chaves taxonômicas elaboradas por Vizotto e Taddei (1973).

3.2 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT-PCR) PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DA NUCLEOPROTEÍNA (N) E GLICOPROTEÍNA (G) DO RABV

As amostras foram submetidas à reação de RT-PCR para amplificação do gene *N* e de *G*, segundo protocolo descrito por Carnieli (1999), com *primers* para nucleoproteína descritos por Orciari et al. (2001) e *primers* para a glicoproteína viral descritos por Sato et al. (2004).

Como controles positivo e negativo, foram inseridos, respectivamente, suspensão de cérebros de camundongos inoculados com a amostra fixa *Challenge Virus Standard* (CVS) e água ultra-pura livre de DNAse e RNAse, desde a fase de extração do RNA até a amplificação das amostras.

3.2.1 Extração de RNA

A extração de RNA total de SNC e controles positivo e negativo foi realizada com o método do *TRIzol Reagent* (Invitrogen™) seguindo-se as instruções do fabricante.

3.2.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) - Transcrição Reversa (RT) e Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Para a transcrição reversa, adicionaram-se 5µL do RNA extraído de cada respectiva amostra ao *mix* contendo 8µL 5X *First Strand Buffer* (Invitrogen™), 6µL do pool de dNTPs na concetração de 10mM, 4µL DTT a 100mM, 5µL de cada *primer* na concentração de 10µM (senso e antissenso, Quadro 2); 200U de Superscript™ II *Reverse Transcriptase* (Invitrogen™), 1µL de RNAseout (Invitrogen™) e 12µL de água ultra-pura livre de DNAse e RNAse estéril para um volume final de 47µL, realizando-se a transcrição reversa a 42ºC/60min.

Após a obtenção do cDNA, foi realizada a reação de PCR pela adição, para cada amostra, de 10µL de cada respectivo cDNA ao *mix* de PCR contendo 10µL de 10X PCR *Buffer* (Invitrogen™), 16µL do pool de dNTPs à 1,25mM, 5µL de cada *primer* à 10mM (senso e antissenso, Quadro 2), 5µL 50mM $MgCl_2$, 50,5µL de água ultra-pura estéril e 2,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™) para um volume final de 102µL e levados ao termociclador e submetidos ao ciclo descrito no quadro 3.

Primers	Sentido	Sequência	Gene	Posição na amostra PV[3]
21G	senso	5' ATGTAACACCTCTACAATG 3'	*N*	55-73
304	antissenso	5' TTDACGAAGATCTTGCTCAT 3'	*N*	1514-1533
GA 3222-40	senso	5´CGCTGCATTTTRTCARAGT 3´	*G*	3221-3239
GB 4119-39	antissenso	5' GGAGGGCACCATTTGGTMTC 3'	*G*	4116-4135
GS 3994	senso	5'GGGMTTTGTGGATGAAAGRGGC 3'	*G*	3995-4016
GantiBR2072	antissenso	5' TGCTGATTGCRCCTACATT 3'	*G*	5363-5382

Quadro 2 - Relação dos *primers* utilizados nas reações de RT-PCR e no sequenciamento das amostras de RABV de morcegos do gênero *Artibeus* spp. e de amostras de bovinos

Ciclo	Temperatura (°C)	Tempo
1 ciclo	94°C Denaturação	5 minutos
35 ciclos	94°C Denaturação	45 segundos
35 ciclos	55°C Anelamento	45 segundos
35 ciclos	72°C Extensão	2 minutos
1 ciclo	72°C Extensão	10 minutos

Quadro 3 - Ciclo da reação de PCR para amplificação do gene *N* e *G* do vírus da raiva isolados de *Artibeus* spp. e bovinos utilizados no presente estudo

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose em 1% em tampão TBE 1X (0,1M de Tris, 0,09M de ácido bórico e 0,001M de EDTA) contendo brometo de etídeo na concentração de 0,45mg/mL de tampão.

Foram consideradas positivas as amostras que resultaram em fragmentos de 1478 pares de bases (pb) para o gene *N*, e 915 e 1387 pb para o gene *G* (*primers* GA 3222-40/GB 4119-39 e GS 3994/GantiBR2072, respectivamente).

[3] Amostra fixa PV (número de acesso Genbank M13215).

3.3 SEQUENCIAMENTO DE DNA

Para a realização da técnica de sequenciamento de DNA foram realizados os seguintes protocolos:

3.3.1 Purificação dos produtos de PCR

Para a purificação a partir das reações de PCR foi utilizado o kit QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen®) segundo instruções do fabricante. As reações que apresentaram bandas inespecíficas foram purificadas a partir do gel com o mesmo kit.

Após a purificação, as amostras de DNA foram quantificadas visualmente em gel de agarose a 2% com *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen™).

3.3.2 Reação de sequenciamento de DNA

A reação de sequenciamento de DNA foi composta de 4µL de *BigDye* 3.1 (Applied Biosystems®), 4µL de 5x *Sequencing buffer* (Applied Biosystems®), 3,2pmol de cada *primer* (senso e antissenso, Quadro 2), referente a cada gene (*N* e *G*) em reações separadas, 30 a 50ng do DNA alvo e água DNAse/RNAse free q.s.p. para uma reação final de 10µL, levando-se ao termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf®) para 35 ciclos de 96ºC/10 segundos, 50ºC/5 segundos e 60ºC/4 min, com rampa de 1ºC/segundo entre cada temperatura.

O produto desta reação foi precipitado à temperatura ambiente com 90µL de isopropanol a 66%, incubando-se durante 20 minutos, centrifugando-se a 14.000 x g/ 25min, removendo-se o sobrenadante e adicionando-se 170µL de etanol a 70%, centrifugando-se a 14.000 x g/5min e secando-se o precipitado a 95ºC/5min. A seguir, o precipitado foi ressuspenso em 10µL de formamida HI-DI, transferido para uma placa de 96 poços para sequenciamento, e levado ao termociclador para

denaturar o DNA a 95°C durante 5 minutos. Em seguida a placa de 96 poços foi levada ao sequenciador automático ABI-3130 (Applied Biosystems™), para a obtenção das sequências.

3.3.3 Edição de sequências

Para cada um dos nt mostrados nos eletroferogramas gerados para cada uma das reações de sequenciamento foram atribuídos escores por meio do *software Phred*[4] online, sendo utilizadas as posições que apresentaram nt com índice *Phred* maior que 20 (EWING; GREEN, 1998).

Os nt com índice *Phred* igual ou menor a 20 foram conferidos manualmente com o programa *Chromas* v. 2.23 (© 1998-2002 *Technelysiumm Pty LTD*), para a busca por erros de interpretação e discrepâncias entre cada uma das fitas sequenciadas. A sequência final de cada amostra foi obtida com o aplicativo *Cap-Contig* com o programa *Bioedit* v. 5.0.9 (HALL, 1999), sendo a mesma submetida à *BLAST*n[5] para confirmação do sequenciamento.

3.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Para a construção das árvores filogenéticas, as sequências de DNA obtidas, bem como de aa traduzidos, foram analisadas pelo método múltiplo de alinhamento CLUSTAL/W utilizando-se o programa *Bioedit* (HALL, 1999), conferindo-se manualmente os alinhamentos para cada conjunto de sequências.

Para a reconstrução filogenética dos isolados de RABV, foi utilizado o método de distância com o algoritmo *Neighbor-Joining* e modelo evolutivo *Maximum Composite Likelihood* (MCL), para nt, e modelo evolutivo de Poisson para aa, com 1000 repetições de *bootstrap*. Foram utilizadas 38 sequências homólogas

---

[4] *Phred* Aplicativo disponível em: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>. Acesso em: 2008/2009.

[5] *BLAST*n Aplicativo disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Acesso em: 2008/2009.

recuperadas do GenBank (29 para *N* e 9 para *G*) e sequências de *European bat lyssavirus* 1 como grupo externo (2 sequências para *N* e 2 sequências para *G*) para o enraizamento das árvores (Quadro 4).

3.5 CÁLCULO DE IDENTIDADES DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS

As identidades médias, máximas e mínimas de nt e aa para os agrupamentos encontrados entre os isolados utilizados para as sequências dos genes *N* e *G* foram calculadas com o programa *Excel* (©1985-2003 *Microsoft Corporation*) a partir das matrizes de identidades calculadas com o programa *Bioedit*.

GENBANK	ISOLADO
Gene *N*	
AF406696.1	CVS
AB263328.1	BRdg325
AB263332.1	BRdg335
AB263324.1	BRdg317
AB083798.1	BRdg15
AB117969.1	BR-AL1
AB117970.1	BR-AL2
AB117971.1	BR-AL3
AB117972.1	BR-AP1
EU636794.1	EBLV1_04032FRA
EU626551.1	EBLV1_08120FRA
FJ649166.1	01Jarinu1500B
FJ649181.1	00Vargem655E
FJ649180.1	00Vargem555E
GQ160934.1	08IacriSP4001B
GQ160933.1	08IacriSP3577B
GQ160959.1	08VargemSP4671B
GQ160958.1	08VargemSP3395B
GQ160954.1	08SocorroSP1600B
FJ649183.1	00Vargem1948E
FJ649176.1	98Piracaia4568E
GQ160942.1	08PiracaiaSP8164B
GQ160912.1	07ItapevaSP4756B
GQ160923.1	08CacondeSP3604B
GQ160940.1	08PedregulhoSP180B
GQ160943.1	08SalesopolisSP10166B
GQ160953.1	08SerraNegraSP11445B
GQ160925.1	08DivinolandiaSP10038B
GQ160944.1	08SaoJoaodaBoaVistaSP10411B
FJ649161.1	01SaoSebastiaodaGrama910B
GQ160951.1	08SaoSebastiaodaGramaSP11322B
Gene *G*	
FJ979833.1	CVS
AB247421.2	BR-DR1
AB247422.2	BR-DR2
AB247423.2	BR-DR3
AB247410.2	BRdg15
AB247412.2	BRdg317
AB247415.2	BRdg325
AB247418.2	BRdg335
AB110664.1	BRvmbt 33
EU636788.1	EBLV1_04032FRA
EU626551.1	EBLV1_08120FRA

Quadro 4 - Sequências dos genes *N* e *G* do vírus da raiva recuperadas do GenBank utilizadas para a reconstrução da filogenia de RABV de *Artibeus* spp. e relacionadas a *Desmodus rotundus*, segundo o número de acesso do GenBank e nomenclatura do isolado

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos, baseados nas metodologias definidas para o presente estudo, estão descritos nos itens a seguir.

4.1 RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DA NUCLEOPROTEÍNA (N) E GLICOPROTEÍNA (G) VIRAIS

Todas as amostras submetidas à técnica de RT-PCR, tanto as dirigidas para o gene *N***,** como para os dois conjuntos de *primers* utilizados para o gene *G* (Quadro 2), resultaram nos fragmentos esperados.

Possíveis contaminações para as reações de RT-PCR não ocorreram, visto que as reações referentes aos controles negativos não apresentaram bandas resultantes da amplificação de DNA.

4.2 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DE DNA

Os 35 isolados de RABV positivos na técnica de RT-PCR (Quadro 1), após sua purificação e quantificação, apresentaram quantidade suficiente de DNA para a realização da reação de sequenciamento de DNA, resultando em sequências viáveis após a aferição com o aplicativo *Phred* e edição manual.

As regiões analisadas para cada gene foram as seguintes: do nt 68 ao nt 1350 do gene *N* (em relação ao vírus fixo CVS - AF406696.1), correspondendo ao aa 23 até o aa 450 da nucleoproteína viral; do nt 8 ao nt 1579 do gene *G* (em relação ao vírus fixo CVS - FJ979833.1), referentes ao aa 3 até o aa 524, incluindo os primeiros 19 aa referentes à região peptídeo sinal.

4.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Foram geradas duas árvores filogenéticas, uma para cada gene analisado, ou seja, *N* e *G*, acrescidas de sequências retiradas do GenBank, bem como as árvores dos respectivos aa.

4.3.1 Gene *N*

A árvore filogenética gerada neste estudo para o gene *N* demonstrou a formação de três grupos apoiados em *bootstraps* de no mínimo 60% e denominados como: grupo D (*Desmodus rotundus*), grupo A1 e grupo A2 (ambas de *Artibeus* spp.) (Figura 2).

O grupo D foi formado pelos isolados relacionados a morcegos hematófagos, ou seja, por isolados de bovinos. Observou-se o agrupamento de 29 isolados, sendo 13 referentes a este estudo e 16 retiradas do GenBank.

O grupo A1 foi composto de nove isolados referentes ao presente estudo, sendo sete classificados como de *Artibeus* spp., e dois de bovinos. Os isolados deste grupo provêm dos municípios de Catanduva, Monte Mor, Paraguaçú Paulista, Marília, Garça e Platina (Quadro 1). Ainda neste grupo, segregaram dois isolados provenientes de bovinos, recuperadas do GenBank.

No grupo A2, estão 13 isolados de *Artibeus* spp. deste estudo e seis isolados do GenBank. Entre os isolados de *Artibeus* spp., 12 são provenientes do município de Ribeirão Preto e um de Paraguaçu Paulista. Quatro dos isolados do GenBank agregados a este grupo, referem-se ao morcego do gênero *Artibeus*, e dois de bovinos, sendo todos do Estado de São Paulo.

Os demais isolados retirados do GenBank incluídos no alinhamento, ainda, resultaram em outras duas linhagens, que foram chamados de grupos CVS e Cão, formados pelas sequências de CVS e de canídeos domésticos.

Quanto à análise de aa, a árvore genealógica formada para o gene *N* (Figura 3) não apresentou o mesmo padrão encontrado para os nt. Neste caso, houve a formação de dois grupos principais, sendo um de isolados de bovinos, e outro, em

sua maioria, por isolados de *Artibeus* spp., e denominados como grupos D e A, respectivamente.

No grupo D, os isolados de bovinos aqui estudados segregaram em um grupo em conjunto com outros dois isolados com sequências disponíveis no GenBank, tendo emergido um outro grupo, constituído pelas demais sequências de bovinos retiradas do GenBank.

O grupo A foi formado por 20 isolados de morcegos do gênero *Artibeus*, sendo 16 do presente estudo e quatro do GenBank. Ainda, o isolado GQ160934.1, de bovino, se agregou a este grupo. Não houve separação do grupo A em duas linhagens entre os isolados de morcegos (A1 e A2), quando comparada à formação da árvore genealógica do gene *N* para nt.

Também para os aa, os demais isolados retirados do GenBank incluídas no alinhamento formaram outras duas linhagens, denominadas de CVS e Cão, formadas pelas sequências de CVS e de canídeos domésticos.

Houve a formação de um grupo constituído pelos isolados 05/Art7436RibeirãoPreto, 05/Art8456ParaguaçuPaulista, 05/Art3738RibeirãoPreto, 05/Art8921RibeirãoPreto, 05/Art7270ParaguaçuPaulista, 05/8688RibeirãoPreto, (todas de *Artibeus* spp. do presente estudo) e isolado GQ160933.1_08IacriSP3577B (do GenBank referente a bovino). Estes isolados, que pertenciam aos grupos A1 e A2, em relação aos nt de *N*, segregaram no grupo D, no estudo de topologia dos aa do gene *N*.

As siglas A1 e A2, designadas para a identificação das duas linhagens de *Artibeus* spp. encontradas no gene *N*, foram incorporadas à nomenclatura dos isolados na reconstrução das árvores filogenéticas para que fossem observadas as diferenças de topologia e formações dos grupos das árvores filogenéticas dos diferentes genes estudados (*N* e *G*).

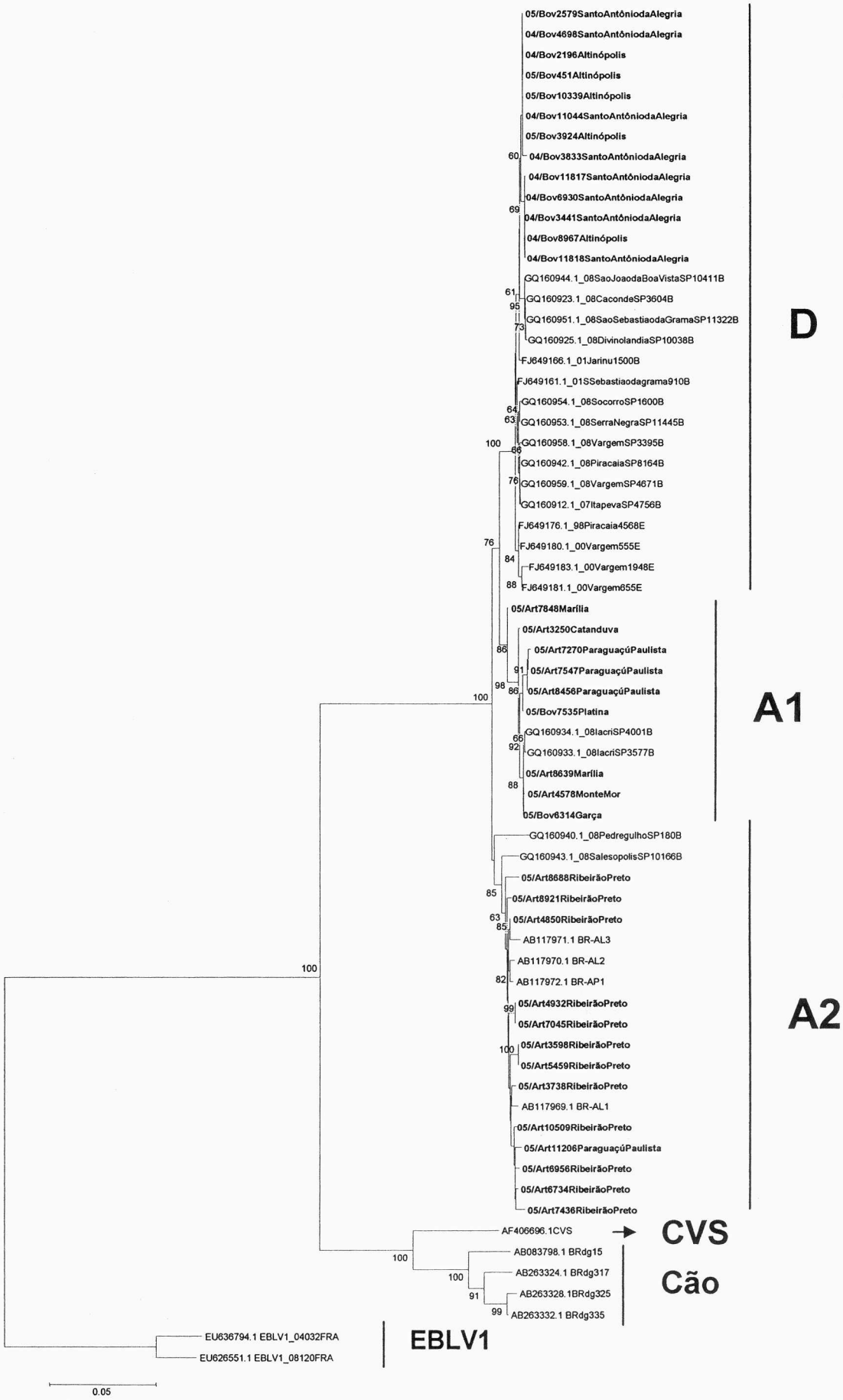

Figura 2 - Árvore de distância com algoritmo *Neighbor-Joining* e modelo evolutivo MCL para o gene *N* de RABV (nucleotídeo 68 ao 1350 em relação ao vírus fixo CVS - AF406696.1) e os respectivos grupos encontrados no presente estudo. Os valores em cada nó representam os resultados de 1000 repetições de bootstrap - São Paulo - 2009

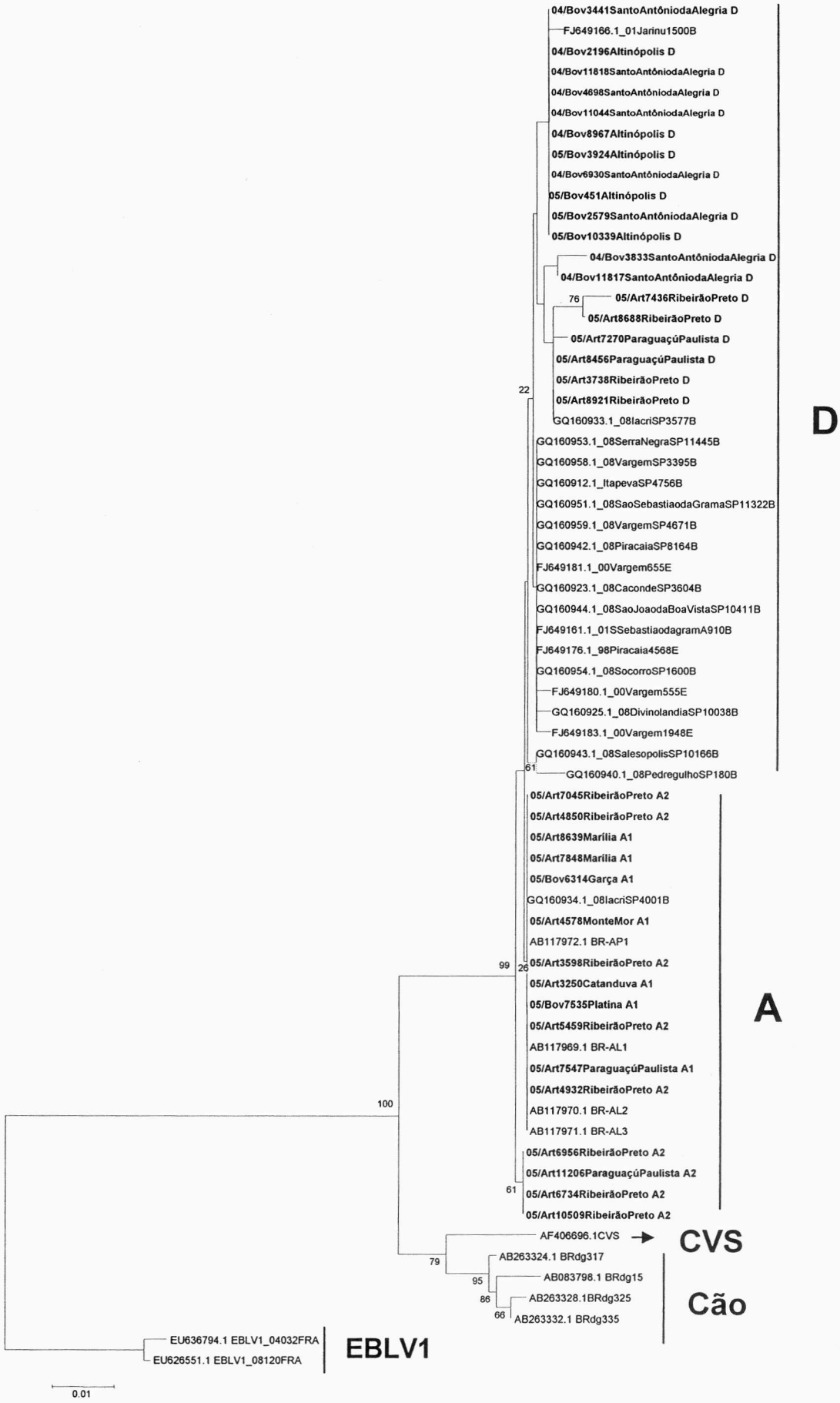

Figura 3 - Árvore de distância com algoritmo *Neighbor-Joining* e modelo evolutivo de Poisson para a proteína N de RABV (aminoácidos 23 ao aminoácido 450 em relação ao vírus fixo CVS - AF406696.1) e os respectivos grupos encontrados no presente estudo. Os valores em cada nó representam os resultados de 1000 repetições de bootstrap - São Paulo - 2009

4.3.2 Gene *G*

Para a construção da árvore filogenética do gene *G* do presente estudo foram acrescidas aos 35 isolados do estudo, nove do GenBank e duas sequências de *European bat lyssavirus* 1 (EBLV1) utilizadas como grupo externo (Figura 4).

No gene *G* houve a distinção entre os isolados de bovinos e morcegos estudados (grupos D e A). Entretanto, não se encontrou a mesma topologia dos grupos A1 e A2, como para o gene *N*, sendo tanto os isolados de A1 quanto de A2 encontrados em um mesmo grupo principal (A), em função dos baixos valores de *bootstap* dos ramos dos grupos mais internos, uma vez que é possível observar nestes, a formação de grupos menores (Figura 4).

A sequência AB110664.1BRvmbt (de morcego hematófago), retirada do GenBank, não se agregou a nenhum grupo.

Assim como para o gene *N*, os demais isolados retirados do GenBank incluídas no alinhamento, resultaram nas linhagens denominadas como CVS e Cão (formados pelas sequências de CVS e de canídeos domésticos).

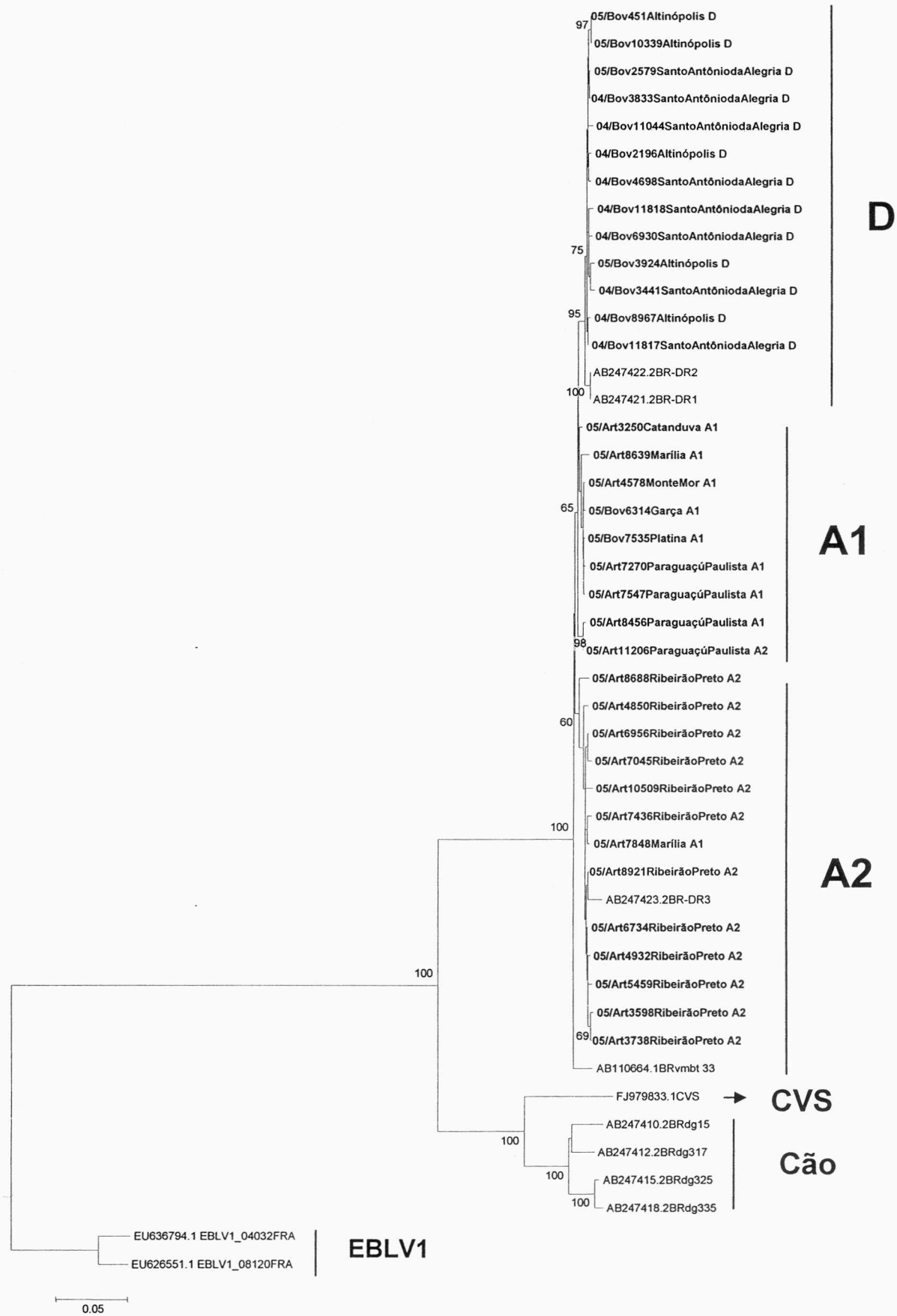

Figura 4 - Árvore de distância com algoritmo *Neighbor-Joining* e modelo evolutivo MCL para o gene *G* de RABV (nucleotídeo 8 ao 1579 em relação ao vírus fixo CVS - FJ979833.1) e os respectivos grupos encontrados no presente estudo. Os valores em cada nó representam os resultados de 1000 repetições de bootstrap - São Paulo - 2009

Ao se compararem os resultados obtidos para as árvores do gene *G* com os gerados para o gene *N*, encontra-se o grupo A1, formado pelos isolados de morcegos do gênero *Artibeus* provenientes dos municípios de Catanduva, Marília, Monte Mor, e Paraguaçu Paulista. Ainda neste grupo, segregaram dois isolados de bovinos, um de Platina e outro de Garça, assim como ocorrido para o gene *N*. O isolado 05/Art11206ParaguaçuPaulista, que no estudo do gene *N* agregou ao grupo A2, foi incorporado ao grupo A1, para o gene *G*.

No grupo A2, foram agrupados os 12 isolados de *Artibeus* spp. provenientes de Ribeirão Preto, acrescidos de um isolado de Marília e de um isolado do morcego hematófago *Desmodus rotundus* retirado do GenBank. O isolado 05/Art7848Marília, que pertencia ao grupo A1 na árvore para o gene *N*, segregou no grupo A2, para o gene *G*.

O grupo D, foi formado por 15 isolados, sendo 13 referentes a bovinos deste estudo e dois de *Desmodus rotundus* retirados do GenBank.

Quanto à análise de aa, a árvore genealógica formada para o gene *G* (Figura 5), foi mantida a mesma topologia encontrada para os nt.

Houve a distinção entre os isolados de bovinos e morcegos do gênero *Artibeus*, entretanto, dentro dos isolados de morcegos frugívoros, não se mantiveram os grupos A1 e A2, como encontrado para o gene *N*.

Oito isolados de *Artibeus* spp. (05/Art3598RibeirãoPreto, 05/Art3738RibeirãoPreto, 05/Art4850RibeirãoPreto, 05/Art4932RibeirãoPreto, 05/Art5459RibeirãoPreto, 05/Art6734RibeirãoPreto, 05/Art6956RibeirãoPreto e 05/Art8921RibeirãoPreto) de Ribeirão Preto (grupo A2 para o gene *N*) segregaram em um grupo. Os isolados 05/Bov7535Platina, 05/Art7270ParaguaçuPaulista, 05/Art7547ParaguaçuPaulista, 05/Art3250Catanduva, 05/Art4578MonteMor e 05/Bov6314Garça, de diferentes municípios (Paraguaçu Paulista, Catanduva, Monte Mor, Platina e Garça), sendo quatro de *Artibeus* spp. e dois de bovinos, formaram um grupo.

Os demais isolados do estudo se agregaram em uma topologia diferente em relação ao resultado obtido para o gene *N*, ou seja, no grupamento formado para o gene *G*, não houve distinção entre isolados que se encontravam nos grupos A1 e A2 para o gene *N*. Foram incluídas, ainda, ao grupo para o estudo dos aa para o gene *G*, dois isolados de morcegos hematófagos recuperadas do GenBank. Entretanto, estes grupos não são sustentados por altos valores de *bootstrap*.

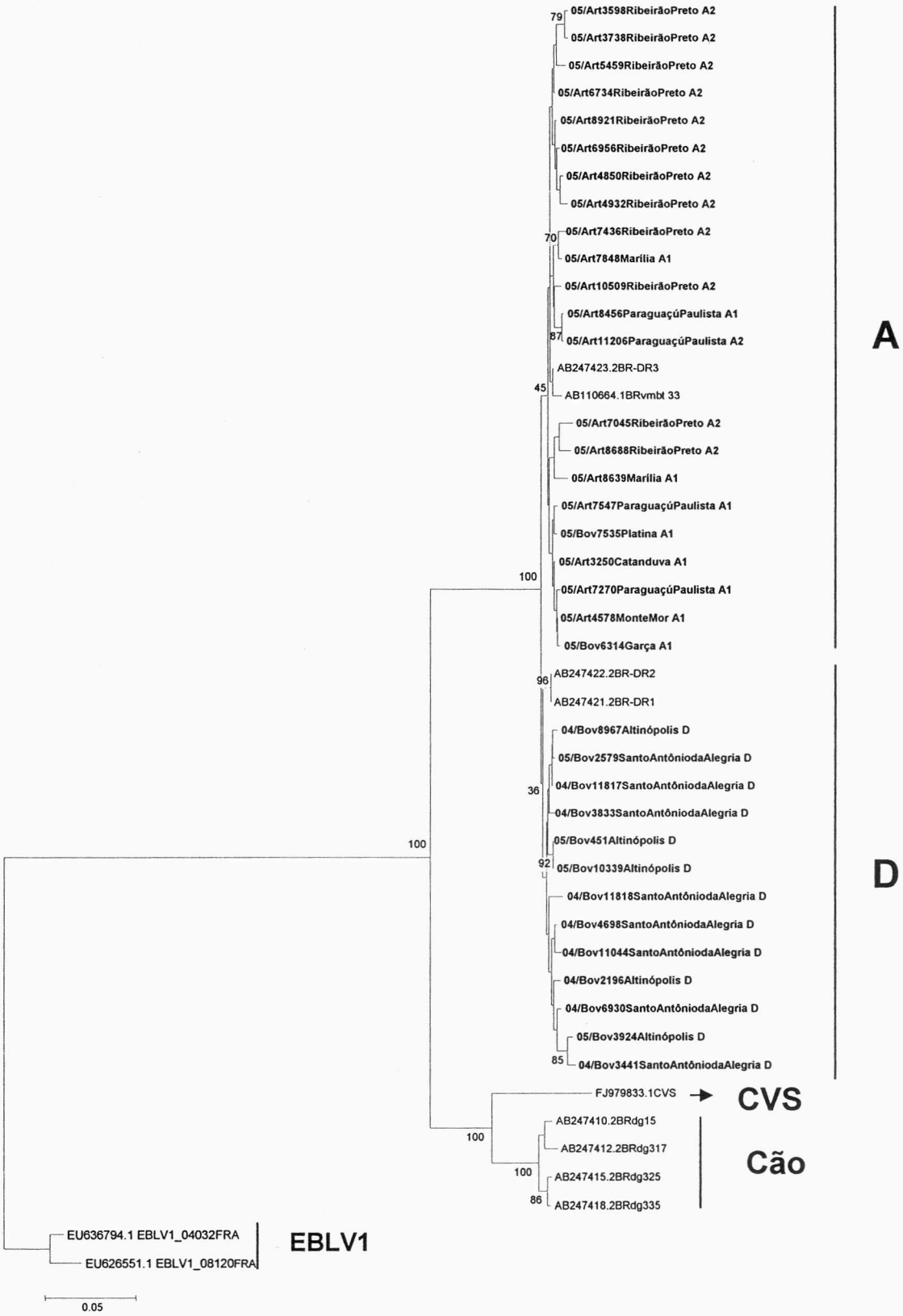

Figura 5 - Árvore de distância com algoritmo *Neighbor-Joining* e modelo evolutivo de Poisson para a proteína G de RABV (aminoácidos 3 ao 524 em relação ao vírus fixo CVS - FJ979833.1) e os respectivos grupos encontrados no presente estudo. Os valores em cada nó representam os resultados de 1000 repetições de bootstrap - São Paulo - 2009

4.4 CÁLCULO DE IDENTIDADES DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS

Para o cálculo de identidade de nt e aa, os isolados foram reunidas em grupos (D, A1 e A2), como obtido na genealogia de nt para o gene *N*, inclusive nas análises de gene e proteína G.

4.4.1 Gene *N*

Entre os 35 isolados de RABV aqui estudados e as sequências de RABV de morcegos recuperadas do GenBank, as identidades em porcentagem entre nt e aa intra e intergrupos encontrados para o gene *N* (nt 68 a 1350 do gene *N* em relação à amostra CVS de número de acesso Genbank AFJ406696.1) encontram-se nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Considerando-se todas as sequências de morcegos do gene *N* incluídas para a análise genealógica, as identidades médias de aa foram maiores que 99,3%, e de nt, maiores que 96,3%.

Tabela 1 - Identidades em porcentagem dos nucleotídeos 68 a 1350 do gene *N* dos grupos presentes na árvore genealógica para este gene para isolados de RABV de morcegos *Artibeus* spp. e bovinos relacionados a *D. rotundus* - São Paulo - 2009

Grupo	Média nt (%)	Máxima (%)	Mínima (%)
D X D	99,5	100	98,8
A1 X A1	99,5	100	98,9
A2 X A2	99,0	100	96,9
D X A1	97,7	98,7	97,1
D X A2	97,3	97,9	96,4
A1 x A2	97,2	98,2	96,3

Tabela 2 - Identidades em porcentagem dos aminoácidos 23 ao 450 para a proteína putativa N dos grupos presentes na árvore genealógica para este gene, isolados de RABV de morcegos *Artibeus* spp. e bovinos relacionados a *D. rotundus* - São Paulo - 2009

Grupo	Média aa (%)	Máxima (%)	Mínima (%)
D X D	99,7	100	98,8
A1 X A1	99,8	100	99,5
A2 X A2	99,6	100	98,1
D X A1	99,5	99,7	98,8
D X A2	99,3	99,7	98,1
A1 x A2	99,7	100	98,8

4.4.2 Gene *G*

As identidades em porcentagem entre nt e aa intra e intergrupos encontrados para o gene *G* (nt 8 a 1579 do gene *G* em relação à amostra CVS de número de acesso Genbank FJ979833.1), foram demonstradas nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

Considerando-se todas as sequências de morcegos do gene *G* incluídas para a análise genealógica, as identidades médias de aa foram maiores que 97,6% e de nt, maiores que 97,0%.

Tabela 3 - Identidades em porcentagem dos nucleotídeos 8 ao 1579 do gene *G* dos grupos presentes na árvore genealógica para este gene para isolados de RABV de morcegos *Artibeus* spp. e bovinos relacionados a *D. rotundus* - São Paulo - 2009

Grupo	Média nt (%)	Máxima (%)	Mínima (%)
D X D	99,3	100	98,7
A1 X A1	99,3	99,8	98,7
A2 X A2	99,2	99,7	98,4
D X A1	98,5	99,1	97,9
D X A2	97,7	98,0	97,0
A1 x A2	98,2	98,6	97,8

Tabela 4 - Identidades em porcentagem dos aminoácidos 3 ao 524 para a proteína putativa G dos grupos presentes na árvore genealógica para este gene, isolados de RABV de morcegos *Artibeus* spp. e bovinos relacionados a *D. rotundus* - São Paulo - 2009

Grupo	**Média aa (%)**	**Máxima (%)**	**Mínima (%)**
D X D	98,8	100	98,0
A1 X A1	99,1	99,8	98,0
A2 X A2	98,6	99,6	97,5
D X A1	98,0	99,0	96,5
D X A2	97,6	98,6	96,1
A1 x A2	98,5	99,8	97,5

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* vêm tendo uma crescente relevância para a epidemiologia da raiva, sobretudo em centros urbanos, tendo sido relatados como carreadores de variantes do RABV similares àquelas encontradas em morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*.

Na presente investigação, a filogenia dos genes *N* e *G* de isolados de RABV encontrados em *Artibeus* spp. e outros relacionadas a *Desmodus rotundus,* conjuntamente com sequências recuperadas do GenBank, sugeriu a existência de linhagens próprias de cada um destes morcegos.

Os resultados encontrados pelas técnicas de RT-PCR, obtidos neste estudo, apresentaram positividade para todos os 35 isolados utilizados, tanto para o gene *N* como para os dois conjuntos de *primers* utilizados para o gene *G*.

Portanto, no presente estudo, as reações de PCR utilizadas mostraram-se eficientes ao serem aplicadas nos isolados de RABV, o que pode ser atribuído principalmente ao baixo polimorfismo das áreas de hibridização dos *primers* selecionados, localizadas em segmentos altamente conservados do genoma do RABV em cada um dos respectivos genes (KISSI; TORDO; BOURHY, 1995), o que torna o desenho dos *primers* mais eficiente.

Esta mesma eficiência aqui encontrada é concordante com o já relatado em outras investigações onde os mesmos conjuntos de *primers* foram utilizados, tanto para linhagens de RABV de carnívoros e bovinos (estas últimas relacionadas ao *D. rotundus*) quanto de diversas espécies de morcegos em estudos epidemiológicos realizados com isolados do vírus provenientes do Brasil (SATO et al., 2004; CARNIELI et al., 2008, 2009a, b).

Mesmo sendo reconhecida a eficiência da técnica de PCR para o diagnóstico de raiva por sua elevada sensibilidade analítica (BORDIGNON et al., 2005), há casos em que ocorrem resultados falso-negativos quando o teste é realizado diretamente em amostras clínicas sem o prévio isolamento viral, e mesmo naqueles onde o isolamento foi realizado, tanto em função de variações de sequências-alvo para determinados conjuntos de *primers* e certas linhagens de RABV, quanto por eventuais baixos títulos virais.

Por exemplo, em um estudo realizado com 70 amostras de RABV isoladas em SNC de camundongos, utilizando os mesmos *primers* aqui utilizados, apenas 66 foram positivas para amplificação do gene *N* e 54 para o gene *G* (OLIVEIRA, 2009).

Da mesma forma, um estudo realizado com a aplicação de PCR para detecção do gene *N* de RABV em dez isolados de folículo piloso de pacientes humanos com raiva resultou em falso-negativos para três delas, sendo que todas as amostras de SNC destes mesmos pacientes haviam sido positivos para o isolamento em camundongos (MACEDO et al., 2006).

Deve-se, ainda, levar em consideração a possibilidade da presença de altos títulos virais, sobretudo nas amostras de *Artibeus* spp., as quais se encontravam isoladas em SNC de camundongos, todas em primeira passagem, o que poderia inibir as reações de transcrição reversa e também de amplificação pela DNA polimerase.

Paralelamente, no caso dos isolados de bovinos, os quais serviram de fontes de isolados relacionados a *D. rotundus*, pode-se inferir que os títulos eram também elevados, ainda que não isoladas, uma vez que, no caso de bovinos, frequentemente as amostras enviadas para diagnóstico ao Instituto Pasteur de São Paulo provêm de animais sintomáticos, nos quais a replicação viral é intensa (WARRELL; WARRELL, 2004).

Quanto à eficiência da técnica de sequenciamento de DNA dos 105 produtos de PCR (35 para o gene *N* e 35 para as porções 5' e 3' de *G*, respectivamente), nota-se no item Resultados que a mesma foi de 100%, uma vez que sequências completas foram obtidas para todos estes produtos.

Entretanto, tal eficiência só foi atingida em função de várias tentativas de sequenciamento realizadas para alguns destes *amplicons*, sendo uma das mais comuns causas de sequenciamentos falhos a baixa concentração de DNA-alvo obtida em algumas reações de PCR.

Finalmente, os métodos criteriosos de edição de sequências aqui utilizados, incluindo a análise de probabilidade de erro para cada base obtida com o aplicativo *Phred*, permitiu a geração de sequências acuradas, o que é essencial para a obtenção de análises confiáveis em filogenia.

Com isto, foram obtidas sequências completas para o gene *G* e parciais para o gene *N* de todos os 35 isolados de RABV incluídos desde o início da investigação.

Ao se realizarem as análises filogenéticas dos nucleotídeos para o gene *N*, as sequências segregaram em três distintos grupos, denominados na figura 2 (item 4.3.1) de grupos D (*Desmodus rotundus*), A1 e A2, estes últimos nomeados em função do gênero *Artibeus*.

No grupo D, encontraram-se exclusivamente isolados associados ao morcego hematófago *D. rotundus*, tanto aqueles do presente estudo quanto os demais recuperados do GenBank.

No grupo A1, linhagens isoladas de RABV de morcegos *Artibeus* spp. de vários municípios segregaram com isolados de bovinos, tanto deste estudo como recuperadas do GenBank.

No grupo A2 houve o predomínio de isolados provenientes do município de Ribeirão Preto. O grupo é formado na sua maioria por isolados provenientes de morcegos do gênero *Artibeus* (do estudo e do GenBank), entretanto, apresentou dois isolados onde o RABV foi obtido de isolados de bovino (retirados do GenBank).

Com isso, pode-se sugerir inicialmente a existência de divergência genética suficiente para a distinção entre linhagens de RABV de *Artibeus* spp. e de *D. rotundus* e que isolados de RABV de *Artibeus* spp. podem ser, ainda, subdivididas em duas diferentes linhagens.

A heterogeneidade de isolados de RABV expressa genealogicamente sob a forma de grupos específicos a certos tipos de mamíferos é um episódio detectado entre distintos hospedeiros (DIAZ et al., 1994; DE MATTOS et al., 1996, 2000; ITO et al., 2001; FAVORETTO et al., 2002; KOBAYASHI et al., 2005, 2007; CARNIELI JR. et al., 2008).

Entretanto, uma vez que no presente estudo não foram obtidos isolados de RABV de *Artibeus* spp. e *Desmodus rotundus* de modo concomitante, ou seja, em um mesmo momento e em um mesmo local, deve-se ponderar que estes resultados poderiam estar enviesados, visto que a ausência de tal amostragem pode ter levado à ausência de linhagens de uma e outra espécie nos agrupamentos aqui considerados como hospedeiro-específicos.

Já foi demonstrado que o agrupamento de isolados de RABV é determinado pela influência de barreiras geográficas em detrimento de barreiras espécie-específicas (HOLMES et al., 2002).

Um estudo acerca da evolução do RABV em amostras isoladas na Europa também demonstrou haver agrupamento em relação à origem geográfica (BOURHY et al., 1999), o qual foi atribuído a barreiras naturais como o Rio Vistula, na Polônia.

Em estudos realizados entre canídeos brasileiros (CARNIELI et al., 2008), também se observou regionalidade entre estes animais, na região nordeste do país.

Assim, pode-se interpretar destes trabalhos que, após a emergência de uma dada linhagem hospedeiro-específica, há uma tendência à emergência de padrões regionais para estas linhagens (KISSI et al., 1999).

Entretanto, consideradas exceções a esta regra, isolados de RABV de morcegos insetívoros, revelaram, em um estudo recentemente concluído, uma tendência de agrupamento gênero-específico para estes hospedeiros no Brasil (OLIVEIRA, 2009).

Assim sendo, levando-se em conta a extensa área geográfica do Estado de São Paulo incluída na amostragem do presente estudo, pode-se especular que a ausência de efeito filogeográfico para o padrão de segregação filogenética aqui descrito que permitiu a distinção entre isolados de *Artibeus* spp. e de *D. rotundus* tenha sido minimizada, uma vez que estes dois gêneros de morcegos são distribuídos por todo o Estado de São Paulo (UIEDA, 1995).

Além disso, especificamente para os dois agrupamentos de morcegos do gênero *Artibeus* (A1 e A2), do mesmo modo já descrito para isolados pertencentes à variante antigênica 3 em *Desmodus rotundus*, (CARNIELI et al., 2009b), os mesmos podem, por sua vez, significar linhagens regionais de RABV neste gênero de morcegos.

Com isto, tanto a diferenciação entre linhagens de RABV de *Artibeus* spp. e *Desmodus rotundus* quanto a existência de duas linhagens para RABV de *Artibeus* spp., é concordante com a sugestão de que, considerando a raiva em morcegos, o hospedeiro é tão importante quanto o fator geográfico para a diferenciação e evolução das linhagens, em função do isolamento geográfico entre subpopulações de morcegos de um mesmo gênero (OLIVEIRA, 2009).

Da mesma forma, pode-se sugerir que diferentes linhagens de RABV existentes em morcegos de um mesmo gênero, com distinta localização geográfica, possam ter emergido após a separação geográfica destas populações de morcegos de um mesmo gênero, os quais, a partir daí, adquiriram suas linhagens de RABV, evoluindo de modo independente.

Variantes e linhagens do RABV circulam ao longo de um determinado território, fato que permite sua identificação, pois são adaptadas e mantidas pelas diferentes espécies animais distribuídas regionalmente. Esta distribuição pode ser alterada se ocorrer a transmissão do vírus de um hospedeiro primário para um secundário (*spillover*). Se esta nova população infectada mantiver a infecção ao longo do tempo, a área de distribuição do vírus é alterada, podendo ser ampliada (CHILDS; REAL, 2007).

Nota-se, entretanto, que, no grupamento A1, encontram-se os isolados 05/Bov7525Platina e 05/Bov6314Garça, cujas sequências foram geradas no presente estudo, e as sequências 08IacreSP4001B e 08IacreSP3577B, obtidas do GenBank, todas estas derivadas de bovinos infectados com raiva, sendo este fato de destaque pelo agrupamento próximo revelado entre isolados derivados das duas espécies de morcegos propostas como tendo linhagens específicas de RABV.

Do mesmo modo, no grupamento A2, tem-se o isolado 08SalesópolisSP10166B, também proveniente de um bovino.

Considerando-se que a hipótese da gênero-especificidade das linhagens de RABV para *Artibeus* spp. e *Desmodus rotundus* seja sustentada, pode-se sugerir como base para a classificação discordante destas linhagens de RABV detectadas em bovinos o fato de as mesmas serem uma linhagem de *Artibeus* spp. que tenha sido transmitida para bovinos por meio de eventos de *spillover* ou salto inter-espécies.

Nestes eventos, um dado reservatório é infectado com uma linhagem de um patógeno não característico da sua espécie, que no caso da raiva, fora descrito para várias espécies de mamíferos de diferentes regiões (HOLMES et al., 2002; BRANDÃO, 2009). Um exemplo fundamental de *spillover*, citado por Badrane e Tordo (2001), é a transmissão da linhagem de RABV de quirópteros para carnívoros, que foi calculado como tendo ocorrido antes mesmo da descoberta das Américas, dando origem, assim, às linhagens de RABV em animais terrestres.

Ainda que o morcego hematófago seja sabidamente o principal transmissor da raiva para os herbívoros na América Latina e Caribe, as hipóteses citadas a seguir, não poderiam deixar de serem mencionadas nesta Discussão, com o intuito de que todas as possibilidades para o evento encontrado fossem explicitadas.

Para tanto, devem ser consideradas três possibilidades de transmissão:

Uma destas é a transmissão diretamente de um *Artibeus* spp. para um bovino, considerando-se que estes morcegos quando acometidos pela raiva têm seu comportamento alterado, e, em geral, encontram-se caídos e com dificuldade de locomoção. Por haver a ocorrência destes morcegos também em áreas rurais (VIZOTTO; TADDEI, 1973) poder-se-iam esperar encontros entre bovinos susceptíveis e estes morcegos, uma vez que os bovinos poderiam acidentalmente entrar em contato com estes através de mordedura durante o pastejar, podendo confundi-lo com uma folha ou pastagem, ou este, ainda, estar camuflado entre a vegetação. Da mesma forma, há a possibilidade de o bovino caminhar sobre um morcego raivoso caído sobre a pastagem e este, em resposta, morde-lo para se defender.

Para uma segunda possibilidade, poder-se-ia considerar a existência de um hospedeiro intermediário entre os bovinos e os *Artibeus* spp., como, por exemplo, o cão, já que carnívoros domésticos já foram encontrados infectados com linhagens de RABV de morcegos, tendo, inclusive, transmitido as mesmas para seres humanos (KOTAIT et al., 2001; CARNIELI et al., 2005).

Finalmente, uma terceira possibilidade, a qual também envolve um hospedeiro intermediário entre *Artibeus* spp. e bovinos pode ser proposta, segundo a qual a transmissão se deu de um *Artibeus* spp. para um *Desmodus rotundus* o qual, por sua vez, levou à transmissão da linhagem em questão para os bovinos nos quais ela foi, então, detectada, levando estes últimos a manifestarem raiva por uma linhagem atípica, não própria de *Desmodus rotundus*.

Entretanto, considerando-se os hábitos alimentares do *D. rotundus*, que o levam a parasitar bovinos, constituindo-se, desta forma, no Brasil, na principal fonte de infecção de raiva bovina (SCHNEIDER et al., 1996; ITO et al., 2001), a hipótese da transmissão *Artibeus* spp. para *Desmodus rotundus* e então para bovinos é a mais plausível como base para o encontro de linhagens de RABV de *Artibeus* spp. em bovinos, o que é apoiado, ainda, pela baixa frequência deste achado no presente estudo.

Esta possibilidade torna-se mais provável se considerado o fato de que diferentes famílias de morcegos poderem compartilhar um mesmo abrigo, ou ainda, em função da capacidade de voo, percorrerem grandes distâncias, compartilhando territórios, o que favorece a transmissão do RABV entre eles (WILKINSON, 1988; UIEDA, 1995). Os morcegos *D. rotundus*, por exemplo, utilizam muitos tipos de

abrigos e podem dividir esse espaço com mais de 40 outras espécies de morcegos (GREENHALL; JOERMANN; SCHMIDT, 1983; ARELLANO-SOTA, 1988).

Na árvore de aminoácidos para o gene *N*, em oposição ao que foi encontrado para a árvore de nucleotídeos para este gene, foram obtidos apenas dois grupos.

Um, em sua maioria, formado por *D. rotundus* (D) e outro por *Artibeus* spp., no qual foram agrupados indistintamente os isolados anteriormente divididos em A1 e A2.

Nesta filogenia de aminoácidos, a distinção de RABV da variante antigênica 3 entre isolados de *D. rotundus* e de *Artibeus* spp. foi mantida. Entretanto, o fato de não ter havido a emergência de duas linhagens de *Artibeus* spp. pode ser explicada em função de maior número de mutações do tipo sinônima (que não causam substituição do aa especificado) em relação às não-sinônimas, nas quais substituições de nt levam a substituição de aa (WUNNER, 2002).

Ou seja, nestes casos, a taxa de substituição de nt é maior do que a de aa, o que leva a uma maior distinção nucleotídica entre isolados indistinguíveis em termos de aa.

Observando-se as identidades de nt e de aa para os grupos A1 e A2, a identidade de aa mínima foi de 98,8% (Tabela 2), enquanto, que, para nt, a mesma foi de 96,3% (Tabela 1). Já entre os isolados derivados de *Artibeus* spp. e de *Desmodus rotundus* 98,1% para aa e 96,4% em nt (Tabelas 3 e 4), o que, de fato, demonstra a prevalência de mutações nucleotídicas sinônimas como base da proximidade filogenética entre isolados de RABV de *Artibeus* spp., em termos de aa.

A discordância entre a topologia das árvores de nt e aa para o gene *N* em relação aos isolados de RABV de *Artibeus* spp. pode significar que, de fato, há um padrão regional para as linhagens de RABV neste gênero de morcegos, mas pode-se especular que a divergência genética não se traduziu em diferença fenotípica para as duas linhagens virais encontradas em morcegos do gênero *Artibeus*.

Neste caso, além do tempo de divergência entre as duas linhagens genéticas de RABV de *Artibeus* spp., é possível que, considerando-se que as pressões de seleção imunológicas e de receptores sejam as mesmas em todos os morcegos *Artibeus* spp., a pressão de seleção purificante levaria as duas linhagens genéticas tornarem-se próximas em termos de aa, o que já foi sugerido como a base para a adaptação e emergência de linhagens de RABV próprias de um ou outro tipo de hospedeiro (BRANDÃO, 2009).

Pode-se, ainda, considerar que tenham ocorrido nas populações de *Artibeus* spp. incluídas neste estudo, dois eventos de aquisição de linhagens de RABV, o que, ao longo do tempo evolutivo e considerando-se o isolamento geográfico, levaria ao estabelecimento de linhagens genéticas diferenciáveis.

Para os isolados de RABV detectados em bovinos, mas que se agruparam juntamente com isolados de *Artibeus* spp. para a árvore de nt do gene *N*, a mesma topologia foi encontrada, o que apoia a hipótese de transmissão de *Artibeus* spp. para bovinos tendo como hospedeiro intermediário *Desmodus rotundus*.

A despeito desta discussão, sete isolados de RABV, sendo seis do presente estudo (05/Art7270ParaguaçúPaulista, 05/Art8456ParaguaçúPaulista, 05/Art7436RibeirãoPreto, 05/Art8921RibeirãoPreto, 05/Art8688RibeirãoPreto e 05/Art3738RibeirãoPreto) e um recuperado do GenBank (08IacriSP3577B), foram classificados no grupo de *Artibeus* spp. na árvore de nt para gene *N*, mas, segregaram no grupo de *D. rotundus* na árvore de aa do gene *N*.

Esta diferença pode significar que foram detectados tanto linhagens de RABV que se encontram fixas, ou seja, adaptadas e restritas a populações de *Artibeus* spp. quanto outras linhagens (as que mudaram de classificação) ainda em processo de fixação em *Artibeus* spp., o que já foi descrito para infecções experimentais de RABV onde se demonstrou ser necessário um número de passagens superior a três para que ocorram mutações significativas (KISSI et al.,1999).

Na análise da árvore filogenética para os nt do gene *G* (Figura 4 - item 4.3.2), foram obtidos dois grupos de sequências, sendo um exclusivo aos isolados de RABV relacionados a *D. rotundus* e outro a de *Artibeus* spp., porém, sem a distinção entre grupos A1 e A2 obtida para a árvore de nucleotídeos do gene *N*.

O gene *G* tem uma maior taxa de mutação quando comparado ao gene *N*, visto que a proteína *G* tem a função de ligação ao receptor celular e é alvo para anticorpos neutralizantes, enquanto que a nucleoproteína tem função estrutural essencial para a manutenção do nucleocapsídeo viral (WUNNER, 2002) e, assim, o gene *G* pode não guardar com acurácia a história evolutiva molecular de uma linhagem de RABV pelo acúmulo de substituições que levam à saturação do sinal filogenético (MATIOLI, 2001).

Apesar do aumento progressivo de variação genotípica, uma linhagem de RABV pode evoluir e expressar mutações características que determinam fenótipos que são traduzidos nas relações vírus-hospedeiro (MORIMOTO et al., 1998).

As mutações no RABV ocorrem com frequência média de 10^{-4} a 10^{-5}/nt/ciclo de replicação, alterando a frequência genômica da população viral. Igualmente, as novas linhagens do vírus que incorporam novas mutações, sendo levadas a se adaptarem, são submetidas à seleção. Este fenômeno forma subpopulações designadas como *quasispecies* (TSIMRING; LEVINES; KESSLER, 1996).

Assim, diferenças encontradas entre isolados de RABV de diversas regiões, em diferentes momentos, devem ser sempre analisadas por meio deste modelo de genética de populações (MORIMOTO et al., 1998; KISSI et al., 1999).

São conhecidas regiões de elevada diversidade no gene *G*, relacionadas com atividades biológicas do vírus como o reconhecimento de receptores celulares e estimulação do sistema imune. Estas características podem facilitar a disseminação do vírus dentro de uma mesma espécie ou, ainda, entre espécies diferentes (BENMANSOUR et al., 1992; MORIMOTO et al., 1998; BADRANE; TORDO, 2001), e relaciona as variações de aa da glicoproteína com a emergência de novos *Lyssavirus* no ambiente, pois podem permitir adaptações a novos hospedeiros (BADRANE et al., 2001).

Desta forma, pode-se sugerir que estes diferentes padrões de segregação para o gene *N* e gene *G* tenham ocorrido em função dos diferentes processos de seleção a que são expostas as linhagens de RABV durante a história evolutiva das mesmas, relacionados às diferentes atividades das proteínas codificadas (HOLMES et al., 2002).

Assim sendo, no caso de diferentes hospedeiros, como por exemplo, diferentes gêneros de quirópteros, apresentarem pequenas diferenças estruturais no receptor de membrana celular para a glicoproteína do RABV, diferentes linhagens virais com glicoproteínas com maior afinidade por determinada subclasse de receptor podem ter sido favorecidas e selecionadas, estabelecendo-se de modo independente em cada tipo de hospedeiro (OLIVEIRA, 2009).

A proteína N também é a mais conservada antigenicamente, e por esta razão é a mais utilizada em diagnósticos e estudos das relações evolutivas e epidemiológicas (TORDO; KOUKNETZOFF, 1993). Considerando-se as elevadas restrições funcionais exercidas sobre a proteína N (WUNNER, 2002), e substituições de aa que impedem sua propagação, o resultado é uma menor taxa de mutação para o gene que a codifica (KISSI et al., 1999; HOLMES et al., 2002). Com isto, a pressão de seleção para o gene *N*, é possivelmente exercida por proteínas

intracelulares do hospedeiro envolvidas no ciclo de replicação viral, de elevada restrição funcional.

A árvore filogenética apresentada para aa nos estudos referente ao gene *G*, apresentou a mesma topologia daquela para os nt do gene *G*. Quando analisadas as identidades inter e intragrupos para o gene *G*, as identidades obtidas para nt foram sempre inferiores às de aa (Tabelas 3 e 4), similarmente ao encontrado para o gene *N*, do que se pode, também, sugerir que houve predomínio de mutações de nt do tipo sinônimas para ambos os genes.

Considerando-se os isolados de RABV de bovinos 05/Bov6314Garça e 05/Bov7535Platina, os quais segregaram no grupamento de RABV de *Artibeus* spp. para nt e aa de N, manteve-se o mesmo padrão de segregação considerando-se os nt e aa de G, o que é novamente concordante com a transmissão indireta entre *Artibeus* spp. e bovinos.

Alterações de topologias de árvores poderiam ser atribuídas também à existência de recombinações entre diferentes isolados de RABV, mas, dado que evidência definitiva deste fenômeno em vírus da raiva ainda não foi encontrada (CHARE; GOULD; HOLMES, 2003), esta variável não foi levada em consideração nas análises aqui apresentadas.

A topologia obtida nas árvores filogenéticas entre RABV de morcegos (AgV3) e cães (AgV2), apresentou-se com a formação de grupos distintos, como esperado. Esta dicotomia foi estabelecida desde o primeiro estudo genético do RABV isolado em canídeos e em morcegos realizado por Ito et al. (2001), o que valida tanto as regiões gênicas sequenciadas quanto os métodos de análise filogenética utilizada no presente estudo.

Somando-se os elementos discutidos até este ponto, pode-se propor, para fins de epidemiologia molecular, que, para a diferenciação entre linhagens de RABV de *D. rotundus* e *Artibeus* spp., a mesma seja realizada em termos de filogenia de aa para a nucleoproteína, eliminando o viés da mudança de topologia encontrada para as árvores de nt e o viés da tipificação de linhagens não fixas a estas espécies, permitindo uma classificação mais acurada com elevados valores de *bootstrap* quando comparados à árvore de aa de G.

O primeiro trabalho publicado relacionado à tipificação genética do RABV no Brasil foi o de Ito et al. (2001), onde os autores descreveram que a identidade

genética dos isolados de cães estudados foi maior que 99%, enquanto que em *D. rotundus*, a mesma foi maior que 96,6%.

A partir deste trabalho a caracterização genética do RABV mostrou a diversidade do vírus no país e se estendeu para outras espécies de quirópteros, além do *D. rotundus*. Kobayashi et al. (2005), analisando isolados do RABV de espécies frugívoras, insetívoras e de *D. rotundus*, relataram linhagens associadas a morcegos *Artibeus* spp. (frugívoro), *D. rotundus* e morcegos insetívoros, sugerindo haver linhagens espécie-específicas. Continuando a pesquisa anterior, obteve uma linhagem associada aos morcegos insetívoros do gênero *Lasiurus* (KOBAYASHI et al., 2007).

Nos casos dos trabalhos citados nos parágrafos anteriores, os resultados encontrados, como a ausência de distinção entre RABV de *D. rotundus* e *Artibeus* spp., podem ser devidos ao baixo número de isolados utilizados, principalmente derivados de *Artibeus* spp., o que, no presente estudo, foi compensando pela inclusão de 20 isolados de RABV destes quirópteros de uma abrangente área geográfica do Estado de São Paulo.

Entretanto, estes achados apontam para a necessidade de estudos mais abrangentes, com maior número de isolados dos diferentes hospedeiros (*D. rotundus* e *Artibeus* spp.) de mesma localidade e de forma concomitante.

Desta maneira, tais estudos poderiam verificar e/ou estender a classificação dos isolados por espécie hospedeira conforme aqui proposto ou ainda, permitir correlações com regiões geográficas, uma vez que o ciclo da raiva no Brasil é altamente complexo e apresenta sobreposição dos ciclos urbano e silvestre em muitas áreas do país (ITO et al., 2003).

Também, o sequenciamento do genoma completo de alguns isolados incluídos neste estudo seria de grande valia para um melhor entendimento das relações evolutivas de linhagens de RABV de *Desmodus rotundus* e de *Artibeus* spp. propostas como base para a diferenciação filogenética entre as mesmas.

Outro caminho seria a inoculação experimental de RABV de *Desmodus rotundus* em *Artibeus* spp. e vice-versa, acompanhando a evolução do RABV ao longo do tempo em passagens sucessivas.

Finalmente, considerando-se as implicações para a saúde pública e para o controle da raiva, estudos voltados à elucidação do grau de proteção entre vacinas contra a raiva em utilização em animais de produção, de companhia e seres

humanos e linhagens do RABV encontradas em diversas espécies de morcegos, incluindo *D. rotundus* e *Artibeus* spp., permitirão entender com maior segurança a eficiência dos programas de controle da raiva.

De posse dessas informações, torna-se fundamental a utilização das ferramentas da epidemiologia molecular para um melhor esclarecimento da relação filogenética entre diferentes linhagens de RABV.

Assim, pela real importância do controle da raiva junto à saúde pública, a relação de transmissão de linhagens de RABV entre os diversos morcegos, como os aqui analisados, devem ser continuamente estudados.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na presente pesquisa e embasados pela literatura consultada permitiram chegar às conclusões que se seguem:

- Para os isolados de vírus da raiva relacionados a morcegos frugívoros do gênero *Artibeus* e morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*, a filogenia com base em sequências do gene/proteína N e do gene/proteína G demonstra a segregação em padrões gênero-específicos concordantes no caso de linhagens fixas em cada um destes quirópteros.

- Com base em sequências parciais de aminoácidos para a nucleoproteína, é possível realizar distinção acurada entre linhagens de RABV de *Artibeus* e morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* com fins de definição de fontes de infecção em epidemiologia molecular.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonoses y enfermidades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 2. ed. Washington, D.C.: Organization Panamericana de la Salud, 1986. p. 502-526. (OPS_Publicación Científica, 503).

ACHA, P. N.; SZYFRES, B**. Zoonoses y enfermidades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington, D. C.: Organization Panamericana de la Salud, 2003. v. 2, 425 p.

ALBAS, A.; SOUZA, E. A.; LOURENÇO, R. A.; FAVORETTO, S. R.; SODRÉ, M. M. Antigen profile of rabies virus isolated from different species of non-hematophagous bats in the region of Presidente Prudente, State of São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 1, p. 15-17, 2009.

ALMEIDA, M. F.; AGUIAR, E. A. C.; MARTORELLI, L. F. A.; SILVA, M. M. S. Diagnóstico laboratorial de raiva em quirópteros realizado em área metropolitana na região sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, n. 5, p. 341-344, 1994.

ANDRADE, A. M.; QUEIROZ, L. H.; PERRI, S. H.; NUNES, C. M. A descriptive profile of the canine population in Araçatuba, São Paulo State, Brazil, from 1994 to 2004. **Revista de Saúde Pública**, v. 24, n. 4, p. 927-932, 2008.

ARELLANO-SOTA, C. Biology, ecology, and control of the vampire bat. **Reviews of Infectious Disease**, v. 10, n. 4, p. 615-619, 1988.

BADRANE, H.; BAHLOUL, C.; PERRIN, P.; TORDO, N. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. **Journal of Virology**, v. 75, n. 7, p. 3268-3276, 2001.

BADRANE, H.; TORDO, N. Host Switching in Lyssavirus History from the Chiroptera to the Carnivora Orders. **Journal of Virology**, v. 75, n. 17, p. 8096-8104, 2001.

BARBOSA, T. F.; MEDEIROS, D. B.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; CASSEB, L. M.; MEDEIROS, R.; PEREIRA, A. S.; VALLINOTO, A. C.; VALLINOTO, M.; BEGOT, A. L.; LIMA, R. J.; VASCONCELOS, P. F.; NUNES, M. R. Molecular epidemiology of rabies virus isolated from different sources during a bat-transmitted human outbreak occurring in Augusto Correa municipality, Brazilian Amazon. **Virology**, v. 370, n. 2, p. 228-236, 2008.

BENMANSOUR, A.; BRAHIMI, M.; TUFFEREAU, C.; COULON, P.; LAFAY, F.; FLAMAND, A. Rapid sequence evolution of street rabies glycoprotein is related to the highly heterogeneous nature of the viral population. **Virology**, v. 187, n. 1, p. 33-45, 1992.

BHATNAGAR, K. P. The brain of the common vampire bat, *Desmodus rotundus murinus* (Wagner, 1840): a cytoarchitectural atlas. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 3, p. 583-599, 2008.

BORDIGNON, J.; BRASIL-DOS-ANJOS, G.; BUENO, C. R.; SALVATIERA-OPORTO, J.; DÁVILA, A. M.; GRISARD, E. C.; ZANETTI, C. R. Detection and characterization of rabies virus in Southern Brazil by PCR amplification and sequencing of the nucleoprotein gene. **Archives of Virology**, v. 150, n. 4, p. 695-708, 2005.

BOTVINKIN, A. D. Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 1623-1625, 2003.

BOURHY, H.; KISSI, B.; AUDRY, L.; SMRECZAK, M.; SADKOWSKA-TODYS, M.; KULONEN, K.; TORDO, N.; ZMUDZINSKI, F. J.; HOLMES, C. E. Ecology and evolution of rabies virus in Europe. **Journal of Genetic Virology**, v. 80, p. 2545-2557, 1999.

BRANDÃO, P. E. On the interference of clinicalout come on rabies transmission and pertubation**. Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 15, n. 2, p. 190-203, 2009.

BRANDÃO, P. E.; CARNIELI JR., P.*;* CARRIERI, M. L.; CASTILHO, J. G.; MACEDO, C. I.; OLIVEIRA, R. N.; ZANETTI, C. R.; KOTAIT, I. Rabies virus versus frugivorous and vampire bats: evolutive and public health insights. In: INTERNATIONAL CONFERENCE RABIES IN THE AMERICAS, 15., 2004, Santo Domingo, Dominican Republic. **XV RITA**. Santo Domingo, 2004. p. 41-42.

BREDT, A.; ARAÚJO, F. A. A.; CAETANO-JÚNIOR, J.; RODRIGUES, M. G. R.; YOSHIZAWA, M.; SILVA, M. M. S.; HARMANI, N. M. S.; MASSUNAGA, P. N. T.; BÜRER, S. P.; POTRO, U. A. R.; UIEDA, W. **Morcegos em áreas urbanas e rurais**: manual de manejo e controle. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, 1996. p. 117.

BRIGGS, D.; HANLON, C. A. World rabies day 7: focusing attention on a neglected disease. **Veterinary Records**, v. 161, n. 9, p. 288-289, 2007.

CARINI, A. Sobre a epizootia de raiva observada no Estado de Santa Catarina – morcegos propagadores de moléstias? **Chácaras e Quintaes**, v. 3, n. 6, jun. 1911.

CARNEIRO, V. E.; FREITAS LIMA, C. Estudos sobre a raiva no Paraná. **Revista de Zootecnia Veterinária**, v. 13, p. 137-156, 1927.

CARNIELI JR., P.; BRANDÃO, P. E.; CASTILHO, J. G.; BUENO, C. R.; CARRIERI, M. L.; MACEDO, C. I.; OLIVEIRA, R. N.; ZANETTI, C. R.; KOTAIT, I. Phylogeny of a rabies virus identified in a cat closely related to vampire bat rabies based on the nucleoprotein gene. **Virus Reviews and Research**, v. 10, n. 1, p. 50-55, 2005.

CARNIELI JR., P.; FAHL, W. O.; CASTILHO, J. G.; OLIVEIRA, R. N.; MACEDO, C. I.; DURYMANOVA, E.; JORGE, R. S. P.; MORATO, R. G.; SPÍNDOLA, R. O.; MACHADO, L. M.; ÚNGAR DE SÁ, J. E.; CARRIERI, M. L.; KOTAIT, I. Characterization of rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in northeastern Brazil. **Virus Research**, v. 131, p. 33-46, 2008.

CARNIELI JR., P.; CASTILHO, J. G.; FAHL, W. O.; VÉRAS, N. M.; CARRIERI, M. L.; KOTAIT, I. Molecular characterization of rabies virus isolates from dogs and crab-eating foxes in Northeastern Brazil. **Virus Research,** v. 141, n. 1, p. 81-89, 2009a.

CARNIELI JR., P.; CASTILHO, J. G.; FAHL, W. O.; VÉRAS, N. M.; TIMENETSKY, M. C. S. T. Genetic characterization of rabies virus isolated from cattle between 1997 and 2002 in an epizootic area in the state of São Paulo, Brazil. **Virus Research***,* v. 144, n.1/2, p. 215-224, 2009b.

CARNIELI, P. **Produção de sondas genéticas não-radioativas para o diagnóstico do vírus rábico pela técnica de RT-PCR e imunoquimioluminescência**. 1999. 98 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

CHARE, E. R.; GOULD, E. A.; HOLMES, E. C. Phylogenetic revels a low rate of homologus recombination in negative-sense RNA viruses. **Journal of General Virology**, v. 84, p. 2691-2703, 2003.

CHILDS, J. E.; REAL, L. A. Epidemiology. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. (Ed.). **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2007. p. 123-199.

CUNHA, E. M. S.; LARA, M. C. C. S. H.; NASSAR, A. F. C.; SODRÉ, M.; AMARAL, L. V. F. Isolamento do vírus da raiva em *Artibeus fimbriatus* no estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 4, p. 683-684, 2005.

DA ROSA, E. S.; KOTAIT, I.; BARBOSA, T. F.; CARRIERI, M. L.; BRANDÃO, P. E.; PINHEIRO, A. S.; BEGOT, A. L.; WADA, M. Y.; OLIVEIRA, R. C.; GRISARD, E. C.; FERREIRA, M.; LIMA, R. J.; MONTEBELLO, L.; MEDEIROS, D. B.; SOUSA, R. C.; BENSABATH, G.; CARMO, E. H.; VASCONCELOS, P. F. Bat-transmitted human rabies outbreaks, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 1197-1202, 2006.

DA SILVA, L. H.; BISSOTO, C. E.; DELBEM, A. C.; FERRARI, C. I.; PERRI, S. H.; NUNES, C. M. Canine rabies epidemiology in Araçatuba and neighborhood, Northwestern São Paulo State-Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 2, p. 139-142, 2004.

DE MATTOS, C. A.; FAVI, M.; YUNG, V.; PAVLETIC, C.; DE MATTOS, C. C. Bat rabies in urban centers in Chile. **Journal of Wild Diseases**, v. 36, n. 2, p. 231-240, 2000.

DE MATTOS, C. A.; DE MATTOS, C. C.; SMITH, J. S.; MILLER, E. T.; PAPO, S.; UTRERA, A.; OSBURN, B. I. Genetic characterization of rabies field isolates from Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 1553-1558, 1996.

DEAN, D. J.; ABELSETH, M. K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. 4 ed. Geneva: WHO, 1996. p. 35-82.

DELPIETRO, H. A.; GURY-DHOMEN, F.; LARGHI, O. P.; MENA-SEGURA, C.; ABRAMO, L. Monoclonal antibody characterization of rabies virus strains isolated in the River Plate Basin. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihl B. Journal of Veterinary medicine**, v. 44, n. 8, p. 477-483, 1997.

DIAZ, A. M.; PAPO, S.; RODRIGUEZ, A.; SMITH, J. S. Antigenic Analysis of rabies virus isolates from Latin America and the Caribbean. **Journal of Veterinary Medicine B**, **Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 41, n. 3, p. 153-160, 1994.

DODET, B. Preventing the incurable: Asian rabies, experts advocate rabies control. **Vaccine**, v. 24, n. 6. p. 3045-3049, 2006.

ERTL, H. C.; DIETZSCHOLD, B.; GORE, M.; OTVOS JR., L.; LARSON, J. K.; WUNNER, W. H.; KOPROWSKI, H. Induction of rabies virus-specific T-helper cells by synthetic peptides that carry dominant T-helper cell epitopes of the viral ribonucleoprotein. **Journal of Virology**, v. 63, n. 7, p. 2885-2892, 1989.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *phred.* II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186-194, 1998.

FAVI, M.; DE MATTOS, C. A.; YUNG, V.; CHALA, E.; LÓPEZ, L. R.; DE MATTOS, C. C. First case of human rabies in Chile caused by an insectivorous bat virus variant. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 79-81, 2002.

FAVI, M.; NINA, A.; YUNG, V.; FERNÁNDEZ, J. Characterization of rabies virus isolates in Bolivia. **Virus Research**, v. 97, n. 2, p. 135-140, 2003.

FAVORETTO, S. R.; CARRIERI, M. L.; CUNHA, E. M. S.; AGUIAR, A. C.; SILVA, L. H. Q.; SODRÉ, M. M.; SOUZA, M. C. A. M.; KOTAIT, I. Antigenic typing of brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-2000. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 2, p. 91-95, 2002.

FENNER, R.; BACHMANN, P. A.; GIBBS, E. P.; MURPHY, F. A.; STUDDERT, M. J.; WHITE, D. O. **Virologia veterinária**. Zaragoza: Acribia, 1992. p. 551-556.

FINKE, S.; COX, J. H.; CONZELMANN, K. K. Differential transcription attenuation of rabies virus genes by intergenic regions: Generation of recombinant viruses overexpressing the polymerase gene. **Journal of Virology**, v. 74, n. 16, p. 7261-7269, 2000.

FLORES-CRESPO, R.; AREALLANO-SOTA, C. Biology and control of vampire bat. In: BAER, G. M. (Ed.). **The natural history of rabies**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 462-474.

FOOKS, A. R.; BROOKES, S. M.; JOHNSON, N.; MCELHINNEY, L. M.; HUTSON, A. M. European bat lyssaviruses: an emerging zoonosis. **Epidemiology and Infection**, v. 131, n. 3, p. 1029-1039, 2003.

GAUDIN, Y.; RUIGROK, R. W.; TUFFEREAU, C.; KNOSSOW, M.; FLAMAND, A. Rabies virus glycoprotein is a trimer. **Virology**, v. 187, n. 2, p. 627-632, 1992.

GIBBONS, R. V. Cryptogenic rabies, bats, and the question of aerosol transmission. **Annals of Emergency Medicine**, v. 39, n. 5, p. 528-536, 2002.

GOMES, M. N.; UIEDA, U.; LATORRE, M. R. D. O. Influência do sexo de indivíduos da mesma colônia no controle químico das populações do morcego hematófago *Desmodus rotundus* (*Phyllostomidae*) no Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 38-43, 2005.

GREENHALL, A. M. Feeding behavior. In: GREENHALL, A. M.; SCHMIDT, U. (Ed.). **Natural history of vampire bats**. Florida: CRC Press, 1988. p. 111-131.

GREENHALL, A. M.; JOERMANN, G.; SCHMIDT, U. *Desmodus rotundus*. **Mammallian Species**, v. 202, p. 1-6, 1983.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HOLMES, E. C.; WOELK, C. H.; KASSIS, R.; BOURHY, H. Genetic Constraints and Adaptive Evolution of Rabies Virus in Nature. **Virology**, v. 292, p. 247-257, 2002.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **Virus Taxonomy**: the classification and nomenclature of viruses: Eighth Report of the Intenational Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2005. p. 630-634.

ITO, M.; ARAI, Y. T.; ITO, U. T.; SAKAI, T.; ITO, F. H.; TAKASAKI, T.; KURANE, I. Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolates in Brazil: identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. **Virology**, v. 284, p. 214-222, 2001.

ITO, M.; ITOU, T.; SHOJI, Y.; SAKAI, T.; ITO, F. H.; ARAI, T. Y.; TAKASAKI, T.; KURANE, I. Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Virology**, v. 26, p. 317-330, 2003.

KAMOLVARIN, N.; TIRAWATNPONG, T.; RATTANASIWAMOKE, R.; TIRAWATNPONG, S.; PANPANICH, T.; HEMACHUDHA, T. Diagnosis of Rabies by polymerase chain reaction with nested *primer*s. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, p. 207-210, 1993.

KAPLAN, G.; TURNER, G.S.; WARREL, D. **Rabies**: the facts**.** 2nd. ed. Oxford; New York: Oxford University Press, 1986. p. 8-74. (Oxford medical publications).

KAPLAN, M. M. Safety precautions in handling rabies virus. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Ed.). **Laboratory techniques in rabies.** Geneva: WHO, 1996.

KISSI, B.; BADRANE, H.; LAVENU, A.; TORDO, N.; BRAHIMI, M.; BOURHY, H. Dynamics of virus quasispecies during serial passages in heterologous hosts. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 2041-2050, 1999.

KISSI, B.; TORDO, N.; BOURHY, H. Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. **Virology**, v. 209, n. 2, p. 526-537, 1995.

KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; KATO, M.; ITOU, T.; CUNHA, E. M.; SILVA, M. V.; MOTA, C. S.; ITO, F. H.; SAKAI. T. Genetic diversity of bat rabies viruses in Brazil. **Archives of Virology**, v. 152, n. 11, p. 1995-2004, 2007.

KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; SHOJI, Y.; SATO, T.; ITOU, T.; CUNHA, E. M.; SAMARA, S. I.; CARVALHO, A. A.; NOCITI, D. P.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Molecular epidemiological analysis of bat rabies viruses in Brazil. **Journal of Veterinary and Medical Science**, v. 67, n. 7, p. 647-652, 2005.

KOPROWSKI, H. The mouse inoculation test. In*:* MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Ed.). **Laboratory techniques in rabies**. 4 ed. Geneva: WHO, 1996. p. 80-87.

KOTAIT, I.; CARRIERI, M. L.; CARNIELI JR, P.; CASTILHO, J. G.; OLIVEIRA, R. N.; MACEDO, C. I.; SCHEFFER, K. C.; ACHKAR, S. M. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, n. 40, p. 2-8, 2007.

KOTAIT, I.; FAVORETTO, S. R.; CARRIERI, M. L.; TAKAOKA, N. Y. Raiva humana causada pela variante 3 – *Desmodus rotundus* no Estado de São Paulo. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL. MORCEGOS COMO TRANSMISSORES DE RAIVA, 2001, São Paulo. **Resumos**. São Paulo, 2001. Disponível em: <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/extras/seminario_2001.pdf>. Acesso em: 13 ago. 2009.

KREBS, J. W.; WHEELING, J. T.; CHILDS, J. E. Rabies surveillance in the United States during 2002. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 223, n. 12, p. 1736-1748, 2003.

KREBS, J. W.; WILLIAMS, S. M.; SMITH, J. S.; RUPPRECHT, C. E.; CHILDS, J. E. Rabies among infrequently reported mammalian carnivores in the United States, 1960-2000. **Journal of Wild Diseases**, v. 39, n. 2, p. 253-261, 2003.

KUZMIN, I. V.; ORCIARI, L. A.; ARAI, Y. T.; SMITH, J. S.; HANLON, C. A.; KAMEOKA, Y.; RUPPRECHT, C. E. Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. **Virus Research**, v. 97, n. 2, p. 65-79, 2003.

LAFON, M.; WIKTOR, T.J. Antigenic sites on the ERA rabies virus nucleoprotein and non-structural protein. **Journal of Genetic Virology**, v. 66, p. 2125-2133, 1985.

LORD, R. D. Seasonal reproduction of vampire bats and its relation to seasonality of bovine rabies. **Journal of Wild Diseases**, v. 28, n. 2, p. 292-294, 1992.

LORD, R. D. Control of vampire bats. In: GREENHALL, A. M.; SCHMIDT, U. (Ed.). **Natural history of vampire bats**. Florida: CRC PRESS, 1988. p. 215-226.

MACEDO, C. I.; CARNIELI JR, P.; BRANDÃO, P. E.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; OLIVEIRA, R. N.; CASTILHO, J. G.; MEDEIROS, R.; MACHADO, R. R.; OLIVEIRA, R. C.; CARRIERI, M. L.; KOTAIT, I. Diagnosis of human rabies cases by polymerase chain reaction of neck-skin samples. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 5, p. 341-345, 2006.

MADORE, H. P.; ENGLAND, J. M. Rabies virus protein synthesis in infected BHK-21 cells. **Jounal of Virology**, v. 22, n. 1, p. 102-112, 1977.

MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução.** Ribeirão Preto: Holos, 2001. 202 p.

MAYO, M. A.; PRINGLE, C. R. Virus taxonomy. **Journal of Genetic Virology**, v. 79, p. 649-657, 1997.

MCCOLL, K. A.; TORDO, N.; SETIÉN, A. A. Bat lyssavirus infections. **Revue Scientifique et Technique International Office of Epizootics**, v. 19, n. 1, p. 177-179, 2000.

MEBATSION, T. Extensive attenuation of rabies virus by simultaneously modifying the dynein light chain binding site in the P protein and replacing Arg333 in the G protein. **Journal of Virology**, v. 75, n. 23, p. 11496-11502, 2001.

MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Ed.). **Laboratory techniques in rabies**. 4 ed. Geneva: WHO, 1996. 478 p.

MITCHELL, G. C.; BURNS, R. J.; KOLZ, A. L. Rastreo del comportamiento nocturno de los murciélagos vampiros por radiotelemetria. **Tecnica Pecuaria en Mexico**, v. 27, p. 47-56, 1973.

MORIMOTO, K.; HOOPER, D. C.; CARBAUGH, H.; FU, Z. F.; KOPROWSKI, H.; DIETZSCHOLD, B. Rabies virus quasispecies: implications for pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, v. 6, p. 3152-3156, 1998.

NIEZGODA, M.; HANLON, C. A.; RUPPRECHT, C. E. Animal rabies. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. (Ed.). **Rabies**. Academic Press: San Diego, 2002. p. 163-218.

OLIVEIRA, R. N. **Vírus da raiva em morcegos insetívoros**: implicações em epidemiologia molecular da diversidade dos genes codificadores da nucleoproteína e glicoproteína. 2009. 81 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ORCIARI, L. A.; NIEZGODA, M.; HANLON, C. A.; SHADDOCK, J. H.; SANDELIN, D. W.; YAGER, P. A.; RUPPRECHT, C. E. Rapid clearance of SAG-2 rabies virus from dogs after oral vaccination. **Vaccine**, v. 19, p. 4511-4518, 2001.

PAHO - La situación de la rabia en America Latina de 1990 a 1994. **Boletín Sanitario Panamericano**, v. 119, p. 451-456, 1995.

PAWAN, J. L. The transmission of paralytic rabies in Trinidad by the vampire bat *Desmodus rotundus murinus* (Wagner, 1840). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 30, n. 1, p. 101-130, 1936.

PRINGLE, C. R. *Rhabdovirus* genetics. In: WAGNER, R. R. (Ed.). **The rhabdoviruses**. New York: Plenum, 1987. p. 167-243.

QUEIROZ, L. H.; DE CARVALHO, C.; BUSO, D. S.; FERRARI, C. I.; PEDRO, W. A. Epidemiological profile of rabies in the northwestern region of São Paulo State, from 1993 to 2007. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 1, p. 09-14, 2009.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. (Ed.). **Morcegos do Brasil**. Londrina: Nélio R. dos Reis, 2007. 253 p.

REMENICK, J.; KENNY, M. K.; MCGOWAN, J. J. Inhibition of adenovirus DNA replication by vesicular stomatitis virus leader RNA. **Journal of Virology**, v. 62, n. 4, p. 1286-1292, 1988.

REMENICK, J.; MCGOWAN, J. J. A small RNA transcript of vesicular stomatitis virus inhibits the initiation of adenovirus replication in vitro. **Journal of Virology**, v. 59, p. 660-668, 1986.

RUPPRECHT, C. E.; HANLON, C, A.; HEMACHUDA, T. Rabies re-examined. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 6, p. 327–343, 2002.

ROMIJN, P. C.; HEIDI, R. V. D.; CATTANEO, C. A. M.; SILVA, R. C. F.; POEL, W. H. M. V. D. Study of Lyssaviruses of bat origin as a source of rabies for other animal species in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, p. 81-86, 2003.

SACRAMENTO, D.; BOURHY, H.; TORDO, N. PCR techniques as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. **Molecular and Cellular Probes**, v. 5, n. 3, p. 229-240, 1991.

SATO, G.; ITOU, T.; SHOJI, Y.; MIURA, Y.; MIKAMI, T.; ITO, M.; KURANE, I.; SAMARA, S. M.; CARVALHO, A. A. B.; NOCITI, D. P.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Genetic and phylogenetic analysis of glicoprotein of rabies virus isolated from several species in Brazil. **Journal of Veterinary and Medical Science**, v. 66, n. 7, p. 747-753, 2004.

SCAGLIARINI A.; BATTILANI, M.; CIULLI, S.; PROSPERI, S.; MORGANTI, L. Molecular analysis of the NP gene of Italian CDV isolates. **Veterinary Research Common**, v. 27, p. 355-357, 2003. Supplement 1.

SCATTERDAY, J. E.; GALTON, M. M. Bat rabies in Florida. **Veterinary Medicine**, v. 49, p. 133-135, 1954.

SCHLEGEL, R.; WADE, M. Biologically active peptides of the vesicular stomatitis virus glycoprotein. **Journal of Virology**, v. 53, p. 319-323, 1985.

SCHNEIDER, M. C.; ROMIJN, P. C.; UIEDA, W.; TAMAYO, H.; DA SILVA, D. F.; BELOTTO, A.; DA SILVA, J. B.; LEANES, L. F. Rabies transmitted by vampire bats to humans: An emerging zoonotic disease in Latin America? **Revista Panamericana de la Salud Publica**, v. 25, n. 3, p. 260-269, 2009.

SCHNEIDER, M. C.; SANTOS-BURGOA, C.; ARON, J.; MUNOZ, B.; RUIZ-VELAZCO, S.; UIEDA, W. Potential force of infection of human rabies transmitted by vampire bats in the amazon region of Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 6, p. 680-684, 1996.

SHOJI, Y.; KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; ITOU, T.; MIURA, Y.; MIKAMI, T.; CUNHA, E. M.; SAMARA, S. I.; CARVALHO, A. A.; NOCITTI, D. P.; ITO, F. H.; KURANE, I.; SAKAI, T. Genetic characterization of rabies viruses isolated from frugivorous bat (*Artibeus* spp.) in Brazil. **Journal of Veterinary and Medical Science**, v. 66, n. 10, p. 1271-1273, 2004.

SIMMONS, N. B. Order *Chiroptera*. In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M. (Ed.). **Mammals species of the world**: a taxonomic and geographic reference. 3rd ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005. p. 3125-3529.

SMITH, J. S.; ORCIARI, L. A.; YAGER, P. A. Molecular epidemiology of rabies in the United States. **Seminars in Virology**, v. 6, p. 387-400, 1995.

TADDEI, V. A. Morcegos: algumas considerações sistemáticas e biológicas. **Boletim Técnico – Cati**, v. 172, p. 1-31, 1983.

TORDO, N. Characterization and molecular biology of rabies virus. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. 4 ed. Geneva: WHO, 1996, p. 28-51

TORDO, N.; KOUKNETZOFF. A. The rabies virus genome: an overview. **Onderstepoort Journal of Veterinarian Research**, v. 60, n. 4, p. 263-269, 1993.

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A., KEITH, G.; ROUGEON, F. Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the

L (polymerase) proteins of unsegmented negative-stand RNA-viruses. **Virology**, v. 165, p. 565-576, 1988.

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G. Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome: Segmented homology with VSV. **Nucleic Acid Research**, v. 14, p. 2671-2683, 1986a.

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G.; ROUGEON, F. Walking along the rabies genome: Is the large G-L intergenic region a remnant gene? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, p. 3914-3918, 1986b.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008. 760 p.

TSIMRING, L. S.; LEVINE, H.; KESSLER, D. A. RNA virus evolution via a fitness-space model. **Physical Review Letters**, v. 76, n. 23, p. 4440-4443, 1996.

UIEDA, W. Período de atividade alimentar e tipos de presa dos morcegos hematófagos (*Phyllostomidae*) no Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 52, v. 4, p. 563-573, 1992.

UIEDA, W. The common vampire bat in urban environments from southeastern Brazil. **Chiroptera Neotropical**, v. 1, n. 2, p. 22-24, 1995.

UIEDA, W.; HAYASHI, M. M.; GOMES, L. H.; SILVA, M. M. S. Espécies de quirópteros diagnosticados com raiva no Brasil. **Boletim do Instituto Pasteur**, v. 1, p. 17-35, 1996.

VELASCO-VILLA, A.; GÓMEZ-SIERRA, M.; HERNANDEZ-RODRIGUEZ, G.; JUÁREZ-ISLAS, V.; MELÉNDEZ-FÉLIX, A.; VARGAS-PINO, F.; VELÁZQUEZ-MONROY, O.; FLISSER, A. Antigenic Diversity and Distribution of Rabies Virus in Mexico. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 951-958, 2002.

VELASCO-VILLA, A.; ORCIARI, L. A.; JUAREZ-ISLAS, V.; GOMEZ-SIERRA, M.; PADILLA-MEDINA, I.; FLISSER, A.; SOUZA, V.; CASTILLO, A.; FRANKA, R.; ESCALANTE-MANE, M.; SAURI-GONZALEZ, I.; RUPPRECHT, C. E. Molecular diversity of rabies viruses associated with bats in Mexico and other countries of the Americas. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1697-1710, 2006.

VILLA, R. B. **Los murciélagos de México**. México: Instituto de Biologia, Universidad Nacional Autónoma del México, 1966. 492 p.

VIZOTTO, L. D.; TADDEI, V. A. A chave para determinação de quirópteros brasileiros. **Boletim de Ciências**, n. 1, p. 1-72, 1973.

WARRELL, M.J.; WARRELL, D. A. Rabies and other lyssavirus disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 363, p. 959-969, 2004.

WHO EXPERT CONSULTATION ON RABIES, 2004. Geneva, Switzerland. **WHO Expert consultation on rabies**: First report. Geneva: WHO, 2005. 87 p. (Technical report series, 931).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Zoonoses**. Geneva: WHO, 1959. (Technical Report series, 169).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World survey of rabies:** n. 34 For the Year 1998. Geneva: WHO, 2000. 31 p.

WILKINSON, G. S. Social organization and behavior. In: GREENHALL, A. M.; SCHIMIDT, U. (Ed.). **Natural history of vampire bats**. Florida: CRC Press, 1988. p. 85-97.

WUNNER, W. H. The chemical composition and molecular structure of rabies viruses. In: BAER, G. M. (Ed.). **The natural history of rabies**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 31-67.

WUNNER, H. W. Rabies virus. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, H. W. (Ed.). **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2002, p. 93-111.

ZORTÉA, M. Subfamília Stenodermatinae. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. (Ed.). **Morcegos do Brasil**. Londrina: Nélio R. dos Reis, 2007. Cap. 7, p. 107-128.