

ANDREA ISABEL ESTEVEZ GARCIA

Análise filogenética de amostras de vírus da raiva procedentes de herbívoros da região fronteiriça entre o nordeste do Estado de São Paulo e o Sul de Minas Gerais, Brasil no período 2000 – 2009

SÃO PAULO

2013

ANDREA ISABEL ESTEVEZ GARCIA

Análise filogenética de amostras de vírus da raiva procedentes de herbívoros da região fronteira entre o nordeste do Estado de São Paulo e o Sul de Minas Gerais, Brasil no período 2000 – 2009

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Leonardo Jose Richtzenhain

São Paulo

2013

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.2835
FMVZ

Estevez Garcia, Andrea Isabel

Análise filogenética de amostras de vírus da raiva procedentes de herbívoros da região fronteiriça entre o nordeste do Estado de São Paulo e o Sul de Minas Gerais, Brasil no período 2000 - 2009 / Andrea Isabel Estevez Garcia -- 2013.
98 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2013.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Jose Richtzenhain.

1. Raiva bovina. 2. Glicoproteína. 3. Nucleoproteína. 4. Análise filogenética. 5. Bovinos.
I. Título.

PARECER DE BIOETICA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Análise filogeográfica de amostras de vírus da raiva procedentes de herbívoros do Estado de Minas Gerais, Brasil, no período de 2000-2009", protocolado sob o nº 2123/2011, utilizando 350 (trezentos e cinquenta) camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 16/02/2011.

We certify that the Research "Phylogeographic analysis of rabies virus isolates of herbivores from Minas Gerais State, Brazil, between the years 2000-2009", protocol number 2123/2011, utilizing 350 (three hundred and fifty) mice, under the responsibility Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 02/16/2011.

São Paulo, 17 de fevereiro de 2011

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ESTEVEZ GARCIA, Andrea Isabel

Título: Análise filogenética de amostras de vírus da raiva procedentes de herbívoros da região fronteira entre o nordeste do Estado de São Paulo e o Sul de Minas Gerais, Brasil no período 2000 - 2009

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus por me conceder incontáveis bênçãos ao longo de minha vida, pelos caminhos que Ele abriu e as oportunidades que continua me proporcionando, por segurar a minha mão nesta caminhada.

À CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior) pela bolsa de doutorado e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo Auxílio Pesquisa (processo 2011/06236-0) concedidos fazendo possível a realização deste projeto.

Agradeço ao Prof. Leonardo pela confiança em mim depositada, pela paciência e ensinamentos.

Ao Prof. Paulo Brandão pela valiosa ajuda e aconselhamento

Ao meu marido Cristian Villegas pelo apoio incondicional, gracias corazón!!!

Aos meus pais Pedro e Elizabeth, aos meus irmãos Marta Cecília, Maria Cristina e Alejandro, ao meu Anjo da Guarda Tia Ceferina, pelo incentivo e apoio permanentes.

Aos meus colegas no VPS, pelo convívio, colaboração em muitos e diversos aspectos da execução deste trabalho, pela amizade e carinho: Haila Chagas, Sheila Oliveira de Souza, Cintia Favero, Iracema Nunes, Carolina Torres, Giselle Ayres, Aline da Hora, Patricia Filippesen, Paloma Tonietti, Sibebe Pinheiro, Ekaterina Ono, Gina Polo, Ana Julia Alves, Guilherme Basseto Braga, Bianca Santos, Aline Guilloux.

Agradecimentos a Rafael Novaes, Willian Fahl, Juliana Galera, Pedro Carnieli e Keila Iamamoto do Instituto Pasteur.

Agradeço a Rosana Uti pela valiosa colaboração nas atividades de biotério e no Laboratório de Zoonoses Virais do VPS.

RESUMO

ESTÉVEZ GARCIA, A. I. **Análise filogenética de amostras de vírus da raiva procedentes de herbívoros da região fronteira entre o nordeste do Estado de São Paulo e o Sul de Minas Gerais, Brasil no período 2000 – 2009.** [Phylogenetic analysis of rabies virus isolates from herbivores from border region between northeast of Sao Paulo State and South of Minas Gerais, Brazil, from 2000 to 2009] 2013. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

No Brasil a raiva dissemina-se de maneira insidiosa nos herbívoros domésticos, produzindo perdas à indústria pecuária. No estado de São Paulo, a última epizootia registrada ocorreu entre os anos 1997 – 2002, acometendo bovinos e equinos. Este estudo examinou a possível relação de alguns casos detectados no sul de Minas Gerais no período 2000 a 2009 com o foco paulista citado, mediante análise filogenética de segmentos do gene da glicoproteína (540 nucleotídeos) e nucleoproteína (416 nt) viral, usando o algoritmo de Neighbor-joining, modelo evolutivo Kimura 2- parâmetros com 1000 replicações, considerando sequências de isolados procedentes de diferentes regiões do interior paulista e do Brasil, tomadas do GenBank. Foi proposta uma análise geográfica mediante o programa ArcGis, localizando as coordenadas geográficas dos municípios de origem dos casos sobre mapas de relevo, bacias hidrográficas e distribuição de biomas. A análise filogenética dos dois genes estudados sugeriu que os focos mineiros podem ter a mesma origem genética da última epizootia paulista de raiva em herbívoros ocorrida entre 1997 e 2002. A análise filogenética baseada na nucleoproteína mostrou um maior nível de detalhamento sugerindo a ocorrência de diferentes eventos e/ou centros de dispersão de raiva em herbívoros na área de estudo. A análise geográfica insinuou que os casos aconteceram nas porções menos elevadas da Serra da Mantiqueira, na área de Mata Atlântica e em proximidades das bacias dos rios Piracicaba/Jaguari, Paranaíba do Sul, Grande, Pardo e Mogi-Guaçu.

Palavras chave: raiva bovina, glicoproteína, nucleoproteína, análise filogenética, bovinos.

ABSTRACT

ESTÉVEZ GARCIA A.I. **Phylogenetic analysis of rabies virus isolates from herbivores from border region between northeast of São Paulo State and South of Minas Gerais, Brazil, from 2000 to 2009.** [Análise filogenética de amostras de vírus da raiva procedentes de herbívoros da região fronteira entre o nordeste do estado de São Paulo e o Sul de Minas Gerais, Brasil no período 2000 – 2009] 2013. 98f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Bovine rabies is still spreading insidiously in Brazil, producing economic losses to livestock industry. A remarkable epizootics took place in São Paulo state between 1997 and 2002, affecting bovine and equines. This research was intended to examine genetic relations among some rabies outbreaks in Minas Gerais (MG), during 2000 and 2009 with São Paulo epizootics by phylogenetic analysis based on glycoprotein (540 nucleotides) and nucleoprotein (416 nt) genes partial sequences using Neighbor- joining algorithm, Kimura 2-parameters model, with 1000 bootstrap replications, considering sequences from different regions of São Paulo State (SP) and Brazil from GenBank. A geographic analysis was proposed, plotting geographic coordinates of municipalities with rabies cases on topographic, hydrographic and biome maps using ArcGis software. Phylogenetic analysis for both genes suggested that cases from MG can have the same genetic origin of SP epizootics. Phylogenetic analysis based on nucleoprotein gene showed a richer level of detailing than glycoprotein gene, suggesting different events and/or dispersion centers of livestock rabies in the studied area. Geographic analysis proposed that MG cases occurred at less elevated portions of Serra da Mantiqueira mountains in the area of Atlantic forest, near Piracicaba/Jaguari, Paranaíba do Sul, Grande, Pardo and Mogi-Guaçu rivers.

Keywords: bovine rabies, glycoprotein, nucleoprotein, phylogenetic analysis, *Desmodus rotundus*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Casos de raiva bovina nos estados de São Paulo e Minas Gerais 1996-2012, Brasil.....	14
Figura 2	Organização do genoma do vírus da raiva	17
Figura 3	Representação esquemática do vírus da raiva.....	18
Figura 4	Situação geográfica dos municípios de origem das amostras do estudo de diversidade molecular do vírus da raiva baseado no gene da nucleoproteína, realizado por Heineman et. al., (2002)	21
Figura 5	Distribuição geográfica das linhagens genéticas do vírus da raiva de bovinos, período 1987 – 2006 na região sudeste do Brasil, segundo Kobayashi et al., (2008).....	22
Figura 6	Distribuição geográfica das linhagens virais RD1, RD2 e RD3 descritas no trabalho de Carnieli et. al., (2009)	23
Figura 7	Classificação das áreas epidemiológicas de raiva em bovinos no estado de São Paulo.....	26
Figura 8	Origem geográfica das amostras analisadas no presente estudo, 12 municípios da mesorregião Sul e Sudeste de Minas Gerais, Brasil	31
Figura 9	Regiões dos genes da glicoproteína e nucleoproteína do vírus da raiva, reconhecidas por cada par de primers empregados no presente trabalho.....	34
Figura 10	Árvore filogenética baseada na sequência parcial do gene da glicoproteína (540 nt), 32 casos de raiva em herbívoros Área fronteira Minas Gerais/São Paulo	46
Figura 11	Alinhamento da sequência consenso e as sequências de aminoácidos inferidas a partir da sequência parcial do gene da glicoproteína, 32 amostras procedentes do Sul de Minas Gerais (área fronteira com São Paulo), 2000 – 2009.....	48
Figura 12	Árvore filogenética baseada na sequência parcial do gene da nucleoproteína, (416 nt), 25 casos de raiva em herbívoros Área fronteira Minas Gerais /São Paulo.....	50
Figura 13	Alinhamento da sequência consenso e as sequências de aminoácidos inferidas a partir da sequência parcial do gene da nucleoproteína, 25 amostras procedentes do Sul de Minas Gerais (área fronteira com São Paulo), 2000 – 2009.....	52
Figura 14	Mapa de cota de altitude dos municípios de estudo no presente trabalho. Em destaque a Serra da Mantiqueira	54
Figura 15	Mapa das principais bacias hidrográficas da área de estudo. Área fronteira entre Minas Gerais e São Paulo.....	55
Figura 16	Distribuição geográfica dos casos de raiva em herbívoros mencionados no presente estudo segundo os biomas que existem na área de interesse, estado de Minas Gerais e São Paulo, 2002 a 2009.....	56

Figura 17	Proposta de distribuição geográfica das sub-linhagens sugeridas pela análise filogenética do presente estudo, baseado na sequencia parcial dos gene da nucleoproteína do RABV procedentes de casos bovinos e equinos de diversos municípios do Estado de São Paulo e região Sul/Sudeste de Minas Gerais (1986-2009).....	58
Figura 18	Proposta de distribuição geográfica das sub-linhagens sugeridas pela análise filogenética do presente estudo, baseada na sequênciã parcial do gene da nucleoproteína do RABV procedentes de casos em bovinos e equinos de diversos municípios do Estado de São Paulo e região Sul/Sudeste de Minas Gerais (1986 – 2009) considerando relevo da região.	59
Figura 19	Proposta de distribuição geográfica das sub-linhagens sugeridas pela análise filogenética do presente estudo, baseada na sequênciã parcial do gene da nucleoproteína do RABV procedentes de casos em bovinos e equinos de diversos municípios do Estado de São Paulo e região Sul/Sudeste de Minas Gerais (1986 – 2009), considerando as bacias hidrográficas da região.....	61
Figura 20	Proposta de distribuição geográfica das sub-linhagens sugeridas pela análise filogenética do presente estudo, baseada na sequênciã parcial do gene da nucleoproteína do RABV procedentes de casos em bovinos e equinos de diversos municípios do Estado de São Paulo e região Sul/Sudeste de Minas Gerais (1986 – 2009) , considerando a distribuição dos biomas.....	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Amostras de casos de raiva em herbívoros analisadas no presente trabalho, procedentes de municípios das mesorregiões sul/sudeste do estado de Minas Gerais, durante o período 2000 – 2009.....	30
Quadro 2	Ciclo da reação de PCR para amplificação do gene da glicoproteína e nucleoproteína do vírus da raiva isolados de Bovinos utilizados no presente estudo.....	35
Quadro 3	Sequências do gene da glicoproteína e nucleoproteína tomadas do GenBank para realizar a análise filogenética das sequências obtidas no presente trabalho	39
Quadro 4	Substituições de aminoácidos nas sequências da glicoproteína de amostras do vírus da raiva procedentes de herbívoros da região fronteira entre São Paulo e Minas Gerais, 2000 – 2009.....	49
Quadro 5	Substituições de aminoácidos nas sequências da nucleoproteína de amostras do vírus da raiva procedentes de herbívoros da região fronteira entre São Paulo e Minas Gerais, 2000 – 2009.....	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	Organização do genoma do vírus da raiva e estrutura viral.....	16
2.2	Antecedentes de estudos moleculares de casos de raiva bovina nos estados de São Paulo e Minas Gerais.....	20
2.3	Generalidades dos estados de São Paulo e Minas Gerais com relevância na epidemiologia da Raiva dos herbívoros.....	25
3	OBJETIVOS.....	28
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1	Origem das amostras.....	29
4.2	Triagem das amostras.....	32
4.2.1	Teste de IFD.....	32
4.2.2	Prova Biológica (Teste de Infecção Intracerebral em camundongos).....	32
4.3	Extração de RNA.....	33
4.4	Transcrição reversa (RT), Reação em cadeia da polimerase (PCR) e Sequenciamento de DNA.....	33
4.4.1	Transcrição reversa (RT).....	34
4.4.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	35
4.4.3	Visualização dos produtos da PCR mediante eletroforese.....	35
4.4.4	Purificação dos Produtos da PCR.....	36
4.4.5	Reação de Sequenciamento.....	36
4.4.6	Precipitação de DNA.....	36
4.4.7	Obtenção das sequências.....	37
4.4.8	Análise filogenética.....	37
4.4.9	Análise de polimorfismo.....	42
4.5	Análise geográfica.....	43
5	RESULTADOS.....	45
5.1	Análise filogenética.....	45
5.1.1	Análise filogenética baseada na sequencia nucleotídica parcial do gene da glicoproteína.....	45
5.1.2	Análise de polimorfismos das sequências parciais da glicoproteína.....	47
5.1.3	Análise filogenética das sequencias parciais do gene da nucleoproteína.....	49
5.1.4	Análise de polimorfismo da sequencia parcial da nucleoproteína.....	51
5.2	Análise geográfica.....	53
5.2.1	Análise geográfica baseada no gene da glicoproteína.....	53
5.2.2	Análise geográfica baseada no gene da nucleoproteína.....	57
6	DISCUSSÃO.....	65
7	CONCLUSÕES.....	73
	REFERÊNCIAS.....	74
	APÊNDICE A.....	80

1 INTRODUÇÃO

Na atualidade a Raiva continua sendo um problema tanto em saúde pública como em saúde animal produzindo grandes perdas econômicas para as atividades pecuárias nos países em desenvolvimento (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002).

No Brasil a raiva ainda dissemina-se de maneira insidiosa e preocupante em bovinos, sendo o morcego hematófago da espécie *Desmodus rotundus* o vetor desta doença (BRASIL, 2009). Os prejuízos que a raiva produz no rebanho brasileiro ainda não foram dimensionados com exatidão. A sub-notificação causada pela falta de conscientização dos produtores, e por vezes a falta de recursos financeiros para os serviços oficiais de saúde animal, dificultam as tarefas de vigilância e controle. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento realizou um cálculo aproximado das perdas econômicas durante o período 1983 – 1993, tendo em conta a taxa de subnotificação (de cada dez casos que acontecem, somente um é notificado), estimando que anualmente morrem 40 mil bovinos, representando aproximadamente US\$ 15 milhões de dólares, sem considerar os prejuízos indiretos ocasionados pela ação espoliadora dos morcegos vetores. Entre os as perdas indiretas podem ser enumeradas: a diminuição na qualidade do couro, enfraquecimento, perda de peso dos animais, infecções bacterianas e virais, assim como miíases nos ferimentos ocasionados durante a alimentação do *D. rotundus* sobre o gado (BREDT, 1996).

A seguir serão apresentadas algumas informações sobre ocorrência de raiva em herbívoros nos estados de Minas Gerais e São Paulo com objetivo de contextualizar o presente trabalho.

No estado de Minas Gerais durante o período 1976 a 1997 foram registrados 3.802 casos de raiva bovina. Análises de regressão e de distribuição geográfica mostraram uma tendência crescente anual dos diagnósticos positivos, além do incremento no número de municípios atingidos, caracterizando assim a intensa expansão da doença neste estado. Há registros de ocorrência esporádica, endêmica e epidêmica em todo o estado durante esse período, principalmente nos municípios das regiões Metalúrgica, Rio Doce, Mucuri e Jequitinhonha entre os meses de abril e agosto (SILVA et al., 2001a).

Os focos se movimentaram a partir de 1976 desde alguns municípios das mesorregiões do triângulo mineiro, centro, sul/sudoeste e zona da mata, espalhando-se em direção ao norte até atingir aproximadamente o 75% dos municípios no ano 1997 (SILVA et al., 2001a).

No período 1998 a 2006, Menezes et al. (2008), realizaram um estudo semelhante das 3.053 ocorrências de raiva bovina no mesmo estado. Embora houvesse flutuação no número de municípios positivos ao longo do tempo o número de casos apresentou tendência ao declínio com expansão geográfica da doença aos municípios do triângulo mineiro.

Em referência à situação do estado de São Paulo, um estudo retrospectivo mostrou um aumento expressivo no número de casos entre os anos de 1997 e 2000, sendo registrados 2.243 diagnósticos confirmados pela Rede de Laboratórios Estaduais. A casuística teve tendência ao declínio até o ano 2002, tendência que se manteve até 2004 (PERES, 2008; GOMES; MONTEIRO 2011)

O comportamento da casuística de raiva nos estados de São Paulo e Minas Gerais durante o período 1996 a 2012 é ilustrado na figura 1. Tomando como fonte:

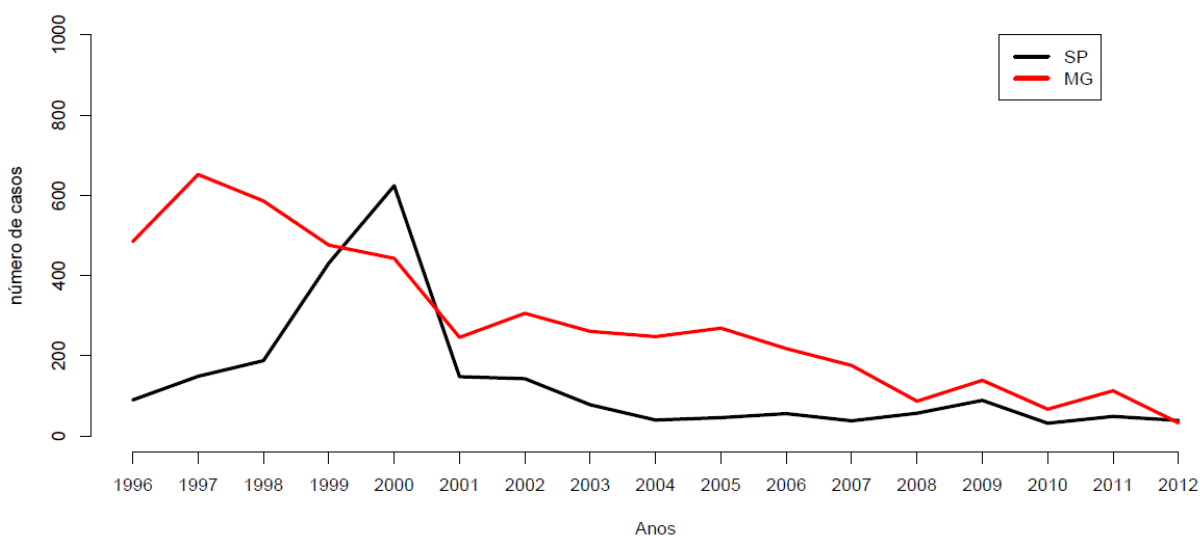
1. Mapas de ocorrência de Raiva Bovina no Brasil segundo Unidades Federativas 2002 a 2008, Secretaria de Saúde, Governo do Estado de Paraná, Brasil [acesso em 06/02/2013]

<http://www.saude.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=1435>

2. Mapas da Raiva no Brasil segundo Unidades Federativas, 2009 até outubro de 2012, Grupo Técnico de Raiva, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, D.F. [acesso em 06/02/2013]

http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=124

Figura 1 - Casos de raiva bovina nos Estados de São Paulo e Minas Gerais 1996 – 2012 – Brasil (ESTEVEZ, 2013)



Fonte: <http://www.saude.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=1435> [acessado em 06/02/2013]
http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=124 [acessado em 06/02/2013]

Legenda: A figura mostra aumento do número de casos em bovinos durante o período 1997 a 2002 no estado de São Paulo, sendo considerado de fato um período de epizootia segundo dados oficiais da Rede Estadual de Diagnóstico

Segundo informações do Instituto Pasteur de São Paulo, no ano 1997 houve incremento no número de casos em herbívoros de importância pecuária na região de Mogi das Cruzes (82 casos), observou-se deslocamento dos casos em direção à Grande São Paulo. Em 1998 foram registrados 188 casos em herbívoros, constatou-se um avanço da doença na Grande São Paulo, São José dos Campos, Taubaté e Botucatu (incremento de 3 para 21 casos). Na região administrativa de Campinas, os casos estiveram concentrados nos municípios de Socorro, Joanópolis e Piracaia, que fazem divisa com o Estado de Minas Gerais (KOTAIT et al., 1998)

A frequência da raiva em bovinos também mostrou tendência crescente na região oeste paulista durante o período de 1996 a 2003, sendo que de 4.950 amostras encaminhadas para o laboratório do Polo de Alta Sorocabana em Presidente Prudente, entre 6 -16%, foram positivas, exibindo o pico de apresentação nos anos 1997 e 2002 (ALBAS et al., 2005)

As regiões sudeste e nordeste (na divisa com Minas Gerais) do estado de São Paulo historicamente têm sido atingidas pela doença, sendo que entre 1996 a

1999 foram registrados 837 casos em bovinos e 80 diagnósticos positivos em morcegos hematófagos (HEINEMANN et al., 2002)

Devido a esses acontecimentos e ao fato de que uma importante área endêmica de raiva estar situada em região fronteiriça, comprometendo os estados de São Paulo, Minas de Gerais e Rio de Janeiro, a partir de 2002, foi declarada a vacinação compulsória de bovinos contra raiva pelos órgãos de controle (CARNIELI, et al, 2009).

A apresentação sazonal de epidemias de raiva em bovinos e equinos em Minas Gerais em concomitância com uma epizootia que aconteceu nos municípios de São Paulo próximos à macrorregião Sul e Zona da Mata do estado de Minas Gerais entre os anos 1997 – 2002 fornece a oportunidade para abordar a filogeografia da raiva bovina em ambos os estados através da análise das linhagens genéticas circulantes na área fronteiriça.

O presente trabalho pretendeu investigar a existência de um possível vínculo epidemiológico entre a epizootia paulista (1997 – 2002) e vários casos em bovinos e equinos que aconteceram em municípios mineiros na região fronteiriça com São Paulo no período subsequente (2002 a 2009), empregando análise filogenética de sequências parciais dos genes da glicoproteína e nucleoproteína do vírus da raiva.

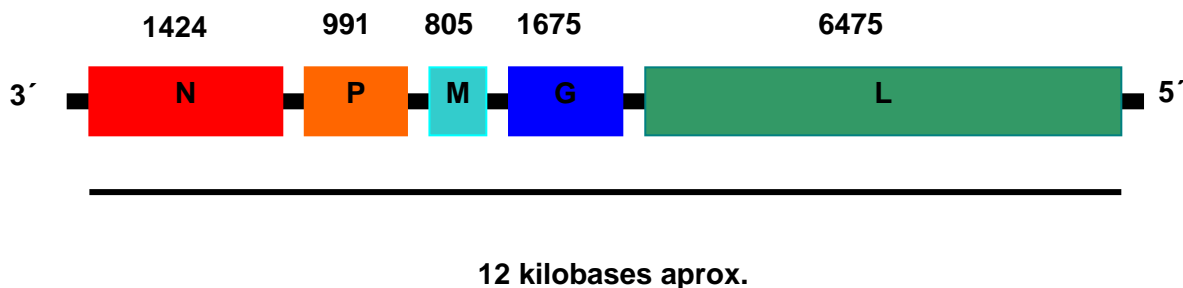
2 REVISÃO DE LITERATURA

Para a melhor compreensão dos estudos moleculares que serão abordados mais adiante é necessário mencionar algumas generalidades sobre: a organização do genoma do vírus rábico e estrutura, antecedentes de estudos moleculares nos estados de São Paulo e Minas Gerais.

2.1 Organização do genoma do vírus da raiva e estrutura viral

O genoma do vírus da raiva (RABV) na amostra fixa Vírus Pasteur (VP), contém 11932 nucleotídeos (nt), consiste em RNA genômico, linear e policistrônico com sentido negativo, codificando do extremo 3´(região aminoterminal) para 5´(carboxiterminal) (WUNNER, 2007). Possui cinco genes dispostos nesta ordem: gene da nucleoproteína (N), com 1350 nt de comprimento, gene da fosfoproteína (P), também designado por gene M1 ou NS (891 nt), gene da proteína matriz (M), também designado por gene M2 (606 nt), gene da glicoproteína (G) (1572 nt) e gene da RNA polimerase RNA dependente (L) (6426 nt). Possui cinco ORF's (Open Reading Frames), transcrevendo as proteínas estruturais com as mesmas designações dos seus respectivos genes como mostrado na figura 2 (TORDO et al., 1986).

Figura 2 - Organização do genoma do vírus da raiva

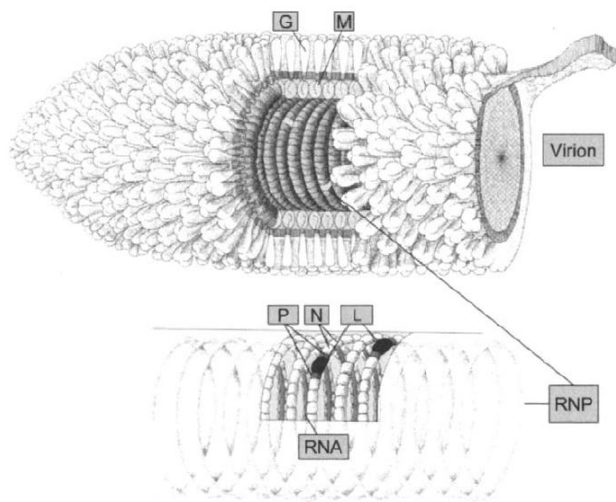


Fonte: Adaptada de <http://www.cdc.gov/rabies/transmission/virus.html> (Centers for Disease Control and Prevention (2013). [acessado em 06/02/2013]

Legenda: O genoma do vírus da raiva é de fita simples, senso negativo, não segmentado, com comprimento de aproximadamente 12 kilobases. Há uma sequência líder de aproximadamente 50 nucleotídeos, seguida pelos genes N,P,M,G e L.

O vírus da raiva (RABV) tem formato baciliforme, com 100 a 250 nanômetros (nm) de comprimento e 75 nm de diâmetro em média, o envoltório externo (envelope) é formado por lipídeos da célula hospedeira, com espículas de 5 a 10 nm de comprimento. Abaixo do envelope encontra-se uma camada matriz formada pela proteína M que une o envelope do vírus à Ribonucleoproteína (RNP) interna. A RNP está composta pelo RNA genômico de fita simples, sentido negativo, não segmentado, associado às proteínas L, P, e N além da proteína M, conforme a figura 3.

Figura 3 - Representação esquemática do vírus da raiva



Fonte: (WUNNER, 2007)

Legenda: A figura mostra RNP (ribonucleoproteína) interna encapsulada pelas proteínas N, Polimerase L e P. A RNP também está associada à proteína M que facilita a condensação do material genético e confere o formato típico baciliforme dos rhabdovirus. Uma bicamada lipídica forma o envelope. A Proteína G com estrutura trimérica se projeta ao exterior da membrana e se ancora ao redor do complexo formado pela associação RNP-M.

A glicoproteína é a única estrutura viral imunogênica, ou seja, capaz de produzir anticorpos neutralizantes contra o vírus da raiva. A glicoproteína está dividida em três regiões (domínios). O ecto-domínio (ED), externo ao vírus e com 439 aminoácidos (1 a 439) da região N-terminal o domínio trans-membrana (TM), com 22 aminoácidos (440 a 461) e o endo-domínio (EDO) com 44 aminoácidos (462 a 505) da região C-terminal e situado no interior do vírus (WUNNER, 2007).

O gene da glicoproteína é de grande interesse para os estudos filogenéticos do RABV. Os principais motivos desses estudos são: importância na resposta imunológica; relação entre hospedeiros suscetíveis e patogênese da raiva (BADRANE; BAHLOUL; PERRIN, 2001). Foram detectadas regiões de elevada diversidade no gene G. As regiões com elevada diversidade relacionam-se com o reconhecimento de receptores neuronais e estimulação do sistema imune. Essas características podem facilitar a disseminação do vírus dentro de uma mesma espécie ou entre espécies diferentes, o que pode alterar a epidemiologia da infecção (BENMANSOUR et al., 1992; MORIMOTO et al., 1998; BADRANE; TORDO, 2001).

Na literatura já foram descritos vários sítios com atividade biológica: I, III, VI e “a” compostos pelos aminoácidos nas posições 231, 330 – 338, 264 e 342 – 343 respectivamente. O sítio II é descontínuo, localizado nas posições 34 – 42 e 198 – 200 ligadas por pontes de dissulfeto. O domínio de fusão dependente de pH baixo está localizado entre as posições 102 a 179, sendo de crucial importância para a adesão do vírus à célula, permitindo o estabelecimento da infecção (TORDO, 1996; WUNNER, 2007).

A proteína N, principal proteína do nucleocapsídeo, é constituída por 1.424 nt (450 aminoácidos) e tem um peso molecular de, aproximadamente, 57.000 daltons, sendo o principal componente viral. Apesar de apresentar algumas pequenas regiões com alto grau de diversidade genética, essa proteína é, ainda, a mais conservada, apresentando alta similaridade na sequência de aminoácidos (WUNNER, 2007).

Na nucleoproteína foram descritos três sítios com atividade biológica: I compreende a posição 358 – 367, e o sítio antigênico III, dividido em duas regiões independentes entre as posições 359 – 366 e 375 – 386. Estudos com anticorpos monoclonais permitiram identificar o epítotope II, (353 – 373) o qual superpõe-se ao sítio IV (TORDO, 1996; WUNNER, 2007).

Como outros vírus RNA, o RABV apresenta pouca fidelidade durante a replicação pela falta de reparo e correção dos erros, facilitando a apresentação de mutações e, portanto, a aparição de distintos genomas de mesma origem que o ambiente selecionará posteriormente (KISSI et al., 1999). As mutações no RABV ocorrem com frequência média de 10^{-4} - 10^{-5} /nt por ciclo de replicação, gerando novas linhagens do vírus que vão incorporando mutações no processo de adaptação a novos hospedeiros e nichos ecológicos, originando sub-populações designadas também como "quase-espécies" ou linhagens (TSIMRING; LEVINE; KESSLER, 1996).

Sabe-se que a diversidade de linhagens é produto de mutações que acontecem aleatoriamente em decorrência à relação vírus/hospedeiro ao longo do tempo, tendo também influencia fatores ecológicos e geográficos (KOBAYASHI et

al., 2008). A análise de aminoácidos ou nucleotídeos de linhagens virais isoladas em diversas regiões geográficas fornece um ótimo indicativo da variação genética do vírus da raiva, permitindo a compreensão da dinâmica de transmissão e reconstrução da história biogeográfica da doença (NADIN-DAVIS, 2007; CARNIELI et al., 2009).

2.2 Antecedentes de estudos moleculares de casos de raiva bovina nos estados de São Paulo e Minas Gerais

Um dos trabalhos pioneiros em abordar aspectos moleculares dos casos de raiva no estado de São Paulo, analisou 22 amostras de bovinos e *Desmodus rotundus*, do período 1986 – 1999, procedentes de vários municípios: da região do Vale do Paraíba (Guaratinguetá, Pindamonhangaba, Taubaté e Jacareí, Santo Antônio do Pinhal, São Roque, Pariquera Açu) e Vale do Ribeira (Cajatí, Bernardino de Campos, Pirajú, Apiaí), São Joaquim da Barra (ver figura 4). Nesta oportunidade foram analisadas as relações evolutivas usando fragmentos da nucleoproteína de 600 nucleotídeos de extensão, que codifica para a região amino terminal. Como conclusão geral foi observada uma baixa variabilidade genética que provavelmente seja consequência da deriva genética. Embora fosse observada segregação de isolados em três grupos principais na árvore filogenética, esta diferenciação não obedeceu a fatores como a localização geográfica, tempo e espécie de origem (HEINEMANN et al., 2002).

Figura 4 - Situação geográfica dos municípios de origem das amostras do estudo de diversidade molecular do vírus da raiva baseado no gene da nucleoproteína, realizado por Heineman et. al., (2002)



Fonte: (HEINEMANN et al., 2002).

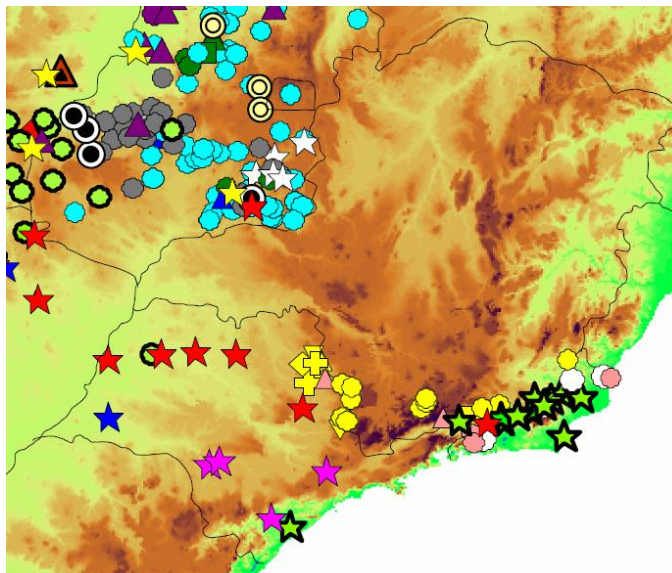
Legenda: O mapa mostra a procedência das 22 amostras isoladas a partir de bovinos e *Desmodus rotundus*, no período 1986 – 1999

Posteriormente em 2008, Kobayashi et al., publicaram um trabalho bem mais abrangente em termos de número de sequências (ao todo 593), áreas geográficas (regiões norte, centro-oeste e sudeste do Brasil) e marco temporal considerados (período 1987 – 2006). Foi realizada uma análise filogenética de um segmento de 203 nt da nucleoproteína, entre as posições 109 a 311.

Neste estudo foram descritas 24 linhagens genéticas em todo o Brasil (com valores de *bootstrap* superiores a 70%), sendo delimitadas por cadeias montanhosas, sendo que a maioria de amostras analisadas foi isolada de áreas adjacentes a rios. O padrão de distribuição geográfica dessas estirpes virais aparentemente foi influenciado pela topografia e bacias hidrográficas (KOBAYASHI et al., 2008). No tangente à região sudeste, foram descritas seis linhagens circulantes no estado de São Paulo designadas como C15 a C19 e C23, sendo possível perceber diferenças genéticas entre isolados de diferentes regiões do estado de São Paulo (norte, nordeste, Vale do Ribeira e fronteira com o sul de Minas

Gerais), assim como do estado de Rio de Janeiro, como pode ser apreciado na figura 5.

Figura 5 - Distribuição geográfica das linhagens genéticas do vírus da raiva de bovinos, período 1987 – 2006 na região sudeste do Brasil



Fonte: Adaptada de Kobayashi et al., (2008).

Legenda: Cada figura e as cores representam as linhagens genéticas descritas nesse trabalho no estado de São

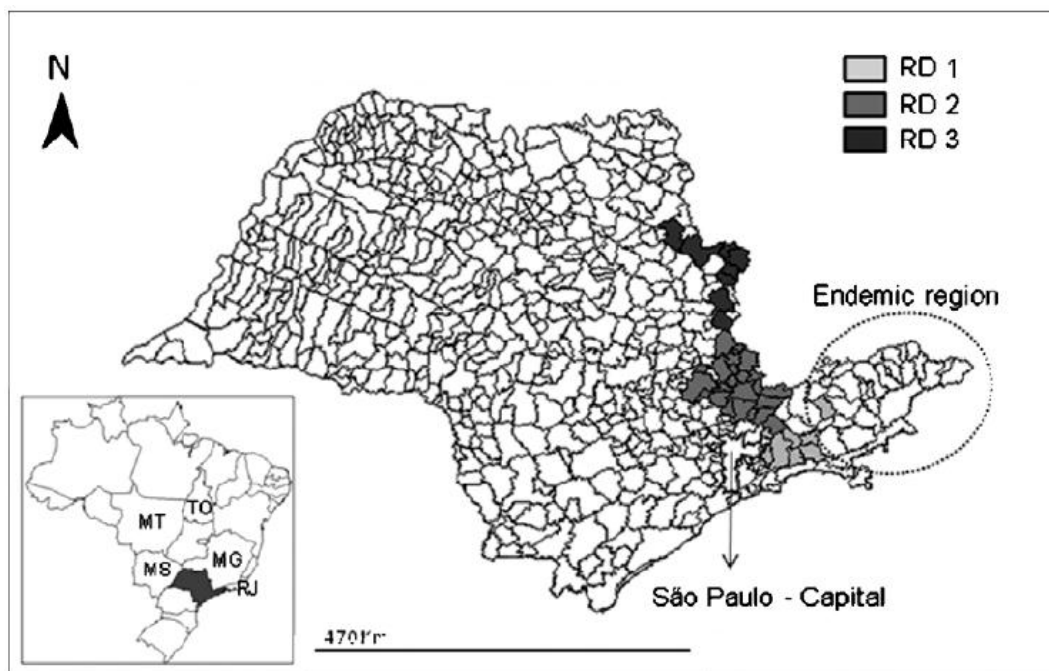
Paulo ● ▲ C15, ★ C16, ☆ C17, ☆ C18, ★ C19, ▼ ⊕ ◻ ◆ ▲ ● C23

A distribuição de estas linhagens genéticas regionais esteve delimitada por cadeias montanhosas que agem com fatores de isolamento, assim sendo descritos linhagens que se distribuíram entre os 100, 300 e 700 metros de altitude. Algumas linhagens estavam distribuídas de forma restrita a determinados tipos de biomas outros apresentaram uma distribuição mais ampla.

O primeiro trabalho que estudou aspectos moleculares da epizootia paulista de raiva dos herbívoros entre 1997 – 2002 foi conduzido por Carnieli et al. (2009). Neste estudo foram analisadas 144 amostras (130 bovinos, 14 equinos) para o gene da nucleoproteína, obtendo um segmento de 1320 nt de comprimento correspondentes aos aminoácidos entre as posições 10 – 450. Sequências parciais do gene da glicoproteína foram analisadas em 62 amostras (57 bovinos, 7 equinos). O segmento da glicoproteína obtido foi de 800 nt de comprimento correspondente às posições de aminoácidos 19 a 269, abrangendo as regiões do peptídeo sinal até a

porção aminoterminal do endodomínio. As árvores filogenéticas obtidas foram concordantes. A área geográfica analisada no estudo foi dividida em três regiões designadas como RD1, RD2 e RD3 sendo representado na figura 6.

Figura 6 - Distribuição geográfica das linhagens virais RD1, RD2 e RD3 descritas no trabalho de Carnieli et. al., (2009)



Fonte: Carnieli et al. (2009)

Legenda: A figura mostra a região geográfica de procedência das amostras isoladas durante o período de epizootia entre 1997 – 2002. Foram analisadas as sequências dos genes da nucleoproteína e glicoproteína viral

Os dois genes analisados mostraram-se altamente conservados em termos temporais e espaciais quando comparados com outros isolados do litoral Atlântico e América do Sul (CARNIELI et al., 2009).

Uma análise mais detalhada sugere as seguintes relações espaciais e temporais na epizootia paulista (1997 – 2002), segundo o trabalho supracitado:

- A circulação de uma linhagem viral denominada **Antiga (“Old Strain”)** que compreende isolados anteriores ao ano 1998 e procedentes das áreas RD1 e RD2
- A linhagem **RD1** permaneceu circunscrita à área que leva seu nome

- A linhagem **RD2/RD3** pode ser subdividida em dois
 - **RD2**: agrupa linhagens exclusivas dessa área
 - **RD2/RD3**: linhagens virais que circularam nas áreas RD2 e RD3 após do ano 1999

Os resultados sugerem que os casos das áreas RD1 e RD2 têm origens diferentes, e que os focos da linhagem RD3 são consequência da expansão da linhagem RD2 (CARNIELI et al., 2009).

É importante salientar que nesta pesquisa foram considerados também fatores geográficos das áreas atingidas pela epizootia. As áreas RD1, RD2 e RD3 apresentam altitudes médias entre 800 a 1600 metros, temperaturas anuais de 18°C, pluviosidade média anual superior a 1300 mm e por tanto possuem condições ecológicas propícias para a manutenção de colônias de *D. rotundus*. A intensa atividade na produção cafeeira nessa área durante os séculos XIX e XX introduziu drásticas modificações da vegetação original (CARNIELI et al., 2009).

Outra pesquisa que analisou 50 sequências parciais do gene da nucleoproteína de casos de raiva em herbívoros nos estados de São Paulo e Minas Gerais sendo comparados com outros do resto do Brasil, revelou a circulação de duas linhagens principais (MACEDO et al., 2010):

- **Linhagem I**: Isolados paulistas e mineiros coletados entre 1999 - 2001 e 2007 – 2008, que apresentaram sub-divisões segundo os municípios de origem, sendo designados como sub-linhagens **la** até **lf**
- **Linhagem II**: Isolados procedentes de São Paulo, Rio de Janeiro, Mato Grosso, Goiás e Tocantins coletados entre 1989 a 2000.

Foi observada variação genética entre as linhagens de diversas regiões geográficas, sendo que os isolados pertencentes a São Paulo e Minas Gerais mostraram ser mais próximas geneticamente quando comparadas com outros estados (MACEDO et al., 2010).

2.3 Generalidades dos estados de São Paulo e Minas Gerais com relevância na epidemiologia da Raiva dos herbívoros

As regiões montanhosas do estado de São Paulo são as áreas mais propícias para o desenvolvimento de abrigos de *D. rotundus* pelo fato delas também estarem situadas, de modo geral nas regiões com maiores índices pluviométricos e temperaturas mais amenas (GOMES, 2011). Considerando estas áreas, a Secretaria de Agricultura do estado de São Paulo propôs um mapa de áreas geográficas diferenciadas segundo o risco de apresentação de raiva em herbívoros (Figura 7). As quarenta regionais foram agrupadas em quatro regiões maiores: epidêmica, endêmica, esporádica e de alerta (KOTAIT et al., 1998a). E assim, para cada região classificada, foram determinadas medidas específicas de controle. Na prática, nos últimos anos a classificação das áreas sofreu algumas mudanças, entretanto, de um modo geral, as regiões que merecem atenção e vigilância da enfermidade continuam sendo as mesmas.

Figura 7- Classificação das áreas epidemiológicas de raiva em bovinos no estado de São Paulo



Fonte: adaptada de Kotait et al. (1998a)

Legenda: A figura mostra a diferenciação de áreas no estado de São Paulo segundo o risco de apresentação de Raiva em herbívoros, proposta pela Secretaria de Agricultura do estado. São descritas quatro regiões maiores: epidêmica, endêmica, esporádica e de alerta.

Além dos fatores geográficos que influenciam para a apresentação de risco diferenciado de raiva entre a região leste (epidêmica) e o oeste paulista (esporádica) a distribuição dos tipos de criação bovina existente no estado de São Paulo, pode ser outro fator a considerar. No planalto ocidental as criações são extensivas e dedicadas à produção de gado de corte. Na região leste, a criação consiste em sua maioria, de subsistência ou leiteira em pequenas propriedades. Entre as duas regiões, há propriedades, predominantemente de áreas extensas de cana de açúcar, laranja e culturas de modo geral (GOMES, 2008).

Em referência ao estado de Minas Gerais, nas últimas três décadas houve importantes transformações ambientais, facilitando assim a dispersão da raiva em diversos ambientes (urbanos e rurais) e por tanto contribuindo na dinâmica das áreas de risco. Um exemplo concreto desta situação ocorreu durante o período 1976 a 1997, quando houve uma progressiva substituição de matas naturais por pastagens, especialmente nas áreas de bioma do cerrado, sendo a região sul/sudeste do estado, uma das regiões atingidas. Esta situação propiciou a

alimentação das colônias de morcegos hematófagos, favorecendo a transmissão da raiva entre as diversas espécies de quirópteros, possivelmente por coabitação nos abrigos (SILVA et al., 2001).

Neste ponto é evidente a carência de estudos sobre questões sociais, econômicas, geográficas e ecológicas como fatores ligados à ocorrência da raiva em herbívoros.

Diante destes fatos, o presente estudo pretende examinar a possível relação entre a os casos procedentes da área epidêmica no nordeste do estado de São Paulo e alguns casos de raiva em herbívoros nos municípios vizinhos à área no estado de Minas Gérias no período 2000 – 2009, caracterizando geneticamente isolamentos com base aos genes da glicoproteína e nucleoproteína viral, comparando a identidade das sequências aqui obtidas com a epizootia do estado de São Paulo (1997 – 200) assim como com linhagens de outras regiões geográficas do Brasil.

3 OBJETIVOS

- Caracterizar geneticamente 33 isolamentos de vírus da raiva de herbívoros do sul de Minas Gerais que formam parte de um banco de conveniência, com base aos genes da glicoproteína e nucleoproteína viral, comparando a identidade genética das sequências aqui obtidas com a epizootia do estado de São Paulo (1997 – 2002) assim como com linhagens descritas em focos de raiva anteriores e posteriores a este acontecimento, cujas sequencias foram obtidas a partir do GenBank.
- Explorar se há relação entre a distribuição espacial dos casos e fatores geográficos como: relevo, bacias hidrográficas e biomas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem das Amostras

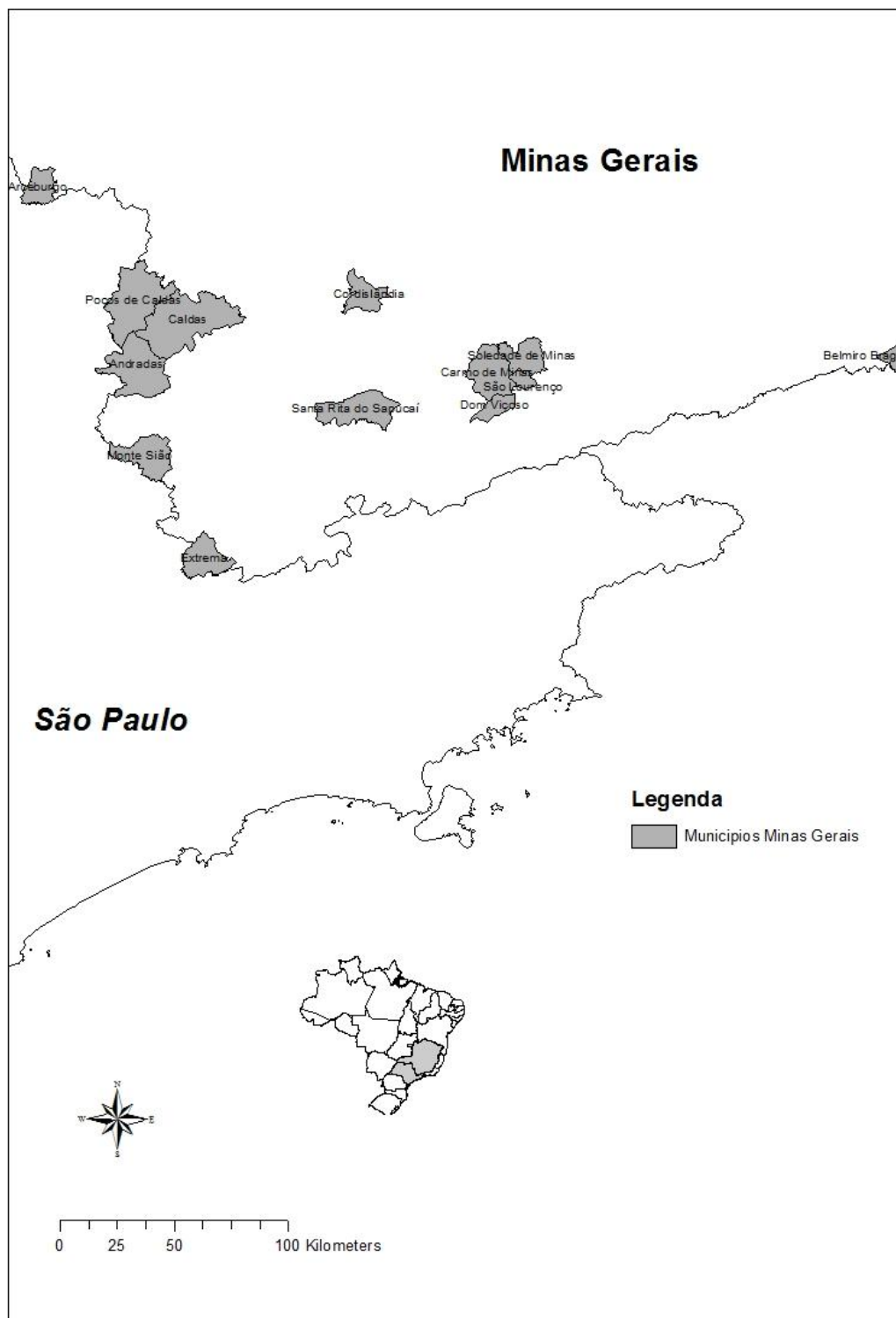
As amostras foram gentilmente fornecidas pela Dra. Elenice Cunha, Instituto Biológico de São Paulo (Laboratório de Raiva e Encefalites Virais), procedentes de 12 municípios de Minas Gerais, da mesorregião Sul e Sudoeste do estado. No quadro 1 é especificado o lugar e espécie de origem.

Quadro 1 - Amostras de casos de raiva em herbívoros analisadas no presente trabalho, procedentes de municípios das mesorregiões sul/sudeste do estado de Minas Gerais, durante o período 2000 – 2009

No	Data Isolamento	No Registro Laboratório	Município	Espécie Animal	Viabilidade após passagem em camundongo
1	26/01/2000	71	Extrema	Equino	Não
2	28/01/2000	90	Extrema	Equino	Não
3	12/03/2000	194	Extrema	Bovino	Sim
4	30/03/2001	154	Extrema	Equino	Sim
5	28/01/2000	91	Poços de Caldas	Bovino	Sim
6	03/05/2000	273	Andradas	Bovino	Sim
7	19/05/2000	315	Andradas	Bovino	Sim
8	28/05/2000	401	Andradas	Bovino	Sim
9	20/07/2000	445	Andradas	Bovino	Sim
10	20/03/2001	123	Andradas	Bovino	Sim
11	12/01/2004	261	Andradas	Bovino	Sim
12	17/07/2009	144	Andradas	Bovino	Sim
13	18/06/2001	395	Carmo de Minas	Bovino	Sim
14	13/07/2001	457	Carmo de Minas	Bovino	Não
15	26/07/2001	490	Carmo de Minas	Bovino	Sim
16	14/08/2001	533	Carmo de Minas	Bovino	Sim
17	29/10/2001	798	Carmo de Minas	Bovino	Não
18	27/11/2001	909	Carmo de Minas	Bovino	Não
19	08/03/2002	269	Carmo de Minas	Bovino	Sim
20	26/05/2004	525	Cordislândia	Equino	Sim
21	15/03/2002	292	Soledade de Minas	Bovino	Sim
22	06/03/2003	325	Soledade de Minas	Bovino	Sim
23	23/07/2002	716	Sta Rita do Sapucaí	Bovino	Sim
24	17/07/2003	753	Sta Rita do Sapucaí	Bovino	Sim
25	26/02/2004	196	Belmiro Braga	Equino	Sim
26	01/04/2008	66	Monte Sião	Bovino	Sim
27	28/07/2009	147	Caldas	Bovino	Sim
28	21/10/2009	210	Caldas	Bovino	Não
29	20/09/2002	1172	Dom Viçoso	Bovino	Sim
30	31/03/2004	365	Carmo de Minas	Bovino	Não
31	18/12/2002	2864	São Lourenço	Bovino	Sim
32	03/06/2003	621	Dom Viçoso	Bovino	Sim
33	2003	605	Arceburgo	Bovino	Sim

Na figura 8 é representada a localização dos municípios de origem das amostras analisadas no presente trabalho.

Figura 8 - Origem geográfica das amostras analisadas no presente estudo, 12 municípios da mesorregião sul e sudeste de Minas Gerais, Brasil (ESTEVEZ, 2013)



4.2 Triagem das Amostras

A triagem foi realizada mediante o teste de Imunofluorescência Direta (IFD) e Prova Biológica de Inoculação Intracerebral em camundongo. Todas as amostras aqui contempladas foram positivas previamente para ambos os testes.

4.2.1 Teste de IFD

A técnica foi executada conforme descrito por Goldwasser e Kissling (1958), com modificação descrita por Dean, Abelseth e Atanasiu (1996). Foram obtidas impressões por pressão de fragmentos de cérebro em lâminas de microscopia, sendo fixadas posteriormente por imersão em acetona a -20°C por duas horas, secadas e incubadas com conjugado antirrábico por 30 minutos a 37°C. Após três lavagens sucessivas com solução salina tamponada com fosfatos (pH 7.4) e secadas à temperatura ambiente. Com a impressão fixa e seca, foi colocada uma gota de glicerina tamponada (pH 8.4) e posteriormente montada uma lamínula cobre objeto. As lâminas prontas foram observadas sob microscópio de fluorescência, dotado de lâmpada de Halogênio.

As lâminas foram consideradas positivas quando observada presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos com coloração característica, de diferentes tamanhos e algumas vezes lembrando a presença de “poeira antigênica”

4.2.2 Prova Biológica (Teste de Infecção Intracerebral em camundongos) e reativação de amostras por passagem em camundongo

Foi empregada a técnica descrita por Koprowski, (1996), utilizando seringa de 1,0 mL do tipo tuberculina, dotada de agulha 27G, aplicando um volume de 0,03 ml. Os animais foram observados por um período de 30 dias, à procura de sinais característicos da raiva.

4.3 Extração de RNA

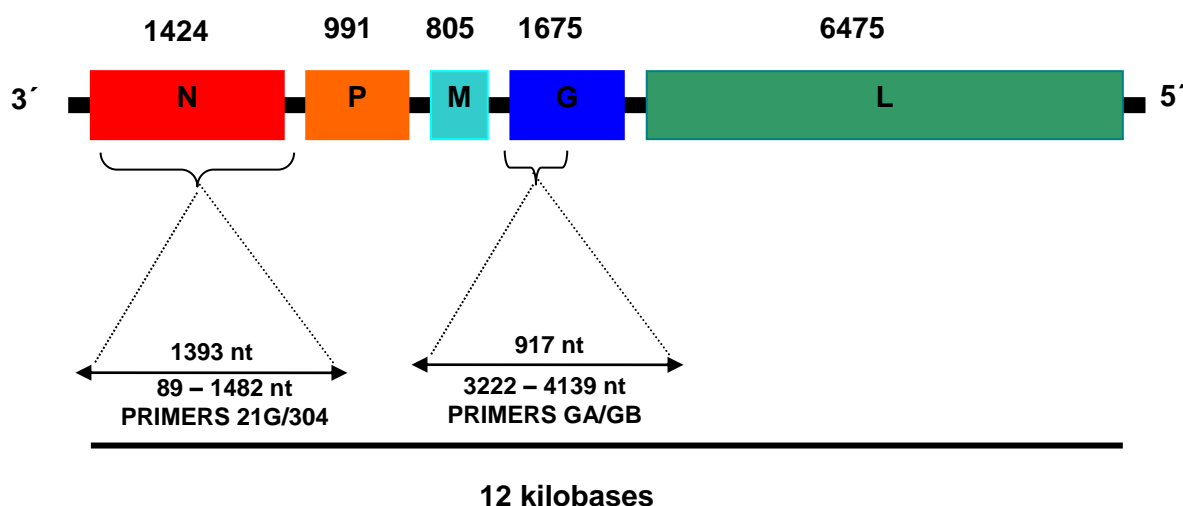
A extração de RNA total foi realizada com o método do TRIZOL (Invitrogen®) descrito pelo fabricante, brevemente: foram usados 100 µL de amostra para 1000 µL de TRIZOL, sendo agitada a suspensão por 15 segundos, submetida a incubação a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente foram acrescentados 200 µL de Clorofórmio absoluto, novamente agitação e incubação como no primeiro passo. Centrifugação (12.000 G, 15 min, 4°C); observou-se a separação da fase aquosa superior (que contém o RNA total) a qual foi retirada e misturada em proporção 1:1 (v/v) com propanol absoluto, sendo a mistura agitada e incubada como no passo anterior. Centrifugação (12.000 G, 15 min, 4°C), o sobrenadante foi descartado por inversão, o *pellet* de RNA total foi lavado com 950 µL de etanol (75% em Água-DEPC), centrifugado novamente. O etanol foi descartado por inversão, para evaporar o resquício dos reagentes, a amostra foi colocada no termobloco a 55°C por 3 minutos ou até verificar a completa evaporação do etanol. O RNA extraído foi ressuspensionado em 20 µL de Água-DEPC para proceder à reação de transcrição reversa.

4.4 Transcrição reversa (RT), Reação em cadeia da polimerase (PCR) e Sequenciamento de DNA

Tanto na RT, PCR quanto na reação de sequenciamento do gene da glicoproteína foram empregados os *primers* [(senso-GA (5' C G C T G C A T T T T R T C A R A G T 3') e antissenso -GB (5' G A G G G C A C C A T T T G G T M T C 3')], sendo obtido um produto de 917 nucleotídeos segundo o descrito por Sato, et al., (2004). Para o gene da nucleoproteína foram empregados os *primers* [sense-21G (5' A T G T A A C A C C T C T A C A A T G 3') e antissenso-304 (5' T T G A C G A A G A T C T T G C T C A T 3')], sendo obtido um produto de 1393 nucleotídeos segundo o descrito por Carnieli et al. (2009). É importante esclarecer que as reações citadas foram executadas de maneira separada para cada gene.

As regiões dos genes da glicoproteína e nucleoproteína, reconhecidas por cada par de *primers*, estão descritas na figura 9

Figura 9 - Regiões dos genes da glicoproteína e nucleoproteína do vírus da raiva, reconhecidas por cada par de primers empregados no presente trabalho



Fonte: Adaptada de <http://www.cdc.gov/rabies/transmission/virus.html> (Centers for Disease Control and Prevention (2013). [acessado em 06/02/2013]

Legenda: A figura ilustra as regiões dos genes da nucleoproteína e glicoproteína do vírus da raiva e o tamanho do produto esperado na PCR.

4.4.1 Transcrição Reversa (RT)

Para a transcrição reversa 3.5 µL de RNA extraído de cada amostra foram acrescentados ao *mix* contendo 2 µL de 5X *First Strand Buffer* (Invitrogen®), 1 µL do *pool* de dNTPs na concentração 10mM, 1 µL de DTT a 100mM, 1 µL de cada *primer* na concentração de 10mM (senso e antissenso); 0.5 µL de enzima *Reverse Transcriptase MMLV* Invitrogen® (200U/µL), para um volume final de 10 µL realizando-se a transcrição reversa a 42°C por 60 minutos.

4.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Após a obtenção do cDNA, foi realizada a reação de PCR pela adição para cada amostra, de 5 µL do cDNA respectivo ao *mix* de PCR contendo 5 µL de 10X *PCR Buffer* (Invitrogen®), 8 µL do *pool* de dNTPs à 1.25 mM, 1.5 µL 50mM MgCl₂, 25.25 µL de Água-DEPC e 0.25 µL de *Platinum Taq DNA* polimerase (5U / µL Invitrogen®) para um volume final de 50 µL e levados ao termociclador e submetidos ao ciclo descrito no quadro 2.

Quadro 2 - Ciclo da reação de PCR para amplificação do gene da glicoproteína e nucleoproteína do vírus da raiva isolados de Bovinos utilizados no presente estudo

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

4.4.3 Visualização dos produtos da PCR mediante eletroforese

A presença dos produtos de PCR foi verificada mediante eletroforese em gel de agarose a 1.5% em tampão TBE 0.5X (0.1M de Tris, 0.09M de ácido bórico e 0.001M de EDTA). Foram usados 5 µL de produto da PCR em cada poço do gel dissolvidos em 2 µL de Tampão de Carga [glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0.25% (w/v), xileno cianol 0.25% (w/v)]. Como marcador de peso molecular foi usado 1kb *plus DNA ladder* (Invitrogen®), aplicando 0,1 ug no poço.

A eletroforese foi executada a 100mVolts até a migração completa das bandas no gel. Para revelar a presença dos produtos desejados o gel foi corado por imersão numa solução de brometo de etídeo na concentração de 0.005% em TBE 0.5X (25 µL brometo de etídeo/500 mL TBE 0.5X) durante 20 minutos, protegendo da luz e a temperatura ambiente. Para a visualização foi usado um transiluminador com lâmpada U.V.

Foram visualizadas as bandas dos tamanhos correspondentes a 917 nucleotídeos e 1393 nucleotídeos para os genes da glicoproteína e nucleoproteína, respectivamente.

4.4.4 Purificação dos Produtos da PCR

Foi usado o método de purificação enzimática com exonuclease I + fosfatase alcalina de camarão (ExoSAP-IT®), seguindo as instruções do fabricante, brevemente, para cada 5 µL de DNA foram usados 2 µL de ExoSAP-IT®, a mistura foi incubada a 37°C por 15 minutos, a enzima foi posteriormente inativada a 80°C durante 15 minutos e posteriormente foi realizada a reação de sequenciamento.

4.4.5 Reação de Sequenciamento

Para executar a reação de sequenciamento de DNA, foram empregados 4 µL de *BigDye 3.1* (*Applied Biosystems*®), 4 µL de *5X Sequencing Buffer* (*Applied Biosystems*®), 2 pmol de cada *primer* (senso e antissenso) referente a cada gene em reações separadas e 6 µL de DNA alvo (contendo aprox. 30 a 50 ng), para um volume final de reação de 10 µL. O programa de sequenciamento compreendeu os seguintes passos: 35 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos, 60°C por 4 minutos.

4.4.6 Precipitação de DNA

Para cada 10 µL de reação de sequenciamento foram empregados 5 µL de EDTA 125 mM e 60 µL de etanol absoluto. A amostra agitada gentilmente e incubada a temperatura ambiente durante 15 minutos, protegida da luz. Posteriormente foi submetida à centrifugação a 16500g por 45 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado por inversão. Foi realizada uma lavagem com 60 µL de etanol 70% (em água *milliQ*) a 16500g por 15 min a 4°C., uma vez descartado o sobrenadante por inversão o resíduo de etanol foi evaporado colocando o tubo no termobloco a 95°C por no máximo 5 minutos.

4.4.7 Obtenção das sequências

O DNA precipitado foi ressuspenso em 10 µL de formamida *HI-DI*, transferido para uma placa de 96 poços para sequenciamento, e levado ao termociclador para submeter à denaturação a 95°C por 2 minutos. Finalmente a placa de 96 poços foi levada ao sequenciador automático ABI 3500 (*Applied Biosystems*®).

4.4.8 Análise filogenética

A qualidade das sequências obtidas foi avaliada usando o programa *FINCH T.V.* (versão 1.4.0) e a aplicação *PHRED* (disponível no site <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Somente os nucleotídeos com mais de 90% de probabilidade e índice de qualidade superior a 21, respectivamente, foram considerados na sequência final.

Os segmentos pouco confiáveis das sequências foram removidos usando o programa *BioEdit* (HALL, 1999).

A identidade e polaridade foi conferida usando a aplicação *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool* disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), posterior à execução do *capping/contig* com a ferramenta *Clustal W* (versão 1.83) incorporada no programa *BioEdit* (versão 5.0.6).

As sequências tanto do gene da glicoproteína como da nucleoproteína foram avaliadas e editadas da mesma maneira.

Com a informação fornecida pelos resultados do *BLAST*, foi feito um levantamento das sequências pertencentes a casos de raiva em herbívoros e quirópteros de diferentes hábitos alimentares. As sequências selecionadas para o alinhamento foram em sua maioria procedentes dos estados de Minas Gerais e São Paulo, acontecendo entre 1986 e 2009. Com o número de acesso do *GenBank* foram achadas as publicações associadas às sequências para conferir a procedência e a espécie hospedeira.

As sequências já editadas conforme o descrito foram alinhadas junto com sequências procedentes do *GenBank* usando o programa CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994).

A análise filogenética foi realizada empregando o algoritmo *Neighbor-joining* (NJ), usando o programa MEGA (versão 4.1) aplicando o modelo evolutivo Kimura -2- parâmetros e *bootstrap* com 1000 replicações como descrito por Kobayashi et al. (2008)

Diversas versões das árvores filogenéticas foram confeccionadas incorporando sequências de cada estirpe genética descrita principalmente nos trabalhos de Heinemann et al. (2002); Kobayashi et al. (2008); Carnieli et al. (2009) e Macedo et al. (2010) e outros. Procurou-se que no possível houvesse representatividade da cada área de risco para raiva no estado de São Paulo: epidêmica, endêmica, esporádica e de alerta. Também foram incorporadas sequências de outros estados como: Maranhão, Tocantins, Goiás, Mato Grosso e Rio do Janeiro.

Como o número de sequências era grande as árvores obtidas ficavam com ramos muito densos e de tamanhos que comprometiam a clareza da representação gráfica das mesmas. A partir de estas observações e depois de várias tentativas optou-se por fazer uma amostragem aleatória incluindo no máximo cinco sequências de cada sub linhagem viral descrita nos trabalhos supracitados. Foram elaboradas fichas de papel com os números de acesso de GenBank de todas as sequências encontradas no levantamento de bibliográfico. Cada grupo de sequências que conformavam uma linhagem foi colocado numa sacola sendo retiradas de cada grupo cinco sequências de maneira aleatória.

As sequências consideradas na confecção da árvore aparecem no quadro 3, mostrando o código de acesso do *GenBank*, a origem geográfica, data de isolamento, gene estudado e referência bibliográfica correspondente.

Quadro 3 - Sequências do gene da glicoproteína e nucleoproteína tomadas do GenBank para realizar a análise filogenética das sequências obtidas no presente trabalho

Código Acesso GenBank	Gene	Município	Estado	Ano Isolamento	Hospedeiro	Referência
FJ649023	G	Socorro	SP	2000	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ649040	G	Monte Siao	SP	2000	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ649012	G	Monte Siao	SP	2000	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ649017	G	Bueno Brandão	SP	2000	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ649031	G	Itapira	SP	2001	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ649025	G	Pedra Bela	SP	2000	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ649036	G	Espirito Santo do Pinhal	SP	2001	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ649034	G	Amparo	SP	2001	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ649008	G	Atibaia	SP	2000	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ649042	G	Itatiba	SP	2001	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ649021	G	Nazaré Paulista	SP	2000	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ649024	G	Vargem	SP	2000	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ649004	G	Joanópolis	SP	1999	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ649030	G	Caconde	SP	2000	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ649009	G	Bragança Paulista	SP	2000	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ649020	G	Pinhalzinho	SP	2000	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ649018	G	Bom Jesus dos Perdões	SP	2000	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ648998	G	Piracaia	SP	1999	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ649033	G	Morungaba	SP	2001	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ649037	G	Mococa	SP	2001	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ649029	G	Caconde	SP	2000	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ649032	G	Campinas	SP	2001	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ648999	G	Socorro	SP	1999	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ648987	G	Taquaritinga	SP	1998	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ648988	G	Araçatuba	SP	1998	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ649019	G	Bragança Paulista	SP	2000	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ649980	G	Morungaba	SP	1997	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ648990	G	Socorro	SP	1998	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ648995	G	São João de Boa Vista	SP	1998	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ648989	G	Socorro	SP	1998	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ648984	G	Suzano	SP	1998	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ649002	G	Aruja	SP	1999	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ648985	G	Mogi das Cruzes	SP	1998	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ648993	G	Salesópolis	SP	1998	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ648981	G	Salesópolis	SP	1997	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
FJ649041	G	Vargem	SP	2000	Bovino	Carnieli, et. al. (2009)
AB110666	G	Colinas	TO	1999	Bovino	Sato, et. al. (2004)
AB247407	G	Araguaia	TO	2001	Bovino	Sato, et. al. (2004)
AB110668	G	---	---	---	Bovino	Sato, et. al. (2004)
AB110663	G	São Roque	SP	1994	Bovino	Sato, et. al. (2004)
AB110665	G	Apiai	SP	1992	Bovino	Sato, et. al. (2004)
AB110664	G	Taubaté	SP	1995	<i>D. rotundus</i>	Sato, et. al. (2004)
AB110659	G	---	---	---	Cão	Sato, et. al. (2004)
AB110660	G	Bela Vista	GO	1999	Cavalo	Sato, et. al. (2004)
AB247393	G	---	TO	1999	Bovino	Sato et al., (2006)
AB247382	G	Presidente Dutra	MA	2004	Bovino	Sato et al., (2006)
AB247386	G	Patos	PB	2003	Bovino	Sato et al., (2006)
AB247387	G	Patos	PB	2003	Bovino	Sato et al., (2006)
AB247442	G	---	---	---	<i>D. rotundus</i>	Sato et al., (2006)
AB247397	G	Presidente Dutra	MA	2004	Bovino	Sato et al., (2006)
AB247422	G	Lindóia	SP	2000	<i>D. rotundus</i>	Sato et al., (2006)
AB247421	G	Lindóia	SP	2000	<i>D. rotundus</i>	Sato et al., (2006)
AB247428	G	Tambaú	SP	2003	<i>D. rotundus</i>	Sato et al., (2006)
AB247391	G	Itapecuru	MA	2004	Bovino	Sato et al., (2006)
AB496682	G	---	---	---	<i>A lituratus</i>	Kobayashi et. al., (2009)
AB247400	G	Poços de Caldas	MG	2004	Bovino	Sato et al., (2006)
AB247426	G	Laje de Muriaé	RJ	1998	<i>D. rotundus</i>	Sato et al., (2006)
AB247427	G	Itaperuna	RJ	1997	<i>D. rotundus</i>	Sato et al., (2006)
AB247415	G	Santa Inés	MA	2003	Cão	Sato et al., (2006)
AB247412	G	Rio de Janeiro	RJ	1985	Cão	Sato et al., (2006)
AB247410	G	Anapolis	GO	1999	Cão	Sato et al., (2006)
AB247429	G	Guarulhos	SP	2000	<i>D. rotundus</i>	Sato et al., (2006)
AB247443	G	Pindamonhangaba	SP	---	<i>D. rotundus</i>	Sato et al., (2006)
AB247423	G	São José do Barreiro	SP	2001	<i>D. rotundus</i>	Sato et al., (2006)
AB276311	G	---	---	---	Humano	Sato (2006)
AB276307	G	---	---	---	Humano	Sato (2006)
AB276308	G	---	---	---	Humano	Sato (2006)
AB276309	G	---	---	---	Gato	Sato (2006)
AB276310	G	---	---	---	Gato	Sato (2006)
AB496683	G	Presidente Prudente	SP	---	<i>A lituratus</i>	Kobayashi et. al., (2009)
AB496693	G	---	---	---	<i>A lituratus</i>	Kobayashi et. al., (2009)
AB496691	G	---	---	---	<i>A lituratus</i>	Kobayashi et. al., (2009)
AB496692	G	Alvares Machado	SP	2003	<i>A lituratus</i>	Kobayashi et. al., (2009)
AB496686	G	Vargem Grande Paulista	SP	2004	<i>A lituratus</i>	Kobayashi et. al., (2009)
AB496680	G	Dracena	SP	2002	<i>A lituratus</i>	Kobayashi et. al., (2009)
AB496681	G	Vargem Grande Paulista	SP	2004	<i>A lituratus</i>	Kobayashi et. al., (2009)
AB110661	G	---	---	1998	Suino	Sato et al., (2004)
AB110657	G	---	---	1999	Humano	Sato et al., (2004)
FJ649104	N	Bragança Paulista	SP	1999	Bovino	Carnieli et. al., (2009)
FJ649137	N	Bragança Paulista	SP	2000	Bovino	Carnieli et. al., (2009)
FJ649102	N	Vargem	SP	1999	Bovino	Carnieli et. al., (2009)
FJ649109	N	Bragança Paulista	SP	2000	Bovino	Carnieli et. al., (2009)
FJ649143	N	Pinhalzinho	SP	2000	Bovino	Carnieli et. al., (2009)
FJ649087	N	Piracaia	SP	1999	Bovino	Carnieli et. al., (2009)
FJ649116	N	Vargem	SP	2000	Bovino	Carnieli et. al., (2009)
FJ649186	N	Itatiba	SP	2001	Bovino	Carnieli et. al., (2009)
FJ649106	N	Bragança Paulista	SP	1998	Bovino	Carnieli et. al., (2009)
FJ649120	N	Nazaré Paulista	SP	2000	Bovino	Carnieli et. al., (2009)

Codigo Acesso GenBank	Gene	Município	Estado	Ano Isolamento	Hospedeiro	Referência
FJ649073	N	Bragança Paulista	SP	1998	Bovino	Carnieli et al., (2009)
FJ649156	N	Caconde	SP	2000	Bovino	Carnieli et al., (2009)
FJ649159	N	Caconde	SP	2000	Bovino	Carnieli et al., (2009)
FJ649172	N	Mococa	SP	2001	Bovino	Carnieli et al., (2009)
FJ649100	N	Vargem	SP	1999	Bovino	Carnieli et al., (2009)
FJ649166	N	Jarinu	SP	2001	Bovino	Carnieli et al., (2009)
FJ649157	N	Itapira	SP	2001	Bovino	Carnieli et al., (2009)
FJ649165	N	Monte Sião	MG	2001	Bovino	Carnieli et al., (2009)
FJ649186	N	São Sebastião da Grama	SP	2001	Bovino	Carnieli et al., (2009)
FJ649186	N	Itatiba	SP	2001	Equino	Carnieli et al., (2009)
FJ649144	N	Pedra Bela	SP	2000	Equino	Carnieli et al., (2009)
FJ649171	N	Atibaia	SP	2001	Equino	Carnieli et al., (2009)
FJ649047	N	Salesópolis	SP	1997	Equino	Carnieli et al., (2009)
FJ649055	N	Salesópolis	SP	1997	Bovino	Carnieli et al., (2009)
FJ649086	N	Arujá	SP	1999	Bovino	Carnieli et al., (2009)
FJ649174	N	Caçapava	SP	1997	Equino	Carnieli et al., (2009)
FJ649056	N	Guararema	SP	1997	Bovino	Carnieli et al., (2009)
FJ649173	N	Biritiba Mirim	SP	1997	Equino	Carnieli et al., (2009)
FJ649053	N	Mogi das Cruzes	SP	1997	Bovino	Carnieli et al., (2009)
FJ649045	N	Salesópolis	SP	1997	Bovino	Carnieli et al., (2009)
FJ649048	N	Salesópolis	SP	1997	Bovino	Carnieli et al., (2009)
FJ649052	N	Santa Branca	SP	1997	Bovino	Carnieli et al., (2009)
FJ649057	N	Suzano	SP	1997	Bovino	Carnieli et al., (2009)
FJ649043	N	Morungaba	SP	1997	Bovino	Carnieli et al., (2009)
FJ649044	N	Morungaba	SP	1997	Bovino	Carnieli et al., (2009)
FJ649065	N	Socorro	SP	1998	Bovino	Carnieli et al., (2009)
FJ649079	N	Socorro	SP	1999	Bovino	Carnieli et al., (2009)
FJ649059	N	Caconde	SP	1998	Bovino	Carnieli et al., (2009)
FJ649075	N	Cajuru	SP	1998	Bovino	Carnieli et al., (2009)
FJ649074	N	Pontal	SP	1998	Bovino	Carnieli et al., (2009)
FJ649046	N	Jaboticabal	SP	1997	Bovino	Carnieli et al., (2009)
FJ649066	N	Socorro	SP	1998	Bovino	Carnieli et al., (2009)
FJ649072	N	São João de Boavista	SP	1998	Bovino	Carnieli et al., (2009)
AB201803	N	Lindóia	SP	2000	<i>D rotundus</i>	Kobayashi et al., (2005)
AB201804	N	Lindóia	SP	2000	<i>D rotundus</i>	Kobayashi et al., (2005)
AB083804	N	Ipora	GO	2000	Equino	Kobayashi et al., (2005)
AB083803	N	Morrinhos	GO	1999	Bovino	Kobayashi et al., (2005)
AB083806	N	Taubaté	SP	---	<i>D rotundus</i>	Kobayashi et al., (2005)
AB083807	N	Pindamonhangaba	SP	1998	<i>D rotundus</i>	Kobayashi et al., (2005)
AB297633	N	Laje de Muriaé	RJ	1998	<i>D rotundus</i>	Kobayashi et al., (2005)
AB297634	N	Itaperuna	RJ	1997	<i>D rotundus</i>	Kobayashi et al., (2005)
AB083808	N	Apiáí	SP	1992	Ovino	Kobayashi et al., (2005)
AB083810	N	Araquáina	TO	1998	Bovino	Kobayashi et al., (2005)
AB083811	N	Colinas	TO	1999	Bovino	Kobayashi et al., (2005)
AB201820	N	Goiana	GO	---	<i>D rotundus</i>	Kobayashi et al., (2005)
AB083812	N	---	---	---	<i>D rotundus</i>	Kobayashi et al., (2005)
AB083816	N	---	---	---	<i>D rotundus</i>	Kobayashi et al., (2005)
AB083815	N	---	---	---	<i>D rotundus</i>	Kobayashi et al., (2005)
AB201805	N	São José do Barreiro	SP	2001	<i>D rotundus</i>	Kobayashi et al., (2005)
AB083817	N	Piraju	SP	1989	Bovino	Kobayashi et al., (2005)
AB117970	N	São José do Rio Preto	SP	1998	<i>A lituratus</i>	Kobayashi et al., (2005)
AB117972	N	São José do Rio Preto	SP	1998	<i>A planirostris</i>	Kobayashi et al., (2005)
AB201819	N	Timburi	SP	2000	<i>D rotundus</i>	Kobayashi et al., (2005)
AB083805	N	São Roque	SP	1994	Bovino	Kobayashi et al., (2005)
AB117969	N	Itapira	SP	1998	<i>A lituratus</i>	Kobayashi et al., (2005)
AB201810	N	Presidente Venceslau	SP	---	<i>E auripendulus</i>	Kobayashi et al., (2005)
AB201817	N	Presidente Venceslau	SP	2002	<i>M rufus</i>	Kobayashi et al., (2005)
AB083818	N	Corumbaíba	GO	1999	Bovino	Kobayashi et al., (2005)
AB083813	N	Alto do Taquari	MT	1999	Bovino	Kobayashi et al., (2005)
AB083814	N	Cáceres	MT	1999	Bovino	Kobayashi et al., (2005)
AF357316	N	Cajati	SP	1986	Bovino	Heinemann et al., (2002)
AF357296	N	---	---	1986	Bovino	Heinemann et al., (2002)
AF357300	N	Bernardino Campos	SP	1989	Bovino	Heinemann et al., (2002)
AF357301	N	Piraju	SP	1988	Bovino	Heinemann et al., (2002)
AF357302	N	Pindamonhangaba	SP	1989	Bovino	Heinemann et al., (2002)
AF357287	N	São Joaquim da Barra	SP	1991	Bovino	Heinemann et al., (2002)
AF357288	N	Apiáí	SP	1991	Bovino	Heinemann et al., (2002)
AF357309	N	Taubaté	SP	1992	<i>D rotundus</i>	Heinemann et al., (2002)
AF357289	N	São Roque	SP	1994	Bovino	Heinemann et al., (2002)
AF357310	N	Guaratinguetá	SP	1994	<i>D rotundus</i>	Heinemann et al., (2002)
AF357314	N	Taubaté	SP	1994	<i>D rotundus</i>	Heinemann et al., (2002)
AF357290	N	Taubaté	SP	1998	Bovino	Heinemann et al., (2002)
AF357291	N	Jacareí	SP	1998	Bovino	Heinemann et al., (2002)
AF357292	N	Santo Antônio do Pinhal	SP	1998	Bovino	Heinemann et al., (2002)
AF357293	N	Taubaté	SP	1998	Bovino	Heinemann et al., (2002)
AF357298	N	Pariquera Açu	SP	1999	Bovino	Heinemann et al., (2002)
GQ160917	N	Poços de Caldas	MG	2007	Bovino	Macedo, et al., (2010)
GQ160946	N	São Sebastião da Grama	SP	2008	Bovino	Macedo, et al., (2010)
GQ160949	N	São Sebastião da Grama	SP	2008	Bovino	Macedo, et al., (2010)
GQ160951	N	São Sebastião da Grama	SP	2008	Equino	Macedo, et al., (2010)
GQ160920	N	Andradas	MG	2008	Bovino	Macedo, et al., (2010)
GQ160910	N	Andradas	MG	2007	Bovino	Macedo, et al., (2010)
GQ160911	N	Andradas	MG	2007	Bovino	Macedo, et al., (2010)
GQ160922	N	Bragança Paulista	SP	2008	Equino	Macedo, et al., (2010)
GQ160928	N	Extrema	MG	2008	Bovino	Macedo, et al., (2010)
GQ160941	N	Piracaia	SP	2008	Bovino	Macedo, et al., (2010)
GQ160952	N	Serra Negra	SP	2008	Bovino	Macedo, et al., (2010)
FJ649138	N	Socorro	SP	2000	Bovino	Macedo, et al., (2010)
FJ649170	N	Espírito Santo do Pinhal	SP	2001	Bovino	Macedo, et al., (2010)
FJ649085	N	Joanópolis	SP	1999	Bovino	Macedo, et al., (2010)
FJ649154	N	Bragança Paulista	SP	2000	Bovino	Macedo, et al., (2010)
GQ160921	N	Belo Horizonte	MG	2008	Bovino	Macedo, et al., (2010)

Código Acesso GenBank	Gene	Município	Estado	Ano Isolamento	Hospedeiro	Referência
GQ160956	N	Três Corações	MG	2008	Bovino	Macedo, et. al., (2010)
GQ160938	N	Mariília	SP	2008	Bovino	Macedo, et. al., (2010)
GQ160933	N	Iacri	SP	2008	Bovino	Macedo, et. al., (2010)
GQ160934	N	Iacri	SP	2008	Bovino	Macedo, et. al., (2010)
GQ160940	N	Pedregulho	SP	2008	Bovino	Macedo, et. al., (2010)
GQ160943	N	Salesópolis	SP	2008	Bovino	Macedo, et. al., (2010)
GQ160913	N	Itirapuã	SP	2007	Bovino	Macedo, et. al., (2010)
M13215	G, N	---	---	----	---	Tordo <i>et al.</i> , (1986)
DVU22848	G, N	---	---	---	Humano	Bourhy <i>et al.</i> , (1993)

Abreviaturas: G: Sequência do gene da glicoproteína, N: Sequência do gene da Nucleoproteína. SP: São Paulo, MG: Minas Gerais, TO: Tocantins, GO: Goiás, MT: Mato Grosso, MA: Maranhão. *D. rotundus*: *Desmodus rotundus*, *A lituratus*: *Artibeus lituratus*, *A planirostris*: *Artibeus planirostris*, *E auripendulus*: *Eumops auripendulus*, *M rufus*: *Molossus rufus*
 ---: sem informação

4.4.9 Análise de polimorfismo

As sequências de aminoácidos da nucleoproteína e glicoproteína foram deduzidas usando *BioEdit*.

As sequências de aminoácidos correspondentes às mesmas sequências de nucleotídeos que aparecem no quadro 1, foram procuradas no *GenBank* e partir delas mediante o *BioEdit* foram obtidas as sequências consenso respectivas para a glicoproteína e nucleoproteína.

A sequência consenso pode ser definida como a sequência ideal que representa a base ou aminoácido predominante em cada posição, mostrando quais resíduos são conservados e quais são variáveis (BALDI; BRUNAK, 2001).

Para avaliar a presença de polimorfismo foi usada como referência a sequência consenso para cada gene analisado.

As substituições de aminoácidos encontradas foram analisadas desde três pontos de vista:

- Presença de mutações não sinônimas
 - Se houve troca por aminoácido de cadeia lateral diferente
 - Se as mutações estavam localizadas em sítios de atividade biológica ou importância antigênica da glicoproteína e nucleoproteína.
-
- Sendo explicado cada caso de forma detalhada a continuação:

Presença de Mutações não sinônimas

Em primeira instância foi conferida a presença de mutações não sinônimas, isto é aquelas que implicassem a troca de aminoácidos (BRINKMAN; LEIPE, 2001).

Mudança nas cadeias laterais dos aminoácidos

Os aminoácidos são os constituintes das proteínas e têm em comum os grupos amino, carboxilo e a cadeia lateral. Estas cadeias laterais possuem grupos funcionais que conferem ao aminoácido diferentes propriedades físicas que influenciam o dobramento, a estrutura tridimensional, estabilidade e funcionalidade das proteínas (STRYER, 1996).

Em consideração a estas generalidades verificou-se se houve mudança nas cadeias laterais do aminoácido, seguindo a classificação bioquímica:

Alifáticos, não polares: Glicina (G), Alanina (A), Prolina (P), Valina (V), Leucina (L), Isoleucina (I), Metionina (M)

Aromáticos: Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofano (W)

Polares não carregados: Serina (S), Treonina (T), Cisteína (C), Asparagina (N), Glutamina (Q)

Carregados positivamente: Lisina (K), Arginina (R), Histidina (H)

Carregados negativamente: Aspartato (D), Glutamato (E)

Mutações em regiões antigénicas ou com atividade biológica

Por último foi verificado se as mutações não sinônimas observadas estavam localizadas em sítios antigénicos ou domínios proteicos com relevância na patogenicidade viral para ambas as proteínas, segundo o descrito na seção “ 2.1 Organização do genoma do vírus raiva e estrutura viral”

4.5 Análise geográfica

Foram elaborados mapas mediante o programa ArcGis versão 9.3 (ESRI INC. Arc View GIS REDLANDS, 1996). As estirpes virais descritas no presente trabalho foram localizadas em mapas segundo o município de origem para

analisar sua distribuição em relação a fatores como: acidentes topográficos, altitude, presença das bacias hidrográficas e diferentes biomas.

As coordenadas geográficas dos municípios onde se originaram os casos foram localizadas nas bases cartográficas digitalizadas do IBGE.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE FILOGENÉTICA

A análise filogenética foi baseada em dois componentes do genoma do vírus da raiva: do gene da glicoproteína e nucleoproteína (sequências parciais). As análises foram realizadas separadamente.

5.1.1 Análise filogenética baseada na sequencia nucleotídica parcial do gene da glicoproteína

Foi possível obter 32 sequências viáveis, a qualidade das mesmas foi verificada, como descrito na seção 4.4.8. No alinhamento somente foram considerados os segmentos das sequencias que atingissem os critérios de qualidade previamente descritos, sendo obtido um segmento final 540 nucleotídeos de comprimento. Este segmento do gene da glicoproteína está posicionado entre os nucleotídeos 3374 a 3914, sendo esta região a responsável de codificar para o domínio externo da glicoproteína do vírus da raiva (ecto-domínio). Para verificar as posições e as regiões funcionais do gene da glicoproteína foi usado como “régua” o genoma completo da amostra fixa de laboratório Vírus Pasteur (número de acesso GenBank M13215).

A árvore filogenética obtida é mostrada na figura 10.

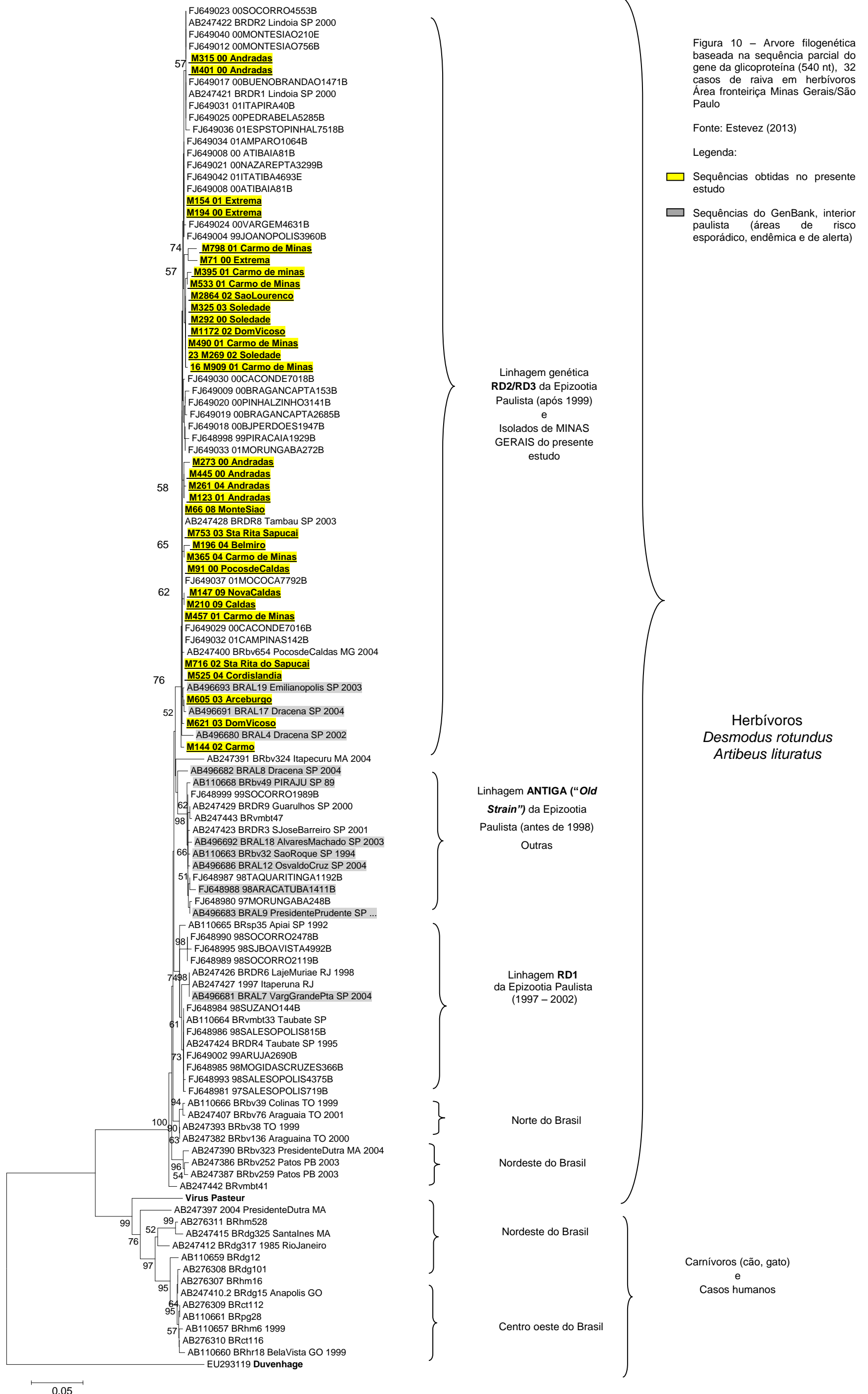


Figura 10 – Arvore filogenética baseada na sequência parcial do gene da glicoproteína (540 nt), 32 casos de raiva em herbívoros Área fronteira Minas Gerais/São Paulo

Fonte: Estevez (2013)

Legenda:

- Sequências obtidas no presente estudo
- Sequências do GenBank, interior paulista (áreas de risco esporádico, endêmica e de alerta)

Herbívoros
Desmodus rotundus
Artibeus lituratus

Carnívoros (cão, gato)
e
Casos humanos

5.1.2 Análise de polimorfismos das sequências parciais da glicoproteína

A partir de cada uma das 32 sequências de nucleotídeos foram inferidas as correspondentes sequências de aminoácidos mediante o programa *BioEDIT*, sendo obtidas 32 sequências de aminoácidos compostas por 180 resíduos, abrangendo as posições 20 a 200 (usando para o alinhamento o vírus fixo Pasteur, número de acesso GenBank M13215), correspondendo ao ectodomínio da glicoproteína viral.

As sequências obtidas no presente trabalho foram alinhadas com a sequência consenso, como pode ser apreciado na figura 11.

No quadro 4 são mostradas as substituições de aminoácidos achadas no alinhamento das sequências de aminoácidos da glicoproteína, a posição das mutações e se houve troca de cadeia lateral.

Quadro 4 – Substituições de aminoácidos nas sequências da glicoproteína de amostras do vírus da raiva procedentes de herbívoros da região fronteira entre São Paulo e Minas Gerais, 2000 – 2009

Amostra	Posição	Mudança	Classificação
Todas as sequências	151	L (Leucina) → I (Isoleucina)	Alifático não polar → Alifático não polar
M273_00 Andradas	131	N (Asparagina) → Q (Glutamina)	Polar não carregado → Polar não carregado
	195	I (Isoleucina) → M (Metionina)	Alifático não polar → Alifático não polar
	196	W (Tryptofano) → R (Arginina)	Aromático → Carregado positivamente
M798_01 Carmo de Minas	58	G (Glicina) → R (Arginina)	Alifático não polar → Carga positiva
	159	D (Ac Aspártico) → H (Histidina)	Carga negativa → Carga positiva

5.1.3 Análise filogenética das sequências parciais do gene da nucleoproteína

Foi possível obter 25 sequências viáveis, a qualidade das mesmas foi verificada, como descrito na seção 4.4.8. No alinhamento somente foram considerados os segmentos das sequências que atingissem os critérios de qualidade previamente descritos, sendo obtido um segmento final 416 nucleotídeos de comprimento. Este segmento do gene da nucleoproteína está posicionado entre os nucleotídeos 296 a 712. Para verificar as posições e as regiões funcionais do gene da nucleoproteína foi usado como “régua” o genoma completo da amostra fixa de laboratório Vírus Pasteur (número de acesso GenBank M13215).

A árvore filogenética da figura 12 sugere a presença de nove sub-linhagens virais circulando no estado de São Paulo designadas como **la** até **li**.

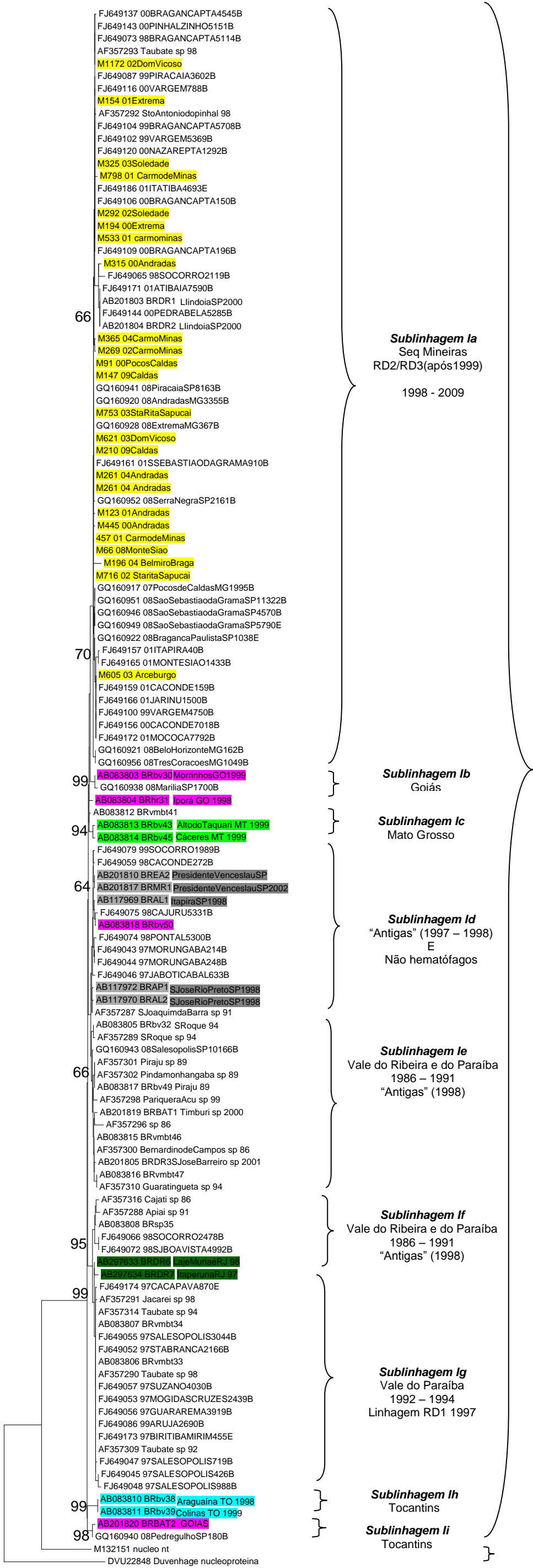


Figura 12 - Árvore filogenética baseada na sequência parcial do gene da nucleoproteína, (416 nt), 25 casos de raiva em herbívoros Área fronteira Minas Gerais /São Paulo

Fonte: Estevez (2013)

Legenda:

- Sequências obtidas no presente estudo
- Sequências obtidas do GenBank:
 - Goiás
 - Mato Grosso
 - Morcegos não hematófagos
 - Rio de Janeiro
 - Tocantins

Cluster I

Cluster II

5.1.4 Análise de polimorfismo da sequência parcial da nucleoproteína

A partir de cada uma das 25 sequências de nucleotídeos foram inferidas as correspondentes sequências de aminoácidos mediante o programa *BioEDIT*, sendo obtidas 25 sequências de aminoácidos compostas por 137 resíduos, abrangendo as posições 77 a 214 (usando para o alinhamento o vírus fixo Pasteur, número de acesso GenBank M13215)

As sequências obtidas no presente trabalho foram alinhadas com a sequência consenso, como pode ser apreciado na figura 13.

Figura 13 - Alinhamento da sequência consenso e as sequências de aminoácidos inferidas a partir da sequência parcial do gene da nucleoproteína, 25 amostras procedentes do Sul de Minas Gerais (área fronteiriça com São Paulo), 2000 - 2009

	80	90	100	110	120	130
Consensus_NUCLEOPROT_AMINOACIDA	M Q F	F E G S C P E D W T	S Y G I L I A R K G	D K I T P D S L V D	I R R T D V E G N W	A L T G G M E L T R D P T V S E H A
M132151_nucleo_nt
M261_04Andradas	.	T	.	G	E	.
M147_09Caldas	.	.	V	.	.	P
M91_00PocosCaldas
M621_03DomVicoso
M123_01Andradas
M605_03_Arceburgo
457_01_CarmodeMinas	.	.	.	N	.	.
M798_01_CarmodeMinas
M196_04_BelmiroBraga
M533_01_carmominas
M716_02_StaritaSapucaí
M261_04_Andradas
M210_09Caldas
M194_00Extrema
M365_04CarmoMinas
M66_08MonteSiao
M1172_02DomVicoso
M315_00Andradas
M753_03StaRitaSapucaí
M325_03Soledade
M269_02CarmoMinas
M292_02Soledade
M154_01Extrema
M445_00Andradas

	150	160	170	180	190	200
Consensus_NUCLEOPROT_AMINOACID	L Y R L	S K I S G Q N T G N	Y K T N I A D R I E	Q I F E T A P F A K	I V E H H T L M T T	H K M C N N W S T I P N F R F L A G
M132151_nucleo_nt	.	S
M261_04Andradas	.	.	.	V	.	A
M147_09Caldas	A
M91_00PocosCaldas	A
M621_03DomVicoso	A
M123_01Andradas	A
M605_03_Arceburgo	A
457_01_CarmodeMinas	A
M798_01_CarmodeMinas	A
M196_04_BelmiroBraga	.	.	.	T	.	A
M533_01_carmominas	.	L	.	.	.	A
M716_02_StaritaSapucaí	A
M261_04_Andradas	A
M210_09Caldas	A
M194_00Extrema	A
M365_04CarmoMinas	.	.	.	L	.	A
M66_08MonteSiao	A
M1172_02DomVicoso	A
M315_00Andradas	A
M753_03StaRitaSapucaí	A
M325_03Soledade	A
M269_02CarmoMinas	A
M292_02Soledade	.	.	.	L	.	A
M154_01Extrema	A
M445_00Andradas	A

Fonte: Estevez (2013)

Legenda: A figura mostra as substituições não sinônimas encontradas nas sequências de aminoácidos de um segmento da nucleoproteína viral de 25 amostras analisadas no presente projeto. As sequências de aminoácidos foram inferidas a partir do alinhamento das sequências nucleotídicas mediante o programa BioEDIT. Resíduos 77-214

No quadro 5 são mostradas as substituições de aminoácidos achadas no alinhamento das sequências de aminoácidos da nucleoproteína, a posição das mutações e se houve troca de cadeia lateral.

Quadro 5 – Substituições de aminoácidos nas sequências da nucleoproteína de amostras do vírus da raiva procedentes de herbívoros da região fronteira entre São Paulo e Minas Gerais, 2000 – 2009

Amostra	Posição	Mudança	Classificação do Aminoácido
Todas as sequências ¹	78	Alanina (A) → Metionina (M)	Alifático não polar → Alifático não polar
	79	Metionina (M) → Glutamina (Q)	Alifático não polar → Polar não carregado
	80	Glutamina (Q) → Fenilalanina (F)	Polar não carregado → Aromático
	195	Asparagina (N) → Alanina (A)	Polar não carregado → Alifático não polar
M605_03_Arceburgo	106	Acido Aspártico (D) → Asparagina (N)	Polar ácido → Polar Neutro
M798_01_Carmo de Minas	176	Alanina (A) → Treonina (T)	Alifático não polar → Polar não carregado
M196_04_Belmiro Braga	151	Serina (S) → isoleucina (I)	Polar Neutro → Apolar
	152	Lisina (K) → Leucina (L)	Positivo → Alifático não polar
M365_04_Carmo de Minas	178	Fenilalanina (F) → Leucina (L)	Aromático → Alifático não polar
M269_02_Carmo de Minas	178	Fenilalanina (F) → Leucina (L)	Aromático → Alifático não polar
M445_00_Andradas	206	Leucina (L) → Prolina (P)	Alifático não polar → Alifático não polar

¹As substituições foram encontradas nas 25 sequências obtidas no presente estudo e em todas as sequências do GenBank usadas no alinhamento

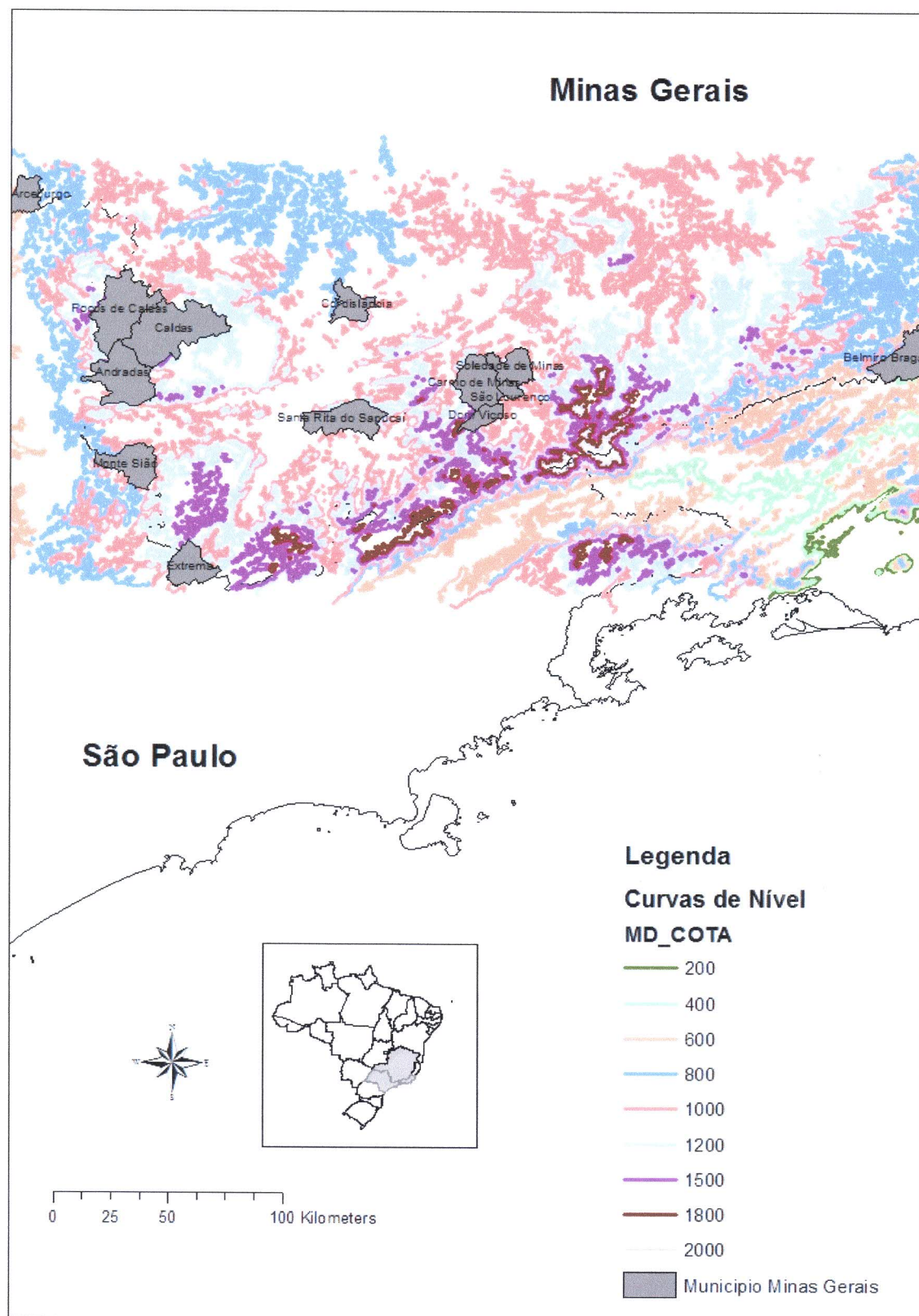
5.2 Análise geográfica

A análise geográfica foi realizada de maneira separada para os dois genes estudados.

5.2.1 Análise geográfica baseada no gene da glicoproteína

Para realizar a análise geográfica baseada no gene da glicoproteína, foi tomada como base o mapa da figura 8 que descreve a posição dos municípios de origem das amostras. A este mapa base foram sobrepostos mapas de relevo (Figura 14), bacias hidrográficas (Figura 15) e biomas (Figura 16) mediante o programa ArcGis versão 9.3 (ESRI INC. Arc View GIS Redlands, 1996), gerando um mapa para cada fator geográfico analisado.

Figura 14 – Mapa de cota de altitude dos municípios de estudo no presente trabalho. Em destaque a Serra da Mantiqueira



Fonte: Estevez (2013)

Figura 15 - Mapa das principais bacias hidrográficas da área de estudo. Área fronteiriça entre Minas Gerais e São Paulo.

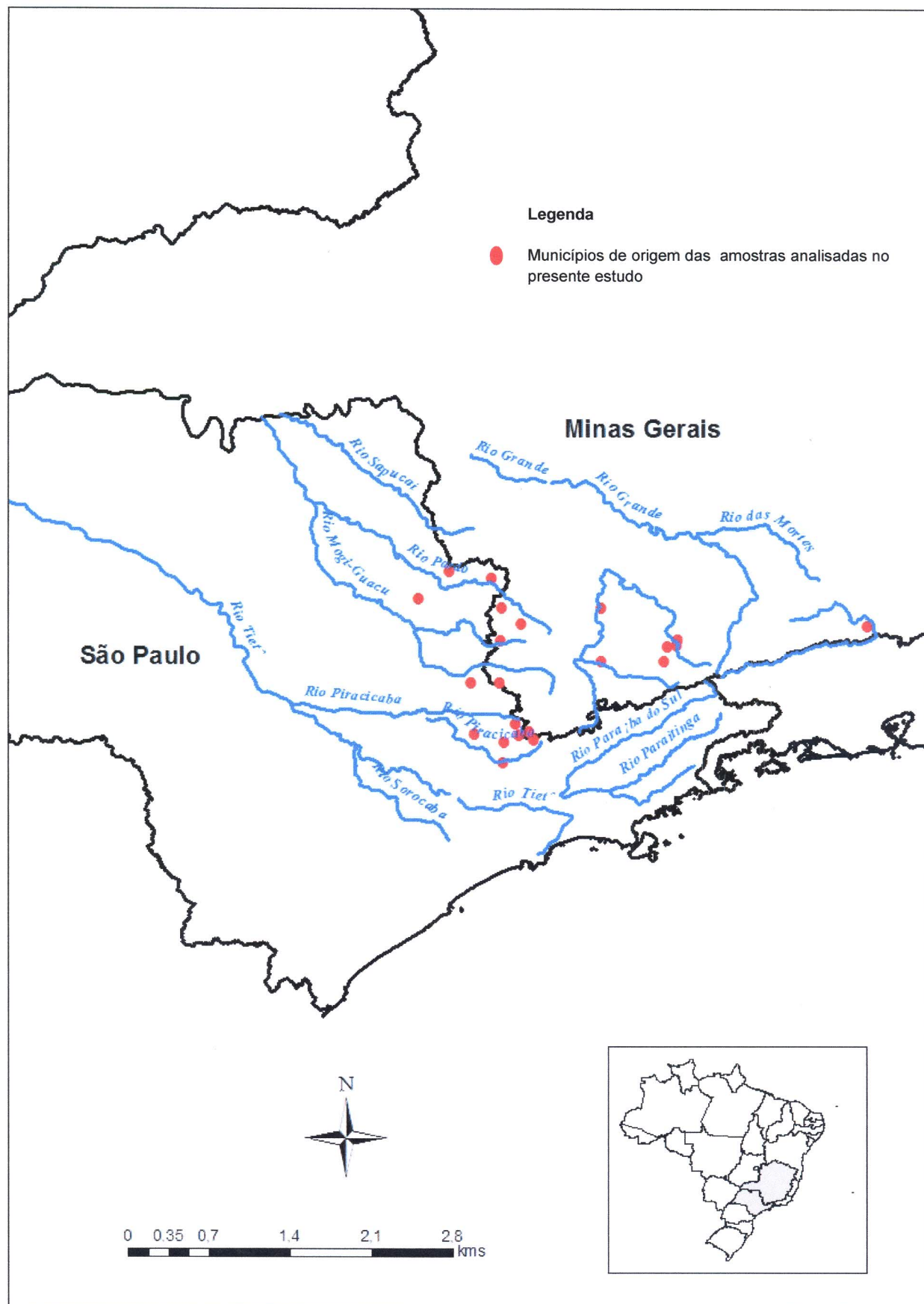
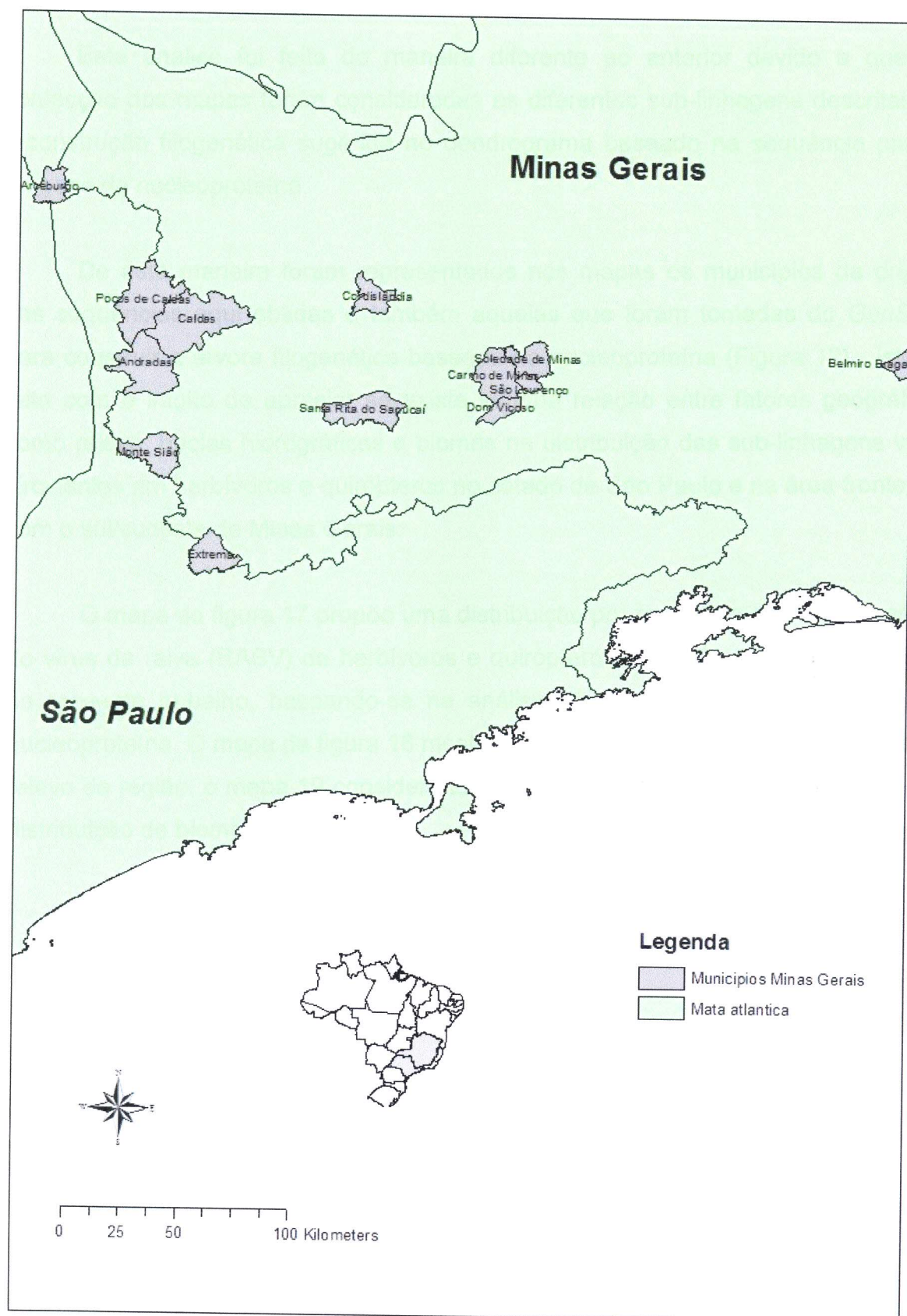


Figura 16 - Distribuição geográfica dos casos de raiva em herbívoros mencionados no presente estudo segundo os biomas que existem na área de interesse, estado de Minas Gerais e São Paulo, 2002 a 2009. Na área de estudo predomina o bioma de mata atlântica



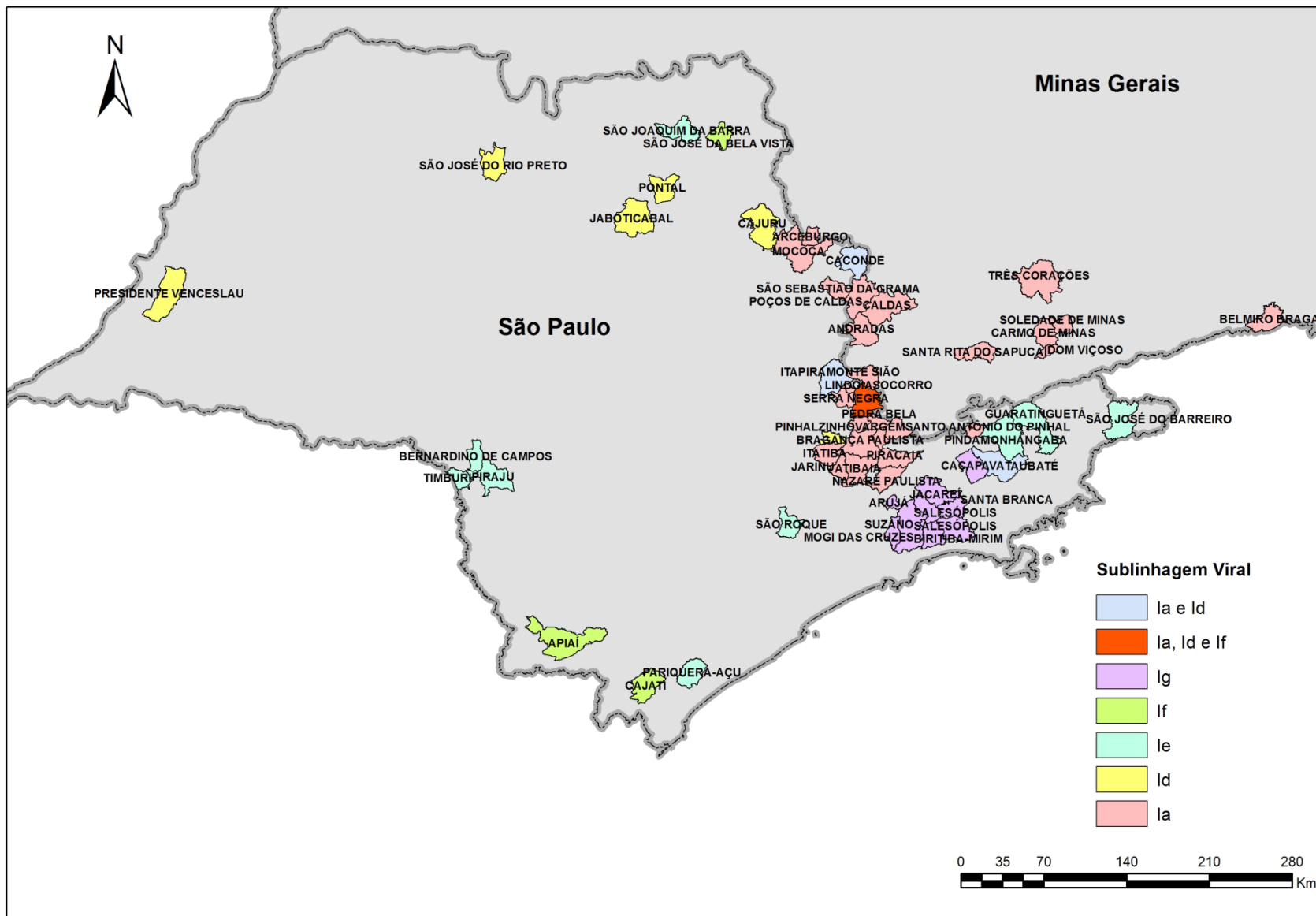
5.2.2 Análise geográfica baseada no gene da nucleoproteína

Esta análise foi feita de maneira diferente ao anterior devido a que na confecção dos mapas foram consideradas as diferentes sub-linhagens descritas na reconstrução filogenética sugerida no dendrograma baseado na sequência parcial do gene da nucleoproteína.

De esta maneira foram representados nos mapas os municípios de origem das sequências aqui obtidas e também aquelas que foram tomadas do *GenBank* para construir a árvore filogenética baseada na nucleoproteína (Figura 12). Isto foi feito com o intuito de apreciar se existe alguma relação entre fatores geográficos como relevo, bacias hidrográficas e biomas na distribuição das sub-linhagens virais circulantes em herbívoros e quirópteros no estado de São Paulo e na área fronteira com o sul/sudeste de Minas Gerais.

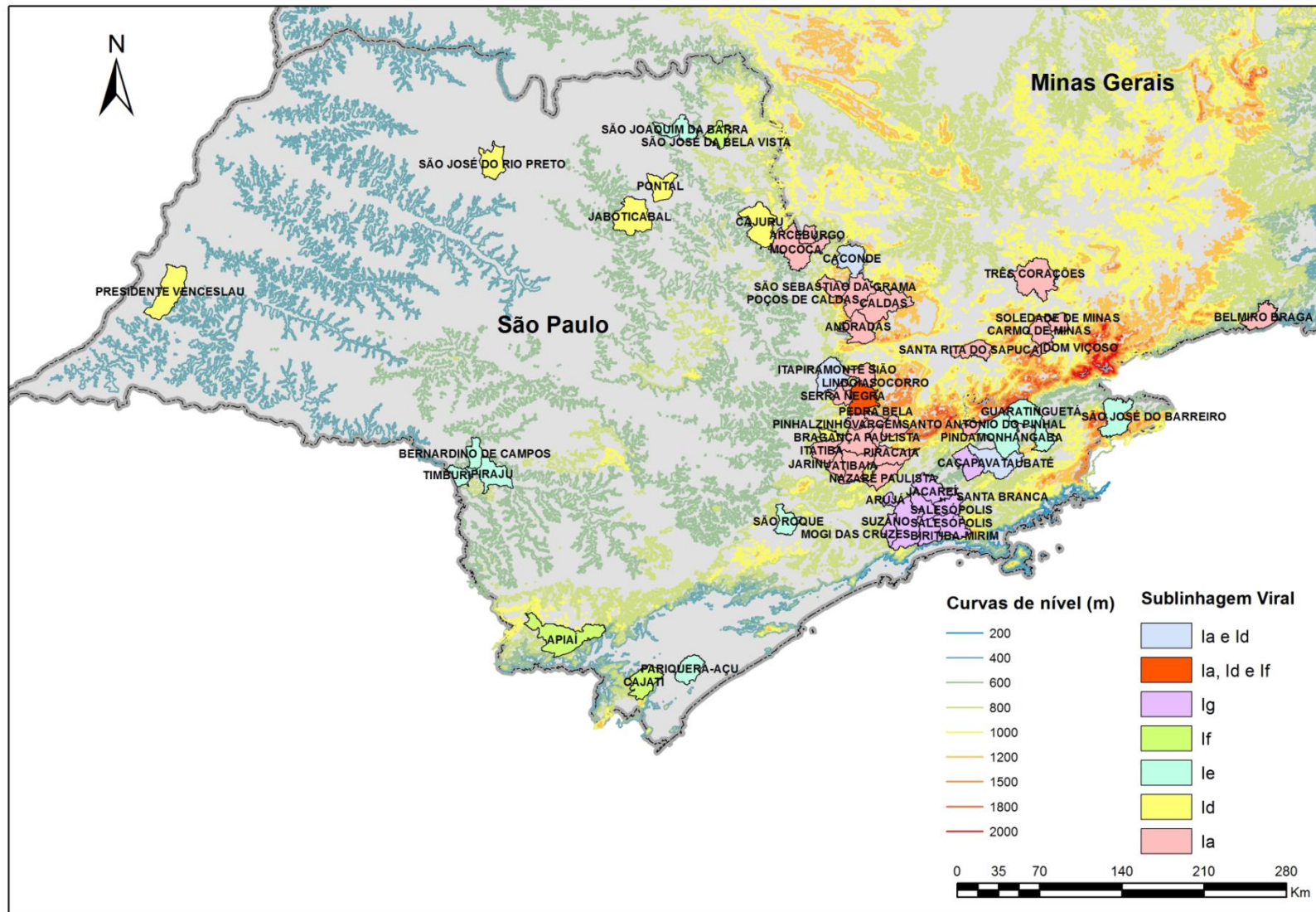
O mapa da figura 17 propõe uma distribuição por município das sub-linhagens do vírus da raiva (RABV) de herbívoros e quirópteros segundo a filogenia sugerida no presente trabalho, baseando-se na análise da sequência parcial do gene da nucleoproteína. O mapa da figura 18 mostra esta mesma distribuição considerando o relevo da região, o mapa 19 considerando bacias hidrográficas e 20 considerando a distribuição de biomas.

Figura 17- Proposta de distribuição geográfica das sub-linhagens sugeridas pela análise filogenética do presente estudo, baseado na sequência parcial do gene da nucleoproteína do RABV procedentes de casos bovinos e equinos de diversos municípios do Estado de São Paulo e região Sul/Sudeste de Minas Gerais (1986-2009)



Fonte: Estevez (2013)

Figura 18 - Proposta de distribuição geográfica das sub-linhagens sugeridas pela análise filogenética do presente estudo, baseada na sequência parcial do gene da nucleoproteína do RABV procedentes de casos em bovinos e equinos de diversos municípios do Estado de São Paulo e região Sul/Sudeste de Minas Gerais (1986 – 2009) considerando relevo da região.



Fonte: Estevez (2013)

O mapa da figura 18 propõe a seguinte distribuição geográfica das sub-linhagens sugeridas a partir da análise filogenética realizada:

Estirpe Ia, Esta sub-linhagem circula predominantemente na região nordeste do estado de São Paulo, região de apresentação epidêmica de raiva, abrangendo também todos os municípios do sul/sudeste do estado de Minas Gerais aqui estudados. A área apresenta altitudes entre 1000 e 1200.

Estirpe Id, Circula na zona oeste do estado de São Paulo, nesta vasta área a raiva tem apresentação esporádica. Incluindo ainda alguns municípios da região norte/nordeste. As altitudes do terreno oscilam entre 200 e 800 metros.

Estirpe Ie, circula em três áreas diferentes: sul, sudoeste, leste.

Sul do estado, corresponde à área endêmica, com altitudes entre 200 e 400 metros. Sudoeste (depressão periférica, área endêmica, 600 m). Leste, principalmente no Vale do Paraíba (planalto atlântico, área epidêmica 1000 - 1200).

Estirpe If, Circula na área sul do estado (província costeira, área endêmica, 200 – 400 metros de altitude), atingindo alguns municípios da área norte/nordeste

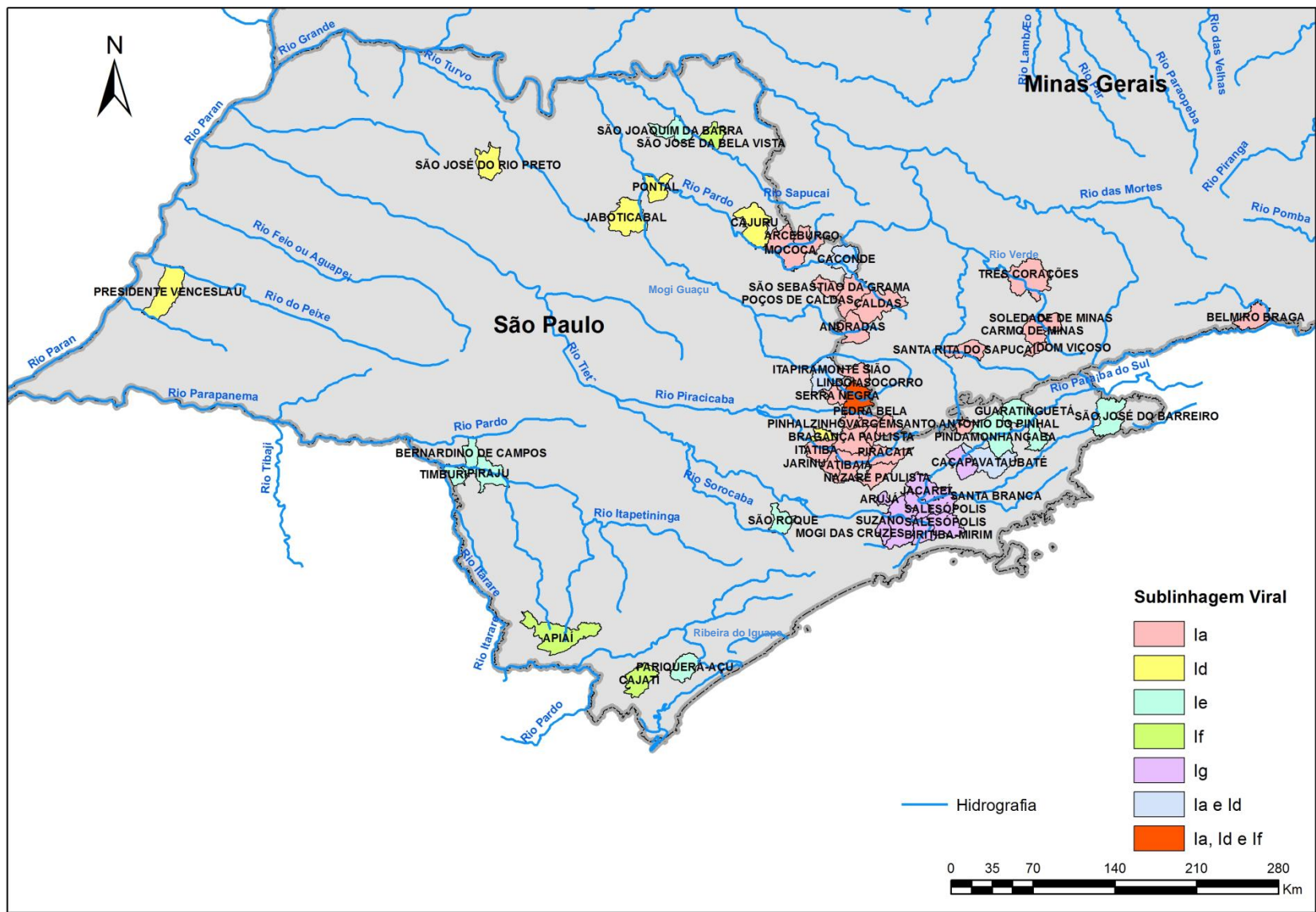
Estirpe Ig, distribuída também na região leste do estado, no Vale do Paraíba.

Nos municípios de Socorro, Caconde, Itapira (região nordeste) e Taubaté (região do Vale do Ribeira) observam-se a circulação de várias sub-linhagens de maneira simultânea. No município de Socorro, circulam as sub-linhagens Ia, Id e If e nos municípios de Caconde, Itapira, Taubaté as sub-linhagens Ia e Id.

As estirpes **Ib** (Goiás), **Ic** (Mato Grosso), **Ih** (Tocantins) e **Ii** (Goiás e do município de Pedregulho, São Paulo) não foram consideradas nas figuras, devido a que sua procedência geográfica dificultou representação das mesmas no mapa.

No mapa 19 é mostrada a distribuição das bacias hidrográficas no estado de São Paulo e sul/sudeste de Minas Gerais.

Figura 19 - Proposta de distribuição geográfica das sub-linhagens sugeridas pela análise filogenética do presente estudo, baseada na sequência parcial do gene da nucleoproteína do RABV procedentes de casos em bovinos e equinos de diversos municípios do Estado de São Paulo e região Sul/Sudeste de Minas Gerais (1986 – 2009), considerando as bacias hidrográficas da região.



Fonte: Estevez (2013)

No mapa da figura 19 sugere-se que algumas sub-linhagens virais circulam nas áreas de influência de bacias hidrográficas na região de estudo assim:

Sub-linhagem Ia, Rios: Pardo, Piracicaba, Mogi Guaçu, Verde

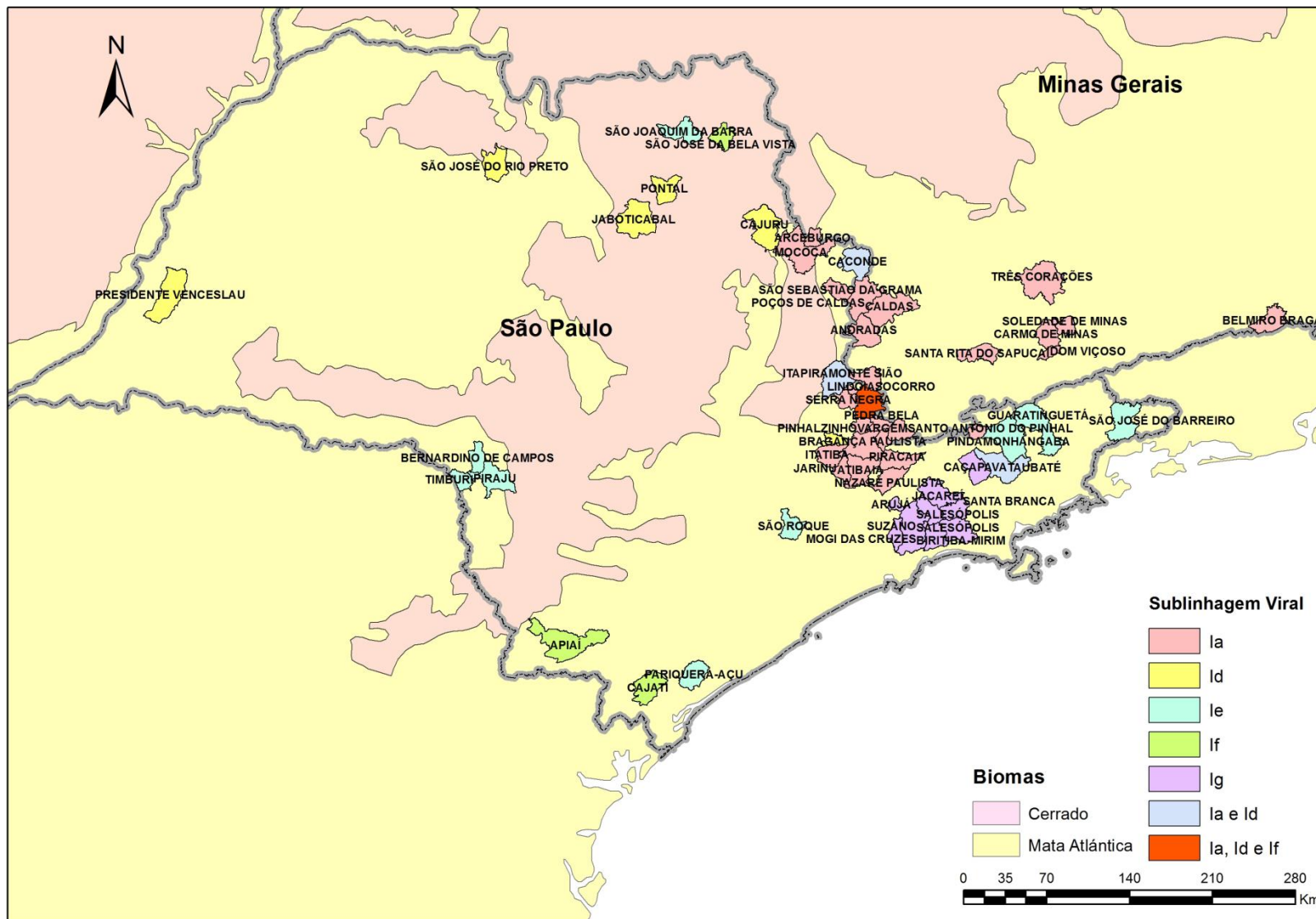
Sub-linhagem Id, Rios: Peixe, Pardo, Piracicaba

Sub-linhagem Ie Rios: Sorocaba, Pardo, Iarare, Paraíba do Sul, Iguape

Sub-linhagem Ig Rios:Paraíba do Sul

No mapa da figura 20 é mostrada a distribuição dos biomas na região de estudo

Figura 20 - Proposta de distribuição geográfica das sub-linhagens sugeridas pela análise filogenética do presente estudo, baseada na sequência parcial do gene da nucleoproteína do RABV procedentes de casos em bovinos e equinos de diversos municípios do Estado de São Paulo e região Sul/Sudeste de Minas Gerais (1986 – 2009), considerando a distribuição dos biomas.



Fonte : Estevez (2013)

A maioria das sub-linhagens está distribuída no bioma de Mata Atlântica o qual é predominante na área de estudo, porém, algumas linhagens se distribuíram em municípios localizados tanto na região de Mata Atlântica quanto na região do bioma de Cerrado:

Sub-linhagem Id: Presente no município de São José do Rio Preto o qual está localizado na divisa de ambos os biomas. Esta linhagem também foi observada na região de cerrado nos municípios de Pontal, Jaboticabal, e Cajuru e em Presidente Venceslau na região de Mata Atlântica.

Sub-linhagem Ie: Presente no município São Joaquim da Barra na região do Cerrado. O restante dos municípios onde esta estirpe viral foi observada, estão localizados no Vale do Paraíba, na região de Mata Atlântica.

Sub-linhagem If: Circulando no município de São João de Boa Vista no Bioma de Cerrado. Também nos municípios de Apiai e Cajati na região de Mata Atlântica.

6 DISCUSSÃO

A análise filogenética mostrou diferentes níveis de detalhamento segundo o gene considerado. Os resultados foram discutidos seguindo a ordem dos tópicos analisados: Análise filogenética, análise de polimorfismo e por último análise geográfica.

A caracterização genética de isolamentos de vírus da raiva de herbívoros do sul de Minas Gerais (2000 – 2009) com base às sequências parciais da glicoproteína viral realizada no presente trabalho sugere uma estreita relação entre todas as sequências analisadas, sendo possível ainda observar graus diferenciados de identidade genética com as sub-linhagens virais envolvidas na epizootia do estado de São Paulo (1997 – 2002) descritas por Carnieli et al. (2009).

As sequências mineiras aqui obtidas mostraram maior proximidade filogenética com a sub-linhagem paulista **RD2/RD3** sugerindo que esses casos podem ter a mesma origem.

O que têm em comum essas sequências em termos epidemiológicos é que são originárias de casos de raiva em herbívoros acontecidos em municípios pertencentes a uma área epidêmica. Houve alguns isolados dentro desta sub-linhagem originários de morcegos frugívoros (*Artibeus lituratus*), procedentes dos municípios de Dracena e Emilianópolis, a 700 km da área onde se apresentou a epizootia no período 1997 - 2002. Ditas sequências correspondem aos números de acesso do GenBank AB496693, AB496691 e AB496680 do trabalho de Kobayashi et. al. (2009). Estes municípios fazem parte da área de apresentação esporádica de raiva do estado de São Paulo, segundo Kotait et al.(1998).

As sequências mineiras obtidas no presente trabalho apresentaram menor identidade em relação às sequências nomeadas por Carnieli et al. (2009) como “**Antiga**” e **RD1**. Este achado sugere que os casos mineiros poderiam ter uma origem genética diferente dessas linhagens, embora exista proximidade geográfica entre os municípios de procedência.

Na sub-linhagem “**Antiga**” junto com os casos da área epidêmica paulista ficaram agrupadas sequências de *A. lituratus*, dos municípios Alvares Machado, Osvaldo Cruz e Presidente Prudente, pertencentes à área de apresentação esporádica de raiva, existindo uma distância média de 560 km, entre elas, sendo que estes casos aconteceram dois anos após o fim da epizootia paulista.

Um comportamento similar foi encontrado na sub linhagem **RD1** onde é observada proximidade filogenética entre alguns casos cronologicamente e geograficamente dispares: Os casos de Apiaí (1992) e Taubaté (1995), ambos municípios do estado de São Paulo, localizados em área endêmica a 480 km de distância um do outro. Dentro deste grupo ficaram inclusos isolados procedentes dos municípios Laje de Muriaé e Itaperuna do estado de Rio de Janeiro, que aconteceram durante a epizootia paulista.

A árvore filogenética baseada na sequência parcial do gene da nucleoproteína mostrou um comportamento semelhante ao do gene da glicoproteína, sugerindo proximidade genética em todos os isolados procedentes do interior de São Paulo e do Sudeste de Minas Gerais. Observando com mais atenção, o dendrograma do gene N, sugere a diferenciação em dois grupos maiores designados com **I** e **II**. Dentro do grupo **I** propõe-se a divisão em nove sub-linhagens nomeadas consecutivamente desde **la** até **li**. O **cluster II** corresponde às sequências usadas como grupo externo para enraizar a árvore filogenética: Vírus Pasteur (M132151) e Vírus Duvenhage (DVU22848). Como pode ser apreciado no alinhamento das sequências, no apêndice A, cada sub-linhagem possui uma combinação de mutações pontuais, na sua maioria sinônimas que marcam ligeiras diferenças genéticas.

Na **sub-linhagem la**, todas as sequências mineiras obtidas no presente trabalho segregaram conjuntamente com a maioria dos isolados classificados dentro das estirpes virais **RD2**, **RD2/RD3** assim como uma das sequências pertencentes à estirpe “**Antiga**” (FJ649065, Socorro, SP) e outra do Vale do Paraíba (AF357292 Santo Antônio do Pinhal, SP); a maior parte dos isolados desta sub-linhagem correspondem a casos de raiva bovina acontecidos no período 1998 – 2009.

O **sub cluster Ib** composto por isolados do ano 1998 e 1999 dos municípios Morrinhos e Iporá (Goiás) e um de Marília (São Paulo, do ano 2008).

O **sub cluster Ic** integrado por sequências do estado de Mato Grosso.

Sub cluster Id compreende isolados de morcegos não hematófagos dos municípios paulistas: Presidente Venceslau (*Eumops auripendulus* e *Molossus rufus*), localizado na área de apresentação esporádica de raiva, Itapira (*Artibeus lituratus*) e São Jose do Rio Preto (*Artibeus planirostris*) ambos procedentes da área epidêmica, incluindo adicionalmente, sequências da estirpe “**Antiga**” (1997 – 1998).

O **sub cluster Ie** abrange amostras da região do Vale do Paraíba e Vale do Ribeira, dos anos 1986 a 2001.

O **sub cluster If** Composto por sequências dos Vales dos Rios Ribeira e Paraíba, do período 1986 – 1991, estão também presentes algumas sequências da estirpe “**Antiga**” do ano 1998.

O **sub cluster Ig**: Vale do Paraíba período 1992 a 1994 e da epizootia paulista durante o ano 1997.

Sub cluster Ih: Isolado do Estado de Tocantins,

Sub cluster Ii: Sequência de Pedregulho, São Paulo, 2008.

A árvore filogenética obtida a partir das sequências parciais do gene da nucleoproteína insinua alta identidade genética entre as sequências mineiras aqui obtidas e a estirpe viral **RD2/RD3** descrita por Carnieli et al. (2009), condizendo com a hipótese da possível origem comum previamente sugerida pela análise filogenética do gene da glicoproteína.

A disponibilidade de um maior número de sequências do gene da nucleoproteína no GenBank, facilitou uma análise filogenética mais detalhada dos casos de raiva em herbívoros em São Paulo pela possibilidade de incorporar

sequências de diferentes regiões geográficas do estado e em diferentes pontos do tempo, abrangendo um período compreendido entre 1986 a 2009.

Nas árvores filogenéticas baseadas no gene da glicoproteína e nucleoproteína foram observadas politomias ou multi furcações (um ancestral dá origem a mais de dois descendentes) que segundo Heinemann et al. (2002) indicam a ocorrência de diferentes eventos e/ou centros de dispersão. Esta observação é condizente com a situação à campo, os registros de ocorrência de raiva feitos pelos órgãos estaduais sugerem que historicamente acontecem focos simultâneos da doença em diversas regiões de São Paulo.

Chama atenção a ocorrência de três situações na dinâmica filogeográfica dos isolados analisados: 1. circulação de uma mesma estirpe viral em lugares geográficos distantes, 2. circulação de diversas estirpes geneticamente relacionadas em áreas próximas, 3. Circulação de duas ou três sub-linhagens simultaneamente num mesmo município.

A primeira situação foi observada com as sub-linhagens **Id** distribuindo-se nas regiões Oeste, Norte e Nordeste de São Paulo, **Ie**: municípios do leste de São Paulo (Vale do Paraíba) e sul (Vale do Ribeira), **If**: sul (Vale do Ribeira) e Norte/Nordeste.

A segunda situação observada na região leste, onde municípios com estreita proximidade geográfica formam três “ilhas” ao interior das quais circulam as sub-linhagens **Ia**, **Ie** **Ig** de maneira independente em cada área.

O terceiro caso, de ocorrência de duas ou mais sub linhagens nos municípios de Socorro (Ia, Id, If) e Taubaté, Caconde, Itapira (Ia, Id), esta situação poderia estar indicando o acontecimento de focos da doença que se sobrepõem geográfica e cronologicamente.

Isto condiz com a observação amplamente documentada na literatura de diferenciação de estirpes do vírus da raiva segundo o hospedeiro e regiões geográficas (REAL et al., 2005), mas esta observação não pode ser assumida com uma regra (HEINEMANN et al., 2002).

Os resultados aqui apresentados refletem a influência simultânea da deriva genética e fatores geográficos, sendo estes dois fatores promotores da diversidade molecular do vírus da raiva (BOURHY et al., 2008). De modo que, o surgimento, circulação e manutenção de uma linhagem viral na natureza é consequência da interação de diversos componentes: as propriedades antigênicas e genéticas do patógeno, a patobiologia da infecção em nível individual e as características ecológicas do hospedeiro em nível populacional (RUPPRECHT; TURMELLE; KUZMIN, 2011).

Na análise de polimorfismo da glicoproteína foram detectadas sete substituições de aminoácidos entre os resíduos 20 a 200 do ectodomínio, sendo esta a região mais conservada da glicoproteína, devido principalmente a restrições estruturais (BENMANSOUR et al., 1992).

Estas substituições poderiam ter impacto na patogenia devido que esta região compromete o domínio de fusão dependente de baixo pH, a qual é fundamental para o processo de adesão celular (TORDO, 1996). Não houve comprometimento de outras regiões descritas na literatura: **Sítio Antigênico AII** (posições 34 – 42 e 198 – 200) o qual é responsável pelo reconhecimento de receptores virais nas terminações nervosas (PREHAUD et al., 1988), nem nas posições, 242, 255 e 268 as quais têm influência na patogenicidade (TAKAYAMA-ITO et al., 2006).

A região analisada da nucleoproteína no presente trabalho está fora dos domínios descritos por Tordo (1996) como determinantes antigênicos: **Sítio AIII** (311 – 337), **AI** (359 – 365), **AIV** (359 – 364) e **Sítio 31** (414 – 419).

Analisar o impacto das mutações nas proteínas do vírus da raiva implica realizar estudos de patogenicidade em modelos animais, com títulos virais conhecidos (MORIMOTO et al., 1998), não sendo este o escopo do presente trabalho.

No tangente a análise geográfica é interessante observar que as porções mais elevadas da Serra da Mantiqueira (1800 metros de altitude) são descontinuas,

sendo interrompidas por áreas de menor altitude (1200 a 1000 metros de altitude). Esta condição geográfica possivelmente facilita a circulação de colônias de morcegos entre os dois estados.

A análise geográfica baseada na sequência parcial do gene da nucleoproteína sugere a circulação de estirpes virais geneticamente próximas entre áreas de diferentes altitudes o qual foi observado também por Pereira et al. (2013). Este resultado é controverso em relação às observações de Sato et al. (2004, 2006), onde é sugerido que cadeias montanhosas podem agir como fatores de isolamento que promovem a diversificação genética. Outros estudos apoiam a teoria de que a circulação de algumas sub-linhagens do RABV de herbívoros na área sudeste e centro-oeste do Brasil está circunscrita entre altitudes de 100, 300 e 700 metros (KOBAYASHI et al., 2008).

Nos mapas de análise geográfica baseados nos genes da glicoproteína e nucleoproteína foi evidente a presença de focos de raiva e circulação de diversas estirpes virais principalmente em municípios próximos às bacias hidrográficas dos rios: Pardo, Piracicaba, Mogi Guaçu, Verde, Peixe, Pardo, Sorocaba, Pardo, Iarare, Paraíba do Sul e Iguape, condizendo com as observações de Tadei et al. (1991), cujo trabalho mostrou que desde 1984, os municípios banhados pelos leitos do Rio Pardo, Mogi Guaçu Piracicaba e Tietê são os mais atingidos pela raiva.

Porém estes resultados devem ser examinados com cautela, devido a diferenças na escala de tamanho dos mapas. Assim, mapas elaborados em escala numérica pequena, dão a impressão de proximidade dos focos de raiva às bacias hidrográficas, sendo que o mesmo mapa elaborado em uma escala maior permite verificar que não existe tal cercania (GOMES et al., 2007). No caso dos mapas do presente trabalho a escala numérica correspondente foi 1:4'000.000 (1 cm = 40km), escalas 1:100.000 (1 cm = 1km) fornecem um nível de detalhamento superior, reduzindo vieses na interpretação dos resultados.

Em referência a distribuição das sub-linhagens virais segundo biomas, o mapa baseado no gene da nucleoproteína sugere que ocorre circulação entre os biomas de mata atlântica de cerrado, sem haver uma delimitação de estirpes virais

específicas a determinados biomas como descrito em alguns casos por Kobayashi et al., (2008)

Uma explicação para a dinâmica geográfica observada é a alta mobilidade do *D. rotundus*. Esta espécie frequentemente circula entre abrigos e cavernas abrangendo um espectro de mobilidade de 2 a 3 km de raio mostrando pouca fidelidade aos abrigos (TRAJANO, 1996), existindo registros de distâncias de voo máximas de 20 km (PEREIRA et al., 2013). Esta particularidade do comportamento da espécie facilita a disseminação de vírus entre populações itinerantes de quirópteros e concomitantemente entre outras espécies animais como os bovinos que compartilham as mesmas áreas ecológicas. Tanto em São Paulo quanto em Minas Gerais acontecem surtos de raiva com diferentes intensidades ao longo do tempo, sendo possível o deslocamento para regiões geográficas próximas, podendo acontecer sobreposição de novos focos envolvendo diversas sub-linhagens genéticas do vírus apenas (ou escassamente) diferenciáveis por algumas mutações pontuais que na maioria das ocasiões são sinônimas.

A frequência de apresentação de casos pode comportar-se de maneira insidiosa ou às vezes mais intensa ao longo do tempo. De fato, no ano 1999 o Programa Estadual de controle de raiva de São Paulo, declarou uma ampliação da área considerada epidêmica, sendo instituída a vacinação obrigatória nas áreas epidêmica e endêmica junto com ações para o controle populacional de *D. rotundus* (PERES, 2008).

Por trás da dinâmica geográfica dos surtos de raiva bovina existem vários fatores ligados à transformação do meio ambiente: destruição de florestas para o estabelecimento de pastagens e introdução de gado. Esta situação oferece condições favoráveis para a alimentação e adaptação dos morcegos hematófagos, estimulando o crescimento demográfico e migração de colônias (DELPIETRO; MARCHEVSKY; SIMONETTI, 1992; TADEI et al., 1991).

De fato modelos de regressão espacial mostraram que o deslocamento de epidemias de raiva em herbívoros no estado de São Paulo pode ser explicado pela interação dos seguintes fatores: 1. Relevo, 2. Características relacionadas ao efetivo

bovino no contexto do sistema agropecuário, 3. As características dinâmicas do mosaico da paisagem considerando usos e classes de cobertura da terra, 4. Hidrografia (GOMES, 2008).

Este trabalho tentou associar os dados moleculares ao seu contexto geográfico atendendo à opinião de outros pesquisadores como Real et al. (2005) quem expressou que a dinâmica de uma epizootia reflete-se nas linhagens e sub-linhagens virais circulantes na área. Caracterizando estas subpopulações podem se verificar vínculos espaciais e temporais entre elas. O que é válido não somente para o caso de raiva se não também para doenças infecciosas em geral (GRENFELL et al., 2004).

Os dados usados na elaboração deste trabalho não permitem fazer uma análise precisa da difusão espacial da raiva em virtude do escasso número de sequências disponíveis no GenBank, procedentes de outras áreas diferentes à epidêmica do estado de São Paulo, gerando um viés amostral. A mesma consideração aplica para os períodos de tempo, havendo pouca representação de amostras de focos anteriores à epizootia paulista acontecida entre 1997 – 2002

7 CONCLUSÕES

A análise filogenética baseada nos genes da glicoproteína e da nucleoproteína no presente trabalho sugerem que o vírus da raiva que circula em herbívoros e quirópteros no estado de São Paulo e na região sul/sudeste de Minas Gerais é altamente conservado e se diferencia dos isolados procedentes de outras regiões geográficas do Brasil.

A análise filogenética sugere que os casos da região sul/sudeste de Minas Gerais aqui estudados podem ter uma origem comum com os casos paulistas acontecidos após o ano 1999 durante a última epizootia paulista de raiva em bovinos.

Com base no conjunto de dados composto pela análise geográfica, análise filogenética e os dados disponíveis da situação da doença à campo sugere-se a ocorrência de diferentes eventos e/ou centros de dispersão de raiva em herbívoros na área de estudo.

A análise geográfica mostrou que a totalidade dos casos mineiros aqui estudados aconteceu em proximidades da Serra da Mantiqueira, nas regiões menos elevadas facilitando possivelmente a circulação de colônias de morcegos entre o nordeste de São Paulo e sul/sudeste de Minas Gerais, sendo a de Mata Atlântica o bioma predominante nesta região. Os municípios de origem dos casos aqui analisados encontram-se nas proximidades das bacias dos rios: Pardo e Piracicaba, Mogi Guaçu.

REFERÊNCIAS

- ALBAS, A.; ZOCCOLARO, P. T.; ZACARIAS, T. CUNHA M., E. Diagnóstico laboratorial da raiva na região oeste do Estado de São Paulo Laboratory diagnosis of rabies in the west region of São Paulo State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 6, p. 493-495, 2005.
- BADRANE, H.; BAHLOUL, C.; PERRIN, P. Evidence of two lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity 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 host switching in lyssavirus history from the chiroptera to the carnivora orders. **Journal of Virology**, v. 75, n. 17, p. 8096-8104, 2001.
- BALDI, P.; BRUNAK, S. **Bionformatics, the machine learning approach**. 2d. ed. Massachusetts: The MIT Press, 2001. p. 447.
- BENMANSOUR, A.; BRAHIMI, M.; TUFFEREAU, C.; COULON, P.; LAFAY, FLAMAND F. 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.
- BOURHY, H.; KISSI, B. T. Taxonomy and evolutionary studies on lyssaviruses with special reference to Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 4, p. 277-282, 1993.
- BOURHY, H.; REYNES, J.C.; DUNHAM, E. J.; DACHEUX, L.; LARROUS, F.; HUONG, V.T.Q.; XU, G.; YAN, J.; MIRANDA, M.E.G.; HOLMES, E.C. The origin and phylogeography of dog rabies virus. **The Journal of general virology**, v. 89, n. 11, p. 2673-81, 2008.
- BRASIL. **Manual de controle da raiva em herbívoros**. 2. ed. Brasília, DF: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2009. p. 122.
- BREDT, A. **Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle**. 2. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 1996. p. 117.
- BRINKMAN, F. S. L.; LEIPE, D. D. Phylogenetic Analysis. In: BAXEVANIS, A. D. O. B. F. F. 2. ed. **Bionformatics a practical guide to the analysis of genes and proteins**. 2. ed. Nova Iorque: Wiley Interscience, 2001. p. 323-357.
- CARNIELI, P.; CASTILHO, J. G.; FAHL, W. O.; VERÁS, N. M. C.; TIMENETSKY, M. 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. 215-24, 2009.

DEAN, D. J.; ABELSETH, M. K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. 4.ed. **Laboratory techniques in rabies**. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 85-95.

DELPIETRO, H. A.; MARCHEVSKY, N.; SIMONETTI, E. Relative population densities and predation of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*) in natural and cattle-raising areas in north-east Argentina. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 14, n. 1-2, p. 13-20, 1992.

GOLDWASSER, R. A.; KISSLING, R. E. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. **Proceedings of the society for experimental biology and medicine**, v. 98, p. 219-223, 1958.

GOMES, M. N. **Padrões espaciais da raiva bovina e seus determinantes no estado de São Paulo ao entre 1992 e 2003**. [s.l.]: Ministério de Ciência e Tecnologia do Brasil, 2008.

GOMES, N. M.; MONTEIRO, A. M. . Raiva bovina no estado de São Paulo e sua distribuição espacial entre 1992 e 2003. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 2, p. 279-286, 2011.

GOMES, M. N.; MONTEIRO, A. M. V.; NOGUEIRA FILHO, V. S.; GONÇALVES, C. A. Áreas propícias para o ataque de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* em bovinos na região de São João da Boa Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 7, p. 307-313, 2007.

GRENFELL, B. T.; PYBUS, O.G.; GOG, J.R.; WOOD J.L.N.; DALY, J. M.; MUMFORD, J.A.; HOLMES, E.C. **Science**, v. 303, n. 5656, p. 327-332, 2004.

HALL, T. 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.

HEINEMANN, M. B.; FERNANDES –MATIOLI, C.; CORTEZ, A.; SOARES, S.M.; SAKAMOTO, M.; BERNARDI, F.; ITO, F.H.; MADEIRA, N.; RICHTZENHAIN, L.J. Genealogical analyses of rabies virus strains from Brazil based on N gene alleles. **Epidemiology and Infection**, v. 128, n. 03, p. 503-511, 2002.

KISSI, B.; BADRANE, L.; AUDRY, L.; LAVENU, A.; TORDO, N.; BRAHIMI, N.; BOUHRY H. Dynamics of rabies virus quasispecies during serial passages in heterologous hosts. **The Journal of general virology**, v. 80, n. 8, p. 2041-50, 1999.

KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; SHOJI, Y.; SATO, T.; ITOU, T.; CUNHA, E.M.S.; SAMARA, S.I.; CARVALHO A.A.B.; NOCITI, D.P.; ITO, F.H.; SAKAI, T. Molecular

epidemiological analysis of bat rabies viruses in Brazil. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 67, n. 7, p. 647-652, 2005.

KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; MOCHIZUKI, N.; HIRANO, S.; ITOU, T.; CARVALHO, A.A.B.; ALBAS, A.; SANTOS, H.P.; ITO, F.H.; SAKAI, T. Molecular and geographic analyses of vampire bat-transmitted cattle rabies in central Brazil. **BMC veterinary research**, v. 4, p. 44. 2008.

KOBAYASHI, Y.; HIRANO, S.; MOCHIZUKI, N.; ITOU, T.; ITO, F.H.; SAKAI, T. High frequency transmissions of rabies viruses between frugivorous bats and vampire bats in Brazil. In: GenBank. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB496680>>. Acesso em: 05 fevereiro 2012.

KOBAYASHI, Y.; HIRANO, S.; MOCHIZUKI, N.; ITOU, T.; ITO, F.H.; SAKAI, T. High frequency transmissions of rabies viruses between frugivorous bats and vampire bats in Brazil. In: GenBank. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB496691>>. Acesso em: 05 fevereiro 2012.

KOBAYASHI, Y.; HIRANO, S.; MOCHIZUKI, N.; ITOU, T.; ITO, F.H.; SAKAI, T. High frequency transmissions of rabies viruses between frugivorous bats and vampire bats in Brazil. In: GenBank. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB496693>>. Acesso em: 05 fevereiro 2012.

KOPROWSKI, H. Routine Laboratory Procedures. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. 4. ed. **Laboratory techniques in rabies**. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 80-87.

KOTAIT, I.; GONCALVES, C. A.; PERES, N. F.; MACEDO SOUZA, C. A.; TARGUETA, M. Controle da raiva dos herbívoros. In: BARRADAS, M.M.; SILVA, S. J.; SILVA, M. G.; FONTELLES. **Manual técnico do Instituto Pasteur**. Sao Paulo: Instituto Pasteur de Sao Paulo, 1998. p. 11.

KOTAIT, I.; TAKAOKA, N. Y.; PANACHAO, M. R. I.; SODRÉ, M. M.; FIGUEREIDO, A. C. C.; SCHIMONSKY, B. V. **Manejo de quirópteros em áreas urbanas, Manual Técnico do Instituto Pasteur, No 7**. Sao Paulo: Instituto Pasteur de Sao Paulo, 1998. p. 45.

MACEDO, C. I.; CARNIELI, P.; FAHL, W. O.; YOSHIKATA, J.; NOVAES, R.; ACHKAR, S. M.; GALERA, J.; CARRIERI, M. L.; KOTAIT, I. Genetic characterization of rabies virus isolated from bovines and equines between 2007 and 2008, in the States of São Paulo and Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 116-120, 2010.

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, n. 6, p. 3152-6, 1998.

NADIN-DAVIS, S. Molecular epidemiology. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, H. 2. ed **Rabies virus**. Ontario, Canadá: ELSEVIER, 2007. p. 69-122.

PEREIRA, L. F.; FERREIRA, S. R.; CARNIELI, P.; BARBOSA, L. C.; KOTAIT, I. Phylogeography of rabies virus isolated from herbivores and bats in the Espírito Santo State, Brazil. **Virus genes**, v. 46, n. 2, p. 330-6, 2013.

PERES, N. F. **Profilaxia e controle da raiva dos herbívoros domésticos no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil, no período 1997 - 2007**. [s.l.] Sao Paulo, 2008.

PREHAUD, C.; COULON, P.; LAFAY, F.; THIERS, C.; FLAMAND, A. *Descrver os demais autores glycoprotein : structure and role in viral Antigenic Site II of the Rabies Virus Glycoprotein : Structure and Role in Viral Virulence*. **Journal of Virology**, v. 62, n. 1, p. 1- 7 , 1988.

REAL, L. A.; HENDERSON, C.; BIEK, R.; SNAMAN, J.; LAMBERT-JACK, T.; CHILDS, J.E.; STAHL, E.; WALLER, L.; TINLINE, R.; NADIN-DAVIS, S. Unifying the spatial population dynamics and molecular evolution of epidemic rabies virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 34, p. 12107-11, 2005.

RUPPRECHT, C. E.; HANLON, C. A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 6, p. 327-43, 2002.

RUPPRECHT, C. E.; TURMELLE, A.; KUZMIN, I. V. A perspective on lyssavirus emergence and perpetuation. **Current opinion in virology**, v. 1, n. 6, p. 662-70, 2011.

SATO, G.; ITOU, T.; SHOJI, Y.; MIURA, Y.; MIKAMI, T.; ITO, M.; KURANE, I.; SAMARA, S.I.; CARVALHO, A. A. B.; NOCITI, D. P.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Genetic and phylogenetic analysis of glycoprotein of rabies virus isolated from several species in Brazil. **The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 66, n. 7, p. 747-53, 2004.

SATO, G. Determination of phylogenetic and genetic feature of the glycoprotein gene of the human rabies virus strains in Brazil. In: GenBank. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB276307>>. Acesso em: 05 fevereiro 2012.

SATO, G. Determination of phylogenetic and genetic feature of the glycoprotein gene of the human rabies virus strains in Brazil. In: GenBank. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB276308>>. Acesso em: 05 fevereiro 2012

SATO, G. Determination of phylogenetic and genetic feature of the glycoprotein gene of the human rabies virus strains in Brazil. In: GenBank. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB276308>>. Acesso em: 05 fevereiro 2012

SATO, G. Determination of phylogenetic and genetic feature of the glycoprotein gene of the human rabies virus strains in Brazil. In: GenBank. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB276310>>. Acesso em: 05 fevereiro 2012.

SATO, G. Determination of phylogenetic and genetic feature of the glycoprotein gene of the human rabies virus strains in Brazil. In: GenBank. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB276311>>. Acesso em: 05 fevereiro 2012.

SATO, G.; KOBAYASHI, Y.; SHOJI, Y.; SATO, T.; ITOU, T.; ITO, F.H.; SANTOS, H.P.; BRITO, C.J.C.; SAKAI, T. Molecular epidemiology of rabies from Maranhão and surrounding states in the northeastern region of Brazil. **Archives of virology**, v. 151, n. 11, p. 2243-2251, 2006.

SILVA, J. A.; MOREIRA, E. C.; HADDAD, J. P. A.; MODENA, C. M.; TUBALDINI, M. A. Distribuição temporal e espacial da raiva bovina em Minas Gerais, 1976 a 1997. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 3, p. , 2001.

STRYER, L. Protein structure and function. In: STANFORD UNIVERSITY. 4. Ed. **Biochemistry**. Nova Iorque: W.H Freeman and Company, 1996. p. 17 - 28.

TADEI, V.; GONÇALVES, C. A.; PEDRO, W. A.; TADEI, W. J.; KOTAIT, I.; ARIETA, C. **Distribuição do morcego vampiro , Desmodus rotundus (Chiroptera , Phyllostomidae) no estado de São Paulo e a raiva dos animais domésticos**. Campinas, São Paulo: Governo do Estado de São Paulo, 1991. p. 1-107

TAKAYAMA-ITO, M.; ITO, N.; YAMADA, K.; SUGIYAMA, M.; NOBOYUKI, M. Multiple amino acids in the glycoprotein of rabies virus are responsible for pathogenicity in adult mice. **Virus research**, v. 115, n. 2, p. 169-75, 2006.

THOMPSON, J.D; HIGGINS, D. G; GIBSON, T. . CLUSTAL, W. improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 22, p. 4673-46780, 1994.

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 of the United States of America**, v. 83, n. 11, p. 3914-3918, jun. 1986.

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

TRAJANO, E. Movements of Cave Bats in Southeastern Brazil , with Emphasis on the Population Ecology of Movements of Cave Bats in Southeastern with Emphasis on the Population Ecology of the Common Vampire *Desmodus rotundus* (Chiroptera) v. 28, n. 1, p. 121-129, 1996.

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.

WUNNER, W. H. **Rabies virus**. 2. ed. Ontario, Canadá: ELSEVIER, 2007. p. 23-69.

APÊNDICE A

Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene da nucleoproteína posições 296 a 712

	★ 300	★ 310	320	330	340	350
FJ649137_00BRAGANCAPTA4545B	G C A A T	G C A G T T C T T T	G A G G G A T C A T	G T C C T G A G G A	C T G G A C T A G C	T A T G G A A T C C T G A T
FJ649143_00PINHALZINHOS151B
FJ649073_98BRAGANCAPTA5114B
AF357290_Taubate_sp_98	G	A
M1172_02DomVicoso
FJ649087_99PIRACAI3602B
FJ649102_99VARGEM5369B
M154_01Extrema
AF357292_StoAntoniopinha_98
FJ649104_99BRAGANCAPTA5708B
FJ649116_00VARGEM788B
FJ649120_00NAZAREPTA1292B
M798_01_CarmodeMinas
M325_03Soledade
FJ649186_01TATIBA4693E
FJ649106_00BRAGANCAPTA150B
M292_02Soledade
M194_00Extrema
M533_01_carmominas
FJ649109_00BRAGANCAPTA196B
M315_00Andradas
FJ649065_98SOCORRO2119B
FJ649171_01ATIBAIA7590B
AB201803_BRDR1
FJ649144_00PEDRABELA5285B
AB201804_BRDR2
M365_04CarmoMinas
M269_02CarmoMinas
M91_00PocosCaldas
M147_09Caldas
GQ160941_08PiracaiaSP8163B
GQ160920_08AndradasMG3355B
M753_03StaRitaSapucaí
GQ160928_08ExtremaMG367B
M621_03DomVicoso
M210_09Caldas
FJ649161_01SSEBASTIAODAGRAMA91
M261_04_Andradas
GQ160952_08SerraNegraSP2161B
M123_01Andradas
M445_00Andradas
457_01_CarmodeMinas
M66_08MonteSiao
M196_04_BelmiroBraga
M716_02_StaritaSapucaí
GQ160917_07PocosdeCaldasMG1995
GQ160951_08SaoSebastiaodaGrama
GQ160946_08SaoSebastiaodaGrama
GQ160949_08SaoSebastiaodaGrama
GQ160922_08BragancaPaulistaSP1
FJ649157_01TAPIRA40B
FJ649165_01MONTESIAO1433B
M605_03_Arceburgo
FJ649159_01CACONDE159B
FJ649166_01JARINU1500B
FJ649100_99VARGEM4750B
FJ649156_00CACONDE7018B
FJ649172_01MOCOCA7792B
FJ649047_97SALESOPOLIS719B	G	A
FJ649055_97SALESOPOLIS3044B	G	A
GQ160921_08BeloHorizonteMG162B
GQ160956_08TresCoracoesMG1049B
AB083803_BRbv30
GQ160938_08MariliaSP1700B
AB083804_BRhr31
AB083813_BRbv43	G
AB083814_BRbv45	G

Sublinhagem Ia

Ic Ib

Ia	FJ649120_00NAZAREPTA1292B								
	M798_01_CarmodeMinas								
	M325_03Soledade								
	FJ649186_01ITATIBA4693E								
	FJ649106_00BRAGANCAPTA150B								
	M292_02Soledade								
	M194_00Extrema								
	M533_01_carmominas								
	FJ649109_00BRAGANCAPTA196B								
	M315_00Andradas								
	FJ649065_98SOCORRO2119B								
	FJ649171_01ATIBAIA7590B								
	AB201803_BRDR1								
	FJ649144_00PEDRABELA5285B								
	AB201804_BRDR2								
	M365_04CarmoMinas								
	M269_02CarmoMinas								
	M91_00PocosCaldas								
	M147_09Caldas								
	GQ160941_08PiracaiaSP8163B								
	GQ160920_08AndradasMG3355B								
	M753_03StaRitaSapucaí								
	GQ160928_08ExtremaMG367B								
	M621_03DomVicoso								
	M210_09Caldas								
	FJ649161_01SSEBASTIAODAGRAMA91								
	M261_04_Andradas								
	GQ160952_08SerraNegraSP2161B								
	M123_01Andradas								
	M445_00Andradas								
	457_01_CarmodeMinas								
	M66_08MonteSiao								
	M196_04_BelmiroBraga								
	M716_02_StaritaSapucaí								
	GQ160917_07PocosdeCaldasMG1995								
	GQ160951_08SaoSebastiaodaGrama								
	GQ160946_08SaoSebastiaodaGrama								
	GQ160949_08SaoSebastiaodaGrama								
	GQ160922_08BragancaPaulistaSP1								
	FJ649157_01ITAPIRA40B					A			
	FJ649165_01MONTESIAO1433B					A			
	M605_03_Arceburgo					A			
	FJ649159_01CACONDE159B					A			
	FJ649166_01JARINU1500B					A			
	FJ649100_99VARGEM4750B					A			
FJ649156_00CACONDE7018B					A				
FJ649172_01MOCOCA7792B					A				
FJ649047_97SALESOPOLIS719B					A				
FJ649055_97SALESOPOLIS3044B				C	A				
GQ160921_08BeloHorizonteMG162B					A				
GQ160956_08TresCoracoesMG1049B									
AB083803_BRbv30								C	
GQ160938_08MariliaSP1700B								C	
AB083804_BRhr31								C	
AB083813_BRbv43								C	
AB083814_BRbv45								C	
FJ649079_99SOCORRO1989B								C	
FJ649059_98CACONDE272B								C	
AB117969_BRAL1								G	
AB201810_BREA2								G	
AB201817_BRMR1								G	
FJ649075_98CAJURU5331B								G	
AB083818_BRbv50								G	
FJ649043_97MORUNGABA214B								G	
FJ649044_97MORUNGABA248B								G	
FJ649074_98PONTAL5300B								G	
AB083812_BRvmbt41								G	
FJ649046_97JABOTICABAL633B								G	
AB117970_BRAL2								G	

Ic	AB117972_BRAP1	.	.	.	C		
	AF357287_SJoaquimdaBarra_sp_91	.	.	.	C	.	C		
	AF357289_SRoque_sp_94	.	.	.	C	.	C	.	.	.	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T		
	AB083805_BRbv32	.	.	.	C	
	GQ160943_08SalesopolisSP10166B	.	.	.	C	
	AF357301_Piraju_sp_89	.	.	.	C	
	AF357302_Pindamonhangaba_sp_89	.	.	.	C	
	AB083817_BRbv49	.	.	.	C	
	AF357298_PariqueraAcu_sp_99	.	.	.	C	A	
	AB201819_BRBAT1	.	.	.	C	
	AF357296_sp_86	.	.	.	C	
	AB083815_BRvmbt46	.	.	.	C	
	AB201805_BRDR3	.	.	.	C	
	AF357300_BernardinodeCampos_sp	.	.	.	C	
	AB083816_BRvmbt47	.	.	.	C	
	If	AF357310_Guaratingueta_sp_94	.	.	.	C
		AF357316_Cajati_sp_86	.	.	.	C	.	A
AF357288_Apiiai_sp_91		.	.	.	C	A	
AB083808_BRsp35		.	.	.	C	
FJ649066_98SOCORRO2478B		.	.	.	C	
FJ649072_98SBOAVISTA4992B		.	.	.	C	
AB297633_BRDR6		.	.	.	C	
AB297634_BRDR7		.	.	.	C	
FJ649174_97CACAPAVA870E		.	.	.	C	A	
AF357291_Jacarei_sp_98		.	.	.	C	
AF357314_Taubate_sp_94		.	.	.	C	
Ig	FJ649048_97SALESOPOLIS988B	.	.	.	C	
	FJ649045_97SALESOPOLIS426B	.	.	.	C	
	AB083807_BRvmbt34	.	.	.	C	
	FJ649052_97STABRANCA2166B	.	.	.	C	
	AF357293_Taubate_sp_98	.	.	.	C	
	FJ649057_97SUZANO4030B	.	.	.	C	
	FJ649053_97MOGIDASCRUZES2439B	.	.	.	C	
	FJ649056_97GUARAREMA3919B	.	.	.	C	
	FJ649086_99ARUJA2690B	.	.	.	C	
	FJ649173_97BIRITIBAMIRIM455E	.	.	.	C	
	AF357309_Taubate_sp_92	.	.	.	C	
	Ih	AB083810_BRbv38	A	T	.	
		AB083811_BRbv39	A	T	.	
AB201820_BRBAT2		
GQ160940_08PedregulhoSP180B		
li	M132151_nucleo_nt	A	A	.	A	.	A	.	.	.	A	G	.	.	.	G	.	.	A	.		

Ia	FJ649137_00BRAGANCAPTA4545B	GAAGG	GAATTGGGGCT	CTAG	CAGGGG	GCATGGAGTT	GACAAGGGAC	CCTACTGTTT	CAGA
	FJ649143_00PINHALZINHO5151B	.	.	A	A
	FJ649073_98BRAGANCAPTA5114B	.	.	A	A
	AF357290_Taubate_sp_98	.	.	A	A
	M1172_02DomVicoso	.	.	A	A
	FJ649087_99PIRACAI3602B	.	.	A	A
	FJ649102_99VARGEM5369B	.	.	A	A
	M154_01Extrema	.	.	A	A
	AF357292_StoAntoniopinhaI_98	.	.	A	A	.	T	.	.
	FJ649104_99BRAGANCAPTA5708B	.	.	A	A
	FJ649116_00VARGEM788B	.	.	A	A
	FJ649120_00NAZAREPTA1292B	.	.	A	A
	M798_01_CarmodeMinas	.	.	A	A
	M325_03Soledade	.	.	A	A
	FJ649186_01ITATIBA4693E	.	.	A	A
	FJ649106_00BRAGANCAPTA150B	.	.	A	A
	M292_02Soledade	.	.	A	A
M194_00Extrema	.	.	A	A	
M533_01_carmominas	.	.	A	A	
FJ649109_00BRAGANCAPTA196B	.	.	A	A	
M315_00Andradas	.	A	C	
FJ649065_98SOCORRO2119B	.	.	A	A	.	.	.	C	
FJ649171_01ATIBAIA7590B	.	.	A	A	.	.	.	C	
AB201803_BRDR1	.	.	A	A	.	.	.	C	

FJ649144_00PEDRABELA5285B				A						C
AB201804_BRDR2				A						C
M365_04CarmoMinas				A						
M269_02CarmoMinas				A						
M91_00PocosCaldas				A						
M147_09Caldas				A						
GQ160941_08PiracaiaSP8163B				A						
GQ160920_08AndradasMG3355B				A						
M753_03StaRitaSapucaí				A						
GQ160928_08ExtremaMG367B				A						
M621_03DomVicoso				A						
M210_09Caldas				A						
FJ649161_01SSEBASTIAODAGRAMA91				A						
M261_04_Andradas				A						
GQ160952_08SerraNegraSP2161B	G			A						
M123_01Andradas		C		A						
M445_00Andradas				A						
457_01_CarmodeMinas				A						
M66_08MonteSiao				A						
M196_04_BelmiroBraga				A		G	A			
M716_02_StaritaSapucaí				A						
GQ160917_07PocosdeCaldasMG1995				GA						
GQ160951_08SaoSebastiao da Grama				GA						
GQ160946_08SaoSebastiao da Grama				GA						
GQ160949_08SaoSebastiao da Grama				GA						
GQ160922_08Braganca Paulista SP1				GA						
FJ649157_01TAPIRA40B				GA						
FJ649165_01MONTESIAO1433B				GA						
M605_03_Arceburgo				GA						
FJ649159_01CACONDE159B				GA						
FJ649166_01JARINU1500B				GA						
FJ649100_99VARGEM4750B				GA						
FJ649156_00CACONDE7018B				GA						
FJ649172_01MOCOCA7792B				GA						
FJ649047_97SALESOPOLIS719B				A						
FJ649055_97SALESOPOLIS3044B				A						
GQ160921_08BeloHorizonteMG162B				A						
GQ160956_08TresCoracoesMG1049B				A						
AB083803_BRbv30				A						
GQ160938_08MariliaSP1700B				A						
AB083804_BRhr31				A						
AB083813_BRbv43			G	A						
AB083814_BRbv45			G	A						
FJ649079_99SOCORRO1989B				A						
FJ649059_98CACONDE272B			C	A						
AB117969_BRAL1				A			A			
AB201810_BREA2				A						
AB201817_BRMR1				A						
FJ649075_98CAJURU5331B				A			A			G
AB083818_BRbv50				A			A			G
FJ649043_97MORUNGABA214B				A						
FJ649044_97MORUNGABA248B				A						
FJ649074_98PONTAL5300B				A						
AB083812_BRvmbt41				GA						
FJ649046_97JABOTICABAL633B				A					C	
AB117970_BRAL2				A						
AB117972_BRAP1				A						
AF357287_SJoaquimdaBarra_sp_91				A						
AF357289_SRoque_sp_94				A						
AB083805_BRbv32				A						
GQ160943_08SalesopolisSP10166B				GA						
AF357301_Piraju_sp_89				A						
AF357302_Pindamonhangaba_sp_89				A						
AB083817_BRbv49				A						
AF357298_PariqueraAcu_sp_99				A						
AB201819_BRBAT1				A						
AF357296_sp_86				GA						
AB083815_BRvmbt46				GA						
AB201805_BRDR3				GA						

1a

1b

1c

1d

1e

lc lb	GQ160938_08MarilynSP1700B T G T			
	AB083804_BRhr31 G T			
	AB083813_BRbv43 G			
	AB083814_BRbv45 A			
	FJ649079_99SOCORRO1989B G			
	FJ649059_98CACONDE272B G			
	AB117969_BRAL1 G			
	AB201810_BREA2 G			
	AB201817_BRMR1 G			
ld	FJ649075_98CAJURU5331B A			
	AB083818_BRbv50 G			
	FJ649043_97MORUNGABA214B G			
	FJ649044_97MORUNGABA248B G			
	FJ649074_98PONTAL5300B A			
	AB083812_BRvmbt41 G			
	FJ649046_97JABOTICABAL633B G			
	AB117970_BRAL2 G			
	AB117972_BRAP1 G			
	AF357287_SJoaquimdaBarra_sp_91 G			
	AF357289_SRoque_sp_94 G C			
	AB083805_BRbv32 G C			
	GQ160943_08SalesopolisSP10166B G			
	AF357301_Piraju_sp_89 G			
	AF357302_Pindamonhangaba_sp_89 G			
le	AB083817_BRbv49 G			
	AF357298_PariqueraAcu_sp_99 G			
	AB201819_BRBAT1 A			
	AF357296_sp_86 G A T C G C			
	AB083815_BRvmbt46 G			
	AB201805_BRDR3 G C			
	AF357300_BernardinodeCampos_sp G			
	AB083816_BRvmbt47 G			
lf	AF357310_Guaratingueta_sp_94 G A			
	AF357316_Cajati_sp_86 G A			
	AF357288_Apiai_sp_91 G G			
	AB083808_BRsp35 G			
lg	FJ649066_98SOCORRO2478B G			
	FJ649072_98SJBOAVISTA4992B G			
	AB297633_BRDR6 T G			
	AB297634_BRDR7 T G			
	FJ649174_97CACAPAVA870E T G			
	AF357291_Jacarei_sp_98 T G			
	AF357314_Taubate_sp_94 T G			
	FJ649048_97SALESOPOLIS988B T G			
	FJ649045_97SALESOPOLIS426B T G			
	AB083807_BRvmbt34 T G			
	FJ649052_97STABRANCA2166B T G			
	AF357293_Taubate_sp_98 T G			
	FJ649057_97SUZANO4030B T G			
	FJ649053_97MOGIDASCRUZES2439B T G			
	FJ649056_97GUARAREMA3919B T G			
	FJ649086_99ARUJA2690B T G			
	FJ649173_97BIRITIBAMIRIM455E T G			
	AF357309_Taubate_sp_92 T G			
lh	AB083810_BRbv38 C A			
	AB083811_BRbv39 C A			
li	AB201820_BRBAT2 T G T			
	GQ160940_08PedregulhoSP180B G			
	M132151_nucleo_nt T T T A			
	 G C			
	 C A			
	 A T			
la	FJ649137_00BRAGANCAPTA4545B	TGGAG	TACCATACCA	AATTTTCAGAT	TCTTGGCTGG	AACTTATGAC	ATGTTTTTC
	FJ649143_00PINHALZINHO5151B
	FJ649073_98BRAGANCAPTA5114B
	AF357290_Taubate_sp_98
	M1172_02DomVicoso
	FJ649087_99PIRACAI3602B
	FJ649102_99VARGEM5369B

la	M154_01Extrema								
	AF357292_StoAntoniopinhais_98								
	FJ649104_99BRAGANCAPTA5708B								
	FJ649116_00VARGEM788B								
	FJ649120_00NAZAREPTA1292B								
	M798_01_CarmodeMinas								
	M325_03Soledade								
	FJ649186_01TATIBA4693E								
	FJ649106_00BRAGANCAPTA150B								
	M292_02Soledade								
	M194_00Extrema								
	M533_01_carmominas								
	FJ649109_00BRAGANCAPTA196B								
	M315_00Andradas								
	FJ649065_98SOCORRO2119B								
	FJ649171_01ATIBAIA7590B								
	AB201803_BRDR1								
	FJ649144_00PEDRABELA5285B								
	AB201804_BRDR2								
	M365_04CarmoMinas								
	M269_02CarmoMinas								
	M91_00PocosCaldas								
	M147_09Caldas								
	GQ160941_08PiracaiaSP8163B								
	GQ160920_08AndradasMG3355B								
	M753_03StaRitaSapucaí								
	GQ160928_08ExtremaMG367B								
	M621_03DomVicoso								
	M210_09Caldas								
	FJ649161_01SSEBASTIAODAGRAMA91								
	M261_04_Andradas								
	GQ160952_08SerraNegraSP2161B								
	M123_01Andradas								
	M445_00Andradas								
	457_01_CarmodeMinas								
	M66_08MonteSiao								
	M196_04_BelmiroBraga								
	M716_02_StaritaSapucaí								
	GQ160917_07PocosdeCaldasMG1995								
	GQ160951_08SaoSebastiaodaGrama								
	GQ160946_08SaoSebastiaodaGrama								
	GQ160949_08SaoSebastiaodaGrama								
	GQ160922_08BragancaPaulistaSP1								
	FJ649157_01TAPIRA40B								
	FJ649165_01MONTESIAO1433B								
	M605_03_Arceburgo								
	FJ649159_01CACONDE159B								
	FJ649166_01JARINU1500B								
	FJ649100_99VARGEM4750B								
	FJ649156_00CACONDE7018B								
	FJ649172_01MOCOCA7792B								
	FJ649047_97SALESOPOLIS719B								
	FJ649055_97SALESOPOLIS3044B								
	GQ160921_08BeloHorizonteMG162B								
GQ160956_08TresCorcoesMG1049B									
AB083803_BRbv30									
GQ160938_08MariliaSP1700B									
AB083804_BRhr31									
AB083813_BRbv43									
AB083814_BRbv45									
FJ649079_99SOCORRO1989B									
FJ649059_98CACONDE272B									
AB117969_BRAL1									
AB201810_BREA2									
AB201817_BRMR1									
FJ649075_98CAJURU5331B									
AB083818_BRbv50									
FJ649043_97MORUNGABA214B									
FJ649044_97MORUNGABA248B									

la

lb

lc

ld

Alinhamento das sequências parciais do gene da glicoproteína posições 3374 – 3914

	3380	3390	3400	3410	3420	
M273_00_Andradas	T T C C C C A	T C T A C A C A A T	A C C A G A C A A G	C T T G G T C C T T	G G A G C C C C A T	C G A T A T A
M365_04_Carmo de Minas	.	.	.	C	.	.
M395_01_Carmo de Minas
M490_01_Carmo de Minas
M533_01_Carmo de Minas
M716_02_Sta Rita do Sapucaí
1_M91_00_PocosdeCaldas
7_M194_00_Extrema
5_M315_00_Andradas
4_M401_00_Andradas
21_M144_02_Carmo	.	G
23_M269_02_Soledade
22_M292_00_Soledade
30_M525_04_Cordislandia
35_M147_09_NovaCaldas
36_M66_08_MonteSiao
15_M154_01_Extrema
27_M621_03_DomVicoso
28_M325_03_Soledade
34_M210_09_Caldas
19_M1172_02_DomVicoso
25_M2864_02_SaoLourenco
17_M123_01_Andradas
16_M909_01_Carmo de Minas
06_M445_00_Andradas
13_M457_01_Carmo de Minas
12_M798_01_Carmo de Minas
29_M753_03_Sta Rita Sapucaí
M71_00_Extrema
M196_04_Belmiro	.	.	.	C	.	.
M261_04_Andradas
M605_03_Arceburgo
FJ649023_00SOCORRO4553B
AB247422_BRDR2_Lindoia_SP_2000
FJ649040_00MONTESIAO210E
FJ649012_00MONTESIAO756B
FJ649017_00BUENOBRANDAO1471B
AB247421_BRDR1_Lindoia_SP_2000
FJ649031_01ITAPIRA40B
FJ649025_00PEDRABELA5285B
FJ649036_01ESPSTOPINHAL7518B
FJ649034_01AMPARO1064B
FJ649008_00ATIBAIA81B
FJ649021_00NAZAREPTA3299B
FJ649042_01ITATIBA4693E
FJ649024_00VARGEM4631B
FJ649004_99JOANOPOLIS3960B
FJ649030_00CACONDE7018B
FJ649009_00BRAGANCAPTA153B	.	.	.	C	C	.
FJ649020_00PINHALZINHO3141B
FJ649019_00BRAGANCAPTA2685B
FJ649018_00BJPERDOES1947B
FJ648998_99PIRACIA1929B	.	.	.	C	.	.
FJ649033_01MORUNGABA272B
AB247428_BRDR8_SP_2003
FJ649037_01MOCOCA7792B
FJ649029_00CACONDE7016B
FJ649032_01CAMPINAS142B
AB247400_BRbv654_PocosdeCaldas
AB496693_BRAL19_Emilianopolis
AB496691_BRAL17_Dracena_SP_200
AB496680_BRAL4_Dracena_SP_2002
AB247391_BRbv324_Itapecuru_MA	.	G
AB496682_BRAL8_Dracena_SP2004	.	T
AB110668_BRbv49_PIRAJU_SP_89	.	T	.	T	.	.
FJ648999_99SOCORRO1989B	.	T	.	T	.	.
AB247429_BR-DR9_Guarulhos_SP_2	.	T	.	T	.	.

25_M2864_02_SaoLourenco							
17_M123_01_Andradas							
16_M909_01_Carmo de Minas							
06_M445_00_Andradas							
13_M457_01_Carmo de Minas							
12_M798_01_Carmo de Minas							
29_M753_03_Sta Rita Sapucaí							
M71_00_Extrema_							
M196_04_Belmiro		C					
M261_04_Andradas				T			
M605_03_Arceburgo							
FJ649023_00SOCORRO4553B						A	
AB247422_BRDR2_Lindoia_SP_2000						A	
FJ649040_00MONTESIAO210E						A	
FJ649012_00MONTESIAO756B						A	
FJ649017_00BUENOBRANDAO1471B						A	
AB247421_BRDR1_Lindoia_SP_2000						A	
FJ649031_01ITAPIRA40B						A	
FJ649025_00PEDRABELA5285B						A	
FJ649036_01ESPSTOPINHAL7518B						A	
FJ649034_01AMPARO1064B							
FJ649008_00ATIBAIA81B							
FJ649021_00NAZAREPTA3299B							
FJ649042_01ITATIBA4693E							
FJ649024_00VARGEM4631B			C				
FJ649004_99JOANOPOLIS3960B							
FJ649030_00CACONDE7018B							A
FJ649009_00BRAGANCAPTA153B							
FJ649020_00PINHALZINHO3141B							
FJ649019_00BRAGANCAPTA2685B							A
FJ649018_00BPERDOES1947B							A
FJ648998_99PIRACAI1929B			C				A
FJ649033_01MORUNGABA272B							A
AB247428_BRDR8_SP_2003							
FJ649037_01MOCOCA7792B							
FJ649029_00CACONDE7016B							
FJ649032_01CAMPINAS142B							
AB247400_BRbv654_PocosdeCaldas							
AB496693_BRAL19_Emilianopolis							
AB496691_BRAL17_Dracena_SP_200							
AB496680_BRAL4_Dracena_SP_2002							
AB247391_BRbv324_Itapecuru_MA			A			G	
AB496682_BRAL8_Dracena_SP2004						G	T
AB110668_BRbv49_PIRAJU_SP_89						G	
FJ648999_99SOCORRO1989B						G	
AB247429_BR-DR9_Guarulhos_SP_2						G	
AB247443_BRvmbt47						G	
AB247423_BRDR3_SJoseBarreiro_S						G	
AB496692_BRAL18_AlvaresMachado						G	
AB110663_BRbv32_SaoRoque_SP_19						G	
AB496686_BRAL12_OsvaldoCruz_SP						G	
FJ648987_98TAQUARITINGA1192B						G	
FJ648988_98ARACATUBA1411B						G	
FJ648980_97MORUNGABA248B						G	
AB496683_BRAL9_PresidentePrude						G	
AB110665_BRsp35_Apiai_SP_1992						G	T
FJ648990_98SOCORRO2478B						G	T
FJ648995_98SJOAVISTA4992B						G	T
FJ648989_98SOCORRO2119B						G	T
AB247426_BRDR6_LajeMuriae_RJ_1				T		G	T
AB247427_BRDR7_Itaperuna_RJ_19				T		G	T
AB496681_BRAL7_VargGrandePta_S				T		G	T
FJ648984_98SUZANO144B				T		G	T
AB110664_BRvmbt33_Taubate_SP_1				T		G	T
FJ649002_99ARUJA2690B				T		G	T
FJ648985_98MOGIDASCRUZES366B				T		G	T
FJ648993_98SALESOPOLIS4375B				T		G	T
FJ648981_97SALESOPOLIS719B				T		G	T
AB110666_BRbv39_Colinas_TO_199						G	A

FJ649042_01TATIBA4693E
FJ649024_00VARGEM4631B
FJ649004_99JOANOPOLIS3960B
FJ649030_00CACONDE7018B
FJ649009_00BRAGANCAPTA153B
FJ649020_00PINHALZINH03141B
FJ649019_00BRAGANCAPTA2685B
FJ649018_00BJPERDOES1947B
FJ648998_99PIRACAI1929B
FJ649033_01MORUNGABA272B
AB247428_BRDR8_SP_2003
FJ649037_01MOCOCA7792B
FJ649029_00CACONDE7016B
FJ649032_01CAMPINAS142B
AB247400_BRbv654_PocosdeCaldas
AB496693_BRAL19_Emilianopolis
AB496691_BRAL17_Dracena_SP_200
AB496680_BRAL4_Dracena_SP_2002
AB247391_BRbv324_Itapecuru_MA	A	.
AB496682_BRAL8_Dracena_SP2004
AB110668_BRbv49_PIRAJU_SP_89
FJ648999_99SOCORRO1989B
AB247429_BR-DR9_Guarulhos_SP_2
AB247443_BRvmbt47
AB247423_BRDR3_SJoseBarreiro_S
AB496692_BRAL18_AlvaresMachado
AB110663_BRbv32_SaoRoque_SP_19
AB496686_BRAL12_OsvaldoCruz_SP
FJ648987_98TAQUARITINGA1192B
FJ648988_98ARACATUBA1411B
FJ648980_97MORUNGABA248B
AB496683_BRAL9_PresidentePrude
AB110665_BRsp35_Apaii_SP_1992	G	.
FJ648990_98SOCORRO2478B	.	.	C
FJ648995_98SJOBAVISTA4992B	.	.	C	.	.	.	T
FJ648989_98SOCORRO2119B	.	.	C
AB247426_BRDR6_LajeMuriae_RJ_1	.	C
AB247427_BRDR7_Itaperuna_RJ_19	.	C
AB496681_BRAL7_VargGrandePta_S	.	C
FJ648984_98SUZANO144B
AB110664_BRvmbt33_Taubate_SP_1
FJ649002_99ARUJA2690B
FJ648985_98MOGIDASCruzES366B
FJ648993_98SALESOPOLIS4375B
FJ648981_97SALESOPOLIS719B
AB110666_BRbv39_Colinas_TO_199	A	.
AB247407_BRbv76_Araguaia_TO_20
AB247393_BRbv38_TO_1999
AB247382_BRbv136_Araguaina_TO
AB247390_BRbv323_PresidenteDut	A	T
AB247386_BRbv252_Patos_PB_2003	T
AB247387_BRbv259_Patos_PB_2003	T
AB247442_BRvmbt41
M13215_VirusPasteur	C	.	T	.	A	.	T	.	A	.	AA	.
AB247397_2004_PresidenteDutra	C	.	G	.	T	.	A	.	A	.	A	A
AB276311_BRhm528	C	.	.	T	.	A	.	.	A	.	A	.
AB247415_BRdg325_Stalnes_MA_20	C	.	.	T	.	A	.	T	.	.	A	A
AB247412_BRdg317_1985_RJ	C	.	.	T	.	A	.	.	T	.	C	.
AB110659_BRdg12	C	.	.	T	.	A	A	.
AB276308_BRdg101	C	.	.	T	.	A	A	.
AB276307_BRhm16	C	.	.	T	.	A	A	.
AB247410_BRdg15_Anapolis_GO	C	.	.	T	.	A	A	.
AB276309_BRct112	C	.	.	T	.	A	A	.
AB110661_BRpg28_NovaAurora	C	.	.	T	.	A	A	.
AB110657_BRhm6_1999_GO	C	.	.	T	.	A	A	.
AB276310_BRct116	C	.	.	T	.	A	A	.
AB110660_BRhr18_BelaVista_GO_1	C	.	.	T	.	A	A	.
EU293119_Duvenhage	A	.	G	T	.	A	.	T	.	T	A	A

	3560	3570	3580	3590	3600
M273_00_Andradas	A C C G G T G	T T G T G A C A G A	G G C T G A A A C C	T A T A C C A A C T	T T G T T G G T T A T G T C A C C
M365_04_Carmo de Minas
M395_01_Carmo de Minas
M490_01_Carmo de Minas
M533_01_Carmo de Minas
M716_02_Sta Rita do Sapucaí
1_M91_00_PocosdeCaldas
7_M194_00_Extrema
5_M315_00_Andradas
4_M401_00_Andradas
21_M144_02_Carmo
23_M269_02_Soledade
22_M292_00_Soledade
30_M525_04_Cordislandia
35_M147_09_NovaCaldas
36_M66_08_MonteSiao
15_M154_01_Extrema
27_M621_03_DomVicoso
28_M325_03_Soledade
34_M210_09_Caldas
19_M1172_02_DomVicoso
25_M2864_02_SaoLourenco
17_M123_01_Andradas
16_M909_01_Carmo de Minas
06_M445_00_Andradas
13_M457_01_Carmo de Minas
12_M798_01_Carmo de Minas
29_M753_03_Sta Rita Sapucaí
M71_00_Extrema
M196_04_Belmiro
M261_04_Andradas
M605_03_Arceburgo
FJ649023_00SOCORRO4553B
AB247422_BRDR2_Lindoia_SP_2000
FJ649040_00MONTESIAO210E
FJ649012_00MONTESIAO756B
FJ649017_00BUENOBRANDAO1471B
AB247421_BRDR1_Lindoia_SP_2000
FJ649031_01ITAPIRA40B
FJ649025_00PEDRABELA5285B
FJ649036_01ESPSTOPINHAL7518B
FJ649034_01AMPARO1064B
FJ649008_00ATIBAIA81B
FJ649021_00NAZAREPTA3299B
FJ649042_01ITATIBA4693E
FJ649024_00VARGEM4631B
FJ649004_99JOANOPOLIS3960B
FJ649030_00CACONDE7018B
FJ649009_00BRAGANCAPTA153B
FJ649020_00PINHALZINHOS3141B
FJ649019_00BRAGANCAPTA2685B
FJ649018_00JPERDOES1947B
FJ648998_99PIRACAIA1929B
FJ649033_01MORUNGABA272B
AB247428_BRDR8_SP_2003
FJ649037_01MOCOCA7792B
FJ649029_00CACONDE7016B
FJ649032_01CAMPINAS142B
AB247400_BRbv654_PocosdeCaldas
AB496693_BRAL19_Emilianopolis
AB496691_BRAL17_Dracena_SP_200
AB496680_BRAL4_Dracena_SP_2002
AB247391_BRbv324_Itapecuru_MA
AB496682_BRAL8_Dracena_SP2004	.	T	G	.	.
AB110668_BRbv49_PIRAJU_SP_89	.	.	G	.	.
FJ648999_99SOCORRO1989B	.	.	G	.	.
AB247429_BR-DR9_Guarulhos_SP_2	.	.	G	.	.