

DÉBORA NUNES DE SOUZA

**ESTUDO DE LINHAGENS GENÉTICAS DO VÍRUS
DA RAIVA ESPECÍFICAS AOS MORCEGOS
DESMODUS ROTUNDUS E *ARTIBEUS LITURATUS***

Tese apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Ciências da
Coordenadoria de Controle de
Doenças da Secretaria de
Estado de Saúde de São
Paulo, para obtenção do título
de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Profa. Dra. Juliana Galera Castilho Kawai

São Paulo

2021

**Trabalho realizado no
Instituto Pasteur de São
Paulo/SP da Coordenadoria
de Controle de Doenças -
Secretaria de Estado da
Saúde de São Paulo.**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Souza, Débora Nunes de

Estudo de linhagens genéticas do vírus da raiva específicas aos morcegos *Desmodus rotundus* e *Artibeus lituratus*/ Débora Nunes de Souza. -2021.

Tese (Doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2021.

Área de concentração: Vigilância em Saúde Pública.

Orientação: Profa. Dra. Juliana Galera Castilho Kawai.

1. Raiva.
2. Quirópteros/microbiologia.
3. Biologia molecular.
4. Sequenciamento de nova geração/veterinária.

SES/CCD/CD - 433/2021

Elaborada por Renan Matheus Predasoli CRB 8/9275

Dedico este trabalho ao meu filho Henrique, meu noivo Rafael e minha mãe Ivete, que são a razão de eu sempre tentar evoluir tanto intelectualmente como pessoalmente.

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora, a professora doutora Juliana Galera Castilho Kawai, pela confiança, e por ser uma orientadora ótima que realmente faz jus a definição de orientar, sempre presente para os questionamentos e disposta a ajudar. É importante destacar que a Juliana também é uma pessoa excepcional de grande coração e muito humana, muito obrigada pela convivência.

Agradeço ao professor doutor Rafael de Novaes Oliveira, pela colaboração, por ampliar o meu conhecimento em epidemiologia molecular de raiva em morcegos, e sem dúvida foi essencial para a finalização desse estudo.

Agradeço à professora doutora Paula Fontes Asprino e a professora doutora Fabiana Bettoni pela parceria, ensinamento.

Agradeço ao professor doutor Paulo Eduardo Brandão, pela parceria, e colaboração nesse estudo.

Agradeço à Carla Macedo, Samira Achkar, Graciane Capolare, Leilane pela convivência e carinho.

Agradeço à Direção do Instituto Pasteur, por proporcionar esta oportunidade dando condições necessárias para o desenvolvimento desta Tese.

Agradeço a todos os funcionários do Instituto Pasteur, que de forma direta ou indireta me auxiliaram.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação, que colaboraram para minha formação científica.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida – (código CCD-SES/SP – 33115010) durante os primeiros dois anos do doutorado.

Agradeço à Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) à FAPESP pelo auxílio financeiro (processo nº 2018/16000-3) concedido por e pela bolsa (processo nº 2019/04023-1) concedida para os últimos dois anos do doutorado que foram essenciais para realização dessa pesquisa.

Agradeço o Hospital Sírio Libanês pela parceria nessa pesquisa.
Agradeço aos meus familiares, pelo incentivo e apoio permanente.

RESUMO

No Estado de São Paulo, a linhagem *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus* é prevalente em bovinos e equídeos na área rural, transmitida por *D. rotundus*, enquanto na área urbana ela é prevalente em cães e gatos, transmitida principalmente *A. lituratus*. Estudo baseado no gene N e G do RABV evidenciou uma possível diferenciação dessa linhagem. Com o objetivo de diferenciar a linhagem *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus* utilizando todos os genes, foram utilizadas 90 amostras positivas para a raiva, 46 relacionadas epidemiologicamente à *D. rotundus* e 44 *A. lituratus*, todas do Estado de São Paulo. Essas amostras foram submetidas a síntese de DNAs randômicos dupla fita, NGS, as sequências foram montadas com *software* CLCBio e as árvores filogenéticas foram elaboradas por ML utilizando o programa GARLI v.0.96. Os resultados mostraram que os isolados da linhagem *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus* foram agrupados em quatro sublinhagens filogenéticas, duas associadas ao *D. rotundus* e duas ao *A. lituratus*. A árvore filogenética com todos os genes concatenados mostra que a sublinhagem Artibeus 1 foi a primeira a se diferenciar, seguida da linhagem Desmodus 1. Desmodus 2 e Artibeus 2 são sublinhagens irmãs, sendo as últimas a se diferenciarem. Na análise filogenética do gene N com isolados da América Latina, todas as sublinhagens desse estudo tinham a mesma origem, mas diversos isolados de bovinos e *D. rotundus* do Brasil e de outros países da América foram observados nas sublinhagens Artibeus 1 e 2. Portanto, foi possível diferenciar a linhagem *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus*, no Estado de São Paulo, no entanto seria fundamental que essa pesquisa se estendesse aos países da América Latina.

Palavras chaves: Raiva, Morcegos, Biologia Molecular, Sequenciamento de Nova Geração

Abstract

In São Paulo State, *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus* lineage (compatible with antigenic variant 3 – AgV3) of rabies virus (RABV) is prevalent in cattle and horses in rural areas, transmitted by *D. rotundus*, while in urban areas it is prevalent in dogs and cats, transmitted mainly by *A. lituratus*. In order to differentiate *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus* lineage the New Generation Sequencing (NGS) RABV complete genome was performed. This study analyzed 90 RABV isolates (46 epidemiologically related to *D. rotundus* and 44 to *Artibeus lituratus*), from São Paulo State. These isolates were submitted to random ds-cDNA synthesis and NGS, assembled with software CLCBIO and phylogenetic trees were performed by Garli program v 0.96. The results demonstrate that samples of lineage *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus* were grouped into four phylogenetic sub-lineages, two associated to vampire bat and two to fruit bat. Phylogenetic tree with the five concatenated genes shows that the lineage Artibeus 1 was first differentiate followed by Desmodus 1. Desmodus 2 and Artibeus 2 lineages were last differentiate and have a common ancestor. A phylogenetic analysis of the N gene was also made with isolates from Latin America, as there are few RABV isolates with the complete genome of RABV available in databases. However, all sub-lineages had the same origin and several isolates from cattle and *D. rotundus* from Brazil and other countries in America were observed in sub-lineages Artibeus 1 and 2. Therefore, it was possible to differentiate the *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus* strain, in the São Paulo State, however, it would be essential for the analysis of all RABV genes to be extended to Latin American countries.

Key Words: rabies, bats, molecular biology, High-Throughput Nucleotide Sequencing

Lista de abreviações e siglas

A= Alanina
aa= Aminoácido
ABLV= *Australian bat lyssavirus*
AChR= Receptor acetilcolina
AcM= Anticorpo monoclonal
ARAV= *Aravan lyssavirus*
a.C.= Antes de Cristo
AgV2= Variante antigênica 2
AgV3= Variante antigênica 3
BBLV= *Bokeloh bat lyssavirus*
°C= Graus Celsius
cDNA= Ácido desoxirribonucleico complementar
CDC= *Center for Disease Control and Prevention*
CVS= *Challenge Virus Standard*
d.C.= Depois de Cristo
DNA= Ácido desoxirribonucleico
DNTP=Deoxinucleosídeo-trifosfato
DUVV= *Duvenhage lyssavirus*
E= Glutamato
EBLV-1= *European bat lyssavirus-1*
EBLV-2= *European bat lyssavirus-2*
EUA= Estados Unidos da América
EPI= Equipamento de proteção individual
et al.= e colaboradores
G= Glicoproteína
G= Glicina
GBLV= *Gannoruwa bat lyssavirus*
g= Gramas
H₂O= Água
I= Isoleucina
ICTV= *International Committee on Taxonomy of Viruses*
IKOV= *Ikoma lyssavirus*
IRKV= *Irkut lyssavirus*
kDA= Quilo Dalton
K= Lisina
KHUV= *Khujand lyssavirus*
L= *Large*
L= Leucina
LBV= *Lagos bat lyssavirus*
LLBV= *Lleida bat lyssavirus*
Le= *Leader*
lnL= logarítmico da Verossimilhança
M= Molar
M= Matriz
M= Metionina
MCC= Máxima credibilidade de clados
min= Minuto

mL= Mililitro
ML= Máxima verossimilhança
mM= Milimolar
MS= Ministério da Saúde
Mg= Micrograma
µL= microlitro
µg= micrograma
MOKV= *Mokola lyssavirus*
mRNA= RNA mensageiro
N= Nucleoproteína
N= Asparagina
NO**= Sequências não obtidas
NCAM= Adesão da célula neuronal
ng= Nanograma
NGS= *Next Generation Sequencing*
nm= Nanômetro
NMJ= Junção neuromusculare
nt= Nucleotídeo(s)
O*= Sequências obtidas após o sequenciamento
OIE = *World Organisation for Animal Health*/Organizacao Mundial de Saúde Animal
OMS= Organização Mundial de Saúde
OPAS = Organização Pan-Americana de Saúde
P= Fosfoproteína
P= Prolina
P.A.= Pura
pb= Pares de bases
PCR= *Reverse transcription polymerase*/reação em cadeia pela polimerase
pH= Potencial hidrogeniônico
pmol= Picomoles
PNPR=Programa Nacional de Profilaxia da Raiva
PV= *Pasteur virus*
Q= Glutamina
R= Arginina
RABV= Vírus da raiva
RNA= Ácido ribonucleico
RNP= Ribonucleoproteína viral
RT= *Reverse transcriptase*/transcrição reversa
RT-PCR= *Reverse transcription polymerase chain reaction*/transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase
RT-qPCR= *Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative*
S= Serina
SHIBV= *Shimoni lyssavirus*
SNC= Sistema Nervoso Central
spp.= Espécie
SVS/MS= Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde
T= Treonina

Tr= *Trailer*

TWBLV= *Taiwan bat lyssavirus*

V= Valina

VSV= Vírus da estomatite vesicular

U/μl= Unidades internacio por microlitro

WCBV= *West caucasian bat lyssavirus*

WHO= *World Health Organization*

Y= Tirosina

Lista de Quadros

Quadro 1. Amostras utilizadas nesse estudo com ano de isolamento, hospedeiro e localidade.	49
Quadro 2. Ciclo da reação de PCR Controle dirigida ao gene N do RABV para amplificação de um fragmento de 360pb.	58
Quadro 3. Quantificação em ng/uL no equipamento Nanodrop® do RNA total das 90 amostras após a extração do RNA.	67
Quadro 4. Quantificação em ng/uL no equipamento Nanodrop® do RNA das 89 amostras após o tratamento com a DNase.	70
Quadro 5. Amostras quantificadas no equipamneto Qubit após a depleção ribossomal. Quantificação em ng/uL realizada no Qubit das 89 amostras após depleção do RNA ribossomal e concentração do RNA genômico do RABV.....	74
Quadro 6. Amostras quantificadas no Qubit após a diluição em ng/uL.....	79
Quadro 7. Amostras quantificadas no Qubit após a diluição em ng/uL.....	80
Quadro 8. Bibliotecas de cada amostra quantificadas pelo Bioanalyzer.....	85
Quadro 9. Amostras utilizadas nesse estudo com ano de isolamento, hospedeiro e sequências obtidas para cada gene.	90
Quadro 10. Amostras contendo todos os genes do RABV concatenados, juntamente com o hospedeiro, localidade, sublinhagem e código do <i>GenBank</i>	101

Lista de Tabelas

Tabela 1. Identidades genéticas médias, máximas e mínimas calculadas utilizando todas as sequências de DNA dos isolados desse estudo	106
Tabela 2. Identidades proteicas médias, máximas e mínimas calculadas utilizando todas as sequências de DNA dos isolados desse estudo.	107
Tabela 3. Cálculo da identidade genética <i>intraclusters</i> contendo 70 sequências com todos os genes concatenados (10.800 nucleotídeos) dos isolados do vírus da raiva desse estudo.	107
Tabela 4. Cálculo da identidade genética <i>interclusters</i> contendo 70 sequências com todos os genes concatenados (10.800 nucleotídeos) dos isolados do vírus da raiva desse estudo.	108
Tabela 5. Cálculo da identidade genética <i>intraclusters</i> para cada gene (N, P, M, G e L) dos isolados do vírus da raiva desse estudo.....	109
Tabela 6. Cálculo da identidade genética <i>interclusters</i> de cada gene isolado do vírus da raiva desse estudo.....	110

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática do virion da raiva. Fonte: Adaptado de Bourhy et al. (1990).	27
Figura 2. Esquema da estrutura do genoma do vírus da raiva. Os genes são separados por regiões intergênicas variáveis. As áreas não codantes do genoma são constituídas pelas áreas terminais 3' <i>leader</i> e 5' <i>trailer</i> e as áreas intergênicas.	30
Figura 3. Esquema ilustrativo das fases da replicação do vírus da raiva (RABV). 1) Interação da glicoproteína do envelope viral com os receptores na superfície celular; 2) Fusão do envelope viral com a membrana endossomal e liberação da RNP; 3) Transcrição, replicação 4) Síntese de proteínas; 5) Síntese de cópias adicionais do RNA genômico; 6) Montagem das partículas virais, brotamento e liberação do RABV. https://www.nature.com/articles/nrmicro.2018.11/figures/1	35
Figura 4. Fotografia de gel de poliácridamida corada com nitrato de prata, mostrando o resultado do fragmento esperado (60pb) no tratamento com DNase de algumas amostras (1 a 6). Legenda: L <i>ladder</i> , 1 – isolado de equino (2085/15), 2 – isolado de <i>Artibeus lituratus</i> (4611/11), 3 – isolado de <i>Desmodus rotundus</i> (4987/06), 4 – isolado de bovino (3604/08), 5 – isolado de bovino (5378/07), 6 – isolado de bovino (1505/12), 7 – controle negativo (<i>Nuclease free water</i>), e controles positivos (8 – isolado de equino sem tratamento com DNase (2085/15), 9 – isolado de <i>Artibeus lituratus</i> sem tratamento com DNase, 10 – amostra de DNA extraída de camundongo).	73
Figura 5. Fotografia de gel de agarose corada com brometo de etídeo, mostrando o resultado do fragmento de 360pb direcionado ao gene N conforme esperado na reação da PCR Controle. Legenda: L- <i>ladder</i> , do 1 ao 89 – amostras utilizadas nesse estudo, 90 – controle positivo (CVS) e 91 - controle negativo (<i>Nuclease free water</i>).	78
Figura 6. Perfil dos tamanhos de pares de bases das moléculas da biblioteca, amostras: 1 - 6371/06, 4 - 2990/06, 6 - 5283/06 e 29 - 4731/09 e do <i>Ladder</i>	85

Figura 7. Perfil da curva do pool de todas as amostras em que o pico ficou em torno de 600pb, sendo que o tamanho médio (considerando a área) foi de 497 pb.	88
Figura 8. Alinhamento das sequencias dos 70 isolados de RABV desse estudo mostrando a cauda poli A existente na amostra PV que marca o início do pseudogene.....	92
Figura 9. Alinhamento das seqüências dos 70 isolados de RABV desse estudo mostrando o tamanho menor da proteína L em relação a amostra PV.....	94
Figura 10. Árvore Filogenética de máxima verossimilhança contendo 84 sequências de isolados do vírus da raiva (70 desse estudo e 14 sequencias obtidas do GenBank) com 10.800 nucleotídeos dos genes N, P, M, G e L concatenados. A árvore foi construída utilizando o modelo evolutivo GTR I + G através do software Garli 0.96.	96
Figura 11. Árvore de máxima credibilidade de clados inferida a partir dos genes N-P-M-G-L concatenados com respectivos valores de posterior obtidos para cada nó. Os ramos são calibrados de acordo com o ano de isolamento da linhagem. A escala na parte inferior do gráfico está em anos e pode ser usada para identificar quando ocorrem os eventos de separação entre a sublinhagem de RABV <i>D. rotundus</i> / <i>A. lituratus</i>	97
Figura 12. Árvore de máxima credibilidade de clados inferida a partir dos genes N-P-M-G-L concatenados. Os ramos estão calibrados de acordo com o ano em que cada linhagem foi isolada. A escala na parte inferior do gráfico está em anos e pode ser usada para identificar quando ocorreram os eventos de separação entre a sublinhagem de RABV <i>D. rotundus</i> / <i>A. lituratus</i>	98
Figura 13. Árvore filogenética de máxima verossimilhança contendo 84 sequências de isolados do vírus da raiva (70 desse estudo e 14 sequências obtidas do <i>GenBank</i>) com 778 nucleotídeos do gene N. A árvore foi construída utilizando o modelo evolutivo Tamura 3 parâmetros + G (T92+G) com 1000 repetições de <i>bootstrap</i>	103
Figura 14 Árvore filogenética de máxima verossimilhança, contendo 73 sequências do gene N obtidas nesse estudo e 213 sequências obtidas no <i>GenBank</i> , totalizando 286 sequências baseada em 1281 nucleotídeos do gene N do RABV.....	104

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	18
1.1.Histórico	22
1.2.Taxonomia do vírus	25
1.3.Estrutura do vírus	26
1.3.1. Morfologia do vírus	26
1.3.2. Genoma viral	27
1.3.3. Proteínas virais	27
1.4.Replicação	30
1.5.Transmissão	35
1.6.Ciclos de Transmissão	37
1.7.Epidemiologia	39
2. JUSTIFICATIVA	42
3. OBJETIVO	47
3.1.OBJETIVO GERAL	47
3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4. MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1.Amostras	48
4.2.Extração de RNA	51
4.3.Tratamento com DNase e teste controle para depleção de RNA ribossomal do hospedeiro	51
4.4.Depleção de RNA ribossomal do hospedeiro	53
4.5.Transcrição reversa (RT) para obtenção de DNA complementar (cDNA) randômico do RABV e transformação em DNAs randômico fita dupla	56

4.6. Reação em cadeia pela polimerase (PCR) dirigida ao gene N do RABV – PCR controle.	57
4.7. Preparo da Biblioteca de DNA das amostras e sequenciamento genômico por Next Generation Sequencing (NGS) no sequenciador <i>ILLUMINA MISEQ</i>	58
4.7.1. Diluição das amostras	58
4.7.2. Fragmentos, inserção dos adaptadores e neutralização	58
4.7.3. Amplificação de DNA tagmentado	59
4.7.4. Purificação da Biblioteca de DNA	59
4.7.5. Normalização das bibliotecas	60
4.8. Amplificação dos <i>clusters</i> e sequenciamento por síntese no sequenciador <i>ILLUMINA MISEQ</i>	60
4.9. Edição das sequências	60
4.10. Análise descritiva das sequências obtidas nesse estudo	61
4.11. Alinhamentos	62
4.12. Estimativas da taxa de substituição de nucleotídeos por sítio, tempo para o ancestral comum mais recente (TACMR) e estimativas de filogenia	62
4.13. Análise de Recombinação	64
4.14. Identidades genética e peptídica	64
5. RESULTADOS	66
5.1. Extração de RNA	66
5.2. Tratamento com DNAase e teste controle para depleção de RNA ribossomal do hospedeiro	69
5.3. Depleção de RNA ribossomal do hospedeiro	73
5.4. Transcrição reversa (RT) para obtenção de DNA complementar (cDNA) randômico do RABV e transformação em DNAs randômico fita dupla	76

5.5.Reação em cadeia pela polimerase (PCR) dirigida ao gene N do RABV – PCR controle.	76
5.6.Preparo da Biblioteca de DNA das amostras e sequenciamento genômico por <i>Next Generation Sequencing</i> (NGS) no sequenciador <i>ILLUMINA MISEQ</i>	79
5.6.1. Diluição das amostras.....	79
5.6.2. Fragmentos, inserção dos adaptadores e neutralização.....	84
5.6.3. Amplificação	84
5.6.4. Purificação das bibliotecas de DNA	84
5.6.5. Normalização das bibliotecas	84
5.7.Amplificação dos <i>clusters</i> e sequenciamento por síntese no sequenciador <i>Illumina Miseq</i>	88
5.8.Edição de sequências.....	88
5.9.Alinhamentos.....	92
5.10. Estimativas da taxa de substituição de nucleotídeos por sítio, tempo para o ancestral comum mais recente (TACMR) e estimativas de filogenias	95
5.11. Análise de Recombinação.....	106
5.12. Identidade genética	106
6. DISCUSSÃO	111
7. CONCLUSÃO	128
8. REFERÊNCIAS	129
9. ANEXOS.....	144
9.1.Aprovação CEUA	144

1. INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença infecciosa de caráter agudo e progressivo que acomete o Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos, ocasionada pelo vírus da raiva (RABV). Este vírus está presente na saliva de animais infectados, sendo assim, a principal forma de transmissão é por meio de mordedura (Acha e Szifres, 2003). Também é considerada a doença viral mais patogênica conhecida, com uma letalidade de quase 100%. Dezenas de milhares de pessoas na África e na Ásia morrem de raiva por ano, principalmente por meio de mordidas de cães raivosos (Hampson et al., 2015).

No entanto, nos países onde a raiva encontra-se controlada, os morcegos estão se tornando uma fonte cada vez mais comum de infecção humana (Petersen & Rupprecht, 2011). Nos Estados Unidos, de 1960 até 2018, 127 casos de raiva humana foram reportados, sendo que das infecções adquiridas nos Estados Unidos, 70% foram atribuídas a exposição de morcegos (CDC, 2020). E no Brasil desde 2002, o número de casos de raiva humana transmitida por morcegos hematófagos excedeu a transmissão de raiva por cães (Schneider et al., 2009).

Em consequências do impacto de mudanças ambientais de origem antropogênica, como o crescimento desordenado das cidades, houve aumento da população de quirópteros em centros urbanos e a aquisição de hábitos sinantrópicos por esses animais (Langoni et al., 2005; Kotait et al., 2007). A proximidade dos morcegos e humanos em áreas urbanas densamente povoadas torna o contato acidental quase que inevitável o que reforça a importância desses animais na epidemiologia da raiva (Menozzi, 2019).

Desde década de 90 os morcegos hematófagos estão associados à transmissão do RABV para humanos (SVS/MS, 2020). Atualmente, os morcegos não hematófagos têm transmitido o RABV para cães e gatos, que ocasionalmente vem transmitindo o vírus para os humanos. O Brasil foi o primeiro país a registrar transmissão secundária,

em que morcego transmitiu o RABV para gato e este transmitiu a humano, e até o momento, foram registrados cinco casos nos estados de São Paulo (2001), Paraíba (2015), Roraima (2016), Pernambuco (2017) e Santa Catarina (2019) (SVS/MS, 2020).

No Estado de São Paulo a variante antigênica 2 (AgV2) do RABV que circulava em cães não é encontrada desde 1999 (Kotait et al., 2001). Entretanto, casos de raiva em cães, gatos, herbívoros, animais silvestres e humanos são relatados no Estado de São Paulo e são resultados de infecção por morcegos como veremos a seguir.

No estudo realizado por Castilho et al. (2018) no Estado de São Paulo dos 24 casos positivos para raiva em cães e gatos 79,1 % (19/24) a linhagem do RABV encontrada foi compatível com *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus*.

A linhagem genética *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus* tem sido tipicamente encontrada em morcego hematófago *Desmodus rotundus*, morcego frugívoro *Artibeus lituratus*, cães, gatos e herbívoros (Castilho et al. 2018; Carnieli et al, 2009). A diferenciação molecular entre as linhagens virais destas duas espécies de morcegos ainda não está completamente definida (Fahl et al., 2012), sendo assim, a falta da identificação do animal transmissor, não permite inferir qual morcego foi a fonte de infecção para estes animais, portanto, mais pesquisas neste sentido são necessárias. Nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, a linhagem associada ao *Desmodus rotundus* e *Artibeus lituratus* é a mais prevalente nos animais domésticos infectados com raiva, o que demonstra que os morcegos são os principais transmissores da raiva para estes animais (Rocha et al., 2017).

Para o melhor entendimento da dinâmica da raiva em morcegos foram realizados diversos estudos moleculares no Brasil. Carnieli (2009) estudaram o surto ocasionado por morcegos hematófagos em bovinos e equinos de São Paulo e sugeriram que as linhagens que circulavam nesses herbívoros eram provenientes *Desmodus rotundus* e encontravam-se altamente conservadas. Já Macedo et al. (2010),

caracterizaram geneticamente 50 isolados do vírus da raiva de bovinos e equinos oriundos de São Paulo e Minas Gerais e verificaram que as linhagens que circulam nesses animais eram provenientes de morcegos hematófagos, *Desmodus rotundus*, e a partir da análise das sequências de aminoácidos da proteína N observaram ainda, que existe marcadores genéticos que podem determinar uma possível regionalidade embora as regiões biologicamente ativas apresentem-se conservadas dentro das espécies ao longo do tempo e espaço.

Estudos filogenéticos baseados no gene N demonstraram que os RABV encontrados em morcegos do gênero *Artibeus* são próximos filogeneticamente àqueles associados aos morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* (Shoji et al., 2004), sendo todos pertencentes a uma mesma linhagem genética do RABV (Kobayashi et al., 2005).

No entanto, para um melhor entendimento da epidemiologia, filodinâmica e evolução do RABV, o estudo de genomas virais completos é imprescindível. Segundo Mochizuki et al., 2011, as análises das sequências do genoma de RABVs de amostras silvestres fornecem informações úteis para a compreensão das características genéticas e biológicas de RABVs prevalentes na natureza.

Como a grande maioria dos vírus RNA fita simples, o complexo RNA polimerase RNA dependente do RABV, constituído pelas proteínas P e L, não possui atividade corretiva exonuclease 3-5'. Isto aliado à elevada progênie e curto intervalo de gerações do ciclo de vida do RABV, acarreta a uma elevada taxa de mutação com grande probabilidade de fixação das mutações neutras em subpopulações de mutantes que se mantém replicando em menor frequência que a população original (Master) em seus reservatórios. Quando estas subpopulações de mutantes se deparam com uma mudança repentina de habitat, representada, por exemplo, pelos eventos de transmissão interespecies, estas mutações podem ser responsáveis por uma melhor adaptabilidade destas subpopulações nestes novos hospedeiros, levando assim ao aparecimento de novas linhagens virais. Vários outros

fatores podem estar envolvidos na geração de heterogeneidade das sequências de RNA do RABV, como por exemplo, duração da infecção, via de transmissão, carga viral, resposta imunológica do hospedeiro e interações com proteínas virais (Borucki et al., 2013; Kissi et al., 1999).

A mutação é a principal fonte de variabilidade genética, em que a seleção natural, a deriva genética, o fluxo genético e a recombinação atuam moldando a estrutura genética em todas as populações (Duffy et al., 2008).

É importante entender a evolução dos organismos por de meio taxas de mutação geradas nos genomas dos organismos e relacionar ao ritmo de mudança evolutiva no nível das populações, as quais estão refletidas nas taxas de substituição de nucleotídeos ao longo do tempo. Quando estas mutações são neutras ou quase neutras, há uma relação simples entre a taxa em que elas são geradas em um genoma (a taxa de mutação) e então fixadas ao nível de população (a taxa de substituição). Os desvios da esperada neutralidade podem revelar aspectos fundamentais do processo evolutivo, incluindo a ação da seleção natural e variações nas dinâmicas de replicação (Duffy et al., 2008).

As mutações são imprescindíveis para a evolução dos organismos por meio da seleção natural, na medida em que a variabilidade genética entre indivíduos pode levar ao surgimento de diferentes fenótipos dentro de uma população, os quais podem ou não se mostrar mais adaptados ao seu habitat (Wasik & Turner, 2013).

Muitas das características de vírus de rápida evolução, aqueles com o genoma baseado em fitas simples de DNA ou RNA, como o vírus da raiva, os tornam sistemas ideais para o estudo das variações das taxas de evolução, sendo que o grande conhecimento sobre a biologia molecular, replicação e ciclos de vida de vírus específicos tornam as inferências relativas à integração dos processos evolutivos, fisiológicos e estruturais (Duffy et al., 2008).

Portanto, a caracterização molecular por meio do sequenciamento de DNA do genoma completo de linhagens gêneros

específicas de vírus da raiva mantidas por morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* e morcegos frugívoros *Artibeus lituratus* é fundamental, pois permitirá o aprimoramento da vigilância epidemiológica para o controle da doença no país.

1.1. Histórico

A raiva é uma doença que tem sido relatada desde o advento da civilização (Singh et al., 2017), sendo que a primeira documentação oficial da raiva ocorreu no código de Eshnunna, na Mesopotâmia, no século XXI a.C. (Tarantola, 2017).

Demócrito no século V a.C. descreveu pela primeira vez o quadro clínico da raiva canina. Já Aristóteles, no século IV a.C. documentou em seu livro de História Natural dos Animais, que os cães acometidos pela raiva ficavam muito irritados e atacavam outros cães, os quais se tornavam raivosos também. No entanto, Aristóteles desconsiderava a possibilidade do homem ser acometido pela raiva animal. Em contrapartida, o Filósofo Plínio acreditava que a raiva que acometia os cães poderia ser transmitida para os humanos (Villaseñor, 1974; Baer, 2007).

Assim como o Filósofo Plínio, autores como Xenofontes, Virgílio, Horácio e Ovídio, relataram em suas obras a importância do cão na transmissão da raiva para o homem. Eles acreditavam na existência de um "veneno", que em latim era chamado de "vírus", presente na saliva dos animais raivosos, e que esse "veneno" ocasionava a doença nas pessoas (Wilkinson, 2002).

Cornelius Celsus, no século I d.C. enfatizou a importância da saliva dos animais na transmissão da raiva, e considerou que outros animais além do cão poderiam transmitir a doença (Koprowski, 1996).

Já a raiva silvestre foi descrita apenas no século IX d.C., quando um urso raivoso saiu de um bosque, próximo ao porto de Lyon e atacou

vinde lenhadores que tentaram matá-lo a paulada. Em consequência das mordeduras, seis lenhadores desenvolveram a doença (Bravo, 1978).

Um dos primeiros surtos decorrentes da raiva na Europa ocorreu no século XIII d.C. Este surto foi ocasionado por lobos raivosos que atacaram 30 pessoas na cidade de Francônia, as quais desenvolveram a sintomatologia da doença e vieram á óbito (Baer, 2007). No século XV d.C. a Espanha foi devastada pela raiva canina e no século XVII d.C. espalha-se por Paris e por toda a Europa Central. Na Inglaterra, a doença foi reconhecida no século XVIII d.C. (Wilkinson, 2002). Já no século XIX d.C. a raiva adquire grandes proporções na Europa, principalmente na França, Inglaterra e Alemanha (Baer et al.,1990).

No continente americano, a primeira referência feita da raiva foi datada no século XVI pelo capitão Fernandez de Oviedo, durante a conquista espanhola da península mexicana de Yacután. O capitão espanhol relacionou a raiva com a morte de vários soldados, após serem mordidos por morcegos (Baer, 2007).

Na América Latina, a primeira associação entre morcegos hematófagos e epizootias de raiva em animais de produção foi em 1910, no Brasil, mesmo ano em que ocorreu o primeiro relato de morte humana por mordidas de morcegos hematófagos na ilha de Trinidad. Carini observou corpúsculos de inclusão de Negri em cérebros de bovinos agredidos por morcegos (Carini,1911).

Embora a ocorrência da raiva tivesse aumentado, especialmente na Europa, inúmeros progressos estavam sendo alcançados no que diz respeito à prevenção de mordidas por cães em cidades europeias (Blancou, 1994). Leis que regulamentavam a manutenção de cães pelos proprietários, a contenção dos mesmos e o controle de cães errantes estavam sendo exitosos (Tarantola, 2017).

Uma abordagem semelhante levou à eliminação da raiva transmitida por cães na Dinamarca, Noruega e Suécia em 1826 (Rupprecht & Hanlon, 1997). Em uma comunicação de 1793, Samuel

Bardsley, médico inglês, propôs a quarentena de cães locais e importados para “erradicar a raiva nas Ilhas Britânicas” (Blancou, 1994).

Vale ressaltar que durante esse período a compreensão da fisiopatologia da raiva também tinha evoluído, pois em 1546, Girolamo Fracastoro, escreveu um Tratado "A ferida incurável", em que detalhou a doença desde a mordida até o óbito do paciente. E após o acompanhamento de diversos casos de raiva, o autor concluiu que a doença não tinha cura, quando houvesse o aparecimento dos sinais clínicos (Koprowski, 1996).

Na virada do século XIX-XX, a abordagem científica melhorou a compreensão da fisiopatologia (Vos et al., 2011) e da epidemiologia clínica da raiva, incluindo a imunização de animais (Pearce, 2002). Muitos trabalhos experimentais sobre a transmissão da raiva e sua prevenção foram realizados, incluindo o de Georg Zinke, pesquisador alemão, que por meio da aplicação da saliva de cães raivosos em tecidos de cães saudáveis, propôs a infecciosidade da saliva (Baer, 2007).

Galtier no século XIV, também realizou importante pesquisa em que inoculou extrato de tecido nervoso de coelhos com raiva em cabras, carneiros e em animais de laboratório, com a intenção de induzir proteção imunológica nesses animais. É importante salientar que esses experimentos influenciaram Louis Pasteur em suas pesquisas com a raiva (Wilkinson, 2002).

Seguindo o modelo de pesquisa criado por Galtier, Pasteur e seus colaboradores (1881) concluíram que a sede do vírus da raiva era o SNC e que a inoculação intracerebral era a forma mais eficiente para a transmissão da doença. No ano de 1885, Pasteur conseguiu atenuar o vírus por meio de passagens seriadas em cérebros de coelhos, e verificou que, após essas passagens, o vírus perdia o tropismo pelo SNC (Ferreira, 1976).

Jacques-Joseph Grancher, pediatra, foi quem administrou por via subcutânea as primeiras doses de vacina viva atenuada em 6 de julho de 1885, às 20h, na presença de Louis Pasteur, que, como químico, não

estava autorizado a realizar injeções. A primeira injeção foi derivada de medula espinhal de um coelho inoculado que morreu de raiva em 21 de junho, 15 dias antes (Debré, 1994). Nos 10 dias que se seguiram, Joseph Meister recebeu 12 doses adicionais de vírus atenuado e progressivamente mais virulento, para gerar rapidamente uma resposta imune, numa tentativa de uma “corrida” contra o tempo (Jackson, 2013; Wasik & Murphy, 2013). Meister sobreviveu.

A pesquisa sobre o RABV em si fez avanços rápidos. Em 1903, Adelchi Negri, médico bacteriologista italiano, descreveu a primeira interação RABV-neurônio (Kristensson et al., 1996). O RABV foi observado pela primeira vez em microscópio eletrônico no início dos anos 1960 (Almeida et al., 1962; Matsumoto, 1962).

As sínteses das proteínas do RABV (mapeamento transcricional) foram descritas por Flamand e Delagneau (1978), e os genes virais que as codificam, sequenciados em sua totalidade (Tordo et al., 1988).

1.2. Taxonomia do vírus

O RABV pertence ao reino *Riboviria*, filo *Negarnaviricota*, subfilo *Haploviricotina*, classe *Monjiviricetes*, ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus* (ICTV, 2020). O gênero *Lyssavirus* possui até o momento 17 espécies distintas e uma subdivisão em três filogrupos, baseando-se em propriedades genéticas, por meio de relações filogenéticas (WHO, 2018; ICTV, 2020).

O filogrupo I inclui: *Rabies Lyssavirus* (RABV), *Australian bat lyssavirus* (ABLV), *Duvenhage lyssavirus* (DUVV), *European bat lyssavirus-1* (EBLV-1) e 2 (EBLV-2), *Aravan lyssavirus* (ARAV), *Khujand lyssavirus* (KHUV), *Bokeloh bat lyssavirus* (BBLV), *Irkut lyssavirus* (IRKV), *Gannoruwa bat lyssavirus* (GBLV) e *Taiwan bat lyssavirus* (TWBLV). O filogrupo II inclui: *Lagos bat lyssavirus* (LBV), *Mokola lyssavirus* (MOKV) e *Shimoni bat lyssavirus* (SHIBV). Os vírus mais divergentes no gênero, *West Caucasian bat lyssavirus* (WCBV), *Ikoma*

lyssavirus (IKOV) e *Lleida bat lyssavirus* (LLBV), está classificado dentro do filogrupa III (WHO, 2018; ICTV, 2020).

Das 17 espécies de *Lyssavirus* apresentadas, apenas o *Rabies Lyssavirus* está associado à raiva clássica. As demais espécies podem ser denominadas como vírus aparentados ao vírus da raiva (*rabies-like viruses*) (Fauquet et al., 2007), e as espécies que provocam a doença em mamíferos podem ser denominadas de lissavirose com sintomas semelhantes à raiva clássica (Hanlon et al., 2005).

1.3. Estrutura do vírus

1.3.1. Morfologia do vírus

O RABV possui forma de um projétil com uma das extremidades esféricas e outra plana, e sua partícula é constituída por duas estruturas principais, o ribonucleocapsídeo ou ribonucleoproteína viral (RNP) e o envelope viral. A RNP é composta pelo RNA genômico associada à três proteínas: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P) e *large* ou RNA polimerase RNA dependente (L) (Fauquet et al., 2007). O envelope viral é composto por uma bicamada lipídica à qual estão associadas às proteínas matriz (M) e glicoproteína (G). A glicoproteína é a única proteína transmembranária e se projeta para o exterior com espículas glicosiladas constituídas por trímeros que sobressaem da superfície do vírion com comprimento de 9 nm (Wunner et al., 1985). A proteína M está localizada na superfície interna do envelope, circundando a ribonucleoproteína viral (Mebatsion, 2001), conforme representado na Figura 1.

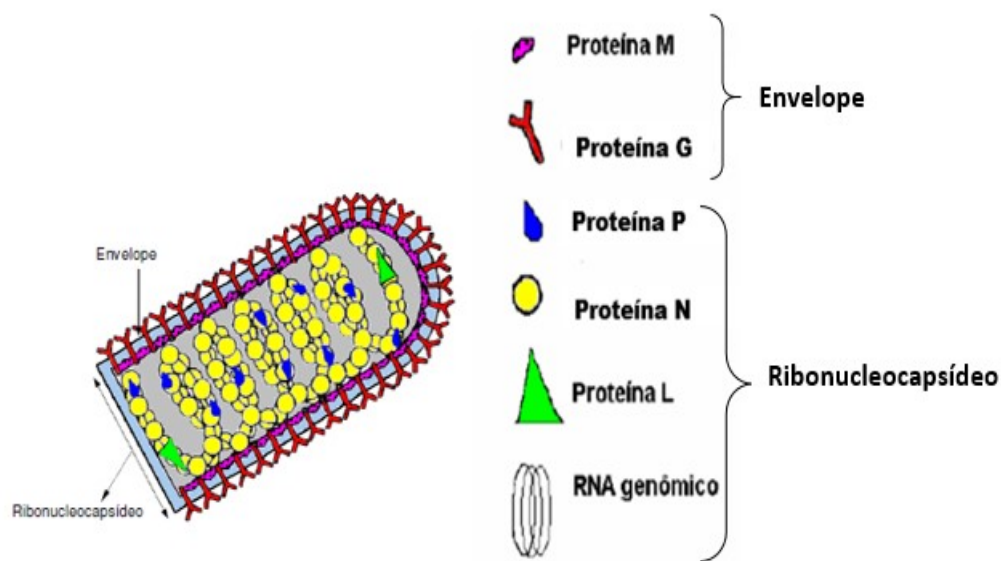


Figura 1. Representação esquemática do virion da raiva. Fonte: Adaptado de Bourhy et al. (1990).

1.3.2. Genoma viral

O RABV apresenta um genoma não segmentado de RNA de fita simples, com polaridade negativa, fazendo com que o RNA viral não seja infeccioso, por não ser capaz de ser traduzido diretamente em proteínas. O genoma completo apresenta 11.932 nucleotídeos baseado no vírus fixo *Pasteur Virus* (PV), os quais codificam cinco proteínas estruturais (N, P, M, G e L) a partir dos mRNAs monocistrônicos. Os genes que codificam estas proteínas recebem o mesmo nome das proteínas e apresentam-se separados por quatro regiões intergênicas não codificantes (Wunner, 2007), que têm importante papel na regulação da expressão viral (Finke et al., 2000).

1.3.3. Proteínas virais

O vírus da raiva possui cinco genes virais que codificam as cinco proteínas estruturais que constituem esses vírus. A proteína N é fosforilada, composta por 450 aminoácidos (aa) e com peso molecular de aproximadamente 57 kDa, sendo o componente mais abundante do

RABV é a mais conservada do vírus em termos de sequência de aa, mesmo entre as diferentes espécies do gênero *Lyssavirus*, apesar de um grau relativamente alto de diversidade genética ser encontrado em algumas pequenas regiões do gene N. Uma das razões do alto nível de conservação desta proteína é a sua função chave na encapsidação específica do RNA genômico, protegendo o mesmo das atividades de ribonucleases celulares e mantendo o RNA genômico em configuração adequada para a transcrição. Essa proteína também é capaz de induzir anticorpos neutralizantes, apresentando ainda epítomos importantes para o reconhecimento de linfócitos T (Marston et al., 2007; Wunner, 2007). A proteína N também é a mais conservada antigenicamente e apresenta quatro sítios antigênicos (I a IV), localizados nos segmentos de aminoácidos de posições 358-367 (sítio I), 373-383 (sítio II), 313-337 (sítio III), e no sítio IV foram mapeadas duas regiões independentes entre os aminoácidos: 359-366 e 375-383 (sítio IV) (Tordo, 1996; Wunner & Conzelmann, 2020). Isso faz com que o gene N seja um alvo ideal para o desenvolvimento de métodos voltados ao diagnóstico.

A proteína P é um polipeptídeo fosforilado que contém 297 aa e com peso molecular de 38 kDa. Esta interage com as proteínas N e L e acredita-se que atue como co-fator da L. A proteína P é multifuncional, ligando-se às outras proteínas virais para auxiliar na replicação do genoma viral interagindo com fatores celulares e, possivelmente, está associada à disseminação e patogênese viral, pois liga-se à dineína intracitoplasmática e está envolvida no transporte axonal do vírus. Esta, por sua vez, é a menos conservada entre os *Lyssavirus* (Lafon & Wiktor, 1985; Mebatsion, 2001).

A proteína M é a menor proteína do vírus, sendo composta de 202 aa com peso molecular de 25 kDa. Esta proteína forma uma bainha em volta da RNP produzindo o esqueleto do vírus. É também uma proteína multifuncional, que interage com outras proteínas virais e com os componentes das proteínas da membrana celular (Wunner, 1991). Está envolvida na montagem e liberação viral (Mebatsion, 2001),

também é responsável pela ligação do RNP viral à membrana celular da célula hospedeira, na periferia do citoplasma celular, onde inicia o processo de brotamento do RABV através da membrana plasmática. O mecanismo pelo qual a proteína M intermedeia a ligação do vírus à membrana celular provavelmente está associado ao domínio rico em prolina, localizada nos resíduos 35-38, dentro de uma sequência conservada de 14 aa, localizada no N-terminal da proteína (Wunner & Conzelmann, 2020).

A glicoproteína possui 505 aa e o peso molecular de aproximadamente 65 kDa. Exerce a função de proteína de fusão, que permite a entrada do vírus na célula. Além disso, participa do processo de brotamento de novos vírions. Essa proteína é fundamental para a resposta imune contra o vírus da raiva, sendo responsável pela indução e ligação de anticorpos neutralizantes, principalmente por sua porção externa do envelope, denominada domínio antigênico ou ectodomínio. A glicoproteína também é capaz de estimular em conjunto com as proteínas N e P, células T auxiliares e citotóxicas gerando uma resposta imune celular. Alguns sítios de G têm sido relacionados com a patogenicidade do vírus, apresentando uma maior taxa de mutação. A glicoproteína também tem importante papel na patogênese da doença (Wunner, 2007).

A proteína L é a maior proteína do vírus, com 2.142 aa e com peso molecular de 244 kDa, originando assim, o nome *large*. É responsável pelas atividades enzimáticas necessárias à transcrição e replicação do RNA viral (Tordo et al., 1988). Como em todos os vírus de RNA sentido negativo, a RNA polimerase associada ao vírion possui um papel essencial na infecção viral, pois inicia a transcrição primária do genoma RNA, após a liberação do RNP no citoplasma da célula hospedeira. Além de atuar nos processos enzimáticos da transcrição, os quais incluem a iniciação e alongação da região *Leader* +, também é responsável pela transcrição de RNAs mensageiros, bem como as suas modificações pós-transcricionais tais como 5' *capping*, metilação e 3'

poliadenilação (Wunner & Conzelmann, 2020). Além das proteínas virais existem o RABV é composto de quatro regiões intergênicas: N/P composta por dois nucleotídeos, P/M e M/G compostas por cinco nucleotídeos e a região G/L varia de 19 a 28 nt, no entanto foi visto em alguns *lyssavirus* a variação de 16 nt na região M/G (Wunner & Conzelmann, 2020). A descrição do genoma viral está esquematizada na Figura 2.

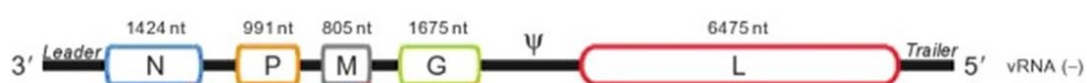


Figura 2. Esquema da estrutura do genoma do vírus da raiva. Os genes são separados por regiões intergênicas variáveis. As áreas não codantes do genoma são constituídas pelas áreas terminais 3' *leader* e 5' *trailer* e as áreas intergênicas.

Fonte Albertini et al. (2011).

1.4. Replicação

Para o vírus da raiva, o ciclo da replicação viral pode ser dividido em três fases. A fase inicial, que inclui a adsorção do vírion a receptores celulares das células do hospedeiro, a sua entrada por meio da fusão direta com a membrana plasmática da célula hospedeira e posterior fusão com as membranas endossomais celulares, e o desnudamento seguido da liberação do RNP helicoidal no citoplasma celular (Schnell et al., 2010). A fase intermediária, que inclui a transcrição e replicação do genoma viral e síntese de proteínas. Já a fase de maturação e liberação engloba montagem viral e seu egresso da célula infectada (Schnell et al., 2010), conforme ilustrado na Figura 3.

A fase inicial do ciclo de replicação do RABV é marcada a interação da glicoproteína do envelope viral com os receptores na superfície celular, que resulta na adsorção e penetração do vírus por endocitose (Fauquet et al., 2005; Rodriguez et al., 2007).

Um possível receptor, responsável pelo processo de adsorção e penetração do vírus, poderia ser o receptor acetilcolina (AChR), que é

encontrado em junções neuromusculares (NMJs) (Wunner, 2007). Isto porque, esse receptor consegue acumular partículas virais próximas as NMJs, e dessa forma aumenta as chances dessas partículas serem recebidas pelos terminais neuronais (Lentz et al., 1982; Lewis et al., 2000). No entanto, pelo fato desse receptor somente ser encontrado nas junções pós-sinápticas neuromusculares, é difícil considerar que esse receptor faça parte da entrada inicial do RABV nas células hospedeiras. No entanto, existe a hipótese que os AChRs colaboram na infecção dos neurônios adjacentes e otimizam a infecção de células musculares estriadas pelo vírus da raiva (Schnell et al., 2010).

Outros receptores que podem atuar nessa fase inicial da infecção é a molécula de adesão da célula neuronal (NCAM) e o receptor p75NTR de neurotrofismo, também chamado de receptor de baixa afinidade para o fator de crescimento do nervo (Schnell, et al, 2010). O NCAM está concentrado em regiões sinápticas e NMJs, e foi visto em estudos com camundongos que tiveram o gene de codificação do NCAM retirado, continuaram susceptíveis a infecção pelo RABV, entretanto a manifestação da doença foi adiada. A partir desses dados pode-se concluir que estes receptores não foram essenciais para infecção, mas assim como AChR tem participação no processo de infecção (Thoulouze et al., 1998).

Já o receptor p75NTR é um co-receptor para a ligação e a entrada do vírus na célula, no entanto existem muitas dúvidas se os receptores do vírus utilizados para a entrada na célula são os mesmos durante a disseminação do mesmo entre as células (Dietzschold, 1985). Segundo Schnell et al. (2010), provavelmente carboidratos, lipídios e gangliosídeos são receptores para o RABV, mas as interações entre eles ainda não bem compreendidas.

Com os dados citados anteriormente, nota-se que nenhum dos receptores para o RABV parece ser essencial para os processos de adsorção e penetração do vírus *in vitro*. No entanto, Schnell et al. (2010) sugerem que o vírus possa utilizar dois tipos de receptores diferentes

durante a fase inicial, pois, diferenças na velocidade de adsorção e espalhamento de vírus de morcegos e vírus vacinais em culturas celulares corroboram com a hipótese de que diferentes receptores podem ser usados.

Portanto, qualquer que seja o receptor celular utilizado pelo RABV para a sua adsorção e fusão com a célula hospedeira, provavelmente não existe apenas uma alternativa para que o vírus da raiva consiga completar o primeiro estágio do seu ciclo de vida no animal infectado (Wunner, 2007).

Após a ligação com o receptor a penetração viral ocorre por endocitose e pela fusão do envelope viral com a membrana celular (Marsh & Helenius, 1989; Whitt et al., 1991; Gaudin et al., 1992). A fusão do vírus com a membrana endossomal é dependente de pH baixo (6,3), envolve diversas mudanças específicas e discretas na conformação da glicoproteína viral. A liberação de RNP ocorre no citoplasma pela pressão do endossomo (Wunner, 2007).

Na fase intermediária para que o RABV consiga realizar a replicação é necessário que ele alcance o corpo da célula neuronal (Schnell et al., 2010). O vírus da raiva recruta os mecanismos regulatórios para otimizar a produção de seus componentes virais em níveis baixos suficiente, para não serem reconhecidos precocemente pelo sistema imune ou interferir nas funções vitais da célula hospedeira (Schnell et al., 2010).

Quando ocorre a liberação do RNP, o nucleocapsídeo relaxa e forma uma hélice flexível facilitando a sequência dos eventos da replicação viral na célula (Iseni et al., 1998). Como o genoma RNA não segmentado fita simples não pode ser traduzido diretamente em proteínas, o primeiro evento no processo da replicação do RABV é a sua transcrição, a qual irá produzir os RNAs mensageiros monocistrônicos das cinco proteínas (Wunner, 2007).

O processo de transcrição viral no ciclo de replicação do RABV é realizado por meio da interação do RNA viral ligado a proteína N com o

complexo RNA polimerase RNA dependente (proteína L e cofator proteína P) e é independente da célula hospedeira. A polimerase viral associada ao vírus inicia a transcrição na extremidade 3' do genoma. Este processo de transcrição é denominado transcrição primária uma vez que utiliza o RNA liberado no citoplasma celular e não requer proteínas do hospedeiro, nem a síntese prévia de alguma proteína viral (Wunner, 2007; Schnell et al., 2010).

Os primeiros transcritos de RNA produzidos são os RNA Le, que não se encontram com cap e poliadenilados como é visto nos RNAs mensageiros (mRNA) que transcrevem as proteínas (Colonno & Banerjee, 1978; Leppert et al., 1979) (Figura 3).

Os RNAs Le iniciam a síntese de mRNA em um mecanismo de "iniciação parada" de transcrição genômica durante o movimento da RNA polimerase pelo genoma a partir do RNA genômico sentido negativo (Wunner, 2007).

Os cinco mRNAs mensageiros monocistrônicos (Figura 3) são então traduzidos em ordem sequencial nas proteínas virais, sendo que durante este processo o gradiente de produção das proteínas segue a ordem N>P>M>G>L (Rodriguez et al., 2007). Esse processo envolve os ribossomos celulares, fatores de iniciação e elongação e RNA transportadores do hospedeiro. A organização e características do genoma do RABV são críticas nos processos de transcrição e replicação do RABV (Schnell et al., 2010). A sequência 3' UUGU-5' no RNA genômico no ponto 3' de cada gene identifica o início da síntese de mRNA. Durante esse período o ponto 5' de mRNA nascente recebe um cap pela proteína L por meio do acréscimo de 7-metil guanosina no nucleotídeo de 5' de mRNA (Testa et al., 1980).

A replicação do genoma é iniciada pela síntese da cópia completa do RNA genômico conhecido como antígenoma, o qual serve como molde para replicação de RNA genômico de sentido negativo. Após esse evento tanto o antígenoma quanto o genoma são produzidos

e encapsidados pela proteína N solúvel que está no citoplasma (Banerjee & Barik, 1992).

A replicação é dependente da síntese da proteína N que é sintetizada pelo mRNA-N (Banerjee & Barik, 1992). O mRNA-N assim como os mRNA virais P-M-L são traduzidos em ribossomos livres no citoplasma. Enquanto o mRNA-G é traduzido nos ribossomos ligados ao retículo endoplasmático rugoso.

A proteína G nascente é introduzida ao ser traduzida dentro do lúmen do retículo endoplasmático rugoso, onde monômeros de G sofrem modificações em determinados resíduos de asparagina por meio de glicosilações e processamento de N-glicanos necessários para a formação dos trímeros funcionais das glicoproteínas que serão expostos na superfície da membrana das células hospedeiras. A formação dos trímeros de glicoproteína ocorre no complexo de golgi pela adição de monossacarídeos por glicosidases e glicotransferases (Wunner, 2007; Schnell et al., 2010).

Na fase de maturação e liberação, a montagem das partículas virais começa com a encapsidação de RNA viral, a qual é iniciada quando a proteína N é adicionada no final 5' do RNA nascente, formando o complexo RNA-N. Esse complexo protege o RNA viral das ações das endonucleases virais. Quando as proteínas N, P e L acumuladas no interior da célula infectada, atingem concentrações ideais de RNA viral ocorre a formação do nucleocapsídeo. Acredita-se que como em outros vírus da ordem *Mononegavirales*, a proteína P seja a responsável por mediar a ligação da proteína L ao complexo RNA-N-P (Wunner, 2007).

A próxima proteína que se associa ao complexo RNP é a M. Essa proteína multifuncional está envolvida em vários processos relacionados a formação da progênie viral. Primeiramente a proteína M coordena a mudança no balanço dos processos de transcrição e replicação viral, realizados pelo RNP viral, com aumento da replicação viral e diminuição da transcrição. Esta regulação pode estar relacionada com condensação helicoidal do RNP viral direcionada pela proteína M,

fazendo com que a atividade da polimerase viral seja interrompida. Após a realização deste processo, a proteína M irá transportar o RNP viral condensado até locais específicos da membrana celular onde estão transpassados os trómeros da glicoproteína viral. A interação entre G com M é importante para a estabilização dos trómeros da proteína G na superfície celular, para que dessa forma o brotamento da partícula viral seja eficiente. O brotamento ocorrerá quando os vírions com RNP-M associados à membrana adquirem a camada lipídica (Wunner, 2007).

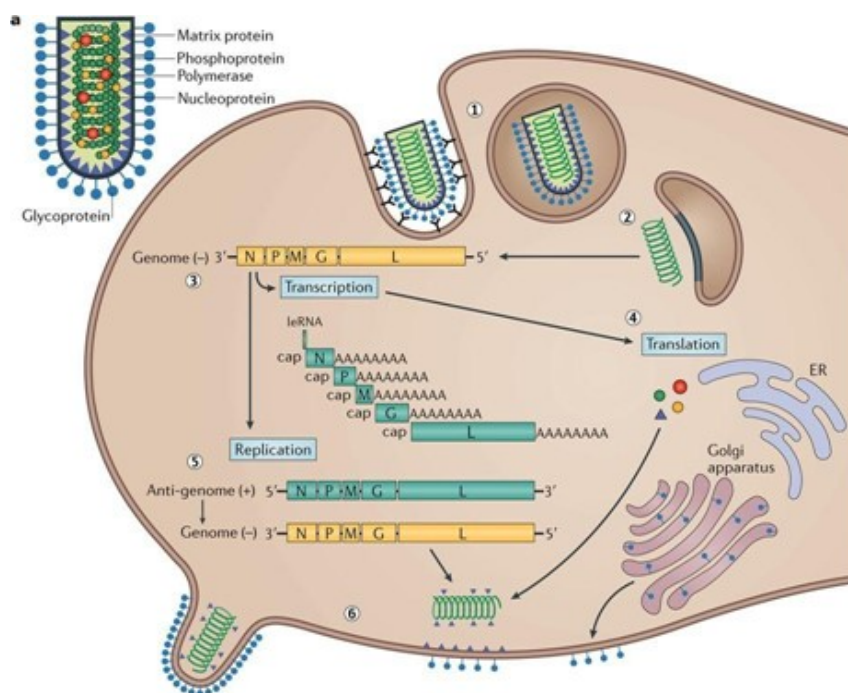


Figura 3. Esquema ilustrativo das fases da replicação do vírus da raiva (RABV). 1) Interação da glicoproteína do envelope viral com os receptores na superfície celular; 2) Fusão do envelope viral com a membrana endossomal e liberação da RNP; 3) Transcrição, replicação 4) Síntese de proteínas; 5) Síntese de cópias adicionais do RNA genômico; 6) Montagem das partículas virais, brotamento e liberação do RABV. <https://www.nature.com/articles/nrmicro.2018.11/figures/1>.

1.5. Transmissão

A maioria das infecções pelo RABV ocorre por meio do contato direto (corte na pele ou nas mucosas dos olhos, nariz e boca) com a saliva ou tecidos do cérebro ou do sistema nervoso de um animal infectado. A mordedura é a principal via de transmissão, no entanto a

transmissão também pode ocorrer por meio de outros tipos de exposição, como arranhões, escoriações ou feridas abertas expostas à saliva ou outro material potencialmente infeccioso de uma animal com RABV (CDC, 2019).

Também há casos descritos na literatura de transmissão pela via respiratória por meio da inalação de aerossóis contendo o vírus da raiva. Em dois casos descritos, os indivíduos se infectaram com o RABV após entrarem em uma caverna povoada densamente por morcegos infectados nos EUA (CDC, 2019). Outros dois casos registrados foram de indivíduos que se contaminaram com o vírus da raiva após manipularem material biológico positivo para raiva no laboratório, sem adotarem as medidas de biossegurança adequada como a utilização de equipamentos de proteção individual (EPI) e a imunização prévia contra o RABV (Kotait et al., 2009). É importante ressaltar que esses casos são pontuais e não possuem importância epidemiológica relevante no ciclo da infecção.

Outra forma de transmissão incomum do vírus da raiva abordada na literatura foi por meio de práticas sexuais com animais infectados com o vírus (Kotait et al., 2009).

Já houve relatos na literatura de infecção de raiva inter-humana. Apenas dois casos registrados que ocorreram na Etiópia, o primeiro caso a mãe contraiu a doença após receber uma mordida no dedo pelo filho que já estava infectado com o vírus; e o segundo caso foi de uma mãe, que foi beijada várias vezes na boca pelo seu filho que estava com a doença (Kotait et al., 2009).

A transmissão por meio de transplante de córnea e órgãos como rins, pulmões, fígado e pâncreas não devem ser negligenciados. Esse tipo de infecção ocorreu pela primeira vez em 2004 nos Estados Unidos quando um doador (usuário de drogas e infectado com o vírus da raiva proveniente de morcego) transmitiu a doença para mais quatro pessoas, as quais receberam o seu fígado, rim direito, rim esquerdo e um segmento da artéria ilíaca. Um quadro semelhante de transmissão

ocorreu na Alemanha em 2005, em que três pessoas contraíram raiva após receberem órgãos de um mesmo doador que havia se infectado com o vírus da raiva após ser agredido por um cão no continente asiático (Kotait et al., 2009).

A manipulação de carcaças de animais infectados com o vírus da raiva sem os devidos cuidados como a utilização de EPIs e a pré-exposição ao vírus por meio de imunização, é outra forma de transmissão do vírus da raiva menos usual. Em Hanoi/Vietnã houve registro de dois casos de raiva humana após a manipulação das carcaças de um cão que havia sido atropelado e de um gato que havia apresentado a sintomatologia da doença por quatro dias e veio a óbito após esse período (Kotait et al., 2009).

1.6. Ciclos de Transmissão

Segundo Acha e Szifers (2003), são admitidos dois ciclos de transmissão para raiva, ciclo urbano e ciclo silvestre. No ciclo urbano o cão é o principal reservatório, enquanto no ciclo silvestre existem diferentes espécies que atuam como reservatórios silvestres e transmissores do RABV, sendo que a manutenção do vírus nas espécies pode variar conforme a região geográfica (Mattos et al., 1996).

O ciclo urbano é mantido pelos cães domésticos, o principal transmissor dos casos de raiva humana no mundo, sendo o reservatório de sete complexos de linhagens ao redor do planeta (Oliveira, 2014). O caráter zoonótico da raiva é mais evidente nesse ciclo devido à proximidade desses animais com os seres humanos (Acha e Szyfres, 2003; Belotto et al., 2005; Rodriguez et al., 2007).

Na América Latina foi observada uma redução de 95% dos casos de raiva humana e canina, após a implementação de programas de controle de raiva canina e atuação da vigilância. Porém, o número de casos de morcegos continua estável (Escobar et al., 2015).

Já no Brasil com a implantação do Programa Nacional de Profilaxia da Raiva (PNPR) na década de 70, houve uma acentuada

redução da raiva humana. O resultado das ações de vacinação antirrábica canina e felina resultaram num grande ganho para a saúde pública, permitindo que o país saísse de um cenário de mais de 1.200 cães positivos para raiva e uma taxa de mortalidade de raiva humana por cães de 0,014/100 mil habitantes em 1999, para um cenário de 9 casos de raiva canina e nenhum registro de raiva humana por cães em 2018. Durante o período de 2010 a 2020 apenas 38 casos de raiva humana foram registrados, sendo que em 2014 não houve casos. Desses casos, nove tiveram o cão como animal agressor, vinte por morcegos, quatro por primatas não humanos, quatro por felinos e em um deles não foi possível identificar o animal agressor (SVS/MS, 2020). Vale destacar que os morcegos foram responsáveis por 52% dos casos de raiva humana reportados nos últimos 10 anos.

Segundo Kotait et al. (2007), a redução dos casos de raiva em cães, alertou a vigilância epidemiológica para as questões da raiva silvestre, principalmente aquelas ocasionadas por morcegos e canídeos silvestres. Portanto, o vírus da raiva mantido no ciclo silvestre assumiu grande importância na cadeia epidemiológica, isto porque os principais reservatórios no Brasil (morcegos, canídeos silvestres, saguis-do-tufo-branco), possuem hábitos sinantrópicos e acabam chegando a áreas urbanas e de transição em busca de alimentos, já que muitas vezes tem o seu ambiente alterado pelo homem e acabam reintroduzindo a raiva em animais domésticos e em humanos.

Atualmente, a maioria dos casos de morte humana no Brasil são atribuídas a infecções de RABV ocasionadas pela transmissão dos morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* (SVS/MS, 2020). Na região nordeste do Brasil *Cerdocyon thous* é o principal transmissor da raiva para os animais domésticos (Carnieli et al., 2006, Souza et al., 2017). Aproximadamente 40 espécies de morcegos, o *Cerdocyon thous* e *Callithrix jacchus*, além de serem transmissores do RABV atuam com reservatório do vírus, ou seja, em cada uma desses animais circulam uma linhagem do RABV adaptada à espécie (Antunes et al., 2018;

Carnieli et al., 2006; Souza et al., 2017, Favoretto et al., 2001). Vale ressaltar que a circulação do RABV nos animais silvestres, principalmente em morcegos, tem sido um grande desafio para saúde pública (Rupprecht et al., 2017; Fisher et al., 2018).

1.7. Epidemiologia

A raiva ainda representa um sério problema de saúde pública, dada sua evolução fatal e seu elevado custo social e econômico. Segundo Rupprecht et al. (2002), a raiva pode ser considerada a mais importante zoonose viral conhecida, devido seu amplo poder de disseminação e as consequências ocasionadas na saúde pública e na economia. Esta doença está presente em todos os continentes, com exceção da Antártica e aproximadamente 95% dos casos ocorrem na Ásia e África (WHO, 2020). Desde o século XVIII existem intervenções de sucesso para o controle da raiva, mas apesar do aumento da eficiência das vacinas e medidas profiláticas (Wallace & Blanton, 2020), estima-se que aproximadamente 60 mil pessoas morram por causa dessa doença (WHO, 2020), principalmente por meio de mordidas de cães raivosos (Hampson et al., 2015).

Já na Europa, a raiva continua sendo considerada endêmica em muitas populações animais (Cliquet et al., 2014). No entanto, a raiva canina foi progressivamente eliminada na virada do século XX em grande parte dos países europeus, por meio de medidas de controle de cães, como captura e eutanásia, restrição de trânsito e uso de focinheira (Pastoret et al., 2004).

Assim como na Europa os países da América do Norte também possuem programas de vacinação em cães estão bem estabelecidos, e o RABV mantém o seu ciclo nas espécies silvestres (Müller & Freuling, 2018; Fehlner-Gardiner, 2018).

Em diferentes regiões dos EUA e Canadá são encontradas diferentes linhagens de RABV em animais silvestres; nos mamíferos silvestres terrestres temos nas espécies de coiotes (*Canis latrans*) e em

raposas cinzentas (*Urocyon cinereoargenteus*) no oeste e centro do estado do Texas. Os guaxinins (*Procyon lotor*) são reservatórios na região Sudeste e Meio-Atlântico, os gambás (*Mephitis mephitis*) na Califórnia e em estados do Centro-Norte e Centro-Sul e as raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*), as raposas árticas (*Alopex lagopus*) nos estados de fronteira com o Canadá e no Alasca (Monroe et al., 2016; Canadá, 2018). Enquanto nos morcegos a raiva é endêmica em todo o território dos EUA, e 29 espécies de quirópteros insetívoros de diferentes gêneros já foram diagnosticadas positivas em 48 estados americanos (De Serres et al., 2008; Monroe et al., 2016). No Canadá dos seis casos de raiva humana reportados de 1970 a 2007, três deles foram ocasionados por quirópteros (CDC, 2008; Canadá, 2018).

No México a raiva silvestre também é um problema, e a raiva canina encontra-se controlada, e o país está em processo de certificação de área livre para raiva humana transmitida por cães (Velasco-Villa et al., 2017a). Diversas espécies participam do ciclo silvestre da doença, ocasionando mortes humanas, incluindo os “zorrillos” (*Spilogale putorius* e *Conepatus semistriatus*), guaxinim (*Procyon lotor*), quati de nariz branco (*Nasua narica*) e as espécies de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* e *Diphylla ecaudata* (Ortega-Pacheco & Jimenez-Coelho, 2017). Espécies de morcegos não hematófagos com hábitos alimentares diversos também já foram diagnosticadas com o RABV (Velasco-Villa et al., 2006).

Na América Latina e Caribe, a raiva encontra-se distribuída em todos os 35 países (Vigilato et al., 2013), entretanto foi observada uma redução de 95% dos casos de raiva humana e canina, após a implementação de programas de controle de raiva canina e atuação da vigilância iniciados na década de 70 (OPAS, 2001). Esses programas foram fundamentais no controle e vigilância da raiva nos animais domésticos e como resultado, houve a redução do risco de infecção em humanos. Porém, o decréscimo no número de casos de raiva canina, não exclui a existência de regiões com alto risco de transmissão da

doença aos humanos, por mordeduras de cães. São exemplos destas regiões: Haiti, Peru, Honduras, República Dominicana, Guatemala, Bolívia e algumas regiões do Brasil (Norte e Nordeste) (Vigilato et al., 2013; Velasco-Villa et al., 2017a). Vale ressaltar que a raiva silvestre é muito presente também nos países da América Latina e entre as espécies acometidas pela raiva nessas localidades temos: *Cerdocyon thous* (Carnieli et al., 2006, Carnieli et al., 2008, Souza et al., 2017, Amarilla et al., 2018) sagui do tufo branco (*Callithrix jacchus*) no Brasil (Favoretto et al., 2006; Antunes et al., 2018), as raposas cinzentas (*Urocyon cinereoargenteus*) na Colômbia (Páez et al., 2007) e o “mangusto” (Família *Herpestidae*) no Caribe e Porto Rico (Nadin-Davis et al., 2008), e na Ilha de Granada (Zieger et al., 2017). No entanto outra espécie silvestre de elevada importância epidemiológica na América Latina são os morcegos, os *D. rotundus* constituem um importante reservatório silvestre para raiva, entretanto outros quirópteros têm importância na transmissão dessa doença (Favi et al., 2003, Oliveira et al., 2010; Fahl et al., 2012). Aproximadamente 25% das espécies de morcegos da América Latina já foram confirmadas com infecção pelo RABV (Salmón-Mulanovich, 2009).

A epidemiologia da raiva no Brasil apresenta heterogeneidade em relação a distribuição dos casos em suas regiões. Entre os anos 2010-2020, a região Nordeste foi responsável por 52,6% (20/38) dos casos humanos registrados no Brasil, a região Norte 39,5% (15/38), Região Sudeste 2,6% (1/38) e região Centro-Oeste 2,6% (1/38) (Wada et al., 2011) e a região Sul 2,6% (1/38) (SVS/MS, 2020).

O Estado de São Paulo pode ser considerado um exemplo positivo no controle da raiva em cães e gatos. A ampla vacinação dos animais associada a medidas de controle de populações de cães e gatos, e o trabalho constante de vigilância epidemiológica resultaram na eliminação da AgV2 circulante em cães no estado. O último caso de raiva humana transmitida por cão foi em 1997 no município de Avanhandava, interior do estado (Takaoka, 2000), e os últimos casos de

raiva em cães e gatos foram registrados em 1998. Entretanto casos de raiva em cães, gatos, herbívoros, animais silvestres e humanos são relatados no Estado de São Paulo e são resultados de infecção por morcegos. O ciclo silvestre da raiva inseriu-se no meio urbano em decorrência da expansão da urbanização e o desmatamento de florestas em várias áreas da região paulista, o que favorece o contato entre morcegos, humanos e animais domésticos (Kotait et al., 2007; Kobayashi et al., 2007).

Kotait et al. (2001), analisaram os casos de raiva em cães e gatos no período de 1998 a 2001 no Estado de São Paulo. Nesse período ocorreram 28 casos de raiva nesses animais e desses, 22 casos foram tipificados antigenicamente, utilizando um painel de anticorpos monoclonais cedidos pelo CDC e 21 foram caracterizados como variante antigênica 3 (AgV3) que circula em morcego *Desmodus rotundus* e no *Artibeus lituratus*. Somente um caso foi caracterizado como AgV2 que circula em cães, sendo esse o último caso que ocorreu no estado, no município de Guararapes em 1998.

No período de 2002 a 2016, foram registrados no Estado de São Paulo 24 casos positivos de cães (n=8) e gatos (n=16) e em todos os casos a tipificação genética ou antigênica evidenciou a transmissão por morcegos, sendo que em 19 casos, a linhagem encontrada foi compatível com *Desmodus rotundus*/*Artibeus lituratus* (Castilho et al., 2018). Nesse mesmo período também foram registrados 1.061 casos de morcegos positivos para raiva, mostrando a importância do ciclo silvestre na transmissão da raiva para animais domésticos no estado (dados Instituto Pasteur).

2. JUSTIFICATIVA

A linhagem genética *Desmodus rotundus*/*Artibeus lituratus* tem sido tipicamente encontrada em morcego hematófago *Desmodus rotundus*, morcego frugívoro *Artibeus lituratus*, cães e gatos e herbívoros

(Castilho et al. 2018; Carnieli, 2009). A diferenciação entre as linhagens virais destas duas espécies de morcegos ainda não está completamente definida (Fahl et al., 2012), sendo assim, a falta da identificação do animal transmissor, não permite inferir qual morcego foi a fonte de infecção para estes animais, portanto, mais pesquisas neste sentido são necessárias. A linhagem associada ao *Desmodus rotundus* e *Artibeus lituratus* é a mais prevalente nos animais domésticos infectados com raiva, nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (Rocha et al., 2017).

Os casos de raiva humana e animal ocasionados por morcegos se deve ao fato de quirópteros serem os únicos mamíferos com a habilidade de voo, o que lhes permite uma maior mobilidade, além disso algumas espécies possuem capacidade de se adaptar ao ambiente urbano e abrigar-se em habitações humanas, fato que aumenta a probabilidade de contato com humanos e animais domésticos (Uieda et al., 1995).

Outro fator que potencializa a importância dos morcegos na transmissão da raiva e consequentemente problemas na saúde pública se deve à expansão da área urbana em detrimento das áreas verdes, que favorece o contato entre morcegos, humanos e animais domésticos. Isto potencializa o reaparecimento da raiva em áreas urbanas onde encontrava-se sob controle em animais domésticos (Kotait et al., 2007; Kobayashi et al., 2007).

Os *D. rotundus* são noctívagos, estão bem estabelecidos em áreas rurais, normalmente se abrigam em refúgios escuros, úmidos e de difícil acesso e vivem em colônias (Taddei, 1983). Esses morcegos estão distribuídos em toda a América Latina tropical e subtropical, desde o norte do México até o norte da Argentina e Chile (Lee et al., 2012). Nos anos de 2004 e 2005, nos Estado do Pará e Maranhão, houve o primeiro surto de raiva notificado no Brasil, em que esses morcegos foram os principais transmissores de raiva humana, responsáveis por 62 casos. O RABV desse surto foi isolado e caracterizado geneticamente como linhagem *Desmodus rotundus* e antigenicamente como variante 3 (AgV3)

que é comumente encontrada em morcegos hematófagos (Rosa et al., 2006; Castilho et al., 2010). Neste caso, o histórico epidemiológico de mordeduras por morcegos hematófagos nestas populações e a identificação da espécie agressora não geraram dúvidas quanto à fonte de infecção.

Vale ressaltar ainda, que os morcegos hematófagos além de ser um grande problema para saúde pública também ocasionam um grande prejuízo econômico para pecuária dos países da América Latina (Belotto et al., 2005).

Estudos filogenéticos baseados no gene N demonstraram que os RABV encontrados em morcegos do gênero *Artibeus* são próximos filogeneticamente àqueles associados aos morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* (Shoji et al., 2004), sendo todos pertencentes a uma mesma linhagem genética do RABV (Kobayashi et al., 2005).

Nos últimos anos o gênero de morcego frugívoro *Artibeus lituratus*, tem ganhado importância na saúde pública, pois além do número desses animais terem aumentado nas áreas urbanas, eles também apresentam circulando entre eles a linhagem do RABV *Desmodus rotundus* / *Artibeus lituratus*, mantendo este ciclo epidemiológico entre outros morcegos do seu gênero de maneira independente do ciclo mantido pelo morcego hematófago. Vale salientar que ainda não se sabe qual dessas duas espécies é o reservatório original para esta linhagem. Fahl et al. (2012) estudaram geneticamente isolados de RABV de morcegos *Desmodus rotundus* e *Artibeus lituratus* baseados na análise do gene G e N e verificaram uma possível diferenciação desta linhagem em relação a esses morcegos, porém o número amostral e a pouca variabilidade geográfica dos isolados não permitem a confirmação deste achado.

Poucos estudos no Brasil sobre caracterização molecular do RABV em morcegos do gênero *Artibeus* têm sido realizados, entretanto, os mesmos apresentam poucos isolados e são restritos ao Estado de São Paulo e Rio de Janeiro (Shoji et al., 2004; Kobayashi et al., 2007;

Albas et al., 2011; Queiroz et al., 2012; Fahl et al., 2012; Allendorf et al., 2012; Menozzi et al., 2017). Em outros países neotropicais, poucos isolados de RABV do gênero *Artibeus* têm sido caracterizados geneticamente, como no México (Velasco-Villa et al., 2006), na Guiana Francesa (Troupin et al., 2016) e na Colômbia (Calderón et al., 2019), embora estudos sobre a detecção do vírus da raiva nesse gênero de morcego têm sido descrito em diversos países da América Latina e no Caribe (Escobar et al., 2015).

Os morcegos *Artibeus* spp. são predominantemente frugívoros, porém se alimentam também de flores, insetos e folhas. Esses animais são encontrados em países Neotropicais (Shoji et al., 2004; Kobayashi et al., 2005; Velasco-Villa et al., 2006) e são considerados excelentes dispersores de sementes de plantas, pelo fato de levarem alimento ao abrigo (Zortéa, 2007). Por isso são importantes na natureza e protegidos por Lei Federal não sendo passíveis de controle (Da Rosa et al., 2017).

O *Artibeus lituratus* é a espécie de morcego mais bem adaptada a ambientes alterados e urbanos (Bredt et al., 1996), o que demonstra a importância de estudar essa espécie para o melhor entendimento da circulação do RABV nessa espécie e sua importância para a saúde pública. Ele é amplamente distribuído na região Neotropical, ocorrendo desde o México até o Norte da Argentina, Bolívia, Trinidad e Tobago, Pequenas Antilhas, Ilhas Três Marias e em todas as regiões do Brasil (Simmons, 2005). Delpietro et al. (1997) estudaram anticorpos monoclonais (AcM) e relataram que isolados do RABV de morcegos frugívoros *Artibeus lituratus* eram antigenicamente relacionados com a variante de *Desmodus rotundus*.

No entanto, para um melhor entendimento da epidemiologia, filodinâmica e evolução do RABV nessas duas espécies de morcegos de hábitos diferentes, o estudo de genomas virais completos é imprescindível. No Brasil, até o momento, poucos exemplares de sequências genômicas de RABV estão disponíveis no *GenBank*.

Assim sendo, a caracterização molecular por meio do sequenciamento de DNA do genoma completo das linhagens específicas do RABV mantidas por morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* e morcegos frugívoros *Artibeus lituratus* é fundamental para a confirmação da presença dos ciclos endêmicos, estudar o potencial de transmissão interespecífica entre estes reservatórios do RABV e realização de estudos filogenéticos e evolutivos envolvendo estas prováveis sublinhagens dentro da linhagem *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus*, pois esses morcegos estão cada vez mais próximos das populações humanas e animais, e a compreensão da epidemiologia da raiva nestes morcegos é imprescindível para o conhecimento de qual deles é a fonte de infecção do RABV para os animais de estimação, para que dessa forma possam ser estabelecidas medidas de controle efetivas para evitar a disseminação do vírus nas áreas urbanas em que a raiva canina encontra-se controlada.

3. OBJETIVO

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a possibilidade da diferenciação entre a linhagem de RABV *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus* e caracterizá-la geneticamente nestes dois reservatórios.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar os genomas completos das linhagens de RABV *Desmodus rotundus/A. lituratus* isolados de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*, *Artibeus lituratus*, cães, gatos, bovinos e equídeos.
- ✓ Descrever em relação aos códons e aminoácidos as regiões de importância biológica conhecidas dos 5 genes e proteínas dos RABV relacionados à linhagem *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus*.
- ✓ Realizar o estudo filogenético da linhagem *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus*.
- ✓ Avaliar a existência de recombinação entre os RABV isolados destes dois reservatórios (*Desmodus rotundus/Artibeus lituratus*).
- ✓ Estudar a identidade genética dos isolados de RABV, com base no genoma completo e cada um dos genes do RABV separadamente, entre os isolados destes dois reservatórios.
- ✓ Estimar com base nos 5 genes concatenados do RABV o tempo de ancestral comum mais recente (TACMR) para a linhagem *D. rotundus/ A. lituratus*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras

Para execução deste trabalho foram selecionadas 90 amostras de primeira passagem em SNC de camundongos inoculados, conforme estabelecido na rotina de diagnóstico da Seção de Diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur, com quatro amostras de RABV isoladas de *Desmodus rotundus*, duas de cães, duas gatos, 32 de bovinos, dez de equídeos e 40 isolados de RABV de *Artibeus lituratus*, previamente caracterizadas como linhagem genética *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus*. Todas as amostras utilizadas são provenientes do Estado de São Paulo no período de 2006 a 2015 (Quadro 1).

Quadro 1. Amostras utilizadas nesse estudo com ano de isolamento, hospedeiro e localidade.

Amostras	Hospedeiro	Município/Estado
6371/06	Equino	Patrocínio Paulista/SP
5657/06	Bovino	São Carlos/SP
10357/06	Bovino	Socorro/SP
8346/06	Bovino	Joanópolis/SP
2990/06	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto/SP
3869/06	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto/SP
5283/06	<i>Artibeus lituratus</i>	Campinas/SP
4987/06	<i>Desmodus rotundus</i>	Ubatuba/SP
3970/06	<i>Artibeus lituratus</i>	Piracicaba/SP
8532/06	<i>Artibeus lituratus</i>	Campinas/SP
4548/07	Bovino	Socorro/SP
5379/07	Equino	Franca/SP
5730/07	Bovino	Joanópolis/SP
9511/07	Bovino	Pedra Bela/SP
5337/07	<i>Artibeus lituratus</i>	Campinas/SP
6077/07	<i>Desmodus rotundus</i>	Socorro/SP
6521/07	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto/SP
7770/07	<i>Artibeus lituratus</i>	Assis/SP
6784/07	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto/SP
5378/07	Bovino	Franca/SP
1038/08	Equino	Bragança Paulista/SP
1559/08	Bovino	Pedregulho/SP
6312/08	Bovino	Joanópolis/SP
7191/08	Equino	Pedra Bela/SP
6763/08	Bovino	São João da Boa Vista/SP
7329/08	<i>Artibeus lituratus</i>	Piracicaba/SP
7899/08	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto/SP
3604/08	Bovino	Caconde/SP
1692/09	Bovino	São José do Rio Preto/SP
2429/09	Bovino	Divinolândia/SP
3227/09	Bovino	São José do Rio Pardo/SP
4731/09	Bovino	São João da Boa Vista/SP
8622/09	Bovino	Ribeirão Preto/SP
895/09	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto/SP
1110/09	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto/SP
2470/09	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto/SP
2685/09	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto/SP

Quadro 1 (Continuação). Amostras utilizadas nesse estudo com ano de isolamento, hospedeiro e localidade.

Amostras	Hospedeiro	Município/Estado
2939/09	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto/SP
218/10	Bovino	Piracaia/SP
3313/10	Bovino	Franca/SP
2974/10	Muar	Socorro/SP
3959/10	Bovino	Pedregulho/SP
6901/10	Felino	Jaguariúna/SP
2656/10	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto/SP
5731/10	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto/SP
4433/10	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto/SP
1469/11	Bovino	Marília/SP
2461/11	Bovino	São João da Boa Vista/SP
2732/11	Equino	Amparo/SP
6378/11	Bovino	Franca/SP
4611/11	<i>Artibeus lituratus</i>	Campinas/SP
5517/11	<i>Artibeus lituratus</i>	Nova Odessa/SP
5845/11	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto/SP
6041/11	<i>Artibeus lituratus</i>	Herculândia/SP
2009/11	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto/SP
732/12	Bovino	Mococa/SP
763/12	Equino	Amparo/SP
1881/12	Cão	Ribeirão Preto/SP
2023/12	Bovino	Descalvado/SP
4338/12	<i>Artibeus lituratus</i>	Campinas/SP
3234/12	<i>Artibeus lituratus</i>	Campinas/SP
1505/12	Bovino	Amparo/SP
25/13	Bovino	Mococa/SP
113/13	Bovino	Pedregulho/SP
233/13	Bovino	Tambaú/SP
410/13	Bovino	Descalvado/SP
2149/13	<i>Artibeus lituratus</i>	Barretos/SP
2249/13	<i>Artibeus lituratus</i>	Campinas/SP
3247/13	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto
4495/13	<i>Artibeus lituratus</i>	Itapira/SP
4534/1f3	<i>Desmodus rotundus</i>	Campinas/SP
22/14	Equino	Itatiba/SP
255/14	Bovino	Mococa/SP
267/14	Bovino	Patrocínio Paulista/SP

Quadro 1 (Continuação). Amostras utilizadas nesse estudo com ano de isolamento, hospedeiro e localidade.

Amostras	Hospedeiro	Município/Estado
3313/14	Cão	Ribeirão Preto/SP
161/14	<i>Artibeus lituratus</i>	Campinas/SP
1410/14	<i>Desmodus rotundus</i>	Rio Claro/SP
2258/14	<i>Artibeus lituratus</i>	São José Do Rio Pardo/SP
2367/14	<i>Artibeus lituratus</i>	Itapevi/SP
2701/14	<i>Artibeus lituratus</i>	Mogi Guaçu/SP
3235/14	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto/SP
2085/15	Equino	Joanópolis/SP
1486/15	Equino	Jaguaríuna/SP
1382/15	Bovino	Ituverava/SP
3251/15	Felino	Ribeirão Preto/SP
1613/15	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto/SP
2430/15	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto/SP
3595/15	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto/SP
4426/15	<i>Artibeus lituratus</i>	Campinas/SP
4507/15	<i>Artibeus lituratus</i>	Luiz Antônio/SP

4.2. Extração de RNA

Para a extração de RNA total foram utilizados 0,6g do SNC de camundongos previamente inoculados. A extração de RNA total do SNC das amostras estudadas, bem como dos controles positivo (suspensão de cérebros de camundongos inoculados com vírus fixo denominado (*Challenge Virus Standard* – CVS) e negativo (água ultrapura livre de DNase e RNase) foi realizada com o método do TRIzol (Invitrogen™), conforme as instruções do fabricante e ressuspensas em 50µL de água livre de DNase/RNase. Após a extração, o RNA total das 90 amostras foi quantificado no equipamento Nanodrop® para realização da etapa posterior, e em seguida as amostras foram acondicionadas em freezers - 80 °C até o momento de uso.

4.3. Tratamento com DNase e teste controle para depleção de RNA ribossomal do hospedeiro

O RNA total foi tratado com DNase I Livre RNase 2 (2U/ μ L, Ambion), seguindo as instruções do fabricante. Para realização desse tratamento foram utilizadas 6 unidades da enzima para tratar 20 μ g de RNA por 40 min. a 37°C, a fim de eliminar a contaminação do material de interesse (RNA viral) com DNA genômico do hospedeiro. Após os 40 min., foi adicionado 150 μ L de água livre de DNase/RNase, completando dessa forma o volume total de 250 μ L, para reduzir a perda do RNA. Em seguida foi realizado vórtex e spin e adicionado 250 μ L de *UltraPure – Buffer Saturated Phenol* (Invitrogen), sendo essa mistura centrifugada durante 5 min. na velocidade de 12.000g. Durante a centrifugação foi preparada a mistura Fenol/Clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 25:24:1 (125uL de fenol, 120uL de clorofórmio e 5uL de álcool isoamílico) e foram distribuídos 250uL dessa mistura em um tubo de 1,5mL. Após a centrifugação foi retirado 250uL da suspensão e foi acrescentado 250uL da mistura Fenol/Clorofórmio/ álcool isoamílico. Após esse procedimento a suspensão foi levemente agitada e centrifugada durante 5 min. na velocidade de 12.000g. Durante a centrifugação foi preparada a mistura clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1 e distribuída em tubos de 1,5mL. Após a centrifugação foi transferido 250uL da suspensão para a mistura preparada acima. Em seguida as amostras foram agitadas e centrifugadas por mais 5 min. na velocidade 12.000g. Após centrifugação, foi preparado tubos de 0,5mL com 25uL de acetato de sódio 3M, e foi adicionado 250uL da suspensão da amostra, seguido de vórtex e spin e por último foi adicionado 250uL de isopropanol. Logo após foi realizado vórtex e spin e essa mistura ficou 1 hora no freezer (-20°C). Após esse período, essa mistura foi centrifugada durante 15 min. a 12.000g, a 4°C. Após a centrifugação foi formado um *pellet* e o sobrenadante foi descartado e adicionado 500uL de etanol 70%, em seguida a amostra foi submetida a vórtex e centrifugada por 5 min. a 12.000g. Foi descartado o sobrenadante e adicionado novamente 500uL de etanol 70%, e novamente submetida a vórtex e centrifugação por 5 min. a 12.000g. Após evaporação do etanol em temperatura ambiente

(até o *pellet* ficar transparente) as amostras foram ressuspensas em 40uL de *Nuclease Free Water* (Promega), submetidas a vórtex e colocados no termobloco a 55°C durante 10 min. Após esse procedimento foi dado *spin* (centrifugação breve) e as amostras foram quantificadas no equipamento Nanodrop® para que uma concentração de 200ng/uL do RNA tratado seja adicionado na etapa seguinte.

Para avaliar a eficiência do tratamento do RNA com DNase foi realizado um teste controle, que consiste em uma reação de PCR simples direcionada ao gene MLH1 de murino, utilizando os *primers* senso - 5' GATGCTTGCAGACTATTTCTC 3' e antisenso - 5' GGTAATCCAATCAGGTTCCC 3', seguindo o protocolo desenvolvido *in house* no Centro de Oncologia Molecular do Hospital Sírio Libanês, conforme descrito a seguir. Como molde para a reação de PCR foi utilizado 200ng/uL do RNA tratado. Como controles positivos da reação foram utilizados dois RNAs de amostras não tratadas e uma amostra de DNA extraída de camundongo, enquanto, como controle negativo, foi utilizada *Nuclease free water* (Promega). A reação foi realizada em presença de tampão 10X, 1,5mM de MgCl₂, 0,05mM de dNTPs, 0,1µM de cada *primer* e 1 unidade de *Taq Platinum DNA polimerase* (Invitrogen). A reação consistiu em 35 ciclos, seguindo a sequência de denaturação a 95°C por 60 segundos, anelamento a 60°C por 1 min. e extensão a 72°C por 1 min. Após a reação todas as amostras foram submetidas a um gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata. Caso o RNA esteja livre de DNA genômico, será observada uma banda de 60pb, por outro lado, caso o material esteja contaminado com DNA genômico, será amplificado um fragmento de 625pb.

4.4. Depleção de RNA ribossomal do hospedeiro

Após a avaliação da eficiência do tratamento do RNA com DNase, foi realizada a depleção do RNA ribossomal do hospedeiro utilizando o *RiboMinus Eukaryote Kit* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Primeiramente foi calculado o volume de amostra para

quantidade de 10ug. Após a adição do RNA das amostras no tubo, foi adicionado 10uL de *Ribominus Eukaryote Probe* e 100uL do *Hybridization Buffer* seguido de vórtex e spin. Após esse processo a amostra foi colocada no termobloco a 72°C durante 5 min. Em seguida, as amostras foram colocadas a temperatura de 37°C durante 30 min. Durante o tempo que a amostra permaneceu no termobloco foi realizado o preparo das *Magnetic beads*. Em um tubo de 1,5mL identificado com o número da amostra foi adicionado 750uL de *Magnetic beads* seguido de spin em cada tubo. Após esse procedimento os tubos foram colocados na estante magnética (DynaMag™ -2 – Invitrogen) durante 1 minuto. Após esse período foi retirado o sobrenadante (suspensão) com ponteira (750uL). Logo após foi adicionado 750uL de *DEPC-Treated Water* (presente no kit), seguido de vórtex (fraco) e spin, e novamente os tubos foram colocados na estante magnética durante 1 min. Foi repetido novamente o mesmo procedimento e após a retirada do tubo da estante magnética foi adicionado 750uL de *Hybridization Buffer*, seguido de vórtex e spin. Depois desse procedimento foram feitas duas alíquotas, uma com 250uL e outra com 500uL, para isso foi transferido 250uL do tubo inicial para outro tubo. O tubo com 500uL após spin, foi colocado na estante magnética durante 1 min. Já o tubo de 250uL foi colocado imediatamente no termobloco a 37°C até o próximo passo. No tubo com 500uL após o período na estante magnética, foi descartado o sobrenadante ainda na estante magnética, e em seguida foi retirado os tubos da estante magnética, adicionado 200uL de *Hybridization Buffer*, e os tubos foram submetidos a spin e mantidos a 37°C até o uso.

Após os 30 min. que o RNA estava hibridizando com a sonda no termobloco, o volume de 120uL do tubo que continha o RNA foi transferido para o tubo com 500uL, seguido de vórtex (fraco) e spin. Esses tubos permaneceram durante 15 min. no termobloco a 37°C, e a cada 5 min. essas amostras foram agitadas. Já o tubo com 250uL (que estava a 37°) foi colocado durante 1 min. na estante magnética e em seguida foi descartado o sobrenadante (250uL) com ponteira ainda na

raque magnética. Todo o conteúdo do tubo (500uL) foi submetido ao tubo de 250uL. Após esse procedimento foi dado vórtex (fraco) e *spin* e os tubos ficaram durante 15 min. a 37°C e cada 5 min. os mesmos foram agitados. Em seguida os tubos foram colocados na estante magnética durante 1 min. e após esse tempo, a suspensão (320uL) foi retirada e colocada em um novo tubo já previamente identificado de 2mL. Todo esse processo foi realizado para a retirada do RNA ribossomal do hospedeiro nas amostras.

Após depleção do RNA ribossomal do hospedeiro, as amostras foram concentradas com o uso de colunas de enriquecimento contidas no *RiboMinus Concentration Module* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Para isso foi adicionado na suspensão de cada amostra 300uL de *Binding Buffer* L3, seguido de vórtex e spin. Em seguida, foi adicionado 900uL de etanol, seguido de vórtex e spin. Após esse procedimento foi feita a identificação dos tubos das colunas presentes no kit e as colunas foram colocadas dentro desses tubos e foram adicionados 800uL dessa mistura e centrifugadas a 12.000g durante 1 min. a temperatura ambiente. Em seguida, foi descartado o conteúdo que passou pela coluna e foram adicionados mais 800uL da suspensão na coluna que foi novamente centrifugada a 12.000g por mais 1 min. O conteúdo foi novamente descartado e foi adicionado 600uL *Wash Buffer* (W5) nas colunas e foram centrifugadas novamente a 12000g durante 1 min., seguido de uma nova centrifugação por mais 2 min. a 12.000g. Após esse procedimento a coluna foi transferida para um novo tubo (final) e foi adicionado 15uL de *Nuclease free water* (presente no kit) e após 1 min. os tubos foram centrifugados durante 1 min. a 12000g. Foi adicionado novamente 15uL de *Nuclease free water* nas colunas e repetido o procedimento. Após o tempo de centrifugação, os tubos foram submetidos a vórtex e spin e todas as amostras foram quantificadas utilizando o *Qubit RNA HS Assay Kit* (Invitrogen) para o cálculo da concentração de massa adequada de RNA das amostras para serem

utilizadas na próxima etapa. Após a quantificação as amostras foram armazenadas -80°C até a sua utilização.

4.5. Transcrição reversa (RT) para obtenção de DNA complementar (cDNA) randômico do RABV e transformação em DNAs randômico fita dupla

Após depleção do RNA ribossomal do hospedeiro, concentração e quantificação do RNA viral do RABV, foi realizada a RT para obtenção do cDNA randômico e transformação em DNAs randômicos fita dupla, utilizando a *Superscript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen) e a *Klenow Fragment*, *exo* – (5U/μL) (Thermoscientific), respectivamente, seguindo as instruções do fabricante. Para realização dessa técnica foram utilizados *primers* randômicos (*Randon Hexamers* – número de catálogo - SO142). Na reação foram utilizados 2uL de *primers* randômicos na concentração de 50ng/uL (Invitrogen), 1uL de dNTPs na concentração de 10mM (Invitrogen) e adicionado o volume de RNA correspondente a massa de 1ug/uL de RNA da amostra, e caso necessário, foi adicionado *Nuclease free water* (Promega) para completar o volume de 10uL. Após a adição de todos esses reagentes, os tubos foram incubados a 65°C durante 5 min., e em seguida colocados imediatamente no gelo durante 2 min. Depois foi adicionado em cada tubo 4uL de 5X *First Strand Buffer*, 1uL de DTT (0,1 M), 1uL de *RnaseOUT* (40u/uL) (Invitrogen) e 1uL de *SuperScript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen). Todas as amostras foram submetidas a umaciclagem no termociclador a 25°C durante 5 min., 50°C durante 60 min. e 70° durante 15 min. Após o término da transcrição reversa foi adicionado 1uL de RNaseH 2U (Invitrogen) em cada amostra, e estas foram incubadas durante 20 min. a 37°C. Após esse processo foi adicionado 0,5uL de *Klenow Fragment*, *exo* (Thermoscientific) em cada amostra para síntese do cDNA dupla fita, e todas as amostras foram colocadas no termociclador a 37°C durante 60 min. e depois a 75°C durante 10 min. Após esse processo, as amostras foram acondicionadas -80°C até o momento de uso.

4.6. Reação em cadeia pela polimerase (PCR) dirigida ao gene N do RABV – PCR controle.

Foi realizada a PCR Controle em todas as amostras para verificação da transcrição reversa randômica dos genomas do RABV, seguindo o protocolo descrito por Oliveira, 2014. Esta reação consistiu em 2,5uL de cDNA, 2,5uL de 10X PCR Buffer, 4uL de dNTPs a 1,25 mM (Invitrogen), 1,25uL dos *primers* Início e Nes-c, 1,25uL de Mgcl₂ 50nM, 12,5 uL de *Nuclease free water* (Promega) e 0,25uL de *Taq DNA polimerase Recombinant* (Invitrogen) para um volume final de 25uL. Foi utilizada na reação um controle positivo (suspensão de cérebro de camundongo inoculado com CVS) e um controle negativo (*Nuclease free water* (Promega)). Após o preparo das reações, as amostras foram levadas ao termociclador e submetidas ao ciclo descrito no Quadro 2.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1 X (0,1M de Tris, 0,09M de ácido bórico em 0,001M de EDTA), contendo brometo de etídeo (0,45mg/mL) na proporção de 7uL para cada 100mL de tampão. Foram consideradas positivas as amostras que resultaram em fragmentos de 360 pares de bases (pb) para o gene N.

Em seguida as amostras foram encaminhadas ao Centro de Oncologia Molecular do hospital Sírio Libanês (Instituição parceira nesse projeto) onde foi realizado o preparo da biblioteca de DNA das amostras e sequenciamento genômico por *Next Generation Sequencing* (NGS) na plataforma *ILLUMINA MISEQ*.

Quadro 2. Ciclo da reação de PCR Controle dirigida ao gene N do RABV para amplificação de um fragmento de 360pb.

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

4.7. Preparo da Biblioteca de DNA das amostras e sequenciamento genômico por Next Generation Sequencing (NGS) no sequenciador *ILLUMINA MISEQ*

4.7.1. Diluição das amostras

Após a diluição, as amostras de cDNA foram quantificadas para a concentração de DNA, utilizando o *Kit Qubit DNA BR* (Invitrogen) e resuspendidos em 25µl q.s.p. em água *DNase RNase free* na concentração de 1 ng/µl de DNA.

4.7.2. Fragmentos, inserção dos adaptadores e neutralização

Para o preparo das bibliotecas de DNA foi usado o *Kit Nextera XT DNA library preparation*, (catálogo – FC-131-1002 - Illumina), conforme as instruções do fabricante. Nesta etapa o DNA foi tagmentado (etiquetado e fragmentado), o qual simultaneamente fragmenta a amostra de DNA e adiciona sequências de adaptadores em suas extremidades, que permitirão que estes fragmentos possam ser amplificados por PCR nos passos subsequentes. O procedimento foi realizado em placas de PCR de 96 poços. Foi utilizado 1ng das amostras já diluídas, nas quais foram adicionados 10µL de *Tagment DNA Buffer* (Illumina) e 5µL de *Amplicon Tagment Mix* (Illumina). A placa foi centrifugada a 280g por 1 min e depois submetida a um termociclador a 55°C por 5 minutos e incubação a 10°C. Assim que a temperatura atingiu

os 10°C na placa, foram adicionados 5µL de *Neutralize Tagment Buffer* (Illumina). A placa foi centrifugada a 280g por 1 min. e em seguida incubada a temperatura ambiente por 5 min..

4.7.3. Amplificação de DNA tagmentado

O DNA já tagmentado foi amplificado por PCR convencional com *primers* complementares aos adaptadores presentes no kit, e ao mesmo tempo foi adicionado um par de Index (barcodes) nas extremidades de cada amostra, permitindo sua identificação de acordo com o protocolo do fabricante

Foram adicionados à placa 15µL de *Nextera PCR Master Mix* (Illumina), 5µL de Index 1 *primers* e 5µL de Index 2 *primers*. A placa foi então centrifugada a 280g por 1 min. e submetida ao termociclador com o seguinte programa: 72°C por 3 min., 95°C por 30 segundos seguido de 12 ciclos de 95°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, uma extensão final a 72°C por 5 min. e incubação a 10°C.

4.7.4. Purificação da Biblioteca de DNA

Nesta etapa foram utilizadas *AMPure XP beads* (A63881 - Beckman Coulter) para purificar a biblioteca de DNA e realizar uma seleção por tamanho, removendo fragmentos curtos da população de bibliotecas.

A placa na qual estavam as bibliotecas foi centrifugada por 1 min. a 280g a 20°C. Em uma nova placa de PCR de 96 poços foram transferidos 50µL de cada biblioteca (uma biblioteca em cada poço) e adicionados 30µL de *AMPure XP beads* (Beckman Coulter). Após esse procedimento a placa foi incubada a temperatura ambiente por 5 min..

Em seguida, a placa foi colocada na estante magnética por 2 min. ou até o clareamento do sobrenadante que foi aspirado. Ainda na estante magnética, a placa então foi lavada com 200µL de etanol 80% e incubada por 30 segundos, sendo o sobrenadante descartado após esta

etapa e o procedimento de lavagem repetido. Após esta etapa, o sobrenadante foi aspirado e a placa submetida a secagem por 15 minutos a temperatura ambiente ainda acoplada à placa magnética.

Após a secagem, a placa foi retirada da estante magnética e foram adicionados 52,5µL de *Resuspension Buffer* (RSB) (Illumina) em cada poço, misturados 10 vezes por meio da pipetagem, a placa foi mantida em temperatura ambiente por 2min.. A placa foi então colocada novamente na estante magnética por 2min. ou até o clareamento do sobrenadante, sendo que ao final desta etapa, 50µL de cada amostra foram transferidos para uma nova placa de PCR de 96 poços.

4.7.5. Normalização das bibliotecas

Cada uma das bibliotecas foi avaliada por *Bioanalyzer (High Sensitivity - Agilent)* tanto em relação a seu perfil de cada biblioteca quanto a concentração. Cada uma das bibliotecas foi então diluída manualmente a 1.5nM fazendo uso do tampão RSB (fornecido no kit). Para o preparo do *pool*, foram usados 5uL de cada biblioteca.

4.8. Amplificação dos *clusters* e sequenciamento por síntese no sequenciador *ILLUMINA MISEQ*

Para o sequenciamento no equipamento *MiSeq* (Illumina) foi usada concentração final de 17pM. Desta forma, 6.8µl, de *pool* de bibliotecas foi adicionado de 6.8uL de NaOH 0.2N, e deixados a temperatura ambiente por 5 min. A seguir, foram adicionados 587uL de tampão HT1 (*MISEQ Reagent kit V2* - Illumina). Para um controle interno da corrida, foi adicionado 5uL do DNA sintético PhiX a 20pM. O *pool* foi desnaturado por 4 minutos a 96°C, colocado no gelo por 5 min. e então carregado no sequenciador.

4.9. Edição das sequências

Os *reads* sequenciados na plataforma *ILLUMINA MISEQ* foram montados no programa *CLC Genomics Workbench* 6, com o uso de uma sequência de referência proveniente de um RABV isolado de um morcego *D. rotundus* (GenBank KM594042.1). Estes *contigs* foram estendidos por mapeamento dos reads à referência com 95% de similaridade e sem abertura de *gaps*, sendo os mesmos avaliados quanto à variabilidade com base no número e qualidade de reads por meio da função *Quality-based Variant Detection* do programa CLC.

As sequências de baixa qualidade foram retiradas da análise e os parâmetros utilizados foram: qualidade de base *phred* igual a 20, cobertura mínima de 100 leituras por sítio, e penalidade para regiões homopoliméricas (redução de qualidade de 30% para cada base adicional).

A sequência de referência utilizada para a montagem dos genomas desse estudo teve seu tamanho inferido indiretamente, pois tratava-se de um sequenciamento de DNA a partir de uma PCR genômica do RABV, e por isso, as regiões de anelamento dos *primers* desta PCR (*primer* senso - 20 primeiros nucleotídeos da região *Leader* e *primer* anti-senso - 21 últimos nucleotídeos da região *Trailer* do RABV) foram retiradas durante a edição dos genomas, que tiveram seus tamanhos finais inferidos com a soma destes 41 nucleotídeos ao tamanho das sequências obtidas. Sendo assim, utilizaremos nesse estudo o mesmo algoritmo para inferir o tamanho dos genomas das sequências que estiverem completas com relação a amostra de referência.

4.10. Análise descritiva das sequências obtidas nesse estudo

A análise descritiva das sequências da linhagem de RABV *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus*, obtidas nesta pesquisa, foi realizada por meio do *software* BioEdit v. 7.0.9.0 (Hall, 1999) usando-se como referência o mesmo isolado citado no item anterior. Nessa análise foi analisada a presença de mutação e marcadores biológicos nos

isolados avaliados. Foi analisado também regiões de importância biológica para o RABV descritas na quarta edição do livro *Rabies* (Wunner & Conzelmann, 2020), utilizando o *software* BioEdit v. 7.0.9.0. Cada região de importância biológica foi analisada manualmente utilizando o alinhamento de cada gene do RABV.

4.11. Alinhamentos

Para a realização das análises filogenéticas descritas a seguir, foram utilizados três alinhamentos diferentes, o primeiro alinhamento é referente aos cinco genes do RABV concatenados e os outros dois referentes a regiões parciais no gene N.

As sequências foram alinhadas com o aplicativo *MUSCLE* por meio do programa MEGA 7 (Kumar et al., 2016), em seguida o alinhamento foi editado manualmente com o programa BioEdit v. 7.0.9.0 (Hall, 1999).

No que diz respeito as sequências correspondentes aos cinco genes do RABV, depois de alinhadas, foram retiradas todas as regiões não codificantes dos RNAs mensageiros de cada um dos cinco genes do RABV e suas regiões intergênicas, e após essa etapa, todas as regiões codificantes de cada um dos genes foram concatenadas em um único passo de leitura e no sentido do genoma viral (N-P-M-G-L), totalizando 10.800 nucleotídeos.

Os melhores modelos de substituição foram selecionados com base no valor corrigido do *Akaike Information Criterion* (AICc) conforme implementado no MEGA 7.0.26.

4.12. Estimativas da taxa de substituição de nucleotídeos por sítio, tempo para o ancestral comum mais recente (TACMR) e estimativas de filogenia

Para estimar as taxas de substituição por sítio por ano e o TACMR para a linhagem *D. rotundus*/ *A. lituratus*, foram utilizadas um total de 84 sequências de todos os cinco genes do RABV concatenados,

sendo 70 delas geradas nesse estudo e as 14 restantes recuperadas do *GenBank*, utilizando-se o programa BEAST v 1.10.4.(Drummond et al., 2012). Árvores filogenéticas com a máxima credibilidade de clados (MCC) foram inferidas para os cinco genes concatenados do RABV utilizando uma abordagem baseada em *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) implementada em *BEAST* v.1.10.4 (Drummond et al., 2012) empregando o modelo *General Time Reversible* (GTR) com taxa de variação gama e uma proporção de sítios invariantes (GTR+ Γ +I) e relógio molecular relaxado não correlato, utilizando uma distribuição probabilística lognormal (Drummond et al., 2006) com o μ (taxa de substituição de nucleotídeos) previamente estimado (Oliveira et al., 2020). A convergência do MCMC foi obtida após 4 execuções independentes com 70 milhões de gerações cada uma, amostrando a cada 70 mil árvores, que foram suficientes para se obter uma amostragem apropriada da estacionariedade do MCMC que foi inspecionada com auxílio do programa Tracer v 1.7.1 (disponível em <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/>), considerando-se suficiente quando os tamanhos amostrais efetivos (ESS) dos parâmetros atingiram valores superiores a 200.

Para testar a recuperação dos mesmos agrupamentos genéticos a partir dos cinco genes do RABV concatenados, foi gerada uma árvore de máxima verossimilhança utilizando o programa GARLI v 0.96 (Zwickl, 2006) que emprega um algoritmo genético estocástico para estimar simultaneamente a melhor topologia, comprimentos de ramos e parâmetros do modelo de substituição empregado que maximizam o valor logarítmico da Verossimilhança (lnL), duas replicações independentes foram executadas sob o modelo de substituição *General Time Reversible* (GTR) com taxa de variação gama e uma proporção de sítios invariantes (GTR+ Γ +I). A replicação com lnL mais alto foi selecionada. Com o objetivo de avaliar o suporte estatístico dos ramos das árvores, foram empregadas mil amostragens não paramétricas de *bootstrap*.

Para a reconstrução filogenética da árvore baseada em 778 nt do gene N (nt 71 ao 848), foi utilizado o método de máxima verossimilhança através do *software* MEGA 7.0.26 (Kumar et al., 2016) com modelo evolutivo Tamura 3 parâmetros com taxa de variação gama pré estimada (T92+ Γ) com 1000 repetições de *bootstrap*, utilizando-se o mesmo alinhamento dos cinco genes do RABV concatenados. Para a reconstrução das árvores filogenéticas com 1281 nt relativos ao gene N do RABV (nt 140 – 1420 em relação ao PV M13215) foram utilizadas 73 sequências do gene N obtidas nesse estudo e 213 sequências obtidas no *GenBank*, totalizando 286 sequências de DNA. Para esta análise foi utilizada a árvore de máxima verossimilhança utilizando o programa GARLI v 0.96 (Zwickl, 2006), em que duas replicações independentes foram executadas sob o modelo de substituição *Hasegawa-Kishino-Yano* com taxa de variação gama (HKY + Γ). A replicação com *likelihood* mais alto foi selecionada com o objetivo de avaliar o suporte estatístico dos ramos das árvores, foram empregadas mil amostragens não paramétricas de *bootstrap*.

4.13. Análise de Recombinação

Para essa análise foi utilizado o alinhamento referente aos cinco genes do RABV concatenados. A detecção de possíveis eventos de recombinação homóloga, identificação de sequências recombinantes e localização de pontos de recombinação foram investigadas por meio dos métodos RDP, GenConv, *Chimaera*, *MaxChi*, *Bootscan*, *SiScan* e 3Seq implementados no programa RDP4 beta 48 (Martin et al., 2010), utilizando-se intervalo de confiança de 95% e correção múltipla de Bonferroni para se evitar resultados falsos positivos.

4.14. Identidades genética e peptídica

A identidade nucleotídica e peptídica média e os valores máximos e mínimos de identidade genética intra e *interclusters*,

calculadas para os cinco genes do RABV concatenados e de cada gene separadamente (N, P, M, G e L) foram calculadas através no programa Excel com base em matrizes de identidade de nucleotídeos e aminoácidos obtida através do programa BioEdit v. 7.0.9.0 (Hall, 1999).

5. RESULTADOS

5.1. Extração de RNA

Das 90 amostras extraídas, o RNA total foi quantificado em ng/uL. As amostras apresentaram uma quantificação que variou de 173,7 a 2596,6 ng/uL (Quadro 3), sendo que a amostra 1881/12 não apresentou quantidade suficiente de RNA e foi excluída do estudo. As demais amostras (89) apresentaram quantidade suficiente para realização da próxima etapa.

Quadro 3. Quantificação em ng/uL no equipamento Nanodrop® do RNA total das 90 amostras após a extração do RNA.

AMOSTRAS/ANO/HOSPEDEIRO	QUANTIFICAÇÃO ng/uL
6371/06/Equino	2573,8
5657/06/Bovino	1134,0
10357/06/Bovino	1936,3
8346/06/Bovino	1033,1
2990/06/ <i>Artibeus lituratus</i>	1100,0
3869/06/ <i>Artibeus lituratus</i>	821,0
5283/06/ <i>Artibeus lituratus</i>	981,0
4987/06/ <i>Desmodus rotundus</i>	894,0
3970/06/ <i>Artibeus lituratus</i>	1120,9
8532/06/ <i>Artibeus lituratus</i>	751,0
4548/07/Bovino	1962,0
5379/07/Equino	1965,5
5730/07/Bovino	749,9
9511/07/Bovino	750,7
5337/07/ <i>Artibeus lituratus</i>	1392,5
6077/07/ <i>Desmodus rotundus</i>	1986,7
6521/07/ <i>Artibeus lituratus</i>	753,3
7770/07/ <i>Artibeus lituratus</i>	509,3
6784/07/ <i>Artibeus lituratus</i>	919,2
5378/07/Bovino	2138,8
1038/08/Equino	3878,3
1559/08/Bovino	799,8
6312/08/Bovino	668,7
7191/08/Equino	856,7
6763/08/Bovino	869,9
7329/08/ <i>Artibeus lituratus</i>	825,1
7899/08/ <i>Artibeus lituratus</i>	979,9
3604/08/Bovino	1551,0
1692/09/Bovino	750,5
2429/09/Bovino	805,3
3227/09/Bovino	1924,8
4731/09/Bovino	1111,7
8622/09/Bovino	850,1
895/09/ <i>Artibeus lituratus</i>	1302,3
1110/09/ <i>Artibeus lituratus</i>	796,2
2470/09/ <i>Artibeus lituratus</i>	1055,2
2685/09/ <i>Artibeus lituratus</i>	770,6
2939/09/ <i>Artibeus lituratus</i>	707,6

Quadro 3 (Continuação). Quantificação em ng/uL no equipamento Nanodrop® do RNA total das 90 amostras após a extração do RNA.

AMOSTRAS/ANO/HOSPEDEIRO	QUANTIFICAÇÃO ng/uL
218/10/Bovino	749,9
3313/10/Bovino	1020,0
2974/10/Muar	1921,1
3959/10/Bovino	1547,1
6901/10/Felino	742,7
2656/10/ <i>Artibeus lituratus</i>	725,5
5731/10/ <i>Artibeus lituratus</i>	580,2
4433/10/ <i>Artibeus lituratus</i>	1136
1469/11/Bovino	868,8
2461/11/Bovino	1140,1
2732/11/Equino	1507,9
6378/11/Bovino	752,1
4611/11/ <i>Artibeus lituratus</i>	1133,3
5517/11/ <i>Artibeus lituratus</i>	740,5
5845/11/ <i>Artibeus lituratus</i>	1028,5
6041/11/ <i>Artibeus lituratus</i>	720,3
2009/11/ <i>Artibeus lituratus</i>	2235,9
732/12/Bovino	2487,5
763/12/Bovino	595,7
1881/12/Cão	173,7
2023/12/Bovino	748,0
4338/12/ <i>Artibeus lituratus</i>	2010,6
3234/12/ <i>Artibeus lituratus</i>	909,5
1505/12/Bovino	2596,6
25/13/Bovino	728,6
113/13/Bovino	1100,7
233/13/Bovino	747,7
410/13/Bovino	1158,0
2149/13/ <i>Artibeus lituratus</i>	2332,3
2249/13/ <i>Artibeus lituratus</i>	1134,9
3247/13/ <i>Artibeus lituratus</i>	753,3
4495/13/ <i>Artibeus lituratus</i>	1851,7
4534/13/ <i>Desmodus rotundus</i>	1660,3
22/14/Equino	739,2
255/14/Bovino	507,1
267/14/Bovino	749,0
3313/14/Cão	762,4
161/14/ <i>Artibeus lituratus</i>	742,7
1410/14/ <i>Desmodus rotundus</i>	744,0

Quadro 3 (Continuação). Quantificação em ng/uL no equipamento Nanodrop® do RNA total das 90 amostras após a extração do RNA.

AMOSTRAS/ANO/HOSPEDEIRO	QUANTIFICAÇÃO ng/uL
2258/14/ <i>Artibeus lituratus</i>	1240,8
2367/14/ <i>Artibeus lituratus</i>	1486,2
2701/14/ <i>Artibeus lituratus</i>	1106,3
3235/14/ <i>Artibeus lituratus</i>	2125,6
2085/15/Bovino	1414,9
1486/15/Equino	1170,8
1382/15/Bovino	754,5
3251/15/Felino	391,0
1613/15/ <i>Artibeus lituratus</i>	525,4
2430/15/ <i>Artibeus lituratus</i>	1586,1
3595/15/ <i>Artibeus lituratus</i>	1080,7
4426/15/ <i>Artibeus lituratus</i>	811,4
4507/15/ <i>Artibeus lituratus</i>	1415,1

5.2. Tratamento com DNAase e teste controle para depleção de RNA ribossomal do hospedeiro

Após tratamento do RNA total das amostras com DNAse I Livre RNAse 2 (Ambion) as 89 amostras foram quantificadas e os resultados estão apresentados no Quadro 4. Todas as amostras apresentaram quantidades suficientes de RNA para realização do teste controle, variando de 681,4 a 2246,9ng/uL.

Quadro 4. Quantificação em ng/uL no equipamento Nanodrop® do RNA das 89 amostras após o tratamento com a DNase.

AMOSTRAS/ANO/HOSPEDEIRO	QUANTIFICAÇÃO ng/uL
6371/06/Equino	950,9
5657/06/Bovino	1572,2
10357/06/Bovino	1066,6
8346/06/Bovino	1065,2
2990/06/ <i>Artibeus lituratus</i>	893,8
3869/06/ <i>Artibeus lituratus</i>	1505,6
5283/06/ <i>Artibeus lituratus</i>	1697,7
4987/06/ <i>Desmodus rotundus</i>	1320,8
3970/06/ <i>Artibeus lituratus</i>	1881,3
8532/06/ <i>Artibeus lituratus</i>	1474,1
4548/07/Bovino	1408,1
5379/07/Equino	2184,9
5730/07/Bovino	1466,4
9511/07/Bovino	1807,1
5337/07/ <i>Artibeus lituratus</i>	1503,5
6077/07/ <i>Desmodus rotundus</i>	1409,3
6521/07/ <i>Artibeus lituratus</i>	1557,4
7770/07/ <i>Artibeus lituratus</i>	799,5
6784/07/ <i>Artibeus lituratus</i>	1675,2
5378/07/Bovino	985,7
1038/08/Equino	1546,5
1559/08/Bovino	1588,1
6312/08/Bovino	1213,8
7191/08/Equino	1815,3
6763/08/Bovino	1607,0
7329/08/ <i>Artibeus lituratus</i>	1885,4
7899/08/ <i>Artibeus lituratus</i>	1695,3
3604/08/Bovino	2004,4
1692/09/Bovino	1709,9
2429/09/Bovino	1761,7
3227/09/Bovino	894,7
4731/09/Bovino	1771,6
8622/09/Bovino	1694,8
895/09/ <i>Artibeus lituratus</i>	1623,7
1110/09/ <i>Artibeus lituratus</i>	1945,8
2470/09/ <i>Artibeus lituratus</i>	1838,6
2685/09/ <i>Artibeus lituratus</i>	1762,7
2939/09/ <i>Artibeus lituratus</i>	1373,3

Quadro 4 (Continuação). Quantificação em ng/uL no equipamento Nanodrop® do RNA das 89 amostras após o tratamento com a DNase.

AMOSTRAS/ANO/HOSPEDEIRO	QUANTIFICAÇÃO ng/uL
218/10/Bovino	1604,6
3313/10/Bovino	1898,1
2974/10/Muar	1050,8
3959/10/Bovino	1721,6
6901/10/Felino	1496,0
2656/10/ <i>Artibeus lituratus</i>	2246,9
5731/10/ <i>Artibeus lituratus</i>	1207,2
4433/10/ <i>Artibeus lituratus</i>	1712,8
1469/11/Bovino	1676,2
2461/11/Bovino	1717,6
2732/11/Equino	1613,7
6378/11/Bovino	1491,6
4611/11/ <i>Artibeus lituratus</i>	1690,7
5517/11/ <i>Artibeus lituratus</i>	1907,3
5845/11/ <i>Artibeus lituratus</i>	1894,7
6041/11/ <i>Artibeus lituratus</i>	1878,2
2009/11/ <i>Artibeus lituratus</i>	1182,6
732/12/Bovino	1892,5
763/12/Bovino	970,0
2023/12/Bovino	1595,8
4338/12/ <i>Artibeus lituratus</i>	1813,2
3234/12/ <i>Artibeus lituratus</i>	1996,8
1505/12/Bovino	1363,10
25/13/Bovino	1195,8
113/13/Bovino	2044,5
233/13/Bovino	2009,09
410/13/Bovino	1939,6
2149/13/ <i>Artibeus lituratus</i>	1492,2
2249/13/ <i>Artibeus lituratus</i>	1734,3
3247/13/ <i>Artibeus lituratus</i>	1742,3
4495/13/ <i>Artibeus lituratus</i>	1969,7
4534/13/ <i>Desmodus rotundus</i>	2134,8
22/14/Equino	1351,4
255/14/Bovino	1171,2
267/14/Bovino	1846,7
3313/14/Cão	2199,2
161/14/ <i>Artibeus lituratus</i>	1962,0
1410/14/ <i>Desmodus rotundus</i>	2010,3
2258/14/ <i>Artibeus lituratus</i>	1781,3

Quadro 4 (Continuação). Quantificação em ng/uL no equipamento Nanodrop® do RNA das 89 amostras após o tratamento com a DNase.

AMOSTRAS/ANO/HOSPEDEIRO	QUANTIFICAÇÃO ng/uL
2367/14/ <i>Artibeus lituratus</i>	1722,7
2701/14/ <i>Artibeus lituratus</i>	1482,6
3235/14/ <i>Artibeus lituratus</i>	1268,4
2085/15/Bovino	1423,7
1486/15/Equino	1617,8
1382/15/Bovino	1717,3
3251/15/Felino	1782,2
1613/15/ <i>Artibeus lituratus</i>	681,4
2430/15/ <i>Artibeus lituratus</i>	1810,6
3595/15/ <i>Artibeus lituratus</i>	1377,6
4426/15/ <i>Artibeus lituratus</i>	1896,3
4507/15/ <i>Artibeus lituratus</i>	1208,3

Após quantificação, foi realizado o teste controle para verificar se o RNA das amostras estava livre de DNA genômico. Todas as amostras foram submetidas a um gel de poliacrilamida e foi observada uma banda de 60pb (Figura 4), mostrando que o RNA de todas as amostras não continha DNA genômico. Os controles positivos da reação sendo dois RNAs de uma amostra não tratada e uma amostra de DNA extraída de camundongo amplificaram um fragmento de 625pb (Figura 4). Por outro lado, o controle negativo *Nuclease free water* (Promega) amplificou um fragmento de 60pb (Figura 4).

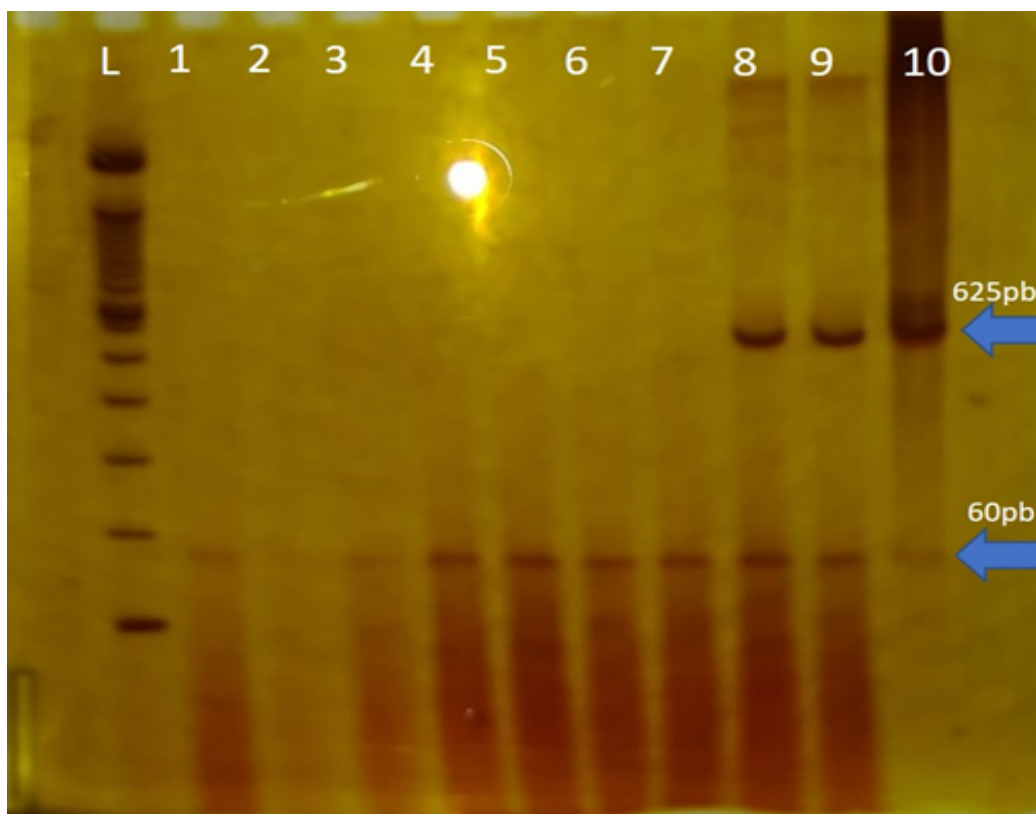


Figura 4. Fotografia de gel de poliacrilamida corada com nitrato de prata, mostrando o resultado do fragmento esperado (60pb) no tratamento com DNase de algumas amostras (1 a 6). Legenda: L *ladder*, 1 – isolado de equino (2085/15), 2 – isolado de *Artibeus lituratus* (4611/11), 3 – isolado de *Desmodus rotundus* (4987/06), 4 – isolado de bovino (3604/08), 5 – isolado de bovino (5378/07), 6 – isolado de bovino (1505/12), 7 – controle negativo (*Nuclease free water*), e controles positivos (8 – isolado de equino sem tratamento com DNase (2085/15), 9 – isolado de *Artibeus lituratus* sem tratamento com DNase, 10 – amostra de DNA extraída de camundongo).

5.3. Depleção de RNA ribossomal do hospedeiro

Após o procedimento para depleção do RNA ribossomal do hospedeiro e concentração do RNA genômico do RABV, as amostras foram quantificadas utilizando o *Qubit RNA HS Assay Kit* (Invitrogen) para o cálculo da concentração de massa adequada de RNA que será utilizada na transcrição reversa para obtenção de cDNA randômico do RABV e transformação em DNAs randômico fita dupla. Os resultados da quantificação das amostras são apresentados no Quadro 5. A quantificação das amostras variou de 29,3 a 407ng/uL, sendo considerada quantidade suficiente para realização do teste controle para depleção ribossomal.

Quadro 5. Amostras quantificadas no equipamneto Qubit após a depleção ribossomal. Quantificação em ng/uL realizada no Qubit das 89 amostras após depleção do RNA ribossomal e concentração do RNA genômico do RABV.

AMOSTRAS/ANO/HOSPEDEIRO	QUANTIFICAÇÃO ng/uL
6371/06/Equino	120
5657/06/Bovino	110
10357/06/Bovino	130
8346/06/Bovino	140
2990/06/ <i>Artibeus lituratus</i>	120
3869/06/ <i>Artibeus lituratus</i>	110
5283/06/ <i>Artibeus lituratus</i>	130
4987/06/ <i>Desmodus rotundus</i>	130
3970/06/ <i>Artibeus lituratus</i>	120
8532/06/ <i>Artibeus lituratus</i>	150
4548/07/Bovino	160
5379/07/Equino	120
5730/07/Bovino	120
9511/07/Bovino	130
5337/07/ <i>Artibeus lituratus</i>	98,2
6077/07/ <i>Desmodus rotundus</i>	130
6521/07/ <i>Artibeus lituratus</i>	150
7770/07/ <i>Artibeus lituratus</i>	150
6784/07/ <i>Artibeus lituratus</i>	180
5378/07/Bovino	211
1038/08/Equino	130
1559/08/Bovino	130
6312/08/Bovino	321
7191/08/Equino	140
6763/08/Bovino	170
7329/08/ <i>Artibeus lituratus</i>	160
7899/08/ <i>Artibeus lituratus</i>	180
3604/08/Bovino	258
1692/09/Bovino	180
2429/09/Bovino	190
3227/09/Bovino	130
4731/09/Bovino	150
8622/09/Bovino	180
895/09/ <i>Artibeus lituratus</i>	150
1110/09/ <i>Artibeus lituratus</i>	223
2470/09/ <i>Artibeus lituratus</i>	210,3
2685/09/ <i>Artibeus lituratus</i>	350
2939/09/ <i>Artibeus lituratus</i>	163
218/10/Bovino	209

Quadro 5 (Continuação). Amostras quantificadas no equipamento Qubit após a depleção ribossomal. Quantificação em ng/uL realizada no Qubit das 89 amostras após depleção do RNA ribossomal e concentração do RNA genômico do RABV.

AMOSTRAS/ANO/HOSPEDEIRO	QUANTIFICAÇÃO ng/uL
3313/10/Bovino	213
2974/10/Muar	296
3959/10/Bovino	316
6901/10/Felino	307
2656/10/ <i>Artibeus lituratus</i>	401
5731/10/ <i>Artibeus lituratus</i>	295
4433/10/ <i>Artibeus lituratus</i>	333
1469/11/Bovino	349
2461/11/Bovino	168
2732/11/Equino	251
6378/11/Bovino	305
4611/11/ <i>Artibeus lituratus</i>	233
5517/11/ <i>Artibeus lituratus</i>	242
5845/11/ <i>Artibeus lituratus</i>	223
6041/11/ <i>Artibeus lituratus</i>	38,8
2009/11/ <i>Artibeus lituratus</i>	38,1
732/12/Bovino	29,3
763/12/Bovino	46,3
2023/12/Bovino	221
4338/12/ <i>Artibeus lituratus</i>	264
3234/12/ <i>Artibeus lituratus</i>	303
1505/12/Bovino	130
25/13/Bovino	376
113/13/Bovino	333
233/13/Bovino	282
410/13/Bovino	253,0
2149/13/ <i>Artibeus lituratus</i>	268,0
2249/13/ <i>Artibeus lituratus</i>	264,0
3247/13/ <i>Artibeus lituratus</i>	333,0
4495/13/ <i>Artibeus lituratus</i>	311,0
4534/13/ <i>Desmodus rotundus</i>	351,0
22/14/Equino	369,0
255/14/Bovino	339,0
267/14/Bovino	362,0
3313/14/Cão	380,0
161/14/ <i>Artibeus lituratus</i>	407,0
1410/14/ <i>Desmodus rotundus</i>	382,0
2258/14/ <i>Artibeus lituratus</i>	377,0
2367/14/ <i>Artibeus lituratus</i>	276,0

Quadro 5 (Continuação). Amostras quantificadas no equipamento Qubit após a depleção ribossomal. Quantificação em ng/uL realizada no Qubit das 89 amostras após depleção do RNA ribossomal e concentração do RNA genômico do RABV.

AMOSTRAS/ANO/HOSPEDEIRO	QUANTIFICAÇÃO ng/uL
2701/14/ <i>Artibeus lituratus</i>	373,0
3235/14/ <i>Artibeus lituratus</i>	500,0
2085/15/Bovino	267,0
1486/15/Equino	315,0
1382/15/Bovino	262,0
3251/15/Felino	276,0
1613/15/ <i>Artibeus lituratus</i>	170,0
2430/15/ <i>Artibeus lituratus</i>	329,0
3595/15/ <i>Artibeus lituratus</i>	437,0
4426/15/ <i>Artibeus lituratus</i>	263,0
4507/15/ <i>Artibeus lituratus</i>	267,0

5.4. Transcrição reversa (RT) para obtenção de DNA complementar (cDNA) randômico do RABV e transformação em DNAs randômico fita dupla

Foi realizada a transcrição reversa para obtenção de cDNA randômico do RABV e transformação em DNAs randômico fita dupla.

5.5. Reação em cadeia pela polimerase (PCR) dirigida ao gene N do RABV – PCR controle.

foi realizado uma PCR (Controle) dirigida ao gene N do RABV para verificar se ocorreu o processo de transcrição do genoma do RABV. Nota-se na Figura 5 que das 89 amostras que foram submetidas a reação, 88 foram consideradas viáveis para a realização das próximas etapas, ou seja, nessas amostras a transcrição do RABV foi realizada com sucesso, sendo amplificado na PCR Controle um fragmento esperado de 360 pb. Apenas duas amostras não apresentaram banda no local esperado: a amostra 20 (1559/08) e a amostra 85 (4507/15) não apresentaram banda (Figura 4), entretanto, somente a amostra 20 (1559/08) foi excluída, enquanto a amostra 85 (4507/15) foi mantida no estudo pois a ausência de banda foi devido a constatação de evaporação da amostra durante a reação de PCR. Vale ressaltar que o controle

positivo (CVS - amostra 90) apresentou um fragmento de 360pb, enquanto o controle negativo (*Nuclease free water* - amostra 91) não amplificou conforme o esperado (Figura 5).

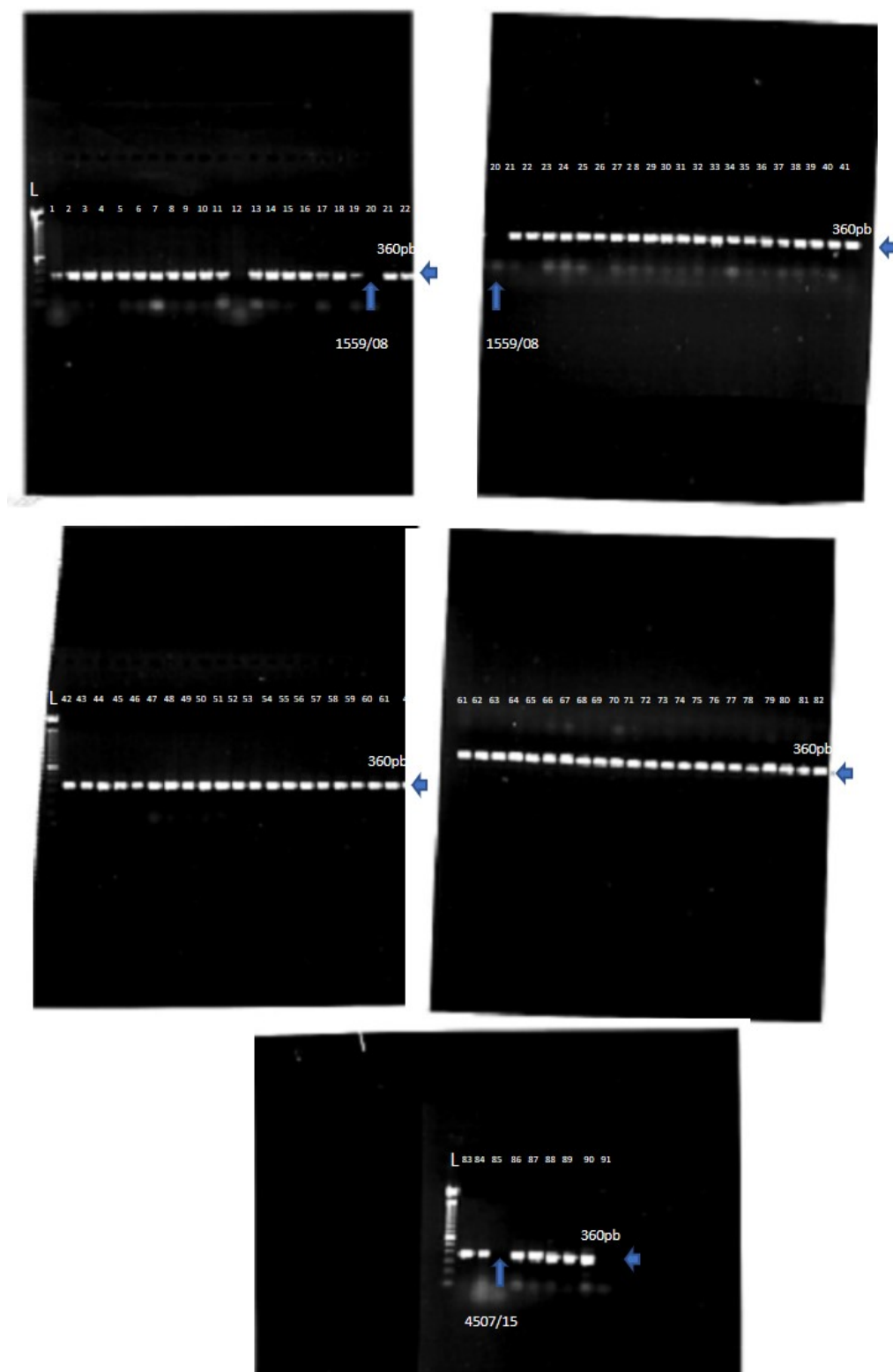


Figura 5. Fotografia de gel de agarose corada com brometo de etídeo, mostrando o resultado do fragmento de 360pb direcionado ao gene N conforme esperado na reação da PCR Controle. Legenda: L- ladder, do 1 ao 89 – amostras utilizadas nesse estudo, 90 – controle positivo (CVS) e 91 - controle negativo (Nuclease free water).

5.6. Preparo da Biblioteca de DNA das amostras e sequenciamento genômico por *Next Generation Sequencing* (NGS) no sequenciador *ILLUMINA MISEQ*

5.6.1. Diluição das amostras

Foi realizado um piloto do preparo da biblioteca com quatro amostras: 1 -6371/06, 4 - 2990/06, 6 - 5283/06 e 29 - 4731/09. As amostras de cDNA foram quantificadas utilizando o *Kit Qubit DNA BR* (Invitrogen) conforme descrito no Quadro 6. Os cDNAs foram diluídos e foi usado 1ng de cada amostra no preparo das bibliotecas.

Já no Quadro 7 estão descritos os valores de concentração de DNA das demais amostras após a purificação.

Quadro 6. Amostras quantificadas no Qubit após a diluição em ng/uL.

Número	AMOSTRAS	cDNA HSL (ng/uL)
1	6371/06	10
4	2990/06	11,1
6	5283/06	10,7
29	4731/09	15,9

Quadro 7. Amostras quantificadas no Qubit após a diluição em ng/uL.

Número	Amostras	cDNA HSL (ng/uL)	Diluição 1:10	1ng (uL)	Vol. qsp 5 (H2O)	Diluição 1:5	1ng (uL)	Vol. qsp 5 (H2O)
2	10357/06	7,25	0,725	1,4	3,6			
3	8346/06	5,14	0,514	1,9	3,1			
5	3869/06	9,43	0,943	1,1	3,9			
7	4987/06	6,95	0,695	1,4	3,6			
8	3970/06	9,1	0,91	1,1	3,9			
9	8532/06	3,17	0,317	3,2	1,8			
10	4548/07	1,87	-	-	-	0,374	2,7	2,3
11	5379/07	4,79	0,479	2,1	2,9			
12	5730/07	7,07	0,707	1,4	3,6			
13	9511/07	4,54	0,454	2,2	2,8			
14	5337/07	8,53	0,853	1,2	3,8			
15	6077/07	2,96	0,296	3,4	1,6			
16	6521/07	2,75	0,275	3,6	1,4			
17	7770/07	1,31	-	-	-	0,262	3,8	1,2
18	6784/07	3,28	0,328	3,0	2,0			
19	1038/08	5,02	0,502	2,0	3,0			
21	895/09	5,49	0,549	1,8	3,2			
22	7191/08	5,04	0,504	2,0	3,0			
23	6763/08	5,52	0,552	1,8	3,2			
24	7329/08	2,49	0,249	4,0	1,0			
25	7899/08	5,11	0,511	2,0	3,0			
26	1692/09	4,51	0,451	2,2	2,8			

Quadro 7 (Continuação). Amostras quantificadas no Qubit após a diluição em ng/uL.

Número	Amostras	cDNA HSL (ng/uL)	Diluição 1:10	1ng (uL)	Vol. qsp 5 (H2O)	Diluição 1:5	1ng (uL)	Vol. qsp 5 (H2O)
27	2429/09	4,15	0,415	2,4	2,6			
28	3227/09	5,62	0,562	1,8	3,2			
30	8622/09	3,25	0,325	3,1	1,9			
31	1110/09	4,28	0,428	2,3	2,7			
32	2470/09	4,55	0,455	2,2	2,8			
33	2685/09	2,58	0,258	3,9	1,1			
34	2939/09	5,43	0,543	1,8	3,2			
35	218/10	3,54	0,354	2,8	2,2			
36	3313/10	3,7	0,37	2,7	2,3			
37	2974/10	2,92	0,292	3,4	1,6			
38	3959/10	2,9	0,29	3,4	1,6			
39	6901/10	3,24	0,324	3,1	1,9			
40	2656/10	2,04	0,204	4,9	0,1			
41	5731/10	3,44	0,344	2,9	2,1			
42	4433/10	2,82	0,282	3,5	1,5			
43	1469/11	2,98	0,298	3,4	1,6			
44	2461/11	5,36	0,536	1,9	3,1			
45	2732/11	3,11	0,311	3,2	1,8			
46	6378/11	2,18	0,218	4,6	0,4			
47	4611/11	6,17	0,617	1,6	3,4			
48	5517/11	5,04	0,504	2,0	3,0			

Quadro 7 (Continuação). Amostras quantificadas no Qubit após a diluição em ng/uL.

Número	Amostras	cDNA HSL (ng/uL)	Diluição 1:10	1ng (uL)	Vol. qsp 5 (H2O)	Diluição 1:5	1ng (uL)	Vol. qsp 5 (H2O)
49	5845/11	4,8	0,48	2,1	2,9			
50	2023/12	4,79	0,479	2,1	2,9			
51	4338/12	5,31	0,531	1,9	3,1			
52	3234/12	4,72	0,472	2,1	2,9			
53	1505/12	7,61	0,761	1,3	3,7			
54	25/13	2,12	0,212	4,7	0,3			
55	113/13	3,52	0,352	2,8	2,2			
56	233/13	4,74	0,474	2,1	2,9			
57	1382/15	5,14	0,514	1,9	3,1			
58	5657/06	3,4	0,34	2,9	2,1			
59	5378/07	3,87	0,387	2,6	2,4			
60	6312/08	3,14	0,314	3,2	1,8			
61	410/13	5,39	0,539	1,9	3,1			
62	2149/13	2,88	0,288	3,5	1,5			
63	2249/13	3,14	0,314	3,2	1,8			
64	3247/13	2,52	0,252	4,0	1,0			
65	4495/13	2,64	0,264	3,8	1,2			
66	4534/13	2,28	0,228	4,4	0,6			
67	22/14	1,14	-	-	-	0,228	4,4	0,6
68	255/14	2,31	0,231	4,3	0,7			
69	267/14	2,07	0,207	4,8	0,2			

Quadro 7 (Continuação). Amostras quantificadas no Qubit após a diluição em ng/uL.

Número	Amostras	cDNA HSL (ng/uL)	Diluição 1:10	1ng (uL)	Vol. qsp 5 (H2O)	Diluição 1:5	1ng (uL)	Vol. qsp 5 (H2O)
70	3313/14	2,01	0,201	5,0	0,0			
71	161/14	1,39	-	-	-	0,278	3,6	1,4
72	1410/14	2,64	0,264	3,8	1,2			
73	2258/14	2,23	0,223	4,5	0,5			
74	2367/14	3	0,3	3,3	1,7			
75	2701/14	2,22	0,222	4,5	0,5			
76	3235/14	1,36	-	-	-	0,272	3,7	1,3
77	2085/15	3,5	0,35	2,9	2,1			
78	1486/15	3,24	0,324	3,1	1,9			
79	732/12	5,5	0,55	1,8	3,2			
80	3251/15	1,46	-	-	-	0,292	3,4	1,6
81	1613/15	1,05	-	-	-	0,21	4,8	0,2
82	2430/15	2,87	0,287	3,5	1,5			
83	3595/15	1,2	-	-	-	0,24	4,2	0,8
84	4426/15	3,96	0,396	2,5	2,5			
85	4507/15	3,84	0,384	2,6	2,4			
86	3604/08	2,34	0,234	4,3	0,7			
87	6041/11	3,62	0,362	2,8	2,2			
88	2009/11	3,42	0,342	2,9	2,1			
89	763/12	2,95	0,295	3,4	1,6			

5.6.2. Fragmentos, inserção dos adaptadores e neutralização

Após a purificação, o DNA foi tagmentado (etiquetado e fragmentado), o qual simultaneamente fragmenta a amostra de DNA e adiciona sequências de adaptadores em suas extremidades, primeiramente esse procedimento foi realizado com quatro amostras: 1 - 6371/06, 4 - 2990/06, 6 - 5283/06 e 29 - 4731/09, utilizadas como piloto, posteriormente esse procedimento foi realizado com as demais amostras.

5.6.3. Amplificação

O DNA já tagmentado foi amplificado por PCR convencional com *primers* complementares aos adaptadores, ao mesmo tempo em foi adicionado um par de Index (barcodes) nas extremidades de cada amostra, permitindo sua identificação. Primeiramente esse procedimento foi realizado com quatro amostras: 1 - 6371/06, 4 - 2990/06, 6 - 5283/06 e 29 - 4731/09, como parte do piloto. As demais amostras foram realizadas posteriormente.

5.6.4. Purificação das bibliotecas de DNA

Nesta etapa foram purificadas as bibliotecas de DNA e foi realizada uma seleção por tamanho, removendo fragmentos curtos da população de bibliotecas. Primeiramente esse procedimento foi realizado com quatro amostras: 1 - 6371/06, 4 - 2990/06, 6 - 5283/06 e 29 - 4731/09, como parte do piloto. As demais amostras foram realizadas posteriormente.

5.6.5. Normalização das bibliotecas

Cada uma das bibliotecas foi avaliada por *Bioanalyzer (High Sensitivity - Agilent)* tanto em relação a seu perfil quanto a concentração. Primeiramente esse procedimento foi realizado com as quatro amostras piloto: 1 - 6371/06, 4 - 2990/06, 6 - 5283/06 e 29 - 4731/09, e o perfil da curva, o qual representa o perfil de tamanho de pares de base das moléculas da biblioteca estão ilustrados na Figura 6.

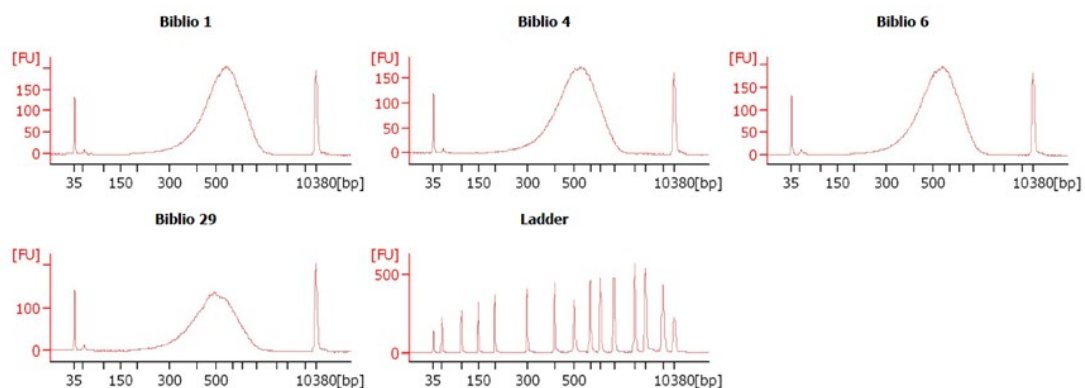


Figura 6. Perfil dos tamanhos de pares de bases das moléculas da biblioteca, amostras: 1 - 6371/06, 4 - 2990/06, 6 - 5283/06 e 29 - 4731/09 e do *Ladder*.

A quantificação de cada biblioteca foi feita individualmente pelo *Bioanalyzer*, conforme o Quadro 8.

Quadro 8. Bibliotecas de cada amostra quantificadas pelo *Bioanalyzer*.

Número	pmol/l
1	6082,8
2	3607
3	3374,2
4	7033,3
5	2940,9
6	6486,8
7	2223,6
8	2424,6
9	2692,5
10	1602,1
11	4761,2
12	4411,3
13	6710,6
14	3024,6
15	3151
16	1883
18	1606,1
19	3742,8
21	2344
22	4349,5
23	2289,7

Quadro 8 (Continuação). Bibliotecas de cada amostra quantificadas pelo Bioanalyzer.

Número	pmol/l (1a)
24	2680,5
25	2769,4
26	3634,7
27	2412,9
28	1879,8
29	5210,5
30	3856,3
31	3375,6
32	3504,5
33	2946,9
34	4197,2
35	2696,3
36	6841,8
37	2615,2
38	3465,9
39	1568,2
40	2816,8
41	2836
42	2068,5
43	2367,3
44	4633,3
45	3817,5
46	1908
47	2952,8
48	2575
49	1961
50	1882,1
51	3377,6
52	2643,9
53	3839,2
54	1738,1
55	1954,3
56	1662,6
57	4488,9
58	2899,5
59	3476,5
60	1608,3
61	5725,9

Quadro 8 (Continuação). Bibliotecas de cada amostra quantificadas pelo Bioanalyzer.

Número	pmol/l
62	2830,9
63	1313,6
64	2237,1
65	1651
66	2259,5
67	4729,4
69	2742,5
71	7040,7
72	3165,3
73	3049,5
74	3471,2
75	1558,3
76	1864,6
77	3005,2
78	1789,9
79	2593,9
80	3095,4
81	3055,4
82	2811,2
83	1104,2
84	3241,7
85	2573,8
86	2240,7
87	2380,7
88	2711
89	3075,6

Após a avaliação pelo *Bioanalyzer* foi possível notar que três amostras: 17 - 7770/07, 70 - 3313/14 e 68 - 255/14 falharam, ou seja, essas amostras não apresentaram moléculas amplificadas e foram excluídas do estudo. Por isso não estão contidas no Quadro 8.

Posteriormente à realização do teste piloto, foi realizada a normalização e agrupamento das demais amostras em um único *pool*, como ilustrado na Figura 7.

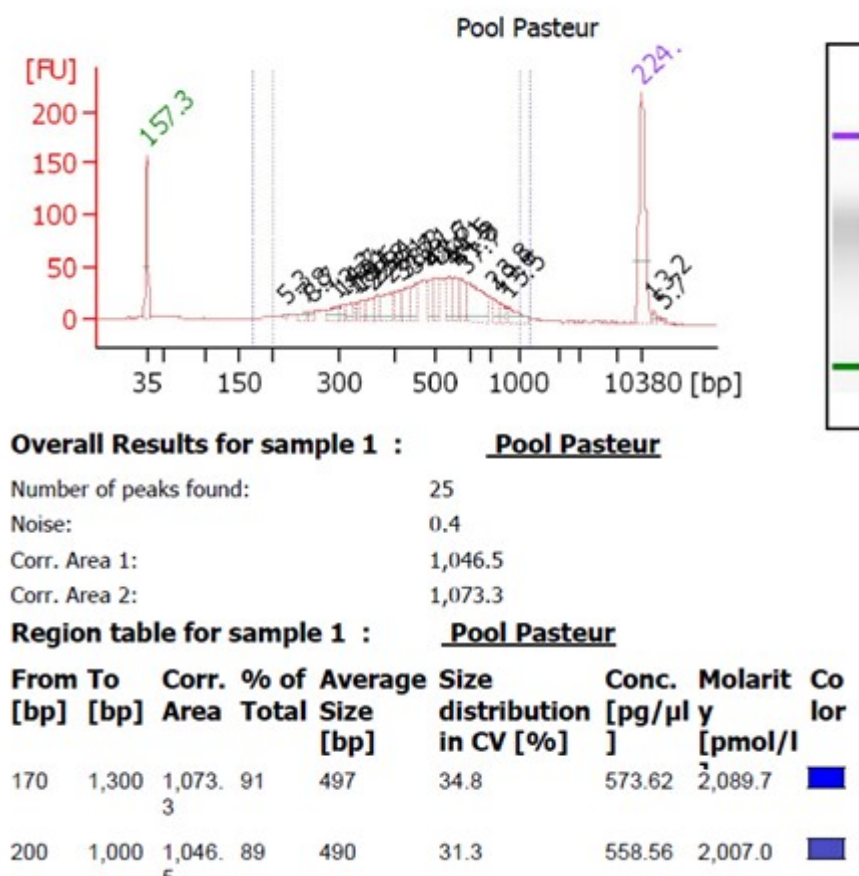


Figura 7. Perfil da curva do pool de todas as amostras em que o pico ficou em torno de 600pb, sendo que o tamanho médio (considerando a área) foi de 497 pb.

Com base no perfil da curva do *pool* das amostras demonstrado na Figura 4, nota-se que todas as amostras avaliadas tiveram o perfil esperado pela biblioteca em que são esperados fragmentos de 250 - 100pb e sem evidência de dímeros, conforme descrito no *Check Library Quality* da Agilent Technology.

5.7. Amplificação dos *clusters* e sequenciamento por síntese no sequenciador *Illumina Miseq*

Foram submetidas ao equipamento MiSeq (Illumina) 85 amostras e o resultado das sequências obtidas para cada gene está descrito no Quadro 9.

5.8. Edição de sequências

Devido ao fato da baixa cobertura obtida para algumas regiões do genoma do RABV na reação de sequenciamento por síntese, não foi possível a realização da montagem dos genomas das amostras sequenciadas sem sequência referência (montagem *de novo*). Como já dito em material e métodos, a montagem dos *contigs* foi realizada com a ajuda de uma amostra de referência isolada de *D. rotundus* e as sequências completas em relação a referência tiveram seus genomas inferidos como explicado no item 4.9.

Ao final da edição foram obtidas 24 sequências genômicas, 15 referentes ao reservatório *Artibeus lituratus* e 9 relativas ao reservatório *Desmodus rotundus*, sendo que nos dois grupos, o tamanho das sequências obtidas foi de 11.920.

Foram obtidas 70 sequências de RABV (33 isoladas de *Desmodus. rotundus*, bovinos, equinos e muar e 37 isoladas de *Artibeus lituratus* e felinos) com um fragmento total de 10.800 nucleotídeos contendo todos os cinco genes do RABV concatenados no sentido do seu genoma, sem as regiões não codificante dos RNAs mensageiros e regiões intergênicas.

Com relação a edição de cada gene, foram obtidas 73 sequências relativas ao gene N, 80 relativas ao gene P, 79 do gene M, 81 do gene G e finalmente 81 sequências relativas ao gene L, conforme descrito no Quadro 9.

Quadro 9. Amostras utilizadas nesse estudo com ano de isolamento, hospedeiro e sequências obtidas para cada gene.

Amostra	Hospedeiro	Gene N	Gene P	Gene M	Gene G	Gene L
6371/06	Equino	O*	O*	O*	O*	O*
10357/06	Bovino	O*	O*	O*	O*	O*
8346/06	Bovino	O*	O*	O*	O*	O*
2990/06	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
3869/06	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	NO**	O*
5283/06	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O	O*
4987/06	<i>Desmodus rotundus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
3970/06	<i>Artibeus lituratus</i>	NO**	O*	O*	O*	O*
8532/06	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
4548/07	Bovino	O*	O*	O*	O*	O*
5379/07	Equino	NO**	NO**	NO**	NO**	NO**
5730/07	Bovino	O*	O*	O*	O*	O*
9511/07	Bovino	NO**	O*	O*	O*	O*
5337/07	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
6077/07	<i>Desmodus rotundus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
6521/07	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
6784/07	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
1038/08	Equino	NO**	NO**	NO**	NO**	NO**
895/09	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
7191/08	Equino	O*	O*	O*	O*	O*
6763/08	Bovino	O*	O*	O*	O*	O*
7329/08	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
7899/08	<i>Artibeus lituratus</i>	NO**	O*	O*	O*	NO**
1692/09	Bovino	O*	O*	O*	O*	O
2429/09	Bovino	O*	O*	O*	O*	O
3227/09	Bovino	O*	O*	O*	O*	O
4731/09	Bovino	O*	O*	O*	O*	O
8622/09	Bovino	O*	O*	O*	O*	O*
1110/09	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	NO**	NO**	O*	O*
2470/09	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
2685/09	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
2939/09	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
218/10	Bovino	O*	O*	O*	O*	O*
3313/10	Bovino	NO**	NO**	NO**	O*	O*
2974/10	Muar	O*	O*	O*	O*	O*

O* Sequências obtidas após o sequenciamento

NO** Sequências não obtidas

Quadro 9 (Continuação). Amostras utilizadas nesse estudo com ano de isolamento, hospedeiro e sequências obtidas para cada gene.

Amostra	Hospedeiro	Gene N	Gene P	Gene M	Gene G	Gene L
3959/10	Bovino	O*	O*	O*	O*	O*
6901/10	Felino	O*	O*	O*	O*	O*
2656/10	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
5731/10	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
4433/10	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
1469/11	Bovino	O*	O*	O*	O*	O*
2461/11	Bovino	O*	O*	O*	O*	O*
2732/11	Equino	NO**	O*	NO**	NO**	NO**
6378/11	Bovino	O*	O*	O*	O*	O*
4611/11	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
5517/11	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
5845/11	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
2023/12	Bovino	O*	O*	O*	O*	O*
4338/12	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
3234/12	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
1505/12	Bovino	O*	O*	O*	O*	O*
25/13	Bovino	O*	O*	O*	O*	O*
113/13	Bovino	O*	O*	O*	O*	O*
233/13	Bovino	O*	O*	O*	O*	O*
1382/15	Bovino	NO	O*	O*	O*	O*
5657/06	Bovino	O*	O*	O*	O*	O*
5378/07	Bovino	NO**	NO**	NO**	O*	O*
6312/08	Bovino	O*	O*	O*	O*	O*
410/13	Bovino	O*	O*	O*	O*	O*
2149/13	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
2249/13	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
3247/13	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
4495/13	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
4534/13	<i>Desmodus rotundus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
22/14	Equino	O*	O*	O*	O*	O*
267/14	Bovino	NO**	O*	O*	O*	O*
161/14	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
1410/14	<i>Desmodus rotundus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
2258/14	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
2367/14	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
2701/14	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
3235/14	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
2085/15	Equino	NO**	O	O	O	O

O* Sequências obtidas após o sequenciamento

NO** Sequências não obtidas

Quadro 9 (Continuação). Amostras utilizadas nesse estudo com ano de isolamento, hospedeiro e sequências obtidas para cada gene.

Amostra	Hospedeiro	Gene N	Gene P	Gene M	Gene G	Gene L
1486/15	Equino	O*	O*	O*	O*	O*
732/12	Bovino	NO**	O	O	O	O
3251/15	Felino	O*	O*	O*	O*	O*
1613/15	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
2430/15	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
3595/15	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
4426/15	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
4507/15	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
3604/08	Bovino	NO**	O*	O*	O*	O*
6041/11	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
2009/11	<i>Artibeus lituratus</i>	O*	O*	O*	O*	O*
763/12	Equino	O*	O*	O*	O*	O*

O* Sequências obtidas após o sequenciamento

NO** Sequências não obtidas

5.9. Alinhamentos

As amostras sequenciadas nesse estudo apresentaram quatro regiões intergênicas do RABV: N/P com 2nt, P/M com 5nt, M/G com 5nt e G/L com 24nt. Não foi encontrado nos isolados do RABV a região intergênica G/L com 423nt, conhecida anteriormente como pseudogene, pois a região poli-A7 que marcaria o início do que seria o pseudogene não existe nas sequências analisadas neste estudo (Figura 8).

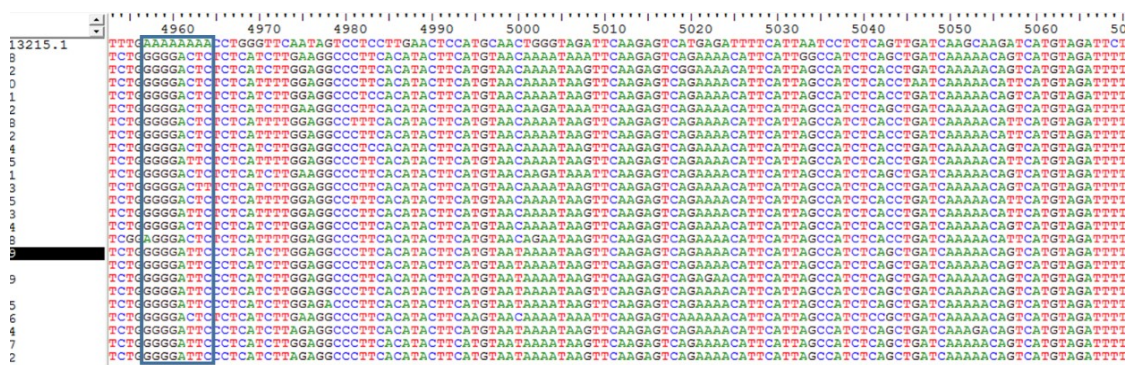


Figura 8. Alinhamento das sequências dos 70 isolados de RABV desse estudo mostrando a cauda poli A existente na amostra PV que marca o início do pseudogene.

Para todos os isolados, observou-se os seguintes tamanhos para cada um dos cinco genes do RABV: Gene N - 1.350 nucleotídeos (450 aminoácidos), Gene P - 891 nucleotídeos (297 aminoácidos), Gene M - 606 nucleotídeos (202 aminoácidos), Gene G - 1572 nucleotídeos (524 aminoácidos) e Gene L - 6.381 nucleotídeos (2.127 aminoácidos).

Na proteína L dos isolados nesse estudo foi observado um menor número de aa (2.127) comparado com a amostra PV (2.142), conforme ilustrado na Figura 9.

foi específico para o grupo Desmodus 1. Na posição 154 houve predomínio do aa. A, o aa. M foi específico para o Grupo Desmodus 1.

Na análise de regiões de importância biológica para proteína G temos o domínio citoplasmático que corresponde aos últimos 44 aa. (462-505) (Gaudin et al., 1992), e foram encontradas quatro substituições específicas para Grupos em quatro posições diferentes. Na posição 473 o aa. G foi evidenciado na maioria dos isolados, no entanto somente o grupo Desmodus 2 apresentou o aa. aspartato (D) em seus isolados. Na posição 478 o aa. E foi o mais prevalente, entretanto o aa. G foi específico para o Grupo Desmodus 1. Na posição 483 houve predomínio do aa. A, mas o aa. V foi específico para o grupo Desmodus 2. Na posição 504 o aa. R foi o mais prevalente e o aa. S foi específico para o grupo Desmodus 2. Na região do domínio transmembrânico da proteína G (439-461), foi encontrada uma substituição específica do grupo Desmodus 2 na posição 439 em que o aa. encontrado foi o R, enquanto os demais isolados apresentaram o aa. K.

Na análise de regiões de importância biológica para proteína L, o triaminoácido GDN que é considerado extremamente conservado (Wunner & Conzelmann, 2020) e está inserido dentro do pentaaminoácido QGDNQ descrito por Poch et al. (1990) foi encontrado nos isolados desse estudo na posição 727-731, e encontrava-se conservado. Vale ressaltar que o triaminoácido GDN também foi encontrado na posição 881-883.

5.10. Estimativas da taxa de substituição de nucleotídeos por sítio, tempo para o ancestral comum mais recente (TACMR) e estimativas de filogenias

Nas Figuras 10, 11 e 12 temos as árvores filogenéticas de máxima verossimilhança e máxima credibilidade de clados obtidas a partir do alinhamento dos cinco genes do RABV concatenados, onde observam-se 84 sequências de DNA, 70 oriundas desse estudo e 14 recuperadas do *GenBank*. Quanto a topologia, as árvores filogenéticas de Máxima Verossimilhança e Máxima Credibilidade de Clados e se mostraram idênticas e com altos valores de posterior e bootstrap respectivamente.

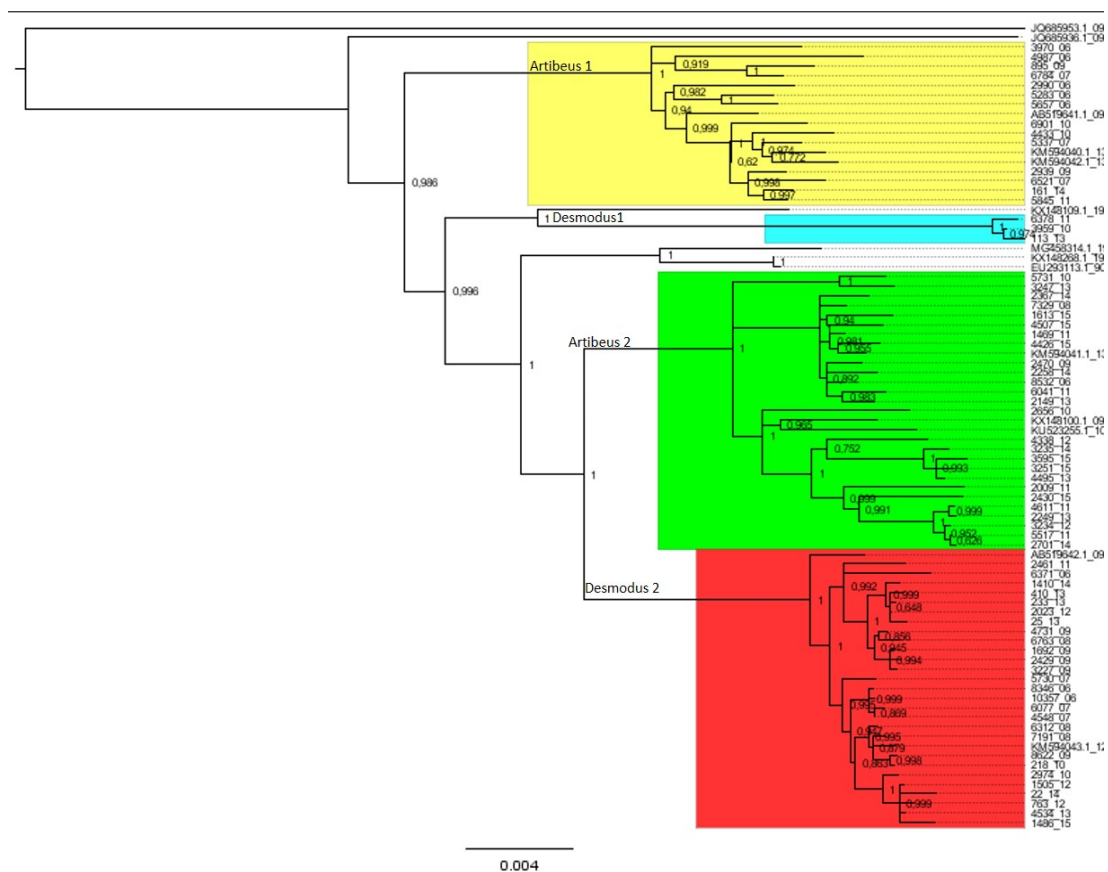


Figura 10. Árvore Filogenética de máxima verossimilhança contendo 84 sequências de isolados do vírus da raiva (70 desse estudo e 14 sequencias obtidas do GenBank) com 10.800 nucleotídeos dos genes N, P, M, G e L concatenados. A árvore foi construída utilizando o modelo evolutivo GTR I + G através do software Garli 0.96.

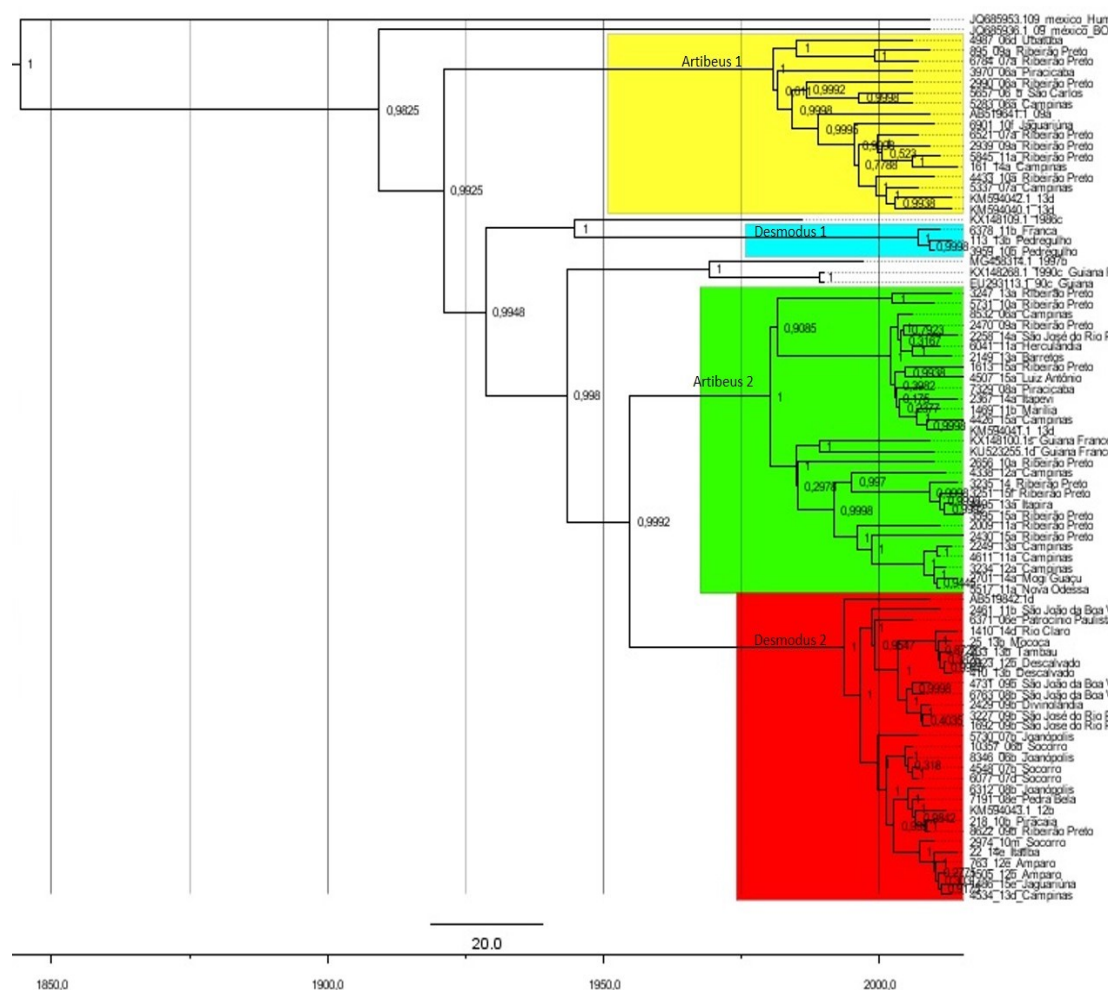


Figura 11. Árvore de máxima credibilidade de clados inferida a partir dos genes N-P-M-G-L concatenados com respectivos valores de posterior obtidos para cada nó. Os ramos são calibrados de acordo com o ano de isolamento da linhagem. A escala na parte inferior do gráfico está em anos e pode ser usada para identificar quando ocorrem os eventos de separação entre a sublinhagem de RABV *D. rotundus* / *A. lituratus*.

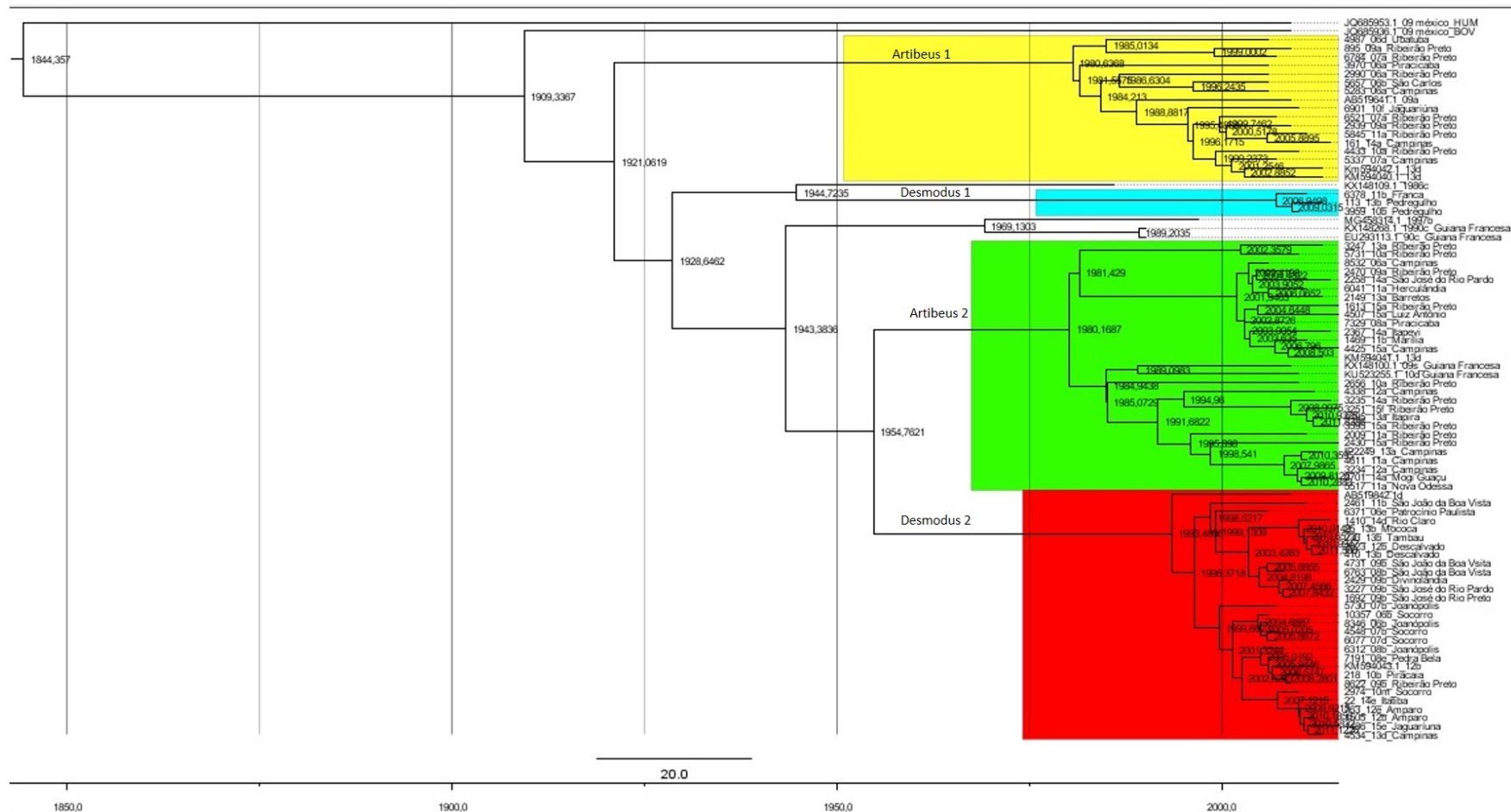


Figura 12. Árvore de máxima credibilidade de clados inferida a partir dos genes N-P-M-G-L concatenados. Os ramos estão calibrados de acordo com o ano em que cada linhagem foi isolada. A escala na parte inferior do gráfico está em anos e pode ser usada para identificar quando ocorreram os eventos de separação entre a sublinhagem de RABV *D. rotundus* / *A. lituratus*

De acordo com as Figuras 10, 11 e 12, observa-se duas sequências do México mais externas (JQ685953.1 e JQ685936.1), ambas divergindo anteriormente em relação aos demais isolados, sendo que o isolado JQ685953.1 é o primeiro táxon a divergir do ancestral comum dessa filogenia e devido aos resultados encontrados para identidade genética deste isolado com relação a todos os outros desta análise (entre 93,7% e 94,5%), talvez este isolado possa ser considerado como pertencente a outra linhagem mantida pelo morcego *D. rotundus*, sendo provavelmente um representante de outras variantes antigênicas (Variante antigênica 5 ou 11) as quais já foram caracterizadas a partir de isolados de *Desmodus rotundus* mexicanos (Diaz et al., 1994). De acordo com as árvores filogenéticas de MCC, o tempo de ancestral comum mais recente (TACMR) para a linhagem *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus* (classificada antigenicamente como Variante 3), teria ocorrido em torno de 170 anos, variando entre 107 até 237 anos com intervalo de confiança de 95% (Figura 12). A taxa média de mutação estimada para todos os genes do RABV concatenados foi de 2,15E-04 substituições por sítio por ano, variando de 1,6E-04 a 2,6E-04 com intervalo de confiança de 95%.

É possível observar nas árvores obtidas a divisão dos 84 isolados em sete agrupamentos, com pelo menos um táxon em cada um, todos suportados por altos valores de bootstrap e/ou posterior, sendo quatro agrupamentos relativos as amostras utilizadas nesse estudo. Os quatro clusters encontrados referentes aos isolados desse estudo foram denominados arbitrariamente segundo o reservatório mais prevalente em cada grupo. Desta maneira, observa-se dois grupos relacionados ao morcego hematófago *Desmodus rotundus*, denominados Desmodus 1 e Desmodus 2, e dois grupos relacionados a espécie *Artibeus lituratus*, denominados Artibeus 1 e Artibeus 2, sendo que todos os quatro grupos apresentam elevados valores de *bootstrap* e *posterior* em seus nós de origem (Figuras 10 e 11).

Nas árvores filogenéticas das Figuras 10, 11 e 12, observa-se que a sublinhagem Artibeus 1 seria a mais antiga entre os representantes da linhagem *D. rotundus*/*A. lituratus*, sendo a primeira a divergir a cerca de 100 anos, seguida da linhagem Desmodus 1, que teria divergido em torno de 80 anos.

De acordo com a filogenia obtida Figura 12, observa-se que os grupos Desmodus 2 e Artibeus 2 são os últimos a divergirem sendo grupos irmãos, divergindo diretamente de um mesmo ancestral comum, a cerca de 70 anos. Os grupos Desmodus 1 e Artibeus 1, que apesar de também se relacionarem mais entre si do que com os outros grupos, não são grupos irmãos, tendo seu ancestral comum representado por dois nós anteriores mais internos da árvore filogenética.

No Quadro 10 está a descrição das 70 sequências com todos os genes do vírus do RABV concatenados presentes nas árvores filogenéticas da Figuras 10, 11 e 12.

Quadro 10. Amostras contendo todos os genes do RABV concatenados, juntamente com o hospedeiro, localidade, sublinhagem e código do *GenBank*.

Amostras	Hospedeiro	Município/Estado	Sublinhagem	Código GenBank
2990/06	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto	Artibeus 1	MW579806
5283/06	<i>Artibeus lituratus</i>	Campinas	Artibeus 1	MW579825
4987/06	<i>Desmodus rotundus</i>	Ubatuba	Artibeus 1	MW579824
3970/06	<i>Artibeus lituratus</i>	Piracicaba	Artibeus 1	MW579814
5337/07	<i>Artibeus lituratus</i>	Campinas	Artibeus 1	MW579826
6521/07	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto	Artibeus 1	MW579837
6784/07	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto	Artibeus 1	MW579839
895/09	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto	Artibeus 1	MW579785
2939/09	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto	Artibeus 1	MW579804
6901/10	Felino	Jaguariúna	Artibeus 1	MW579840
4433/10	<i>Artibeus lituratus</i>	Campinas	Artibeus 1	MW579817
5845/11	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto	Artibeus 1	MW579831
5657/06	Bovino	São Carlos	Artibeus 1	MW579828
161/14	<i>Artibeus lituratus</i>	Campinas	Artibeus 1	MW579780
3959/10	Bovino	Pedregulho	Desmodus 1	MW579813
6378/11	Bovino	Franca	Desmodus 1	MW579836
113/13	Bovino	Pedregulho	Desmodus 1	MW579779
8532/06	<i>Artibeus lituratus</i>	Campinas	Artibeus 2	MW579844
7329/08	<i>Artibeus lituratus</i>	Piracicaba	Artibeus 2	MW579842
2470/09	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto	Artibeus 2	MW579801
2656/10	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto	Artibeus 2	MW579802
5731/10	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto	Artibeus 2	MW579830
1469/11	Bovino	Marília	Artibeus 2	MW579787
4611/11	<i>Artibeus lituratus</i>	Campinas	Artibeus 2	MW579822
5517/11	<i>Artibeus lituratus</i>	Nova Odessa	Artibeus 2	MW579827
4338/12	<i>Artibeus lituratus</i>	Campinas	Artibeus 2	MW579815
3234/12	<i>Artibeus lituratus</i>	Campinas	Artibeus 2	MW579808
2149/13	<i>Artibeus lituratus</i>	Barretos	Artibeus 2	MW579794
2249/13	<i>Artibeus lituratus</i>	Campinas	Artibeus 2	MW579795
3247/13	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto	Artibeus 2	MW579810
4495/13	<i>Artibeus lituratus</i>	Itapira	Artibeus 2	MW579818
2258/14	<i>Artibeus lituratus</i>	São José Do Rio Pardo	Artibeus 2	MW579796
2367/14	<i>Artibeus lituratus</i>	Itapevi	Artibeus 2	MW579797
2701/14	<i>Artibeus lituratus</i>	Mogi Guaçu	Artibeus 2	MW579803
3235/14	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto	Artibeus 2	MW579809

Quadro 10. (Continuação) Amostras contendo todos os genes do RABV concatenados, juntamente com o hospedeiro, localidade, sublinhagem, código *GenBank*.

Amostras	Hospedeiro	Município/Estado	Sublinhagem	Código <i>GenBank</i>
3251/15	Felino	Ribeirão Preto	Artibeus 2	MW579811
1613/15	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto	Artibeus 2	MW579790
2430/15	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto	Artibeus 2	MW579799
3595/15	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto	Artibeus 2	MW579812
4426/15	<i>Artibeus lituratus</i>	Campinas	Artibeus 2	MW579816
4507/15	<i>Artibeus lituratus</i>	Luiz Antônio	Artibeus 2	MW579819
6041/11	<i>Artibeus lituratus</i>	Herculândia	Artibeus 2	MW579832
2009/11	<i>Artibeus lituratus</i>	Ribeirão Preto	Artibeus 2	MW579792
6371/06	Equino	Patrocínio Paulista	Desmodus 2	MW579835
10357/06	Bovino	Socorro	Desmodus 2	MW579846
8346/06	Bovino	Joanópolis	Desmodus 2	MW579843
4548/07	Bovino	Socorro	Desmodus 2	MW579821
5730/07	Bovino	Joanópolis	Desmodus 2	MW579829
6077/07	<i>Desmodus rotundus</i>	Socorro	Desmodus 2	MW579833
7191/08	Equino	Pedra Bela	Desmodus 2	MW579841
6763/08	Bovino	São João da Boa Vista	Desmodus 2	MW579838
1692/09	Bovino	São José do Rio preto	Desmodus 2	MW579791
2429/09	Bovino	Divinolândia	Desmodus 2	MW579798
3227/09	Bovino	São José do Rio Pardo	Desmodus 2	MW579807
4731/09	Bovino	São João da Boa Vista	Desmodus 2	MW579823
8622/09	Bovino	Ribeirão Preto	Desmodus 2	MW579845
218/10	Bovino	Piracaia	Desmodus 2	MW579781
2974/10	Muar	Socorro	Desmodus 2	MW579805
2461/11	Bovino	São João da Boa Vista	Desmodus 2	MW579800
2023/12	Bovino	Descalvado	Desmodus 2	MW579793
1505/12	Bovino	Amparo	Desmodus 2	MW579789
25/13	Bovino	Mococa	Desmodus 2	MW579778
233/13	Bovino	Tambaú	Desmodus 2	MW579782
6312/08	Bovino	Joanópolis	Desmodus 2	MW579834
410/13	Bovino	Descalvado	Desmodus 2	MW579783
4534/13	<i>Desmodus rotundus</i>	Campinas	Desmodus 2	MW579820
22/14	Equino	Itatiba	Desmodus 2	MW579777
1410/14	<i>Desmodus rotundus</i>	Rio Claro	Desmodus 2	MW579786
1486/15	Equino	Jaguariúna	Desmodus 2	MW579788
763/12	Equino	Amparo	Desmodus 2	MW579784

É importante ressaltar que foram construídas árvores filogenéticas dos isolados do RABV desse estudo para cada um dos cinco genes separadamente, resultando na formação dos mesmos *clusters* apresentados na Figura 10, embora a topologia de algumas árvores tenha variado de acordo com cada gene. A Figura 13 mostra a árvore filogenética baseada na região parcial do gene N, construída a partir dos mesmos 84 isolados de RABV mostrados na Figura 10.

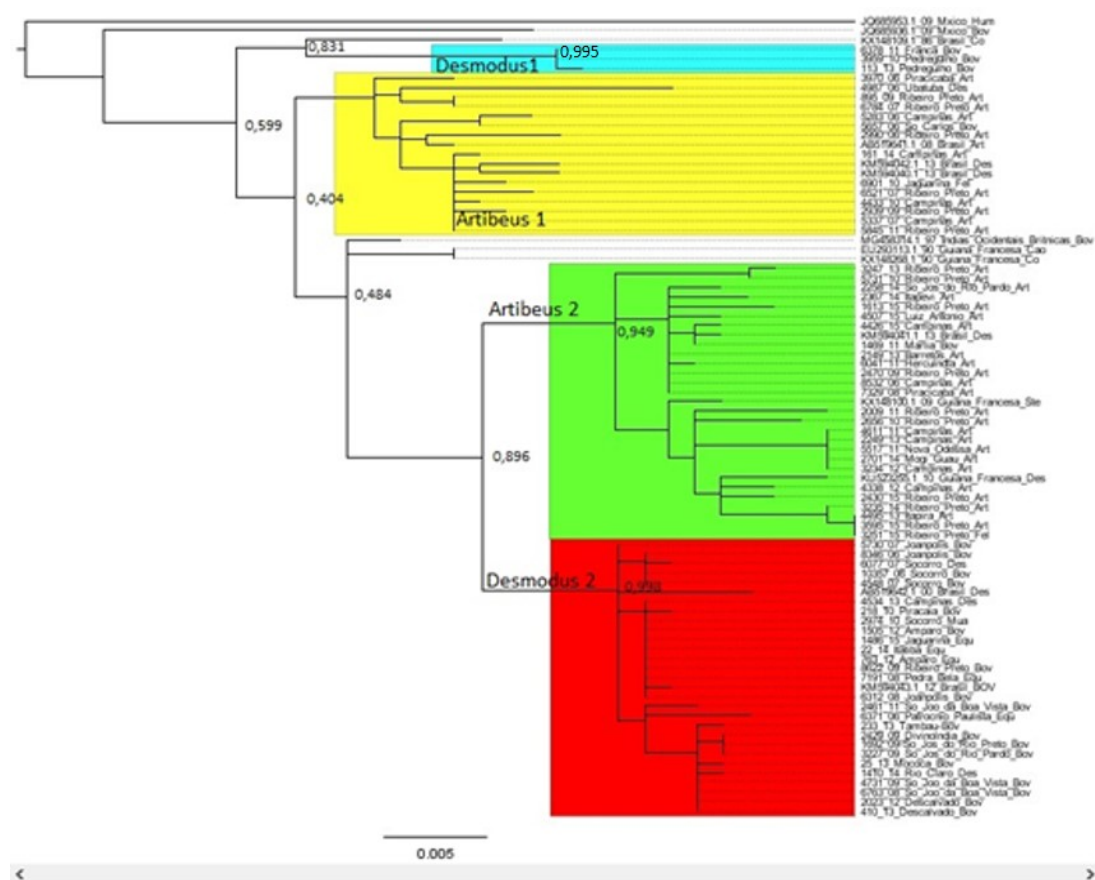


Figura 13. Árvore filogenética de máxima verossimilhança contendo 84 sequências de isolados do vírus da raiva (70 desse estudo e 14 sequências obtidas do *GenBank*) com 778 nucleotídeos do gene N. A árvore foi construída utilizando o modelo evolutivo Tamura 3 parâmetros + G (T92+G) com 1000 repetições de *bootstrap*.

A árvore filogenética apresentada na Figura 14 foi construída com 286 isolados de RABV da América Latina e do Brasil, utilizando 1281 nucleotídeos do gene N. Pode-se observar que foram mantidos os quatro *clusters* relativos aos isolados avaliados nesse estudo Desmodus 1, Artibeus 1, Desmodus 2 e Artibeus 2.



Figura 14 Árvore filogenética de máxima verossimilhança, contendo 73 sequências do gene N obtidas nesse estudo e 213 sequências obtidas no *GenBank*, totalizando 286 sequências baseada em 1281 nucleotídeos do gene N do RabV.

A figura 14 refere-se à árvore filogenética de ML baseada em 1281nt do gene N, inferida a partir de 286 sequências de DNA, sendo 73 obtidas nesse estudo e o restante extraído do *Genbank*, sendo provavelmente bastante representativa em relação as diferentes sublinhagens dentro da linhagem *D. rotundus*/*A. lituratus* distribuídas na América Latina.

Na análise filogenética baseada no gene N, observa-se primeiramente origem em comum de todas as linhagens mantidas pelos morcegos *D. rotundus* e *A. lituratus* na América Latina.

Na filogenia obtida para a região parcial do gene N da figura 14, observa-se a formação de pelo menos 14 agrupamentos, suportados por altos valores de *bootstrap*, além de duas sequências que formam dois grupos isolados (JQ685953.1 e GU592649.1), porém os baixos valores de *bootstrap* ou sua ausência em seus nós de origem não permitem sua classificação como sublinhagens dentro da linhagem *D. rotundus*/*A. lituratus*.

Os 14 agrupamentos ou sublinhagens descritas na Figura 14 foram arbitrariamente nomeados segundo a localização de seus isolados, sendo que além das quatro sublinhagens já caracterizadas nas Figuras 10 e 11, mais três sublinhagens parecem circular no Brasil, enquanto as outras sete prováveis sublinhagens circulam em diferentes países da América Latina.

Embora os valores de *bootstrap* não sejam robustos, pode-se observar que as sublinhagens Desmodus 1 e Artibeus 1 são mais antigas e divergem anteriormente das linhagens Desmodus 2 e Artibeus 2, que continuam divergindo de um ancestral comum direto com alto valor de *bootstrap*.

Um fato observado na análise do gene N foi o agrupamento de vários RABVs isolados de bovinos e *D. rotundus* de outras regiões do Brasil e outros países sul-americanos nas sublinhagens *A. lituratus* 1 e 2. Observa-se também que várias sublinhagens descritas até o momento em *D. rotundus* não apresentam regionalidade, sendo observadas em diferentes regiões ou países.

Nota-se também relações de ancestralidade direta entre sublinhagens geograficamente distantes, porém a maioria destas

divergências tem pouco suporte estatístico segundo os valores de *bootstrap* dos seus nós, devendo assim ser interpretadas com cautela.

5.11. Análise de Recombinação

Para essa análise foi utilizado o alinhamento contendo os cinco genes do RABV concatenados, sendo que não foram encontrados indícios de recombinação entre os isolados de RABV desse estudo.

5.12. Identidade genética

Na Tabela 1, estão expostos os valores das identidades em nucleotídeos e médias, máximas e mínimas calculados para cada gene separadamente e todos os genes concatenados, usando para este cálculo somente as amostras do presente estudo, o que em última análise, reflete o grau de conservação de cada gene dentro da linhagem *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus* circulante no Estado de São Paulo.

Tabela 1. Identidades genéticas médias, máximas e mínimas calculadas utilizando todas as sequências de DNA dos isolados desse estudo

Gene	Média %	Máximo %	Mínimo%
N	97,64	100	95,6
P	97,50	100	94,9
M	97,80	100	95,5
G	98,05	100	95,6
L	97,90	99,9	96,3
N-P-M-G-L	97,8	99,9	96,2

Pode-se observar que o gene P mostrou-se mais variável na linhagem de RABV *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus*, tanto em valores médios quanto em valores absolutos. Em valores médios temos a seguinte ordem crescente na variação dos genes $G < L < M < N < P$. Já em valores absolutos o grau de conservação dos genes ficaria na seguinte ordem $P < M < N = G < L$.

Na tabela 2, estão descritos os valores das identidades médias, máximas e mínimas, calculados para cada proteína do RABV

separadamente e todas as proteínas concatenadas, usando para este cálculo somente as amostras do presente estudo.

Tabela 2. Identities proteicas médias, máximas e mínimas calculadas utilizando todas as sequências de DNA dos isolados desse estudo.

Proteína	Média %	Máximo %	Mínimo%
N	99,5	100	98,6
P	99,02	100	95,9
M	99,3	100	97,5
G	99,05	100	96,9
L	99,5	100	98,7
N-P-M-G-L	99,4	100	98,6

Na Tabela 2 podemos observar que a proteína P mostrou-se a mais variável na linhagem de RABV *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus*, tanto em valores médios quanto em valores absolutos. Em valores médios temos a seguinte ordem crescente na variação das proteínas $N = L < M < G < P$. Já em valores absolutos o grau de conservação das proteínas ficaria na seguinte ordem $P < G < M < N < L$.

Na Tabela 3 estão descritos os valores de identidade genética *intraclusters* médio, máximo e mínimo calculados com base nas 70 sequências dos cinco genes do RABV concatenados. Vale destacar, que o *cluster* que apresentou a maior média foi o Desmodus 1, o que mostra uma maior similaridade das amostras presentes nesse grupo. O que apresentou menor identidade média foi o *cluster* Artibeus 2. Em valores absolutos, observa-se que as maiores variações nos valores de identidade estão nos *clusters* Artibeus 1 e Artibeus 2, sendo assim os grupos mais divergentes dentro dos grupos analisados.

Tabela 3. Cálculo da identidade genética *intraclusters* contendo 70 sequências com todos os genes concatenados (10.800 nucleotídeos) dos isolados do vírus da raiva desse estudo.

Clusters	Média %	Máximo %	Mínimo%
Desmodus 1	99,77	99,80	99,70
Artibeus 1	99,04	99,70	98,50
Desmodus 2	99,56	99,99	99,20
Artibeus 2	98,95	99,99	98,50

Na Tabela 4 observa-se a identidade média, máxima e mínima *interclusters* calculados com base nas 70 sequências dos cinco genes do RABV concatenados. Os *clusters* Desmodus 2 e Artibeus 2 obtiveram maior identidade média e absoluta entre eles. Os *clusters* Desmodus 1 e Artibeus 2 foram que tiveram menores valores de identidade média e absoluta entre eles, evidenciando uma maior distância genética entre esses grupos.

Tabela 4. Cálculo da identidade genética *interclusters* contendo 70 sequências com todos os genes concatenados (10.800 nucleotídeos) dos isolados do vírus da raiva desse estudo.

<i>Clusters</i>	MÉDIA %	MÁXIMO%	MÍNIMO%
Desmodus 1 x Artibeus 1	96,61	96,70	96,50
Desmodus 1 x Desmodus 2	96,54	96,70	96,30
Desmodus 1 x Artibeus 2	96,47	96,70	96,20
Artibeus 1 x Desmodus 2	96,94	97,10	96,60
Artibeus 1 x Artibeus 2	96,88	97,20	96,50
Desmodus 2 x Artibeus 2	97,66	98,00	97,30

De acordo com a Tabela 3, observa-se que as maiores variações absolutas *intraclusters* (1,5%) foram encontradas nos *clusters* Artibeus 1 e Artibeus 2, sendo que as mesmas são menores que as variações mínimas absolutas *intercluster* (2%) (Tabela 4), mostrando que isolados de um mesmo *cluster* são sempre mais similares geneticamente entre si, quando comparados a isolados de outros *clusters*, quando são levados em consideração todos os cinco genes do RABV concatenados.

Na Tabela 5 observa-se a identidade genética *intracluster* média, máxima e mínima calculada para cada um dos genes do RABV separadamente (N, M, P, G e L). Nota-se que o *cluster* Desmodus 1 apresentou maior similaridade média e absoluta entre todos os genes. Por outro lado, o *cluster* Artibeus 2 apresentou menor identidade média e absoluta entre todos os genes analisados, sendo assim o grupo mais divergente entre si para qualquer gene analisado.

Tabela 5. Cálculo da identidade genética *intraclusters* para cada gene (N, P, M, G e L) dos isolados do vírus da raiva desse estudo.

Gene	Clusters	Média %	Máximo %	Mínimo %
N	Desmodus 1	99,80	99,90	99,70
	Artibeus 1	99,02	99,90	97,90
	Desmodus 2	99,52	100,00	99,00
	Artibeus 2	98,86	100,00	98,00
P	Desmodus 1	99,60	99,80	99,40
	Artibeus 1	99,06	99,80	98,20
	Desmodus 2	99,29	100,00	98,40
	Artibeus 2	98,95	100,00	97,90
M	Desmodus 1	100,00	100,00	100,00
	Artibeus 1	99,31	100,00	98,50
	Desmodus 2	99,51	100,00	98,80
	Artibeus 2	99,08	100,00	98,00
G	Desmodus 1	99,80	100,00	99,60
	Artibeus 1	99,21	100,00	98,70
	Desmodus 2	99,63	100,00	99,00
	Artibeus 2	99,02	100,00	98,00
L	Desmodus 1	99,75	99,80	99,70
	Artibeus 1	99,02	99,80	98,50
	Desmodus 2	99,59	99,90	99,20
	Artibeus 2	98,96	99,90	98,40

Na Tabela 6 observa-se a identidade média, máxima e mínima *interclusters* para cada um dos genes separadamente (N, P, M, G e L). Nota-se que os *clusters* Desmodus 2 x Artibeus 2 apresentaram maior similaridade absoluta entre todos os genes analisados. Por outro os *clusters* Desmodus 1 x Artibeus 2 foram os mais divergentes em valores absolutos para todos os genes.

Nota-se também que os *clusters* Desmodus 2 x Artibeus 2 apresentaram maior similaridade média entre todos os genes analisados, com exceção do gene N (Desmodus 1 x Artibeus 1). Por outro lado, para os genes N, P e M os *clusters* Desmodus 1 x Artibeus 2 apresentaram menor identidade média entre eles, enquanto para os genes G e L os *clusters* Desmodus 1 x Artibeus 1 apresentaram menor identidade média.

Tabela 6. Cálculo da identidade genética *interclusters* de cada gene isolado do vírus da raiva desse estudo.

Gene	Clusters	Média %	Máximo %	Mínimo %
N	Desmodus 1 x Artibeus 1	97,71	97,40	96,70
	Desmodus 1 x Desmodus 2	96,55	96,80	96,10
	Desmodus 1 x Artibeus 2	96,12	96,80	95,60
	Artibeus 1 x Desmodus 2	97,04	97,60	96,40
	Artibeus 1 x Artibeus 2	96,69	97,40	95,80
	Desmodus 2 x Artibeus 2	97,15	97,80	96,50
P	Desmodus 1 x Artibeus 1	96,47	97,00	95,90
	Desmodus 1 x Desmodus 2	95,76	96,62	95,00
	Desmodus 1 x Artibeus 2	95,73	96,40	94,90
	Artibeus 1 x Desmodus 2	96,37	97,00	95,30
	Artibeus 1 x Artibeus 2	96,26	97,00	95,30
	Desmodus 2 x Artibeus 2	97,45	98,20	96,50
M	Desmodus 1 x Artibeus 1	97,60	97,80	97,10
	Desmodus 1 x Desmodus 2	96,68	97,00	96,30
	Desmodus 1 x Artibeus 2	96,55	97,00	96,20
	Artibeus 1 x Desmodus 2	96,68	97,30	95,80
	Artibeus 1 x Artibeus 2	96,50	97,10	95,50
	Desmodus 2 x Artibeus 2	97,73	98,50	97,00
G	Desmodus 1 x Artibeus 1	96,00	96,20	95,80
	Desmodus 1 x Desmodus 2	96,29	96,50	95,80
	Desmodus 1 x Artibeus 2	96,41	96,80	95,60
	Artibeus 1 x Desmodus 2	97,15	97,60	96,50
	Artibeus 1 x Artibeus 2	97,12	97,70	96,10
	Desmodus 2 x Artibeus 2	98,10	98,70	97,10
L	Desmodus 1x Artibeus 1	96,54	96,80	96,30
	Desmodus 1 x Desmodus 2	96,67	96,80	96,50
	Desmodus 1 x Artibeus 2	96,63	96,90	96,40
	Artibeus 1 x Desmodus 2	96,97	97,20	96,60
	Artibeus 1 x Artibeus 2	97,00	97,50	96,60
	Desmodus 2 x Artibeus 2	97,70	98,10	97,30

6. DISCUSSÃO

No Estado de São Paulo, a raiva ocasionada pela variante canina (AgV2) está sob controle, no entanto cães e gatos continuam se infectando, ainda que esporadicamente, com linhagens que circulam em morcegos, entre elas a linhagem *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus* (AgV3). Para um melhor entendimento da epidemiologia da raiva transmitida para cães e gatos e a evolução do RABV nas espécies de morcegos *A. lituratus* e *D. rotundus*, o estudo de genomas virais completos com uma amostragem representativa é fundamental. Poucas sequências do genoma completo do RABV com a linhagem *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus* foram caracterizadas e encontram-se disponíveis no *GenBank* (Mochizuki et al. 2011, Campos et al., 2020, Oliveira et al., 2020).

A extração de RNA utilizando o método do TRizol mostrou-se eficiente, conforme demonstrado na quantificação pelo nanodrop, e grande vantagem desse método é o baixo custo. Bonnaud et al. (2019) também realizou a extração do RNA do vírus da raiva pelo método TRizol e obteve sequências completas do genoma por *Next Generation Sequencing* (NGS) na plataforma *ILLUMINA MISEQ*, sendo a mesma utilizada no nosso estudo. Por outro lado, Mochizuki et al. (2011) utilizaram kits de extração que apresentam um custo maior, mas para o sequenciamento utilizaram o método de Sanger.

Marston et al. (2017) realizaram análise genética de sequências completa de RABV isoladas de cães e raposas durante uma epizootia que ocorreu na Turquia na década de 90 para avaliar a ocorrência da dinâmica viral em um novo reservatório e na espécie de origem. Para avaliar essa dinâmica os autores realizaram o tratamento com DNase e depleção ribossomal e sequenciaram por NGS na plataforma *ILLUMINA MISEQ*. Esse sequenciamento de nova geração permite a avaliação de um espectro de mutantes, o que não é possível pelo método de Sanger. O uso do método de Sanger aliado também a amostragem muito pequena pode justificar o

resultado encontrado por Mochizuki et al (2011), em que não foi encontrada diferença entre o RABV isolado de *Artibeus lituratus* e *Desmodus rotundus*.

Após a depleção ribossomal as amostras foram submetidas à transcrição reversa para obtenção de cDNA randômico do RABV e transformação em DNA randômico fita dupla e foi verificado através de um PCR controle direcionado ao gene N do RABV que a transcrição foi realizada com sucesso. Assim como no estudo realizado por Marston et al. (2017), as amostras foram sequenciadas sem amplificação, ou seja, foi realizada somente a transformação em DNA randômico fita dupla. Essa não amplificação do DNA resulta em um conjunto de dados imparcial sem a introdução de erros de PCR (Marston et al., 2017). A transcrição reversa utilizando *primers* randômicos no nosso estudo mostrou ser um método bastante eficiente, o que pode ser aplicado na rotina de diagnóstico laboratorial para identificação e caracterização molecular do RABV e o cDNA obtido poderá ser estocado para identificação posterior de outros potenciais agentes infecciosos, o que minimizaria tempo e custo em uma rotina de diagnóstico laboratorial.

No nosso estudo, a biblioteca foi preparada conforme as instruções do fabricante, e com base no perfil da curva do pool das amostras foi obtido um tamanho médio de 497pb das bibliotecas e sem evidências de dímero (conforme as orientações do fabricante bibliotecas com qualidade adequada tem tamanho entre 250-100pb e não apresentam dímeros).

A metodologia utilizada para o preparo da biblioteca dos cDNAs foi semelhante a utilizada por Goya et al. (2018), em que a preparação da biblioteca foi realizada utilizando o *Kit Nextera XT DNA* e a normalização foi feita manualmente. No entanto, diferentemente do nosso estudo eles utilizaram metade dos reagentes que devem ser utilizados no preparo da biblioteca, segundo o fabricante. Porém essa divergência metodológica não fez com que alterasse os resultados, pois nos dois estudos, as bibliotecas tiveram resultados adequados para o prosseguimento do estudo. Nota-se que não há ainda uma padronização na metodologia do preparo das bibliotecas, Orlowska et al. (2019) realizaram o sequenciamento de alto

rendimento também utilizando a plataforma *Illumina* em 23 amostras de RABV provenientes de raposas vermelhas e um morcego. A metodologia da biblioteca foi diferente da utilizada nesse estudo, pois as etapas realizadas nesse estudo foram utilizadas em ordem diferente, apesar de terem sido utilizados os mesmos reagentes. Marston et al. (2017), realizaram o preparo da biblioteca de forma divergente desse estudo, utilizando também o *Kit Nextera XT DNA*, no entanto assim como Orlowska foi feita a purificação com *AMPure XP magnetic beads* (Beckman Coulter) com os c-DNAS antes da elaboração das bibliotecas e para quantificação foi utilizado o Quantifour (Promega). Portanto, o que se nota é que não existe uma padronização para elaboração da biblioteca, no entanto, é importante sempre se certificar se existe o material genético presente, após o término do processo.

Com a realização da análise descritiva das 70 sequências dos isolados de RABV desse estudo foi possível observar as quatro regiões intergênicas do RABV: N/P com 2 nt, P/M com 5 nt, M/G com 5 nt e G/L com 24 nt., assim como descrito por Finke et al. (2000). Entretanto, não foi encontrada nas amostras sequenciadas nesse estudo a região intergênica G/L com 423 nt, pois a região poli-A7 que marcaria o início do que seria a região descrita inicialmente como pseudogene não existe nas sequências analisadas nesse estudo (Figura 8). É importante destacar que esse resultado era esperado, pois sabe-se que esta região é uma exceção à regra, já que ela é encontrada em poucas linhagens por ser extremamente instável como observado por Wu et al. (2008). sendo encontrada excepcionalmente em algumas amostras fixas do RABV como PV, ERA e SAD1-3670, e não descrita para nenhum outro *Lyssavirus* (Wunner, 2007; Wu et al., 2007), no entanto tal região é descrita equivocadamente pela maioria dos autores como existente em todos os RABV.

A análise descritiva das sequências também mostrou que a proteína L avaliada nesse estudo apresentou 2.127 aminoácidos (Figura 9). Na amostra PV o número de aminoácidos encontrados é de 2.142 (Wunner & Conzelmann, 2020), embora na amostra SAD-B19 também é relatado 2.127 aminoácidos (Wunner & Conzelmann, 2020), assim como na amostra fixa

Nishigahara (AB044824.1) (Nakagawa et al., 2017). Mochizuki et al. (2011) nos isolados de *Artibeus lituratus* e *Desmodus rotundus* encontraram na proteína L, 2.128 aminoácidos.

Essa diferença de um aminoácido na proteína L nas amostras encontradas nesse estudo em relação aos isolados sequenciados por Mochizuki et al. (2011) se deve provavelmente as duas metioninas que aparecem no início da proteína L nos isolados da linhagem *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus*, o que realmente confunde quanto ao início desta proteína, uma vez que todas as proteínas têm como primeiro aminoácido a metionina. Em relação a amostras fixas PV e Nishigahara, que só tem uma metionina no início de sua polimerase viral, a primeira metionina das duas descritas por Mochizuki et al. (2011), não faria parte da proteína traduzida, sendo que o real tamanho da proteína L na linhagem *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus* deve ser inferido através do sequenciamento da mesma.

Na análise de regiões de importância biológica para o RABV foi observado que a proteína P apresentou substituições de aminoácidos específicas entre os grupos estudado. No estudo realizado Fernandes (2020), também foi evidenciada uma mutação na proteína P, no entanto o isolado era de um morcego insetívoro, *Eptesicus furinalis*, segundo a autora essa mutação provavelmente ocorreu ao acaso, porém a sua manutenção pode indicar seleção positiva favorecendo a adaptação do RABV a esta espécie de morcego não hematófago, vale destacar também que essa mutação ocorreu em aminoácidos da mesma classe, apolares.

Na proteína G foi encontrada quatro substituições específicas no domínio citoplasmático que corresponde aos últimos 44 aa, (462-505) (Gaudin et al., 1992). No estudo realizado por Oliveira (2014) também foi evidenciado mutações na região do domínio citoplasmático no resíduo 498 da glicoproteína madura entre a arginina e lisina, no entanto essa mudança ocorreu em aminoácidos da mesma classe, ambos são polares positivos, em nosso estudo apenas uma substituição ocorreu entre aminoácidos da mesma classe. É importante ressaltar que as substituições observadas por

Oliveira eram referentes a amostras de CVS, a CVS-11 mantida no Instituto Pasteur com a amostras CVS-11 mantida pelo *National Institute for Control of Pharmaceutical and Biological Products* da China. Outro dado importante é que essa região da glicoproteína interage com a proteína M auxiliando na formação da estrutura de montagem do RABV, ou seja, tem uma função estrutural, o que em teoria deveria estar mais conservada, no entanto apresentou mudanças de aminoácidos de classes diferentes, isso evidencia que mais estudos com morcegos devem ser realizados para melhor entendimento dessas mutações.

Já na região do domínio transmembrânico da proteína G (439-461) foi encontrada uma substituição específica do *clusters* Desmodus 2 no resíduo 439 em que o aa. encontrado foi arginina (R, polar positivo) e nos demais *clusters* foi evidenciado a lisina (K, polar positivo). Essa substituição por ocorrer entre aminoácido de mesma classe, é viável biologicamente, uma vez que não prejudicaria a conformação espacial e a atividade biológica da proteína traduzida (Oliveira, 2014).

Na análise de regiões de importância biológica para proteína L, não foram evidenciadas mutações de aminoácido específicas para os grupos estudados. Mas é importante destacar que a região do pentaaminoácido QGDNQ, considerado extremamente conservado, foi observada na posição 727-731, o que difere do descrito por Poch et al. (1990) que relataram a presença desse pentaaminoácido na posição 855-859, no entanto esses autores estudaram diferentes vírus incluindo o RABV, o que gera no alinhamento diversos *gaps* que acabam alterando a contagem de aminoácidos. Portanto, a posição do QGDNQ encontrada por essa pesquisa está descrevendo de forma inédita a real posição desse pentaaminóacido no RABV que está inserido dentro do Bloco III. É importante salientar, que também encontramos o triaminoácido GDN em outra posição 727-731 que está inserido também no bloco III, no entanto não é possível afirmar que esse triaminoácido tenha a mesma função do GDN descrito anteriormente, sendo necessário novos estudos, mas outros vírus da estomatite vesicular

(VSV), que são bem relacionados aos Lyssavírus também apresentaram o GDN em outras posições (Barik et al., 1990; Canter et al., 1993)

Quanto a análise filogenética de todos os genes do RABV concatenados, os isolados sequenciados nesse estudo agruparam-se em quatro *clusters* (Figura 10), os quais foram nomeados arbitrariamente de acordo com a ordem de aparecimento na árvore filogenética e o principal hospedeiro encontrado em cada grupo. Pode-se sugerir, de acordo com os resultados encontrados, que no Estado de São Paulo, a linhagem *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus* está atualmente subdividida em pelos menos quatro sublinhagens denominadas de Desmodus 1, Desmodus 2, Artibeus 1 e Artibeus 2.

Um fato interessante observado na filogenia obtida são as duas divergências independentes e não relacionadas diretamente entre si, que deram origem as duas sublinhagens associadas à espécie *Artibeus lituratus*. Isso mostra que estas duas sublinhagens divergiram em momentos diferentes e de vírus ancestrais diferentes, sendo que segundo os dados desse estudo, a linhagem Artibeus 1 parece ter sido a primeira a se fixar no estado de São Paulo e talvez seja a linhagem ancestral da linhagem *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus* circulante estado de São Paulo. Porém, esse achado deve ser melhor estudado utilizando-se para isso sequências de DNA de amostras isoladas da espécie *Artibeus lituratus* de todo o Brasil.

Quanto aos agrupamentos restantes, nota-se que a sublinhagem Desmodus 1 foi provavelmente a segunda a se diferenciar, e de maneira curiosa, observa-se que as linhagens Desmodus 2 e Artibeus 2 foram as últimas a se diferenciar, sendo sublinhagens irmãs, divergindo diretamente de um mesmo RABV ancestral.

É interessante observar dois eventos independentes de diferenciação de sublinhagens associadas à espécie *Artibeus lituratus*, que ocorreram em momentos diferentes e que não estão diretamente relacionados entre si, ou seja, tais sublinhagens não divergem diretamente de um mesmo vírus, seja ele relacionado ao *Desmodus rotundus* ou *Artibeus*

lituratus. Estes dois eventos de diferenciação podem ser observados de maneira sutil na pesquisa de Fahl et al. (2012), porém os autores deste trabalho não observaram nem discutiram este fato. Allendorf et al. (2012), estudaram 26 amostras de morcegos não hematófagos do Estado de São Paulo e na análise filogenética baseada em 442 pb do gene N foi observado que existe uma relação significativa entre os RABVs isolados de morcegos hematófagos e frugívoros, pois ambos se agruparam no mesmo *cluster*.

Na análise de cada *cluster* foi observado que no Desmodus 1 foram encontrados somente isolados associados ao morcego hematófago *D. rotundus*.

Nota-se que no *cluster* Artibeus 1 houve predomínio de isolados de *Artibeus lituratus*. No entanto foram encontrados um isolado proveniente de um felino de Jaguariúna, um isolado de *Desmodus rotundus* do município de Ubatuba e um isolado de bovino do município de São Carlos (Figura 10).

O felino (6901/10), foi classificado dentro do *cluster* Artibeus 1 (Figura 10) e esse resultado está de acordo com dados encontrados em diversos estudos em que temos regiões em que a variante 2 (Agv2) não circula mais, como acontece em São Paulo. Nessas regiões a principal transmissão da raiva para cães e gatos ocorre por meio do contato de morcegos frugívoros e insetívoros (Batista et al., 2009; Morikawa et al., 2012; Castilho et al., 2017; Castilho et al., 2018), mostrando a importância do entendimento da epidemiologia da raiva em *Artibeus lituratus*, e da identificação de uma linhagem específica ou de sublinhagens dentro da linhagem *D. rotundus/A. lituratus* em morcegos dessa espécie.

Já no caso do morcego *Desmodus rotundus* de Ubatuba (4987/06) com a sublinhagem Artibeus 1 (Figura 10) é possível, pois Ubatuba é um município cercado pela Serra do Mar e Mata Atlântica, quase 80% do seu território consiste em áreas de preservação, ambiente que é favorável para a tanto espécie *Artibeus lituratus* e quanto *Desmodus rotundus*, o que permite uma maior interação entre esses morcegos e transmissão do RABV entre eles (*spillover*).

As amostras extraídas do GenBank (KM594042 e KM594040) do estudo de Oliveira et al. (2020) isoladas de *D. rotundus* também se agruparam na sublinhagem de Artibeus 2 (Figura 10). Um outro caso de possível *spillover* encontrado nesse mesmo *cluster* foi o de bovino (5657/06) com sublinhagem de *Artibeus 1* (Figura 10), resultado também encontrado por Fahl et al. (2012), que sugerem que a mais plausível explicação seria que um *Artibeus lituratus* infectou um *Desmodus rotundus*, o qual transmitiu raiva para o bovino após mordedura.

No *cluster* Desmodus 2 foram encontrados isolados de *Desmodus rotundus*, equídeos e bovídeos. Esses resultados são esperados, visto que o *D. rotundus* se alimenta exclusivamente de sangue desses animais e durante a sua alimentação ocorreu a infecção nesses animais.

No *cluster* Artibeus 2 houve predomínio de isolados de *Artibeus lituratus*, mas foi encontrado um isolado de bovino proveniente do município de Marília contendo o RABV dessa sublinhagem. Assim como observado no *cluster* do *Artibeus 1*, houve um bovino com sublinhagem de *Artibeus*, possivelmente devido a transmissão do RABV de um *Artibeus* infectado para um *Desmodus rotundus* e posterior transmissão para um bovino. Vale ressaltar esses casos são pontuais, o que nos fornece mais indícios da diferenciação dessas sublinhagens.

Nas árvores filogenéticas elaboradas tanto com genes concatenados quanto com os cinco genes separadamente (dados não mostrados), foram encontradas as mesmas quatro sublinhagens dentro da linhagem *D. rotundus/A. lituratus*, conforme Figuras 10 e 13. Vale ressaltar que os isolados de RABV desse estudo se mantiveram nas mesmas sublinhagens independentemente do gene analisado, embora a topologia da árvore tenha variado para cada gene, resultado semelhante aos encontrados por Fahl et al. (2012) que também encontraram essa divisão da linhagem *D. rotundus/A. lituratus* em sublinhagens, utilizando-se para isso árvores filogenéticas baseadas nas proteínas N e G do RABV. Entretanto, nesta pesquisa os autores classificaram os agrupamentos encontrados como linhagens distintas.

Allendorf et al. (2012) caracterizaram o RABV em amostras de morcegos não hematófagos no Estado de São Paulo baseado em 442 pb do gene N e embora fica evidente na árvore filogenética a formação de dois *clusters* com isolados de *Artibeus lituratus* e um *cluster* com isolados de *Desmodus rotundus* (GenBank) os autores classificam como uma única linhagem *Desmodus rotundus*. Esses autores apresentam esses resultados como um evento de *spillover*, justificando que essas duas espécies de morcegos compartilham o mesmo abrigo. Por outro lado, os resultados encontrados em nesse estudo inferem que sublinhagens de *Artibeus lituratus* estão circulando independentemente entre os morcegos da espécie *Artibeus lituratus* no Estado de São Paulo.

Embora os resultados relativos à classificação das sublinhagens de RABV encontradas nesta pesquisa serem bastante prováveis baseado nos altos valores de *bootstrap* dos nós terminais correspondentes a cada *cluster* encontrado, é importante ressaltar o viés representativo de nossa amostragem, principalmente no que diz respeito aos isolados da espécie *Artibeus lituratus*, uma vez que foram utilizadas somente amostras do Estado de São Paulo, e não existem dados das linhagens ou sublinhagens circulantes neste gênero em outras regiões do Brasil e países da América Latina onde estes morcegos são endêmicos, fazendo com que inferências sobre ancestralidade e relação entre grupos sejam analisadas com cautela.

Em relação a divergência temporal, até o momento, poucos trabalhos são realizados sobre esse assunto, sendo que os estudos realizados apresentam diferentes inferências (Kuzmina et al., 2013; Condori-Condori et al., 2013; Troupin et al., 2016; Velasco-Villa et al., 2017b; Oliveira et al., 2020). Oliveira et al. (2020) demonstraram que os cinco genes do RABV evoluem em velocidades diferentes, um fenômeno conhecido como heterotaquia. Sendo assim, a utilização de diferentes genes do RABV para análise evolutiva pode levar a diferentes resultados quanto a taxa de substituição e tempo de ancestral comum mais recente.

Kuzmina et al. (2013) demonstraram utilizando o gene G de amostras de diferentes linhagens de RABV de morcegos, que diferentes

parâmetros como tipos de crescimento populacional e relógios moleculares utilizados como *priors* nas análises bayesianas, podem gerar diferentes resultados em taxas de substituição e tempos de divergência, as vezes sem diferença significativamente estatística entre eles.

Nesta pesquisa escolhemos o melhor modelo baseando-se nos maiores valores de *likelihood* e ESS acima de 200 para todos os parâmetros observados no aplicativo Tracer 1.7.1.

O tempo de divergência do ancestral comum mais recente da linhagem *D. rotundus/A. lituratus* ficou em torno de 170 anos (Figura 12), variando entre 107 até 237 anos com intervalo de confiança de 95%, no entanto esse valor está subestimado, uma vez que todo o sinal evolutivo das relações de ancestralidade das diferentes linhagens de RABV mantidas em morcegos não está presente nessa análise. Oliveira et al. (2020) utilizando os genes G e L concatenados e uma amostragem bastante representativa da distribuição mundial dos RABV, chegaram a um tempo de divergência médio de aproximadamente 260 anos.

Kuzmina et al. (2013) na análise do gene G, utilizando uma metodologia similar a utilizada neste estudo obtiveram o resultado de 309 anos (173 a 484) para o ancestral comum mais recente, encontrando uma taxa média de substituição 1,9E-04 sítios por ano, ambos os resultados contemplados nos intervalos de confiança utilizados nesse estudo.

Na filogenia obtida na árvore de ML gerada a partir de 1281 nt do gene N (Figura 14), pode-se observar a formação de pelo menos 14 agrupamentos, todos com altos valores de *bootstrap*, correspondendo assim a pelo menos 14 sublinhagens contidas dentro da linhagem *D. rotundus/A. lituratus*, sendo que muitas destas sublinhagens estão presentes em diferentes localidades, muitas vezes distantes milhares de quilômetros, demonstrando talvez uma extensa rede de conexão entre as colônias de morcegos hematófagos por toda a América Latina o que tornaria possível a explicação desse achado.

Na mesma filogenia, observa-se que alguns isolados parecem possuir certa regionalidade, seja por estado ou país, porém muitas

sequências de isolados da linhagem *D. rotundus*/*A. lituratus* não entraram nessa filogenia, por serem de tamanho menor ao utilizado nesse estudo, o que não nos permite inferir a real regionalidade dessas sublinhagens (Figura 14).

O *cluster* Artibeus 1, apresentou diversos isolados de bovinos provenientes do Peru, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e isolados de *Artibeus lituratus* do Estado de São Paulo. A partir desses dados poderíamos considerar duas hipóteses. A primeira hipótese seria o *Artibeus lituratus* atuar como reservatório desta sublinhagem não somente em São Paulo como em outras regiões do Brasil e países sul-americanos, já que ele está distribuído em toda América Latina e estes isolados seriam resultado de eventos de spillover *A/lituratus* → *D. rotundus*. No entanto para sustentar essa hipótese seriam necessários mais estudos relacionados a caracterização do RABV em *A. lituratus* nestas regiões, já que os estudos envolvendo caracterização molecular desses vírus no Brasil estão restritos a São Paulo e Rio de Janeiro (Shoji et al., 2004; Kobayashi et al., 2007; Albas et al., 2011; Queiroz et al., 2012; Fahl et al., 2012; Allendorf et al., 2012; Menozzi et al., 2017).

A segunda hipótese seria o *Desmodus rotundus* atuar como reservatório nessas localidades para a sublinhagem Artibeus 1.

Em outros países neotropicais, poucos isolados de RABV do gênero *Artibeus* tem sido caracterizado geneticamente com a linhagem de *Desmodus rotundus*, como no México (Velasco-Villa et al., 2006), na Guiana Francesa (Troupin et al., 2016) e na Colômbia (Calderón et al., 2019). No entanto, estudos sorológicos demonstram a existência de anticorpos neutralizantes para o RABV em morcegos do gênero *Artibeus* spp. em Rondônia (Almeida et al., 2019), e em outros países da América Latina. Zieger et al. (2017) detectaram anticorpos neutralizantes para RABV no soro de 8/54 (14,81%) morcegos do gênero *Artibeus* em Granada, localizada na América Central. Na ilha de Trindade também localizada na América Central foi realizado um estudo para detecção de anticorpos de RABV em diversas espécies de morcegos e do total de 409 amostras de soro, 33 foram

soropositivas, sendo 16 (48,48%) da espécie *Artibeus jamicensis*, e seis (18,18%) de *Artibeus lituratus* (Seetahal et al., 2020). Estudo realizado sobre detecção de anticorpos para o RABV em morcegos hematófagos e não hematófagos também foi realizado no Peru e demonstrou a presença de anticorpos em vários gêneros de morcegos, incluindo os *Artibeus*. Os autores concluíram que, embora nenhum morcego testou positivo para raiva por imunofluorescência direta, evidências de anticorpos sugerem que ocorra transmissão cruzada (*spillover*) entre as várias espécies de morcegos (Salmón-Mulanovich et al., 2009).

O encontro de morcegos do gênero *Artibeus* com elevados níveis de anticorpos neutralizantes para o RABV em outros países latino-americanos pode ser um indicativo da manutenção de ciclos epidemiológicos da raiva nestes animais, porém, o isolamento e sequenciamento genético de RABV isolados deste gênero em toda América Latina é fundamental para estabelecer a real filogenia e o ancestral comum da linhagem *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus*.

No *cluster* Desmodus 2 todos os isolados de bovinos, equídeos e de *Desmodus rotundus* apresentaram a mesma sublinhagem de RABV que também está presente nos Estados de, Minas Gerais e Rio de Janeiro.

No *cluster* Artibeus 2 assim como ocorreu no *cluster* Artibeus 1, foram encontrados diversos isolados de bovinos, equinos, humanos e *Desmodus rotundus*. Essa sublinhagem encontrada no Artibeus 2 também circula no Peru e Guiana Francesa e em outras localidades do Brasil como no Rio Grande do Sul e Pará. Vale ressaltar que houve predomínio de isolados de *Artibeus lituratus*. As duas hipóteses abordadas para o *cluster* Artibeus 1, podem ser utilizadas no *cluster* Artibeus 2.

Vale ressaltar que a evolução de novas linhagens de RABV gênero ou espécie específicas ou a adaptação de uma mesma linhagem em gêneros de morcegos diferentes a partir de eventos de *spillover* bem sucedidos, depende de vários fatores, entre eles, o contato frequente destes animais e a proximidade filogenética existente entre o morcego transmissor e o hospedeiro (Streicker et al., 2010; Streicker et al., 2012; Mollentze et al.,

2014). Os morcegos *D. rotundus* e *A. lituratus*, além de pertencerem a mesma Família (*Phyllostomidae*) também compartilham os mesmos tipos de abrigos, fatos que corroboram a adaptação de uma mesma linhagem de RABV nestes dois gêneros (Greenhall et al., 1983; Arellano-Sota, 1988).

Ainda não foram propostos para a raiva, critérios qualitativos e quantitativos para a separação objetiva entre linhagens de RABV, sendo que estes critérios são estabelecidos apenas para a diferenciação das espécies de *Lyssavirus* (Nadin-Davis, 2020).

Empiricamente, baseado nos resultados de pesquisas que estudaram diferentes linhagens brasileira de RABV utilizando o gene N, observamos que até o momento, isolados considerados como de uma mesma linhagem, geralmente não variaram mais que 5 % em identidade de nucleotídeos (Carnieli et al., 2013; Souza et al., 2017, Oliveira et al., 2010; Macedo et al., 2010). É importante destacar que este valor de identidade também é sugerido por Nadin Davis (2020) para a separação das linhagens de RABV, embora a autora não discuta como chegou a esta conclusão.

Quanto a análise dos cálculos das identidades genéticas de nucleotídeos, em relação às amostras sequenciadas nesse estudo, o que provavelmente reflete a diversidade genética da linhagem *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus* no Estado de São Paulo, observamos em ordem decrescente de conservação genética o seguinte resultado em valores médios: $G > L > M > N > P$, o que difere dos resultados da identidade genética média encontrada por Oliveira (2014). Já em valores absolutos o grau de conservação dos genes declinará na seguinte ordem $L > N = G > M > P$ (Tabela 1).

Oliveira (2014) realizou um estudo filogenético do RABV baseado em genomas completos utilizando uma amostragem bastante significativa das linhagens de RABV distribuídas mundialmente onde obteve o seguinte resultado com relação a identidades genéticas relativas aos cinco genes do RABV: $N > M > L > P > G$. Na mesma pesquisa o autor demonstrou que se o RABV for dividido em dois grandes grupos, no qual o autor denominou de ciclos aéreos e terrestre do RABV, estes valores variam de acordo com o

grupo analisado. Neste caso o resultado obtido para o ciclo aéreo foi $N > M > L > P > G$, enquanto para o ciclo terrestre observou-se $N > M > L > G > P$. Isto demonstra que dependendo da maneira que os dados são analisados ou categorizados, diferentes valores de identidade genética podem ser obtidos.

Quanto a análise de aminoácidos em valores médios temos a seguinte ordem crescente na variação das proteínas $N = L < M < G < P$. Já em valores absolutos o grau de conservação das proteínas ficaria na seguinte ordem $P < G < M < N < L$ (Tabela 2).

Embora o gene N se mostrou como o terceiro gene mais divergente na linhagem *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus*, em termos de aminoácidos, a proteína N juntamente com a proteína L, mostraram-se ser em média as proteínas mais conservadas entre os RABV desta linhagem. A proteína N é considerada a mais conservada na espécie RABV (Wunner & Conzelmann, 2020), porém esse é o primeiro estudo que demonstra que a proteína L pode ser tão conservada quanto a proteína N, mostrando novamente que algumas características de identidades nucleotídicas e peptídicas consideradas como consenso para o RABV como um todo podem variar em análise mais específicas.

As restrições funcionais e organizacionais impostas às proteínas do RABV fazem com que as mesmas, juntamente com seus genes estejam sob intensa seleção purificadora (Wunner & Conzelmann, 2020; Streicker & Biek, 2020; Oliveira, 2014; Kuzmina et al., 2013), o que faz com que a maioria de suas mutações nucleotídicas sejam sinônimas, ou sejam, mutações que codificam um mesmo aminoácido. Desta maneira, é possível que o terceiro gene mais variável dos RABV da linhagem estudada nessa pesquisa (gene N) codifique a proteína mais conservada.

Embora a seleção purificadora sejam o tipo de seleção dominante no RABV, estudos mostram que existe uma maior tolerância para a mudança de aminoácidos nas proteínas P e G em relação as outras proteínas do RABV, fazendo com que mutações não sinônimas sejam fixadas em maior quantidade nestes genes (Streicker & Biek, 2020). Isto poderia explicar o

fato que nesta pesquisa o gene G se mostrou como o gene mais conservado na linhagem *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus* ao mesmo tempo que correspondeu a segunda proteína mais divergente nesta linhagem.

Para todos os genes concatenados, de acordo com a Tabela 1, encontrou-se uma variação máxima de identidade nucleotídica de 4,8%, valor este que talvez possa ser sugerido como ponto de corte para se classificar isolados de RABV como pertencentes a linhagem *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus*, em análises que utilizem todos os genes concatenados.

De acordo com as Tabelas 3 e 4, observa-se que as maiores variações absolutas *intraclusters* (1,5%) encontradas nos *clusters* Artibeus 1 e Artibeus 2 são menores que as variações mínimas absolutas *intercluster* (2%), mostrando que isolados de um mesmo *cluster* são sempre mais similares geneticamente entre si, quando comparados a isolados de outros *clusters*, quando são levados em consideração todos os cinco genes do RABV concatenados.

Diante destes resultados, podemos sugerir que para análises de identidade de nucleotídeos que utilizem todos os genes do RABV concatenados, isolados que variem entre si até 1,5% seriam pertencentes a uma mesma sublinhagem dentro da linhagem *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus*. Utilizando o mesmo raciocínio, isolados que apresentem uma variação na identidade nucleotídica a partir de 2%, seriam pertencentes a sublinhagens diferentes. Por outro lado, com valores de identidade entre 1,6% a 1,9% não seria possível classificar a sublinhagem do isolado. Esses dados mostram que a melhor forma para classificação dos isolados em sublinhagens seria através da topologia da árvore filogenética e valores de *bootstrap* ou posterior, tanto utilizando genes concatenados (Figura 10), quanto utilizando qualquer um dos genes.

Nas análises de identidades baseadas para cada um dos genes RABV, em valores absolutos, observa-se na Tabela 4, que com relação aos genes N, P, M, G e L, o grupo Artibeus 2 é o que apresenta em valores absolutos as menores identidades genéticas entre os quatro grupos

analisados. Em valores médios este grupo é o mais variável com exceção do gene L. Em valores absolutos, para os genes P, M e G, esta variação *intraclusters* chega a ser maior do que as maiores identidades *intercluster* encontradas entre isolados dos *clusters* irmãos Desmodus 2 e Artibeus 2, demonstrando assim a impossibilidade de estabelecer pontos de corte baseado em identidade nucleotídica para a variação máxima das sublinhagens aqui descritas, baseadas nestes genes.

Já para os genes N e L, em valores absolutos, as identidades mínimas *intraclusters* (98% e 98,4% respectivamente) são sempre maiores que as identidades máximas encontradas *interclusters* (97,8% e 98,1% respectivamente), sugerindo talvez ser possível estabelecer valores de ponto de corte, baseados em identidade nucleotídica, baseando-se nas variações máximas encontradas para esses genes dentro de um mesmo grupo.

Sendo assim, se utilizarmos arbitrariamente esses valores de identidade genética baseados no gene N para diferenciarmos linhagens do RABV, não haveria sentido em classificar as sublinhagens encontradas nesta pesquisa em linhagens distintas como sugerido por Fahl et al. (2012), pois a variação entre elas baseada no gene N teve um valor máximo de 4,4%, e seriam segundo nossas observações pertencentes a uma mesma linhagem de RABV. A utilização de uma amostragem representativa de uma grande região geográfica, juntamente com a análise filogenética fornecida pela análise de todos os genes do RABV concatenados fornece subsídios para os achados desta pesquisa.

Na análise de recombinação não foram encontrados indícios deste fenômeno nos isolados aqui estudados, concordando com resultados obtidos por outros autores (Kuzmin et al., 2012; Oliveira et al., 2020). A recombinação entre diferentes linhagens do RABV é um evento raro, poucos estudos apresentaram novas combinações de genes (Liu et al., 2011; He et al., 2012; Ding et al., 2017), e vale ressaltar que todos os estudos descrevem recombinação linhagens de RABV mantidas em cães da China.

Para realizar uma vigilância em raiva adequada é necessário caracterizar os isolados de RABV que circulam nas diversas localidades do

Brasil, pois esses dados são de extrema importância, pois na rotina do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Pasteur são utilizados para caracterização do RABV os *primers* denominados início - senso (ACGCTTAACAACAARATCARAG) e p784 – antisense (CCTCAAAGTTCTTGTGGAAGA), na qual gera um fragmento de 869 pb. Isso pode ser aplicado em outros Laboratórios da Rede de Diagnóstico da Raiva para a caracterização molecular e classificação das sublinhagens de isolados de *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus*. Vale ressaltar, os primers utilizados no estudo foram adequados para isolados de *Artibeus lituratus* e *Desmodus rotundus*, no entanto foram utilizadas apenas amostras do Estado de São Paulo, sendo necessário a realização de outros estudos contendo RABV isolados de *Artibeus* de outras regiões do Brasil, para se obter dados mais representativos.

O avanço nas técnicas de sequenciamento utilizando plataformas mais sofisticadas tem permitido a coleção de dados moleculares para um melhor entendimento no processo de evolução viral incluindo mecanismos moleculares de adaptação de hospedeiros e emergência viral em novos hospedeiros (Brunker et al., 2018). Os dados obtidos nesse estudo utilizando a plataforma *ILLUMINA MISEQ* para sequenciamento do gene completo de RABV, possibilitou a diferenciação e classificação dos isolados de RABV da linhagem *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus* em sublinhagens *Desmodus 1*, *Desmodus 2* e *Artibeus 1* e *Artibeus 2*, tendo uma aplicação importante para determinar as fontes de infecção do RABV transmitidas principalmente a cães e gatos nos centros urbanos do Estado de São Paulo, no entanto para o conhecimento real da relação dessas sublinhagens e seus reservatórios seria fundamental que essa pesquisa fosse estendida para todos os países da América Latina.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos pode-se chegar as seguintes conclusões:

- ✓ Com a filogenia não foi possível diferenciar as linhagens *D. rotundus* e *A. lituratus* com base no genoma completo.
- ✓ Foram encontradas evidências de que a linhagem *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus* se diferencia em quatro sublinhagens no Estado de São Paulo, sem padrão geográfico aparente, sendo duas dessas associadas a cada um dos reservatórios e demoninadas nesse estudo com Desmodus 1, Desmodus 2, Artibeus 1 e Artibeus 2.
- ✓ Não foi evidenciado nesse estudo presença de recombinação entre os isolados do RABV destes dois reservatórios (*Desmodus rotundus/Artibeus lituratus*.)
- ✓ Em relação a identidade genética dos isolados do RABV, tanto o gene quanto a proteína P se mostraram mais variável na linhagem *Desmodus rotundus/Artibeus lituratus*.
- ✓ O tempo de divergência do ancestral comum mais recente da linhagem *D. rotundus/A. lituratus* ficou em torno de 170 anos, variando entre 107 até 237 anos com intervalo de confiança de 95%.
- ✓ As sublinhagens Artibeus 2 e Desmodus 2 são grupos irmãos, sendo as mais relacionadas geneticamente e filogeneticamente entre si, divergindo diretamente de um mesmo RABV ancestral.

8. REFERÊNCIAS

Acha PN, Szyfres B. Rabies. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3rd ed. Washington: Organización Panamericana de La Salud. Oficina sanitária panamericana, Oficina regional de la organización mundial de la salud. 2003; p. 351-383.

Albas A, Campos ACA, Araujo DB, Rodrigues CS, Sodré MM, Durigon EL, et al. Molecular characterization of rabies vírus isolated from non-haematophagous bats in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2011; 44 (6): 678-683.

Albertini AAV, Ruigrok RWH, Blondel D. Rabies Virus Transcription and Replication. *Advances. Virus Research* 2011; 79: 2-19.

Allendorf SD, Cortez A, Heinemann MB, Harary CMA, Antunes JMAP, Peres MG et al. Rabies virus distribution in tissues and molecular characterization of satrains from naturally infect non-hematophagous bats. *Virus Research* 2012; 165:119-125.

Almeida JD, Howatson AF, Pinteric L, Fenje P. Electron microscope observations on rabies virus by negative staining. *Virology* 1962; 18: 147-151.

Almeida MF, Da Rosa AR, Martorelli LFA, Kataoka APG, Aires CC. Rabies virus monitoring in bat populations in Rondônia state, Brazil. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine* 2019; 52: e20180199: 2019.

Amarilla ACF, Pompei JCA Araujo DB, Vázquez FA, Galeano RR, Delgado LM, et al. Re-emergence of rabies v rus maintained by canid populations in Paraguay. *Zoonoses Public Health* 2018; 65(1): 222-226.

Antunes KD, Matos JCC, Mol LP, Oliveira MA, Arcebispo TLM, Santos VG et al. Descriptive analysis of rabies in wild animals in the state of Sergipe, Brazil. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterin ria E Zootecnia* 2018, 70(1), 169-173.

Arellano-Sota C. Biology, Ecology, and Control of the Vampire Bat. *Reviews of Infectious Diseases* 1988; 10: S615-S619.

Baer GM, Belli WJ, Fishbein DB. Rhabdoviruses, In: Fields BN, Knipe DM. *Virology.*, New York: Raven Press 1990. p. 883-930.

Baer GM. History of the Rabies. In: Jackson AC, Wunner WH (ed), *Rabies*. San Diego: Academic Press 2007. P. 1-22

Banerjee AK, Barik S. Gene expression of vesicular stomatitis virus genome RNA. *Virology* 1992; 188(2): 417-428.

Barik S, Rud EW, Luk D, Banerjee AK, Kang CY. Nucleotide sequence analysis of the L gene of vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype): identification of conserved domains in L proteins of nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Virology* 1990;175(1): 332–337.

Batista HBCR, Caldas E, Junqueira DM, Teixeira TF, Ferreira JC, Silva JR., et al. Canine rabies in Rio Grande do Sul caused by an insectivorous bat rabies virus variant. *Acta Scientiae Veterinariae* 2009; 37: 391-394

Belotto A, Leanes LF, Schneider MC, Tamayo H, Correa E. Overview of rabies in the Americas. *Virus Research* 2005; 111(1): 5-12.

Blancou, J. Early methods for the surveillance and control of rabies in animals. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 1994; 13(2): 361-372.

Bonnaud EM, Troupin C, Dacheux L, Holmes EC, Monchatre-Leroy E, Tanguy M, et al. Comparison of intra- and inter-host genetic diversity in rabies virus during experimental cross-species transmission. *PLoS Pathogens* 2019, 15, e1007799.

Bourhy H, Sureau P, Tordo N. From rabies to rabies related viruses. *Veterinary Microbiology* 1990; 23:115-28.

Bravo TC. Investigación documental de la primera epidemia de rabia registrada en La República Mexicana en 1709. *Epoca V* 1978; 20 (06): 705-716.

Bredt A, Araújo FAA, Caetano-Junior J, Rodrigues MGR, Yoshizawa M, Silva MMS, et al. Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle. Brasília: fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde 1996; 117.

Brunker K, Nadin Davis S, Biek R. Genomic sequencing, evolution and molecular epidemiology of rabies virus. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 2018; 37: 401-408.

Calderón A, Guzmán C, Mattar S, Rodríguez V, Acosta A, Martínez C. Frugivorous bats in the Colombian Caribbean region are reservoirs of rabies virus. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2019; 18:11.

Campos ACA, Romano CM, Melo FL, Araújo DB, Cunha EMS, Sacramento DRV, et al. Phylogenetic analysis of near full-length sequences of the *Desmodus rotundus* genetic lineage of rabies virus. *Infection, Genetics and Evolution* 2020, 104179.

Canadá. Government of Canada. Surveillance of rabies [Internet]. 2018 [acesso em 18 Set 2018]. Disponível em: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/diseases/rabies/surveillance.html#a1>

Canter DM, Jackson RL, Perrault J. Faithful and efficient in vitro reconstitution of vesicular stomatitis virus transcription using plasmid-encoded L and P proteins. *Virology* 1993, 194(2), 518–529.

Carini A. Sur une grande epizootie de rage. *Annales de L'Institut Pasteur*, 1911; 25: 843-846.

Carnieli P, Brandão PE, Castilho JG, Bueno CR, Carrieri ML, Macedo CI. Phylogeny of rabies virus identified in a cat closely related to vampire bat rabies based on the nucleoprotein gene. *Virus reviews and research* 2005; 10: 50-54.

Carnieli P, Brandão PE, Carrieri ML, Castilho JG, Macedo CI, Machado LM, et al. Molecular epidemiology of rabies virus strains isolated from wild canids in Northeastern Brazil. *Virus Research* 2006; 120(1-2):113-120.

Carnieli P, Fahl WDO, Castilho JG, Oliveira RDN, Macedo CI, Durymanova E, et al. Characterization of Rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. *Virus Research* 2008; 131 (1): 33-46.

Carnieli P. Caracterização genética do vírus da raiva isolados de bovinos e equinos no período de 1997-2002 em área epidêmica do Estado de São Paulo, Brasil. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado de Saúde, São Paulo, 2009.

Carnieli P, Batista HBCR, Oliveira RN, Castilho JG, Vieira LFP. Phylogeographic dispersion and diversification of rabies virus lineages associated with dogs and crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) in Brazil. *Archives of virology* 2013; 158:2307-2313.

Castilho JG, Carnieli JP, Durymanova EA, Fahl WO, Oliveira RN, Macedo CI, et al. Human rabies by vampire bats: Antigenic and genetic characterization of rabies vírus isolates from Amazon region (Brasil and Ecuador). *Virus Research* 2010; 153:100-105.

Castilho JG, De Souza DN, Oliveira RN, Carnieli P, Batista HBCR, et al. The epidemiological importance of bats in the transmission of rabies to dogs and cats in the state of São Paulo, Brazil, between 2005 and 2014. *Zoonoses Public Health* 2017; 64: 423-430.

Castilho JG, Achkar SM, Oliveira RN, Mori E, Carnieli PJR, Macedo CI. Analysis of rabies diagnosis in dog and cats in the state of São Paulo, Brazil. Archives of Virology 2018; 163: 2369–2376.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Human rabies-Alberta, Canada, 2007.MMWR Morb Mortal Wkly. 2008; 57(8): 197-200.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Rabies. <https://www.cdc.gov/rabies/transmission/index.html> 2019. Acessado:23/02/2021.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention . Rabies in the U.S. <https://www.cdc.gov/rabies/location/usa/index.html>. 2020. Acessado:05/11/2020.

Chenik M, Chebli K, Gaudin Y, Blondel D. In-vivo interaction of rabies virus phosphoprotein (P) and nucleoprotein (N) -Existence of 2 N-binding sites on P-protein. Journal of General Virology 1994; 75: 2889-2896.

Cliquet F, Picard-Meyer E, Robardet E. Rabies in Europe: what are the risks? Expert Review of Anti-infective Therapy 2014; 12(8): 905-908.

Colonno RJ, Banerjee AK. Complete nucleotide sequence of the leader RNA synthesized in vitro by vesicular stomatitis vírus. Cell 1978; 15: 93-101.

Condori-Condori RE, Streicker DG, Cabezas-Sanchez C and Velasco-Villa A. Enzootic and epizootic rabies associated with vampire bats, Peru. Emerging infectious diseases 2013; 19:1463-1469.

Da Rosa AR, Sodré MM, Rocco SC, Oliveira RC, Shimabukuro CEM. Manual de Manejo e Controle de Morcegos Urbanos. 2017, 25f.

De Serres G, Dallaire F, Côte M, Skowronski DM. Bat Rabies in the United States and Canada from 1950 through 2007: Human cases with and without bat contact. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America 2008; 46(9): 1329-1337.

Debré P, (1994). Louis Pasteur. Flammarion, publishing co. Maryland: The John Hopkins University Press 1994; 414-447.

Delpietro HA, Gury-Dhomen F, Larghi OP, Mena-Segura C, Abramo L. Monoclonal antibody characterization of rabies virus strains isolated in the River Plate Basin. Zentralbl Veterinarmed B 1997; 44(8):477-483.

Diaz AM, Papo S, Rodriguez A, Smith JS. Antigenic analysis of rabies-virus isolates from Latin America and the Caribbean. Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B 1994; 41(3):153-60.

Dietzschold B, Wiktor TJ, Trojanowski JQ, Macfarlan RI, Wunner WH, Torres-Anjel MJ et al. Differences in cell-to-cell spread of pathogenic and apathogenic rabies virus in vivo and in vitro. *Journal of Virology* 1985; 56(1): 12-18.

Ding NZ, Xu DS, Sun YY, He HB, He CQ. A permanent host shift of rabies virus from Chiroptera to Carnivora associated with recombination. *Scientific Reports* 2017; 7, 289.

Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ and Rambaut A. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology* 2006; 4(5):e88.

Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular biology and evolution* 2012; 29 (8): 1969-1973.

Duffy S, Shackelton L. A, Holmes EC. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nature reviews. Genetics* 2008; 9, (4), 267-76.

Escobar LF, Peterson T, Myriam F, Yung V, Medina-Vogel G. Bat-Borne Rabies in Latin America. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2015; 57(1): 63:72.

Fahl WO, Carnieli P, Castilho JG, Carrieri ML, Kotait I, Iamamoto K, et al. *Desmodus rotundus* and *Artibeus* sp. bats might present distinct rabies virus lineages. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2012; 1. 16, 545- 551.

Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Virus taxonomy. In: *Classification and nomenclature of viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, CA: Academic Press 2005; 623-633.

Fauquet EM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Virus taxonomy. In: *Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Academic press, CA, San Diego; 2007.

Favi M, Nina A, Yung V, Fernández J. Characterization of rabies virus isolates in Bolivia. *Virus research* 2003; 97: 135-40.

Favoretto SR., De Mattos CC, Morais NB, Araujo FAA, De Mattos CA. Rabies in marmosets (*Callithrix jacchus*), Ceará-Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 2001; 7 1062-1065.

Favoretto SR, De mattos CC, Morais NB, Carrieri ML, Rolim BN, Silva LM, et al. Rabies virus maintained by dogs in humans and terrestrial wildlife, Ceará State, Brasil. *Emerging infectious Diseases* 2006; 12 (12): 1978-1981.

Fehlner-Gardiner C. Rabies control in North America- past, present and future. *Revue scientifique et technique / Office international des épizooties* 2018, 37 (2), 421-437.

Fernandes MES. Caracterização antigênica e molecular da fosfoproteína do vírus da raiva isolada de morcego não hematófago *Eptesicus furinalis*. Tese (Doutorado em Biosistemas) – Universidade Federal do ABC, 2020.

Ferreira A.J. Doenças infecto-contagiosas dos animais domésticos, 3 ed. Lisboa. Fundação Calouste Gulbenkian 1976; 779.

Finke S, Cox HJ, Conzelmann KK. Differential transcription attenuation of rabies virus genes by intergenic regions: generation of recombinant viruses over expressing the polymerase gene. *Journal of virology* 2000; 74: 7261-69.

Fisher CR, Streicker DG, Schnell MJ. The spread and evolution of rabies virus: Conquering new frontiers. *Nature Reviews Microbiology* 2018; 16(4): 241-255.

Flamand A, Delagneau JF. Transcriptional mapping of rabies virus in vivo. *Journal of virology* 1978; 28: 518–523.

Gaudin Y, Ruigrok RW, Tuffereau C, Knossow M, Flamand A. Rabies virus glycoprotein is a trimer. *Virology* 1992; 187(2):627-32.

Goya S, Valinotto LE, Tittarelli E, Rojo GL, Jodar MS, Zaiat JJ, et al. An optimized methodology for whole genome sequencing of RNA respiratory viruses from nasopharyngeal aspirates. *PLoS One* 2018. 13 (06): e0199714.

Greenhall AM, Joermann G, Schmidt U. *Desmodus rotundus*. *Mammalian Species* 1983; 202: 1-6.

Hall TA. Bioedit a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 1999; 4:95-98.

Hampson K, Coudeville L, Lembo T, Sambo M, Kieffer A, Attlan M, et al. Estimating the global burden of endemic canine rabies. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2015; 9:e0003709.

Hanlon CA, Kuzmin IV, Blanton JD, Weldon WC, Manangan JS, Rupprecht, CE. Efficacy of rabies biologics against new lyssaviruses from Eurasia. *Virus Research* 2005; 111: 44-54.

He CQ, Meng SL, Yan HY, Ding NZ, He HB, Yan JX et al. Isolation and identification of a novel rabies virus lineage in China with natural recombinant nucleoprotein gene. *PloS one* 2012; 7(12): e49992.

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses - 2020. Disponível em: < <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: 13 janeiro 2020.

Iseni F, Barge A, Baudin F, Blondel D, Ruigrok RW. Characterization of rabies virus nucleocapsids and recombinant nucleocapsid-like structures. *Journal of General Virology* 1998; 79: 2909-2919.

Jackson AC. History of rabies. In: Jackson AC, editor. *Rabies*, 3ª ed. San Diego: Academic Press 2013, 1-15.

Kissi B, Badrane H, Audry L, Lavenu A, Tordo N, Brahimi M, et al. Dynamics of rabies virus quasispecies during serial passages in heterologous hosts. *The Journal of general virology* 1999; 80 (8), 2041–50.

Kobayashi Y, Sato G, Shoji Y, Sato T, Itou T, Cunha EM, et al. Molecular epidemiological analysis of bat rabies viruses in Brazil. *Journal of Veterinary Medical Science* 2005; 67(7): 647-652.

Kobayashi Y, Inoue N, Sato G, Itou T, Santos HP, Brito CJ, et al. Phylogenetic characterization of rabies virus isolates from Carnivora in Brazil. *Journal Veterinary Medical Science* 2007; 69(7): 691-6.

Koprowski H. Lecture on rabies on the occasion of "The year of Louis Pasteur". *Research in Virology* 1996; 146: 381-387.

Kotait I, Favoretto SR, Carrieri ML, Takaoka N. Raiva Humana causada pela variante 3 - *Desmodus rotundus* - no Estado de São Paulo. In: *Seminário Internacional Morcegos como transmissores da Raiva*; 2001; São Paulo. *Seminário Internacional Morcegos como transmissores da Raiva - Programa e Resumos*; 2001. p. 70-71.

Kotait I, Carrieri ML, Carnieli PJR, Castilho JG, Oliveira RN, Macedo CI, et al. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. *Boletim Epidemiológico Paulista* 2007; 40: 2-8.

Kotait K, Carrieri ML, Takaoka NY. Raiva. In: Veronesi R, Focaccia R (Eds). *Tratado de Infectologia*. 4th ed Atheneu 2009; 709-742.

Kristensson K, Dastur DK, Manghani DK, Tsiang H, Bentivoglio M. Rabies: Interactions between neurons and viruses. A review of the history of Negri inclusion bodies. *Neuropathology and applied neurobiology* 1996; 22: 179-187.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA 7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution* 2016; 33:1870-1874.

Kuzmin IV, Shi M, Orciari LA, Yager PA, Velasco-Villa A, Kuzmina N, et al. Molecular inferences suggest multiple host shifts of rabies viruses from bats to mesocarnivores in Arizona during 2001-2009. *PLOS Pathogens* 2012; 8:e1002786.

Kuzmina NA, Kuzmin IV, Ellison JA, Taylor ST, Bergman DL, Dew B, et al. A reassessment of the evolutionary timescale of bat rabies viruses based upon glycoprotein gene sequences. *Virus Genes*. 2013; 47:305-310.

Lafon M, Wiktor TJ. Antigenic sites on the era rabies virus nucleoprotein and non-structural protein. *The Journal of general virology* 1985; 66: 2125-33.

Langoni H, Cristina K, Menozzi BD, da Silva RC. Rabies in the big fruit-eating bat *Artibeus lituratus* from Botucatu, Southeastern Brazil. *Journals Venomous Animals Toxins Including Tropical Diseases* 2005; 11:84-87.

Lee DN, Papes M, Van Den Bussche RA. Present and potential future distribution of common Vampire bats in the Americas and the associated risk to cattle. *PLoS ONE* 2012; 7: 1-9.

Lentz TL, Burrage TG, Smith AL, Crick J, Tignor GH. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? *Science* 1982; 215 (4529):182-4.

Leppert M, Rittenhouse L, Perrault J, Summers DF, Kolakofsky D. Plus and minus strand leader RNAs in negative strand virus-infected cells. *Cell* 1979; 18(3): 735–747

Lewis P, Fu Y, Lentz TL. Rabies virus entry at the neuromuscular junction in nerve-muscle cocultures. *Muscle Nerve* 2000; 23(5): 720-730.

Liu W, Liu Y, Liu J, Zhai J, Xie Y. Evidence for inter- and intra-clade recombinations in rabies virus. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2011; 11 (8): 1906–12.

Macedo CI, Carnieli Jr P, Fahl WO, Lima JYO, Oliveira RN, Achkar SM, et al. Genetic characterization of rabies virus isolated from bovines and equines between 2007 and 2008, in the State of São Paulo and Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2010; 43 (2):116-120.

Marsh M, Helenius A. Virus entry into animal cells. *Advances in Virus Research* 1989; 36:107-51.

Marston DA, McElhinney LM, Johnson N, Müller T, Conzelmann KK, Tordo N, et al. Comparative analysis of the full genome sequence of European bat lyssavirus type 1 and 2 with other lyssaviruses and evidence for a conserved transcription termination and polyadenylation motif in the G-L 3' non-translated region. *Journal of General Virology* 2007; 88, 1302-1314.

Marston DA, Horton DL, Nunez J, Ellis RJ; Orton RJ, Johnson N, Banyard A; et al. Genetic analysis of a rabies virus host shift event reveals within-host viral dynamics in a new host. *Virus evolution* 2017; 3(2): vex038.

Martin DP, Lemey P, Lott M, Molton V, Posada D, Lefevre P. RD3P: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* (Oxford, England) 2010; 26 (19): 2462-2463.

Matsumoto S. Electron microscopy of nerve cells infected with street rabies virus. *Virology* 1962; 17: 198-202.

Mattos CA, De Mattos CC, Smith JS, Miller ET; Papo S, Utrera A, et al. Genetic characterization of rabies field isolates from Venezuela. *Journal of Clinical Microbiology* 1996; 34,.1553-1558.

Mebatsion T. Extensive attenuation of rabies virus by simultaneously modifying the dynein light chain binding site in the p protein and replacing arg333 in the g protein. *Journal of virology* 2001; 75(23): 11496-502.

Menozzi BD, Oliveira RN, Paiz LM, Richini-Pereira VB, Langoni H. Antigenic characterization of rabies vírus isolated from bats (Mammalia: Chiroptera) from municipalities in São Paulo State, Southeastern Brazil. *Archives of virology* 2017; 162(5):1201-1209.

Menozzi BD. Infecção pelo vírus rábico em quirópteros no Município de Botucatu, São Paulo, e região no período de 2003 a 2018. Tese (Doutorado em Doenças Tropicais), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Botucatu, São Paulo, 2019.

Mochizuki N, Kobayashi Y, Sato G, Hirano S, Itou T, Ito FH, et al. Determination and molecular analysis of the complete genome sequence of two wild-type rabies viruses isolated from a haematophagous bat and a frugivorous bat in Brazil. *The Journal of veterinary medical science* 2011; 73:759–66.

Mollentze N, Biek R, Streicker DG. The role of viral evolution in rabies host shifts and emergence. *Current opinion in virology* 2014; 8: 68-72

Monroe BP, Yager P, Blanton J, Birhane MG, Wadhwa A, Orciari L, et al. Rabies surveillance in the United States during 2014. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2016; 248(7):777-788.

Morikawa VM, Ribeiro J, Biondo AW, Fellini A, Bier Daniele, Molento MB. Cat infected by a variant of bat rabies virus in a 29-year disease-free urban area of southern Brazil. *Revista da sociedade brasileira de medicina tropical* 2012; 45:255-256

Müller TF, Freuling CM. Rabies control in Europe: an overview of past, current and future strategies. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 2018; 37 (2), 409-419.

Nadin-Davis SA, Velez J, Málaga C, Wandeler AI. A molecular epidemiological study of rabies in Puerto Rico. *Virus Research* 2008; 131(1): 8-15.

Nadin-Davis SA. Molecular epidemiology. In: Fooks AR, Jackson AC, editors. *Rabies*. 4th ed. San Diego: Academic Press 2020. p. 143-194.

Nakagawa K, Kobayashi Y, Ito N, Suzuki Y, Okada K, Makino M, et al. Molecular function analysis of rabies virus RNA polymerase Lprotein by using an L gene-deficient virus. *Journal of Virology* 2017; 91: e00826-17.

Oliveira RN, De Souza SP, Lobo RS, Castilho JG, Macedo CI, Carnieli P, et al. Rabies virus in insectivorous bats: implications of the diversity of the nucleoprotein and glycoprotein genes for molecular epidemiology. *Virology* 2010; 405(2): 352 -60.

Oliveira RN. Modos e tempos de evolução em linhagens do vírus da raiva (RABV) mantidos por reservatórios aéreos e terrestres com base em genomas completos. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Oliveira RN, Freire CC, Iamarino A, Zanotto PM, Pessoa R, Sanabani SS, et al. Rabies vírus diversification in aerial and terrestrial mammals. *Genetics and Molecular Biology* 2020; 43, 3, e20190370.

OPAS - Pan American Health/ Organização Pan-Americana da Saúde Organization. Biosafety in health: priorities and strategies of action. OPAS; 2001.

Ortega-Pacheco A, Jimenez-Coello M. La rabia canina, uma zoonosis latente em Yucatán. *Revista biomedica* 2017; 28(2): 61-63.

Orlowska A, Iwan E, Smreczak, Rola J. Evaluation of direct metagenomics and target enriched approaches for high-throughput sequencing of field rabies viruses. *Journal of veterinary research* 2019; 63: 471-479.

Páez A, Velasco-Villa A, Rey G, Rupprecht CE. Molecular epidemiology of rabies in Colombia 1994--2005 based on partial nucleoprotein gene sequences. *Virus Research* 2007; 130(1-2):172-181.

Pastoret PP, Kappeler A, Aubert M. European rabies control and its history. In: King AA, Fooks AR, Aubert M, Wandeler AI, editors. *Historical perspective of rabies in Europe and the Mediterranean Basin*. Paris: OIE 2004; 337-50.

Pearce JMS. Louis Pasteur and rabies: A brief note. *Journal of neurology Neurosurgery & Psychiatry* 2002; 73(1): 82.

Petersen BW, Rupprecht CE. Human rabies epidemiology and diagnosis. In: Tkachev S, ed. *Non-flavivirus encephalitis*, NY: In Tech 2011; 247-278.

Poch O, Blumberg BM, Bougueleret L, Tordo N. Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: Theoretical assignment of functional domains. *The Journal of General Virology* 1990; 71: 1153-1162.

Queiroz LH, Favoretto SR, Cunha SEM, Campos ACA, Lopes MC, Carvalho C, et al. Rabies in southeast Brazil: a change in the epidemiological pattern. *Archives of virology* 2012; 157: 93-105.

Rasalingham P, Rosssiter JF, Mebatsion T, Jackson AC. Comparative pathogenesis of the SAD-L16 strain of rabies virus and a mutant modifying the dynein light chain binding site of the rabies virus phosphoprotein in young mice. *Virus research* 2005; 111(1): 55-60.

Rocha SM, De Oliveira SV, Heinemann MB, Gonçalves VS. Epidemiological Profile of Wild Rabies in Brazil (2002-2012). *Transboundary and emerging diseases* 2017;64 (2): 624-633.doi: 10.1111/tbed.12428.

Rodriguez LL; Roehe PM, Kurath HBG. Rhabdoviridae. In: Flores E. *Virologia Veterinária*. Santa Maria: UFSM 2007; 27: 689-719.

Rosa ESTDA, Kotait I, Barbosa TFS, Carrieri ML, Brandão PE, Pinheiro AS, et al. Bat transmitted human rabies outbreaks, Brazilian Amazon. *Emerging infectious diseases* 2006; 12 (8), 1197–1202.

Rupprecht CE, Hanlon CA. Rabies. In: Evans AS, Kaslow RA, editors. *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control*. New York/London: Plenum Medical Book Company 1997; 665-666.

Rupprecht CE, Hanlon CA, Hemachuda T. Rabies re-examined. *Lancet Infectious Diseases* 2002; 2(6): 327–343.

Rupprecht C, Kuzmin I, Meslin F. Lyssaviruses and rabies: Current conundrums, concerns, contradictions and controversies. *F1000 Research* 2017, 6, 184.

Salmón-Mulanovich G, Vásquez A, Albújar C, Guevara C, Laguna-Torres VA, Salazar M, et al. Human rabies and rabies in vampire and non vampire bat species, Southeastern Peru. *Emerging infectious diseases* 2009; 15:1308-10.

Seetahal JFR, Greenberg L, Satheshkumar PS, Sanchez-Vazquez M, Legall G, Singh S, et al. The serological prevalence of rabies virus-neutralizing antibodies in the bat population on the Caribbean Island of Trinidad. *Viruses* 2020; 12: 178.

Simmons NB. Order Chiroptera. In: Wilson DE, Reeder DM. *Mammals species of the world: a taxonomic and geographic reference*. 3.ed. Baltimore Johns Hopkins University Press 2005; 312-529.

Schneider MC, Romijin PC, Uieda W, Tamayo H, Silva FF, Belotto A, et al. Rabies transmitted by vampire bats to humans: an emerging zoonotic disease in Latin America? *Pan. Am. J. Public Health*. 2009; 25: 260-269. doi: 10.1590/s1020-49892009000300010.

Schnell MJ, Mcgettigan JP, Wirblich C; Papaneri A. The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. *Nature reviews microbiology* 2010; 8 (1), 51-61.

Streicker DG, Turmelle AS, Vonhof MJ, Kuzmin IV, Mccracken GF, Rupprecht CE. Host phylogeny constrains cross-species emergence and establishment of rabies virus in bats. *Science* 2010; 329 (5992), 676-9.

Streicker DG, Altizer SM, Velasco-Villa A and Rupprecht CE. Variable evolutionary routes to host establishment across repeated rabies virus host shifts among bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012; 109:19715–20.

Streicker DG, Biek R. Evolution of rabies virus. In: Fooks AR, Jackson AC, editors. *Rabies*. 4th ed. San Diego: Academic Press 2020; 83-142.

Shoji Y, Kobayashi Y, Sato G, Itou T, Miura Y, Mikami T et al. Genetic characterization of rabies viruses isolated from frugivorous bat (*Artibeus* sp..) in Brazil. *The journal of veterinary medical science* 2004; 66 (10):1271-1273.

Singh R, Singh KP, Cherian S, Saminathan M, Kapoor S, Reddy GBM, et al. Rabies - epidemiology, pathogenesis, public health concerns and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. *The veterinary quarterly* 2017; 37(1): 212-251.

Souza DN, Carnieli JP, Macedo CI, Oliveira RN, Batista HBCR, Rodrigues AC, et al. Phylogenetic analysis of rabies virus isolated from canids in North and Northeast Brazil. *Archives of virology* 2017; 162 (1), 71-77.

SVS/MS–Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, 2020. <https://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/raiva>. Acesso: 06/01/2021.

Taddei VA. Morcegos: algumas considerações sistemáticas e biológicas. *Boletim Técnico – Cati*. 1983; 172:1-31.

Takaoka NY. Alteração no perfil epidemiológico da raiva no Estado de São Paulo. In: Anais do I Seminário Internacional de Raiva: 2000. 22-24 agosto. Instituto Pasteur. São Paulo; 2000; p 2-24.

Tarantola A. Four thousand tears of concepts relating to rabies in animals and humans, its prevention and its cure. *Tropical medicine and infectious disease* 2017; 2(5): 1-21.

Testa D, Chanda PK, Banerjee AK. Unique mode of transcription in vitro by vesicular stomatitis virus. *Cell* 1980; 21(1):267-75.

Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith G, Rougeon F. Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA-viruses. *Virology* 1988; 165: 565-576.

Tordo N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: Meslin F-X, Kaplan M.M., Koprowski H. *Laboratory Techniques in Rabies*. Geneva: World Health Organization. 1996; 28-51.

Thoulouze MI, Lafage M, Schachner M, Hartmann U, Cremer H, Lafon M. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *Journal of Virology* 1998; 72(9): 7181-90.

Troupin C, Dacheux L, Tanguy M, Sabeta C, Blanc H, Bouchier C, et al. Large-scale phylogenomic analysis reveals the complex evolutionary history of rabies virus in multiple carnivore hosts. *PLOS pathogens* 2016; 2(12): e1006041.

Uieda W, Harmani NMS, Silva MMS. Raiva em morcegos insetívoros (Molossidae) do Sudeste do Brasil. *Revista de saúde pública* 1995, 29, (5), 293–297.

Velasco-Villa A, Orciari LA, Juárez-Islas V, Gómez-Sierra M, Padilla-Medina I, Flisser A, et al. Molecular diversity of rabies viruses associated with bats in Mexico and other countries of the Americas. *Journal of clinical microbiology* 2006; 44(5): 1697-1710.

Velasco-Villa A, Escobar LE, Sanchez A, Shi M, Streicker DG, Gallardo-Romero NF, et al. Successful strategies implemented towards the elimination of canine rabies in the Western Hemisphere. *Antiviral Research* 2017a; 143: 1-12.

Velasco-Villa A, Mauldin MR, Shi M, Escobar LE, Gallardo-Romero NF, Damon I, et al. The history of rabies in the Western Hemisphere *Antiviral Research* 2017b; 146:221-232.

Vigilato MAN, Clavijo A, Knobl T, Silva HMT, Cosivi O, Schneider MC, et al. Progress towards eliminating canine rabies: policies and perspectives from Latin America and the Caribbean. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 2013; 368(1623): 20120143.

Villaseñor JV. Epidemiologia de la rabia en México. *Salud Pública de Mexico* 1974; 16(3):407-418.

Vos A, Nunan C, Bolles D, Müller T, Fooks AR, Tordo N, et al. The occurrence of rabies in pre-Columbian Central America: an historical search. *Epidemiology and infection* 2011; 139: 1445-1452.

Wada MY, Rocha SM, Maia--Elkhoury ANS. Situação da raiva no Brasil, 2000 a 2009. *Epidemiologia e serviços da saúde*. 2011; 20(4): 509-518.

Wallace RM, Blanton J. Epidemiology. In: Fooks AR, Jackson AC, editors. *Rabies*. 4th ed. San Diego: Academic Press 2020; 103-142.

Wasik B, Murphy M. In the beginning. In: Wasik B, (editor). *Rabid: A Cultural History of the World's Most Diabolical Virus*. New York: Penguin Group 2013; 17-36.

Wasik BR, Turner PE. On the biological success of viruses. *Annual review of microbiology* 2013; (67): 519-541.

Wilkinson L. History of Rabies. In: Jackson AC e Wunner H (Ed.). *Rabies*. New York, Academic Press 2002; 1-22.

Whitt MA, Buonocore L, Prehaud C, Rose JK. Membrane fusion activity, oligomerization, and assembly of the rabies virus glycoprotein. *Virology* 1991; 185(2): 81-8.

WHO - World Health Organization. Expert Consultation on Rabies, third report. Geneva: World Health Organization; 2018 (WHO Technical Report Series, No. 1012; <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272364/9789241210218-eng.pdf>, acesso em 17 out 2020).

WHO - World Health Organization. Rabies. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rabies>, 2020. Acessado: 05/11/2020.

Wu X, Franka R, Velasco-Villa A, Rupprecht CE. Are all lyssavirus genes equal for phylogenetic analyses? *Virus research* 2007; 129: 91-103.

Wunner WH, Dietzschold B, Smith CL, Lafon M, Golub E. Antigenic variants of cvs rabies virus with altered glycosylation sites. *Virology* 1985; 140:1-12.

Wunner WH. The chemical composition and molecular structure of rabies viruses. In: Baer GM. The natural history of rabies. Boca Raton: CRC Press 1991; 31-67.

Wunner WH, Rabies. In: Rabies. Jackson AC, Wunner WH (Eds). San Diego: Academic press 2007; 23-68.

Wunner WH, Conzelmann KK. Rabies virus In: Fooks AR, Jackson AC, editors. Rabies. 4th ed. San Diego: Academic press 2020; 43-81.

Zieger U, Cheetham S, Santana SE, Leiser-Miller L, Matthew-Belmar V, Goharriz H, et al. Natural exposure of bats in Grenada to rabies virus. Infection ecology & epidemiology. 2017; 7(1):1332935.

Zwickl DJ. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin, 2006.

9. ANEXOS

9.1. Aprovação CEUA



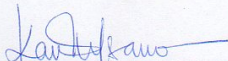
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO PASTEUR
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



São Paulo, 27 de agosto de 2018.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**Estudo da existência de linhagens genéticas do vírus da raiva (RABV) específicas aos morcegos *Desmodus rotundus* e *Artibeus spp.* por meio da análise genômica de populações virais isoladas destes reservatórios utilizando-se o sequenciamento por síntese (*deep sequencing*) na plataforma ILLUMINA MISEQ**”, registrado com o número de protocolo 11.2018, sob a responsabilidade da pesquisadora científica Dra. Juliana Galera Castilho Kawai, foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no uso de Animais do Instituto Pasteur (CEUA-IP) em reunião de 21/08/2018.



Karen Miyuki Asano
Coordenadora CEUA-IP
Biênio 2018 - 2019

Avenida Paulista, 393 – Cerqueira César – São Paulo / SP – CEP 01311-000 – Fones: (11) 3289 7738 / (11) 3145 3145 (DDR) / Fax: (11) 3289 0831
e-mail: pasteur@pasteur.saude.sp.gov.br / website: www.pasteur.saude.sp.gov.br

