THAIS HELENA MARTINS GAMON

**Estudo da etiopatogenia do vírus da raiva utilizando um modelo murino de
neuroinfecção**

São Paulo
2015

THAIS HELENA MARTINS GAMON

Estudo da etiopatogenia do vírus da raiva utilizando um modelo murino de
neuroinfecção

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Enio Mori

São Paulo

2015

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.3151
FMVZ

Gamon, Thais Helena Martins

Estudo da etiopatogenia do vírus da raiva utilizando um modelo murino de
neuroinfecção / Thais Helena Martins Gamon. -- 2015.
73 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Enio Mori.

1. Vírus fixo CVS/31. 2. Variantes virais de rua. 3. Imuno-histoquímica (IHQ).
4. Neuroinvasividade. 5. Neurovirulência. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da etiopatogenia da encefalomielite causada por diferentes variantes do vírus da raiva utilizando um modelo murino de neuroinfecção", protocolado sob o nº 3100/2013, utilizando 386 (trezentos e oitenta e seis) camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Enio Mori, foi aprovado em reunião de 14/8/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Evaluation of the encephalomyelitis etiopathogenesis caused by diferente variants of rabies vírus using a mouse model of neuroinfection", protocol number 3100/2013, utilizing 386 three hundred eighty-six) mice, under the responsibility Prof. Dr. Enio Mori, was approved in the meeting of day 8/14/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 02 de junho de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: GAMON, Thais Helena Martins

Título: Estudo da etiopatogenia do vírus da raiva utilizando um modelo murinho de neuroinfecção

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciência

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

Aos meus pais **Douglas José Gamon** e **Maria da Graça Martins Gamon** por toda dedicação, apoio, amor, conselhos e tudo mais que ofereceram durante toda a vida!

Amo vocês!

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. **Enio Mori**, agradeço imensamente pela confiança, ótima orientação, dedicação e apoio durante este período!

A minha querida irmã **Adriana Martins Gamon**, pelos valiosos conselhos e incentivos que sempre me concedeu visando o meu sucesso.

Aos sobrinhos **Gabriel** e **Luiza**, por tornarem meus dias mais felizes.

A Prof^a Dra. **Cláudia Mori** e Prof^o. Dr. **Paulo Maiorka** pelos auxílios desde o início do meu projeto de Mestrado.

A todos os funcionários do **Instituto Pasteur**, por sempre terem me acolhido tão bem e torcerem por mim, em especial a **Karen Miyuki Asano**, **Keila Iamamoto Nogi**, **Willian de Oliveira Fahl**, **Luciana Botelho Chaves**, **Samira Maria Achkar**, **Dra. Zélia**, **Graciane Caporale**, **Fernanda Guedes Ruiz**, **Elaine Fernandes**, **Karin Corrêa Scheffer Ferreira**, **Pedro Carnielli Junior**, **Graciane Maria Medeiros Caporale**, **Kátia Cristina**, **Maria Aparecida da Silva – “Cidoka”** e **Juliana Galera Castilho**.

Ao **Instituto Pasteur**, em nome da Sra. Diretora, Dra. **Luciana Hardt** e da chefia do laboratório: **Andréa de Cássia Rodrigues da Silva**, pela oportunidade valiosa de disponibilizarem condições necessárias para a realização do meu trabalho.

Ao **Dr. Antônio José da Silva** e **Valéria** pela amizade e conselhos benéficos.

Ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa concedida.

Aos amigos que fiz durante o aprimoramento profissional no **Instituto Pasteur**, em especial a **Natalia Frada Centoamore**, **Marcélia Sad Fernandes**, **Patricia Mariano** e **Viviane Alcântara**, obrigada por sempre me incentivarem rumo ao crescimento e sucesso profissional.

Aos amigos da **FMVZ/USP**: **Andressa**, **Paloma**, **Leonardo**, **Denis** e **Vera**, agradeço pelas ajudas nos experimentos e pela valiosa amizade.

Ao meu amigo e conselheiro **Wilson**, por sempre fornecer respostas claras às minhas dúvidas e por sempre me deixar mais tranquila.

A **Deus** e a toda **espiritualidade superior** por toda sua proteção e auxílio em todos os momentos da minha vida. Tenho a plena certeza de que Ele nunca me abandonou!

“A coragem é a primeira das qualidades humanas porque garante todas as outras”.

ARISTOTELES

RESUMO

GAMON, T. H. M. **Estudo da etiopatogenia do vírus da raiva utilizando um modelo murino de neuroinfecção**. [Study of the pathogenesis of rabies virus using a murine model of neuroinfection]. 2015. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A raiva é uma zoonose quase sempre fatal, que causa milhares de mortes humanas por ano em todo mundo. Essa enfermidade manifesta-se nos mamíferos em duas formas clínicas: furiosa e parálitica. Distinções em relação à evolução, manifestações clínicas, lesões, distribuição e respectiva carga viral no Sistema Nervoso Central (SNC) podem estar relacionadas às características de neuroinvasividade e neuropatogenicidade das diferentes variantes do vírus da raiva (RABV). O objetivo deste projeto foi estabelecer um modelo para o estudo da patogênese da raiva em camundongos inoculados com vírus fixo CVS/31 e variantes de rua do RABV originárias de bovino (variante 3 – compatível com isolados de morcegos hematófagos) e de canídeo silvestre (variante compatível com isolados de canídeo silvestre). Para estabelecer o modelo murino, 24 camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, de três semanas de idade foram inoculados com 10^3 DLIC₅₀/0,03mL por via intracerebral (IC) para confirmar a neurovirulência das diferentes variantes do RABV. De modo concomitante, 32 camundongos desta mesma linhagem e faixa etária, foram inoculados com 10^5 DLIC₅₀/0,03mL pela via coxim plantar (CP) com o intuito de mimetizar a progressão da infecção natural. Para o estudo da patogênese do RABV foram analisados durante um período de trinta dias após a inoculação (DPI) em camundongos pela via CP os seguintes parâmetros: manifestações clínicas, alterações histopatológicas, distribuição antigênica viral pela técnica de imuno-histoquímica (IHQ) e distribuição de RNA viral pela técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real precedida pela transcrição reversa (RT-qPCR) - sistema SYBR Green em diversos segmentos do SNC. Todos os camundongos inoculados com as três amostras do RABV apresentaram sintomas compatíveis com a forma parálitica da doença, tais como: piloereção, perda de peso, postura arqueada, prostração e paresia dos membros posteriores. Apesar de não ser possível observar diferenças de neuropatogenicidade

entre as variantes virais, detectaram-se diversidade de virulência entre essas estirpes, demonstrado pelas distinções de período de incubação e taxa de letalidade. Ao analisar os resultados, também foi possível observar diferenças entre a neurovirulência e a neuroinvasividade das diferentes variantes do RABV. Nos camundongos inoculados com CVS/31 pela via CP, no 6º DPI, observaram-se predomínio de manguitos perivasculares na medula espinhal e degeneração neuronal em córtex e intensa distribuição antigênica de RABV no tronco encefálico. Nos camundongos inoculados via CP com amostras do RABV originárias de bovino, no 8º DPI, apresentaram moderada distribuição de manguitos perivasculares na medula e córtex e intensa distribuição antigênica no tálamo. Já nos animais inoculados com a amostra de canídeo silvestre, no 9ºDPI, relataram-se moderada distribuição de manguitos perivasculares no tronco encefálico e moderada distribuição antigênica no córtex. Além disso, foi observado discrepâncias na comparação entre a intensidade e distribuição de marcações antigênicas pela IHQ e inferência semi-quantitativa de distribuição de RNA viral analisada pelo RT-qPCR-sistema SYBR Green no SNC de camundongos.

Palavras-chave: Vírus fixo CVS/31. Variantes virais de rua. Imuno-histoquímica (IHQ). Neuroinvasividade. Neurovirulência.

ABSTRACT

GAMON, T. H. M. **Study of the pathogenesis of rabies vírus using a murine model of neuroinfection.** [Estudo da etiopatogenia do vírus da raiva utilizando um modelo murino de neuroinfecção].2015. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Rabies is a zoonotic disease usually fatal, causing thousands of human deaths each year worldwide. This disease manifests itself in mammals in two clinical forms: furious and paralytic. Distinctions regarding the evolution, clinical manifestations, injuries, distribution and their viral load on the central nervous system (CNS) may be related to the characteristics of neuroinvasiveness and neuropathogenicity of different variants of rabies virus (RABV). The objective of this project was to establish a model to study the pathogenesis of rabies in mice inoculated with fixed virus CVS / 31 and RABV Street variants originating from bovine (variant 3 - compatible with isolates from vampire bats) and wild canid (variant supports isolated from wild canid). To establish the mouse model, 24 mice of the inbred strain BALB/c, three weeks old were inoculated with 10^3 DLIC₅₀/0,03mL intracerebrally (IC) to confirm the neurovirulence of the different variants of RABV. Concomitantly, 32 mice of the same lineage and age were inoculated with 10^5 DLIC₅₀/0,03mL via footpad (CP) in order to mimic the natural progression of the infection. To study the pathogenesis of RABV CP the following parameters were analyzed over a period of thirty days after inoculation (DPI) in mice via CP: clinical, histopathological changes, viral antigen distribution by the technique of immunohistochemistry (IHC) and distribution of RNA by real-time polymerase chain reaction technique preceded by reverse transcription (RT-qPCR) - SYBR Green system in various segments of the CNS. All mice inoculated with the three RABV samples showed symptoms consistent with the paralytic form of the disease, such as ruffled fur, weight loss, hunched, prostration and paresis of the hind limbs. Although it is not possible to observe neuropathogenicity differences between viral variants, the virulence diversity is detected between these strains demonstrated by distinctions incubation period and fatality rate. When analyzing the results, it was also possible to observe differences between neurovirulence and neuroinvasiveness of different variants of RABV. In

mice inoculated with CVS/31 via CP on the 6th DPI, there were predominance of perivascular cuffing in spinal cord and neuronal degeneration in cortex and intense antigenic distribution of the RABV in the brainstem. Mice inoculated via CP with RABV samples originating from bovine on the 8thDPI had moderate distribution of perivascular cuffing in the medulla and cortex and intense antigenic distribution in the thalamus. The animals inoculated with the sample of wild canid in 9thDPI reported a moderate perivascular cuffing distribution in the brainstem and moderate antigenic distribution in the cortex. Additionally, discrepancies were observed when comparing the intensity and distribution of antigenic tags by IHC, semi-quantitative inference viral RNA distribution analyzed by RT-qPCR using SYBR Green system in the mouse CNS.

Keywords: Fixed virus CVS/31, Street viral variants, Immunohistochemistry (IHC), Neuroinvasiveness, Neurovirulence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclos epidemiológicos de transmissão da raiva no Brasil	21
Figura 2 - Inoculação intracerebral (IC) em (A); Inoculação no coxim plantar (CP) em (B). São Paulo, 2013 – Instituto Pasteur	34
Figura 3 - Secções realizadas em encéfalo para realização dos exames histopatológicos.....	36
Figura 4 - Processo de retirada do encéfalo de camundongos	36
Figura 5 - Processo de retirada de medula espinhal por extração hidráulica	37
Figura 6 - Técnica de imunofluorescência direta	38
Figura 7 - Camundongos da linhagem BALB/c inoculados com a amostra CVS/31 por via intracerebral (Grupo I) no quinto dia de observação no período da manhã.....	49
Figura 8 - Comparação entre camundongo da linhagem BALB/c do grupo controle com um animal inoculado com a amostra CVS/31 por via CP no quinto dia de observação no período da manhã	49
Figura 9 - Cortes de encéfalo em medula espinhal de camundongos inoculados com o vírus da raiva	56
Figura 10 - Coloração Fluoro-JadeC	57
Figura 11 - Marcação imuno-histoquímica para RABV em cortes de cerebelo e encéfalo de camundongos BALB/c infectados com o CVS/31 (Grupo III)	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Delineamento experimental para determinação da DLIC ₅₀ (dose letal intracerebral 50%) contendo os grupos de camundongos da linhagem Swiss-Webster inoculados com vírus fixo (CVS/31). N=80 camundongos	32
Tabela 2 -	Delineamento experimental contendo os grupos de camundongos BALB/c inoculados com amostra de vírus fixo CVS/31 e de rua (Bovino 4005-V/IP2010 e Cão 5053-V/IP2010 pelas vias: coxim plantar (CP) e intracerebral (IC). N=72 camundongos.....	34
Tabela 3 -	Mortalidade de camundongos após inoculação intracerebral com a amostra de vírus fixo CVS/31 por diluição versus dia pós-inoculação (DPI). Número total n=80 animais.	45
Tabela 4 -	Cálculo da DLIC ₅₀ (dose letal intracerebral 50%) em camundongos por Reed e Muench inoculados com amostra de vírus fixo CVS/31.	46
Tabela 5 -	Período de incubação, período de morbidade e principais sintomas dos animais inoculados via Coxim Plantar e Intracerebral com as amostras: CVS/31; Canídeo Silvestre (Can. Silv.) 5053-V/IP2010 e Bovino (Bov) 4005-V/IP2010	50
Tabela 6 -	Valor médio por região de ciclo de quantificação (Cq), Valor de Cq corrigido (VC) e temperatura de “melting” TM (°C) referente as amostras de SNC de camundongos inoculados com vírus Bovino 4005-V/10IP (Grupos V e VI), Canídeo Silvestre (CS) 5053-V/IP2010 (Grupos VII e VIII) e CVS/31 (Grupos III e I), por via coxim plantar (CP) e intracerebral (IC)	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Relação de oligonucleotídeos iniciadores (primers) para a identificação do RABV direcionados à região do gene codificador da nucleoproteína N e as respectivas regiões de hibridização.....	41
Quadro 2 –	Condições de temperatura e de tempo selecionadas para cada ciclo da RT-PCR em tempo real pelo sistema SYBR Green para amplificação do gene codificador da proteína N do RABV.	43
Quadro 3 -	Intensidade da distribuição de lesões em fragmentos de SNC de camundongos inoculados no coxim plantar com vírus fixo CVS/31 (Grupo III) analisadas por HE	54
Quadro 4 -	Intensidade da distribuição de lesões em fragmentos de SNC de camundongos inoculados no coxim plantar com a amostra Bovino4005-V/IP2010 (Grupo V) analisadas por HE	54
Quadro 5 -	Intensidade da distribuição de lesões em fragmentos de SNC de camundongos inoculados no coxim plantar com a amostra Canídeo Silvestre 5053-V/IP2010 (Grupo VII) analisadas por HE	55
Quadro 6 -	Intensidade da distribuição de neurônios degenerados marcados pelo Fluoro-Jade C em fragmentos de SNC de camundongos inoculados no coxim plantar com vírus fixo CVS/31 (Grupo III) e vírus de rua Bovino 4005-V/IP2010 (Grupo V) e Canídeo Silvestre 5053-V/IP2010IP (Grupo VII)	55
Quadro 7 -	Intensidade de distribuição antigênica pela técnica de imuno-histoquímica em fragmentos de SNC de camundongos inoculados no coxim plantar com vírus fixo CVS/31 (Grupo III) e vírus de rua Bovino 4005-V/IP2010 (Grupo V) e Canídeo Silvestre 5053-V/IP2010 (Grupo VII).....	58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Médias de peso (em gramas) dos camundongos BALB/c inoculados por via intracerebral (IC) com a amostra CVS/31 (Grupo I) comparados com animais do grupo controle inoculados pela via IC com diluente (Grupo II).....	50
Gráfico 2 - Médias de peso (em gramas) dos camundongos BALB/c inoculados por via intracerebral (IC) com a amostra Bovino 4005-V/IP2010 (Grupo VI) comparados com animais do grupo controle inoculados pela via IC com diluente (Grupo II).....	51
Gráfico 3 - Médias de peso (em gramas) dos camundongos BALB/c inoculados por via intracerebral (IC) com a amostra Canídeo Silvestre 5053-V/IP2010(Grupo VIII) comparados com animais do grupo controle inoculados pela via IC com diluente (Grupo II)....	51
Gráfico 4 - Médias de peso (em gramas) dos camundongos BALB/c inoculados por via coxim plantar (CP) com a amostra Bovino 4005-V/IP2010 (Grupo V) comparados com animais do grupo controle inoculados pela via CP com diluente (Grupo IV)	52
Gráfico 5 - Médias de peso (em gramas) dos camundongos BALB/c inoculados por via coxim plantar (CP) com a amostra de Canídeo Silvestre 5053-V/IP2010(Grupo VII) comparados com animais do grupo controle inoculados pela via CP com diluente (Grupo IV)	52
Gráfico 6 - Médias de peso (em gramas) dos camundongos BALB/c inoculados por via coxim plantar (CP) com o vírus fixo CVS/31 (Grupo III) comparados com animais do grupo controle inoculados pela via CP com diluente (Grupo IV).....	53
Gráfico 7 - Médias de valor corrigido de ciclo de quantificação (VC) por porção do encéfalo e medula espinhal de camundongos BALB/c inoculados via intracerebral (IC) com CVS/31 (Grupo I). *P=0,035	61
Gráfico 8 - Médias de valor corrigido de ciclo de quantificação (VC) por porção do encéfalo e medula espinhal de camundongos BALB/c inoculados via coxim plantar (CP) com CVS/31 (Grupo III).....	61
Gráfico 9 - Médias de valor corrigido de ciclo de quantificação (VC) por porção do encéfalo e medula espinhal de camundongos BALB/c inoculados via intracerebral (IC) com a amostra de Canídeo Silvestre 5053-V/IP2010 (Grupo VIII)	62

Gráfico 10 - Médias de valor corrigido de ciclo de quantificação (VC) por porção do encéfalo e medula espinhal de camundongos BALB/c inoculados via coxim plantar (CP) com a amostra de Canídeo Silvestre 5053-V/IP2010 (Grupo VII).....	62
Gráfico 11 - Médias de valor corrigido de ciclo de quantificação (VC) por porção do encéfalo e medula espinhal de camundongos BALB/c inoculados via intracerebral (IC) com a amostra de Bovino4005-V/IP2010 (Grupo VI).....	63
Gráfico 12 - Médias de valor corrigido de ciclo de quantificação (VC) por porção do encéfalo e medula espinhal de camundongos BALB/c inoculados via CP com a amostra de Bovino4005-V/IP2010 (Grupo V)	63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	28
2.1	OBJETIVOS GERAIS	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	VÍRUS DA RAIVA (RABV)	29
3.1.1	Amostra de vírus fixo	29
3.1.2	Amostras de vírus de rua	29
3.2	ANIMAIS	30
3.3	CÁLCULO DA TITULAÇÃO VIRAL DO CVS/31	30
3.4	INOCULAÇÃO DO RABV	31
3.4.1	Preparo do diluente	31
3.4.2	Preparo da suspensão a 20%	31
3.4.3	Cálculo da dose letal intracerebral 50% (DLIC₅₀)	31
3.4.4	Reativação viral das amostras de rua	32
3.5	EXPERIMENTO UTILIZANDO VÍRUS FIXO CVS/31 E AMOSTRAS DE RUA	33
3.6	COLHEITA DE AMOSTRAS DOS CAMUNDONGOS	35
3.7	TÉCNICA DE IMUNOFLOURESCÊNCIA DIRETA (IFD) PARA ANTICORPO ANTINUCLEOPROTEÍNA DO RABV	37
3.8	TÉCNICA HISTOPATOLÓGICA	38
3.9	COLORAÇÃO FLUORO-JADE C	39
3.10	TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA ANTICORPO ANTINUCLEOPROTEÍNA	39

3.11	TÉCNICA DE RT-PCR EM TEMPO REAL COM ALVO PARA O GENE N DA NUCLEOPROTEÍNA DO RABV	41
3.11.1	Extração do RNA utilizando Kit RNA spin Mini RNA isolation Kit (GE Healthcare, UK).....	41
3.11.2	Oligonucleotídeos iniciadores “Primers”	41
3.11.3	Transcrição Reversa – Síntese do DNA complementar	42
3.11.4	Reação em Cadeia pela Polimerase em tempo real (qPCR) pelo sistema SYBR Green	42
3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4	RESULTADOS	45
4.1	CÁLCULO DA DLIC50.....	45
4.2	SINAIS CLÍNICOS APÓS INOCULAÇÃO VIA COXIM PLANTAR E INTRACEREBRAL.....	47
4.3	COLORAÇÃO FLUORO JADE C E ANÁLISE HISTOLÓGICA PELA COLORAÇÃO HE.....	53
4.4	TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	57
4.5	RT-PCR EM TEMPO REAL.....	59
5	DISCUSSÃO	64
6	CONCLUSÃO.....	68
	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

O vírus da raiva ou *rabies virus* (RABV) é um agente neurotrópico causador de encefalomielite em todas as espécies mamíferas e com raras exceções, uma vez sintomáticos, a evolução nos animais e seres humanos é fatal (BRASIL, 2008).

A Organização Mundial de Sanidade Animal estima que aproximadamente 70.000 pessoas morrem anualmente em decorrência da raiva em todo o mundo, principalmente crianças providas de países em desenvolvimento. A Ásia e a África são os continentes com o mais alto risco de mortalidade humana, representando 95% de casos fatais no mundo. Sendo que estas regiões são as que apresentam menores índices de controle de raiva em canídeos no mundo (OIE, 2015).

Casos positivos de raiva humana causadas por mordedura de cães ainda acontecem na América Latina, com regiões consideradas críticas como Haiti, Peru, Honduras, República Dominicana, Guatemala, Bolívia e alguns Estados do Brasil, por exemplo: Maranhão, Piauí, Ceará e Mato Grosso do Sul (VIGILATO et al., 2013; WHO, 2014).

Entretanto, a incidência de raiva canina na América Latina declinou drasticamente nas últimas décadas, sendo que de 25.000 casos de cães confirmados positivos em 1980 diminuiu para menos de 300 casos em 2010. Em relação a raiva humana transmitidos por cães, também ocorreu um decréscimo significativo neste mesmo período, sendo que de 350 casos positivos declinou para menos de 10 casos. Isto ocorreu graças aos intensos programas nacionais de controle da Raiva em vários países da América Latina a partir dos anos 80, exemplificados pelas vacinações massivas em cães com mais de 51 milhões de doses anuais, profilaxia pré e pós-exposição, melhorias no diagnóstico da doença e vigilância intensiva (VIGILATO et al., 2013).

Anualmente, mais de 15 milhões de pessoas ao redor do mundo são submetidas ao esquema de profilaxia pós-exposição com o intuito de prevenir milhares de mortes pelo RABV anualmente (WHO, 2014).

O RABV pertence ao gênero *Lyssavirus* e família *Rhabdoviridae*, pelo qual junto com as famílias *Paramyxoviridae*, *Filoviridae* e *Bornaviridae*, constituem a ordem *Mononegavirales* (ICTV, 2014). O RABV é um vírus envelopado, devido a

isso, é sensível a detergentes e solventes lipídicos como éter e clorofórmio, sendo sua resistência fora do hospedeiro muito baixa (RODRIGUES et al., 2012)

O vírion, que é a partícula completa do RABV, apresenta um formato característico de projétil, com uma extremidade semicircular e outra plana, sendo constituído pela ribonucleoproteína (RNP) e pelo envelope viral que envolve a RNP (RODRIGUES et al., 2012).

O envelope viral é composto por uma bicamada lipídica à qual estão associadas a proteína M – Proteína Matriz e pela proteína G – Glicoproteína. A proteína M une o envelope do vírus à RNP interna e está envolvida na montagem e liberação viral (MEBATSION, 2001). A Glicoproteína G é fundamental para a resposta imune contra o RABV, sendo responsável pela indução de anticorpos neutralizantes, além de importante papel na adsorção viral a receptores específicos nas células do hospedeiro (WUNNER, 2007).

A RNP apresenta-se sob a forma de um complexo helicoidal constituído de RNA de fita simples, sentido negativo, associado a uma proteína N – Nucleoproteína e uma proteína P – Fosfoproteína, assim como a uma proteína L – do inglês *Large* - Proteína RNA-polimerase (WUNNER et al., 1988).

A proteína N está intimamente associada ao RNA viral, protegendo-o da ação de ribonucleases, sendo a mais conservada dentre as proteínas dos *Lyssavirus* (TORDO et al., 1986). Devido a esta característica importante, o gene da proteína N tem sido a mais utilizada para a detecção do vírus da raiva por RT-PCR (WUNNER, 2007).

A proteína P interage com as proteínas N e L e acredita-se que atue como co-fator da RNA polimerase, sendo multifuncional, ligando-se a outras proteínas virais para auxiliar na replicação do genoma viral e interagir com fatores celulares, provavelmente na disseminação e patogênese viral (MEBATSION, 2001). A proteína L possui função de RNA polimerase RNA dependente (TORDO et al., 1986).

As correlações filogenéticas e sorológicas contribuem para a formação de dois filogrupos principais dentro do gênero *Lyssavirus*. O filogrupo I inclui o *Rabies virus* (RABV), *Duvenhage virus* (DUVV), *European bat lyssavirus* – tipo 1 e tipo 2 (EBLV 1 e 2), *Australian bat lyssavirus* (ABLV), *Aravan virus* (ARAV), *Khujand virus* (KHUV), *Irkut virus* (IRKV) e *Bokeloh bat lyssavirus* (BBLV). O filogrupo II inclui *Lagos bat virus* (LBV), *Mokola virus* (MOKV) e *Shimoni bat virus* (SHIBV). Baseado

nas características filogenéticas e sorológicas, o *West Caucasian bat virus* (WCBV) e *Ikoma lyssavirus* (IKOV) não podem ser incluídos em nenhum destes filogrupos (BANYARD et al., 2013; ICTV, 2014).

Em estudo realizado por Badrane et al. (2001) com o intuito de verificar as diferenças de patogenicidade e imunopatogenicidade entre as espécies do filogrupo I e do filogrupo II, camundongos da linhagem BALB/c e C3H foram inoculados por via intramuscular após cálculo da DLIC₅₀ em camundongos da linhagem Swiss, demonstrando que as viroses do filogrupo I são mais patogênicas do que as viroses do filogrupo II.

O ciclo epidemiológico da raiva no Brasil pode ser dividido didaticamente em quatro ciclos: urbano, rural, silvestres terrestre e aéreo, sendo que os reservatórios mais importantes são os da Ordem *Carnivora* e *Chiroptera* (Figura 1). No ciclo urbano, a principal fonte de infecção é o cão doméstico. No Brasil, o morcego é o principal responsável pela manutenção do ciclo silvestre. Outros reservatórios silvestres são: macaco, raposa, coio, chacal, gato-do-mato, jaritaca, guaxinim e mangusto (KOTAIT et al., 2007). As principais formas de transmissão são por mordedura, arranhadura e lambedura, ou seja, por meio da saliva contaminada com o vírus (BRASIL, 2008).

Figura 1 - Ciclos epidemiológicos de transmissão da raiva no Brasil

Fonte: <http://www.medicinanet.com.br/conteudos/conteudo/2185/raiva.htm>

O painel de anticorpos monoclonais anti-nucleoproteína estabelecido pelo CDC (*Centers for Disease Control* – Atlanta – EUA), para estudos de isolados do RABV nas Américas, estabelecido por Diaz et al. (1994), permitiu demonstrar a existência de 12 variantes antigênicas, das quais 5 já foram identificadas no Brasil, que são: a variantes¹ (informação verbal)^{1,2} e 2 com perfis antigênicos compatíveis com cães domésticos (*Canis familiaris*), variante 3 compatível com morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*, variante 4 compatível com morcegos insetívoros *Tadarida brasiliensis* e variante 6 compatível com morcegos insetívoros *Lasiurus cinereus*. Foi encontrado também perfis não compatíveis com o painel de monoclonais pré-estabelecido para o estudo das estirpes isoladas nas Américas por Diaz et al. (1994), especialmente as variantes isoladas de sagui do tufo branco (*Callithrix jacchus*) e as de cachorro do mato (*Cerdocyon thous*) (FAVORETTO et al., 2001, 2002, 2006).

A apresentação clínica da raiva é muito variável na maioria das espécies atingidas. As apresentações clássicas da doença são as formas parálitica e furiosa (RODRIGUES et al., 2012). As variantes virais do RABV, classificadas por suas características moleculares e antigênicas da nucleoproteína e da glicoproteína G, podem também ser identificadas pelas suas diferenças em relação às manifestações clínicas, origem geográfica e espécie de hospedeiro reservatório. A manifestação da raiva furiosa é mais frequente em variantes do RABV encontrada em carnívoros domésticos e selvagens na região nordeste do Brasil. Vale salientar que as estirpes do vírus da raiva relacionadas com os canídeos silvestres são geneticamente agrupadas em dois *clusters* independentes, com perfis distintos (identidade nucleotídica de 88,6%) (CARNIELI et al., 2006). Já a raiva com sinais clínicos de paralisia é mais comum em isolados derivados da variante viral relacionados a agravos de morcegos hematófagos, que é prevalente em todo território (FAVORETTO et al., 2002; CARNIELI et al., 2006; BRASIL, 2015).

Manifestações límbicas de agressividade, alta neuroinvasividade (quantificada pela concentração de antígeno e de RNA viral no encéfalo) e moderada inflamação foram observadas em cães e camundongos infectados com variantes virais de raiva furiosa. Já em cães e camundongos infectados com variantes virais da raiva

¹ Informação fornecida pelo Sr. Eduardo Pacheco de Caldas na 14ª. Reunião de Diretores dos Programas de Controle da Raiva (REDIPRA 14) em Lima, em agosto de 2013.

² Informação fornecida pelo Profº. Dr. Enio Mori sobre surto epizootico em cães e um caso diagnosticado positivo em humano com raiva em Corumbá/MS com perfil compatível com Variante 1 no Instituto Pasteur/ SP, em abril de 2015.

paralítica, observa-se predominância de manifestações de paralisia do neurônio motor inferior, período de incubação longo (média de 11 dias) e intensa inflamação predominante no tronco encefálico com denso infiltrado de células T. No entanto, os mecanismos que resultam nessas distintas formas clínicas ainda não foram devidamente esclarecidos (IWASAKI; GERHARD; CLARK, 1977; SHUANGSHOTI et al., 2013). Modelos experimentais com cangambás *Mephitis mephitis*, mimetizando o que ocorre na infecção natural, mostram que após inoculação intramuscular na extremidade dos membros posteriores, ocorre uma replicação extra neural do RABV no músculo localizado na porta de entrada (CHARLTON et al., 1997). A seguir, o RABV invade o sistema nervoso periférico (SNP) através da ligação da glicoproteína G a receptores neurais nas terminações nervosas, sendo que os mais relatados são os receptores nicotínicos da acetilcolina na junção neuromuscular (nAChR), a molécula de adesão da célula neuronal (NCAM) e o neuro-receptor p75 (p75NTR) (LENTZ et al., 1982; THOULOZE et al., 1998; TUFFEREAU et al., 1998).

Então, o RABV se propaga passivamente pelos axônios dos nervos periféricos até o sistema nervoso central (SNC) através do fluxo axoplasmático retrógrado de modo centrípeto por intermédio da disseminação célula a célula (KUCERA et al., 1985). A partir da intensa replicação no SNC, o RABV segue em direção centrífuga, disseminando-se através do SNP e autônomo para diferentes órgãos ou estruturas extra neurais (pulmões, coração, rins, bexiga, trato genital, folículo piloso, glândulas salivares, córnea, pâncreas e fígado) (BALACHANDRAN; CHARLTON, 1994; CHARLTON et al., 1997; SRINIVASAN et al., 2005; MAIER et al., 2010).

Experimentos realizados após inoculação intracerebral (IC) e intramuscular (IM) em camundongos da linhagem C57BL/6J de seis semanas de idade com o vírus fixo CVS/11 demonstraram uma encefalomielite fatal. Sendo que nos camundongos inoculados via intracerebral foi detectado antígenos virais em córtex cerebral e hipocampo dois dias após a inoculação e após isto, ocorreu uma distribuição centrífuga para tálamo, tronco encefálico, cerebelo, medula espinhal e gânglios nervosos. Em contraste, camundongos inoculados via IM foi observado antígenos virais na musculatura no local da inoculação no segundo dia após inoculação. No quarto dia após inoculação os antígenos estavam na medula espinhal e nas fibras musculares, sem sua detecção em encéfalo e hipocampo. Todos os animais

inoculados por esta via apresentaram paralisia. Este estudo sugere, portanto, que a necrose dos neurônios da medula espinhal foram mais importantes para causar paralisia do que a severa infecção cerebral e apoptose em camundongos C57BL/6J infectados com o vírus fixo CVS-11 (PARK et al., 2006), sugerindo que as diferentes lesões histopatológicas em diferentes locais influenciam nas manifestações clínicas da doença.

Kojima et al. (2010) observaram que camundongos BALB/c inoculados com CVS-11 pela via IC não manifestavam sinais de paralisia e as lesões ficavam restritas ao encéfalo. Esses autores constataram pela imuno-histoquímica (IHQ) que os antígenos virais estavam presentes nas células piramidais do hipocampo e córtex cerebral no 3º dia pós-inoculação (DPI), e que estas mesmas células apresentavam apoptose no 5º DPI. Além disso, houve aumento das células inflamatórias microgliais e astrogiais nas regiões do SNC que ocorreram apoptose.

Diferentemente, em camundongos C57BL/6J inoculados pela via intramuscular com CVS-11, Kojima et al. (2009) verificaram quadro paralítico associado com alterações na medula espinhal, constituídas pela infiltração de linfócitos T e aumento das células da microglia no 5º DPI. Esses autores observaram que no 7º DPI as células descritas acima apresentaram apoptose, enquanto que os neurônios infectados com vírus apresentavam necrose.

Cunha et al. (2010) utilizando amostras de vírus de rua (isolados de cães e morcegos hematófagos e não-hematófagos) observaram diferenças na patogenicidade em camundongos *Swiss* quando inoculados pelas vias IC e IM, com 100% de letalidade pela via IC e com diferentes taxas de mortalidade pela via IM, variando de acordo a estirpe viral.

Além da via de inoculação, Huang et al. (2013) demonstraram que diferenças na patogenicidade de três variantes do RABV que são representativos na China também podem ser influenciadas pela faixa etária dos camundongos, por exemplo, camundongos de 14 dias de vida inoculados por via IM e IC não apresentaram mortalidade, enquanto a inoculação IC com a mesma variante viral em camundongos de 7 dias de vida obteve 100% de fatalidade. No entanto, estes mesmos autores não observaram diferenças na distribuição viral no SNC entre os vírus fixo e de rua.

Sugamata et al. (1992) observaram após inoculação via coxim plantar (CP) com variantes de rua do RABV, que os camundongos imunocompetentes apresentaram paralisia de maneira progressiva de membro posterior com sinal inicial de “fraqueza” no membro inoculado com desenvolvimento de paralisia bilateral. No entanto, os autores sugerem que a observação da raiva paralítica é mediada pelos linfócitos T, evidenciada pela presença de processo inflamatório, caracterizado como infiltrado celular difuso nas meninges, parênquima e extensivo manguito perivascular com presença de células mononucleares. Os autores observaram mortalidade de 71% nos camundongos inoculados pela via CP em contraste com 100% de mortalidade em animais inoculados pela via IC. Provavelmente, os linfócitos TCD8⁺ difusamente distribuídos no parênquima devem estar envolvidos na eliminação citotóxica das células neuronais infectadas pelo vírus, causando morte do neurônio motor.

Lesões conceituadas como encefalomielite não-suprativa é caracterizada pela presença de manguito perivascular, infiltrado mononuclear (linfócitos, macrófagos e plasmócitos em menor quantidade), neurônios degenerados, hemorragias, gliose focal e regional, podendo estar distribuídos no tronco encefálico, cerebelo, medula espinhal, tálamo e telencéfalo (incluindo o hipocampo). Sendo estas características observadas em análise de materiais provindo de herbívoros com sintomas de raiva paralítica (LANGOHR et al., 2003; BERNARDI et al., 2005). Nestes casos, o processo inflamatório poderia levar a uma diminuição da disseminação viral no SNC, particularmente nos hemisférios cerebrais, o que explicaria o período de sobrevivência maior quando comparado com os casos de raiva furiosa (SHUANGSHOTI et al., 2013).

Além disso, lesões e encefalomielite não-suprativa relacionados à raiva paralítica estão presentes em camundongos imunocompetentes (SUGAMATA et al., 1992). Dois terços dos pacientes humanos infectados com variantes caninas do RABV desenvolvem manifestações de raiva furiosa, com inflamação leve do SNC pela pesquisa histopatológica, podendo estar mais associada a uma extensiva propagação do RABV, sendo considerado um mecanismo vírus-mediado (HEMACHUDHA et al., 2013).

Sabe-se que amostras do RABV apresentam diferentes potenciais de neuroinvasividade e neurovirulência. Amostras de vírus de laboratório fixo,

previamente adaptadas em cultivos celulares ou camundongos e amostras de vírus da raiva de rua podem apresentar diferentes potenciais patogênicos (FABER et al., 2004). Sendo que neuroinvasividade pode ser definida como sendo a capacidade do vírus de invadir, multiplicar-se e distribuir-se no sistema nervoso central (SNC) e a neurovirulência é a capacidade que o vírus possui de provocar lesões no SNC (SPILKI et al., 2002).

Em 2004, nos Estados Unidos, é descrito o primeiro relato de cura da raiva sem a utilização de vacinação em um tratamento baseado na indução de coma profundo associado com terapia antiviral, denominado “Protocolo de Milwaukee” (WILLOUGHBY et al., 2005). Já em 2008, um tratamento baseado no “Protocolo de Milwaukee” foi realizado em Recife-PE, tendo como resultados a eliminação (*clearance*) viral e a recuperação clínica do paciente com raiva, sendo considerado o segundo caso de cura no mundo (BRASIL, 2009).

De modo rotineiro, coletas seriadas de amostras clínicas, tais como saliva, líquido cefalorraquidiano e folículo piloso, são utilizados na detecção do RABV no diagnóstico *ante mortem* pela técnica de *hemi-nested* RT-PCR utilizando o gene N (MACEDO et al., 2006). O monitoramento da eliminação do vírus durante o curso da terapia pode ser uma importante ferramenta para indicar o *clearance* viral no tecido nervoso. Parece promissor a utilização da RT-PCR em tempo real, uma técnica mais sensível do ponto de vista analítico, para a detecção e quantificação da carga viral durante a terapia com a finalidade de monitoramento (SCHEFFER, 2011; SILVA et al., 2013).

Contudo, estudos mais detalhados serão necessários para correlacionar as manifestações clínicas com a intensidade e as características das lesões no SNC em relação às amostras de diferentes espécies animais.

Sendo assim, com o intuito de estudar a etiopatogenia do vírus da raiva utilizamos uma amostra de vírus fixo (CVS/31) e duas amostras de vírus de rua, que representam importantes reservatórios do RABV no Brasil, sendo uma de morcego hematófago e outra compatível com canídeo silvestre. As vias de inoculação escolhidas foram via IC para confirmar a neurovirulência do vírus e via CP, com o intuito de mimetizar a infecção natural e servir como indicativo de neuroinvasividade, através da capacidade de diferentes amostras virais de invadir e se distribuir em diversas porções do SNC após replicação primária na musculatura.

A partir dos resultados obtidos do presente trabalho, obter-se-á uma possível relação entre lesões no SNC, evolução clínica da doença e tipo de variante viral. Essas informações poderão fornecer subsídios para o monitoramento *ante mortem* de casos de raiva em humanos submetidos a tratamento como protocolo de Milwaukee.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Estabelecer um modelo murino para o estudo da patogênese da raiva, utilizando camundongos da linhagem isogênica BALB/c inoculados pela via coxim plantar (CP) com diferentes amostras do RABV originárias de vírus fixo (CVS/31) e de rua (bovino - variante antigênica 3 compatível com isolados de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*) e de canídeo silvestre – (variante antigênica compatível com isolados de canídeo silvestre *Cerdocyon thous*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Comprovar diferenças na neuropatogenicidade das variantes do RABV provenientes de canídeo silvestre (variante compatível com isolados de canídeo silvestre) e de bovino (variante 3) pela observação das manifestações clínicas de raiva furiosa ou paralítica em camundongos inoculados via CP.

b) Estabelecer diferenças na neurovirulência das variantes de canídeo silvestre e 3 do RABV pela observação dos seguintes parâmetros: período de incubação, período de morbidade, taxa de letalidade e alterações histopatológicas das lesões de natureza inflamatória e/ou degenerativa em diferentes segmentos do SNC (encéfalo e medula espinhal) de camundongos inoculados via CP.

c) Verificar diferenças na neuroinvasividade das variantes de canídeo silvestre e 3 do RABV pela análise da distribuição viral em diferentes porções do SNC (encéfalo e medula espinhal) de camundongos inoculados via CP.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os protocolos e procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão Científica do Instituto Pasteur (Protocolo IP 12/2014).

3.1 VÍRUS DA RAIVA (RABV)

3.1.1 Amostra de vírus fixo

Foi utilizada a estirpe de vírus fixo CVS/31 (*Challenge Virus Standard*), adaptado em camundongos, pelo qual foi calculado o título de DLIC₅₀ (dose letal intracerebral 50%) utilizando o método (REED; MUENCH, 1938).

3.1.2 Amostras de vírus de rua

Foram utilizadas amostras de vírus de rua, derivadas do setor de diagnóstico do Instituto Pasteur de São Paulo, provenientes de:

- a) Canídeo silvestre – amostra 5053-V/2010IP, mantida na 7ª passagem em cultivo celular de neuroblastoma murino (N2a). Amostra proveniente do município de Salgueiro/PE. Tipificação antigênica com anticorpos monoclonais como variante com perfil compatível com isolados de canídeos silvestres *Cerdocyon thous* da região Nordeste.
- b) Bovino – amostra 4005-V/2010 mantida na 6ª passagem em cultivo celular de N2a. Amostra proveniente do município de Piracaia/SP. Tipificação antigênica com anticorpos monoclonais como variante 3, com perfil compatível com isolados de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*.

3.2 ANIMAIS

As condições climáticas e do ambiente para os camundongos, foram controladas com temperatura entre 22 e 24°C, umidade relativa do ar entre 40 e 60% e fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro. A cama foi a maravalha de pinus autoclavada, trocada semanalmente. Água filtrada e ração comercial peletizada (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes SA., Curitiba, PR) foram oferecidas *ad libitum* durante todo o experimento. As condições de alojamento e manejo dos animais foram de acordo com as normas éticas internacionais, em especial àquelas do National Research Council (NRC, 2010).

Os animais foram utilizados segundo as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório do Comitê de Ética no Uso de Animais da FMVZ – USP (Protocolo nº 3100/2013) e da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Pasteur (Protocolo nº 03/2014).

3.3 CÁLCULO DA TITULAÇÃO VIRAL DO CVS/31

A seguir foram utilizados 80 animais da linhagem Swiss-Webster com três semanas de idade, com peso corpóreo entre 11 a 14g, provenientes do Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ/USP, com o intuito de calcular a titulação em DLIC₅₀(dose letal intracerebral 50%) da amostra de vírus fixo CVS/31 de acordo com o método descrito por (REED; MUENCH, 1938).

Para o cálculo da DLIC₅₀, os camundongos infectados foram alojados separadamente por diluição, em grupos de cinco animais, em mini-isoladores de polisulfona medindo 20X32X21 cm (422 cm²), utilizando um sistema de *rack* ventilada com ventilação individual para cada gaiola e filtros hepa na entrada e saída do ar.

3.4 INOCULAÇÃO DO RABV

3.4.1 Preparo do diluente

Em uma proveta de 2000mL, foi adicionado 20mL de soro fetal bovino Gibco[®], 1,0mL de antibiótico gentamicina e solução salina a 0,85% q.s.p. para completar 2 litros.

3.4.2 Preparo da suspensão a 20%

Para o preparo da suspensão a 20%, foi macerado 1,0g de tecido de SNC de cada amostra em um gral, com o auxílio de um pistilo e adicionados 4,0mL de diluente (preparado no item 3.4.1). Após isso, foi centrifugado a 1500 rpm (301,86G) para que os resíduos grosseiros sedimentem. A seguir o sobrenadante foi submetido à filtração através de membranas esterilizadas de 0,45 micrômetros.

3.4.3 Cálculo da dose letal intracerebral 50% (DLIC₅₀)

A amostra de vírus fixo foi diluída em série com razão de 10, com diluente descrito no item 3.4.1, partindo-se de uma suspensão inicial de cérebros de camundongos a 20% (p/v). Cada diluição foi inoculada intracerebralmente em 10 camundongos da linhagem *Swiss-Webster*, com volume de 0,03mL nas diferentes diluições 10^{-2} até 10^{-9} , conforme descrito na tabela 1. Para determinação da DLIC₅₀ obtida a partir do número de animais mortos e sobreviventes nas diferentes diluições, os camundongos foram avaliados diariamente até o aparecimento dos sintomas durante o período de 30 dias. As amostras de vírus de rua canídeo silvestre 5053-V/2010IP e Bovino 4005-V/2010 já haviam sido previamente tituladas

no Instituto Pasteur/SP no projeto intitulado “Análise da resposta imune humoral de camundongos infectados com as variantes II e III do RABV” de responsabilidade da pesquisadora Karin Scheffer.

Tabela 1 - Delineamento experimental para determinação da DLIC₅₀ (dose letal intracerebral 50%) contendo os grupos de camundongos da linhagem Swiss-Webster inoculados com vírus fixo (CVS/31). N=80 camundongos

Diluições	Número de camundongos inoculados
	CVS/31
10^{-2}	10
10^{-3}	10
10^{-4}	10
10^{-5}	10
10^{-6}	10
10^{-7}	10
10^{-8}	10
10^{-9}	10

3.4.4 Reativação viral das amostras de rua

Inicialmente, com intuito de reativação viral, as amostras de vírus de rua provenientes do setor de diagnóstico do Instituto Pasteur previamente mantidas em células de N2a (*American Type Culture Collection-ATCC*) até a 6ª passagem para a amostra Bovino 4005-V/IP2010 e 7ª passagem para a amostra Canídeo Silvestre 5053-V/IP2010, foram tituladas em DLIC₅₀ em camundongos *Swiss-Webster* (protocolo CEUA IP03/2015). As amostras de Bovino 4005-V/IP2010 e Canídeo Silvestre 5053-V/2010IP possuíam títulos em DLIC₅₀ de 10^6 e 10^5 , respectivamente.

3.5 EXPERIMENTO UTILIZANDO VÍRUS FIXO CVS/31 E AMOSTRAS DE RUA

Os camundongos da linhagem Balb/c, em um total de 56 animais, com três semanas de idade, fêmeas, provenientes do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), foram inoculados por via intracerebral (IC) e via coxim plantar (CP) com 10^3 DLIC₅₀/0,03ml por via IC e 10^5 DLIC₅₀/0,03mL por via CP com suspensão de SNC a 20% contendo vírus fixo CVS/31 e vírus de rua: Bovino 4005-V/IP2010, Canídeo Silvestre 5053-V/IP2010 (Figura 2). Os camundongos do grupo controle foram tratados de forma idêntica aos experimentais e receberam diluente sem inóculo viral por via IC e CP. Conforme especificado na tabela 2, os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- **Grupo I** (CVS/31-IC), composto por 6 animais submetidos à inoculação intracerebral com vírus fixo CVS/31 na dose de 30µL;
- **Grupo II** (controle -IC), composto por 6 animais submetidos à inoculação intracerebral com diluente na dose de 30µL;
- **Grupo III** (CVS/31-CP), composto por 8 animais submetidos à inoculação no coxim plantar esquerdo com CVS/31 na dose de 30 µL;
- **Grupo IV** (controle – CP), composto por 8 animais submetidos à inoculação no coxim plantar esquerdo com diluente na dose de 30 µL;
- **Grupo V** (Bovino 4005-V/IP2010-CP), composto por 8 animais submetidos à inoculação no coxim plantar esquerdo com suspensão da amostra Bovino 4005-V/IP2010 na dose de 30 µL;
- **Grupo VI** (Bovino 4005-V/IP2010 - IC), composto por 6 animais submetidos à inoculação por via intracerebral na dose de 30 µL;
- **Grupo VII** (Canídeo Silvestre 5053-V/IP2010 - CP) composto por 8 animais submetidos à inoculação no coxim plantar esquerdo com suspensão da amostra na dose de 30 µL;
- **Grupo VIII** (Canídeo Silvestre 5053-V/IP2010 - IC) composto por 6 animais submetidos à inoculação por via intracerebral na dose de 30 µL.

Os camundongos foram avaliados e pesados diariamente até o aparecimento dos sintomas durante o período de 30 dias, sempre as 11:00 horas. Aqueles animais

que apresentaram sintomas graves de encefalite viral foram submetidos à eutanásia por *overdose* de anestésico inalatório isofluorano.

Os camundongos infectados e controles foram alojados separadamente, em grupos de seis animais, em mini-isoladores de polisulfona medindo 20x32x21 cm (422 cm²), utilizando um sistema de *rack* ventilada com ventilação individual para cada gaiola e filtros hepa na entrada e saída do ar.

Tabela 2 - Delineamento experimental contendo os grupos de camundongos BALB/c inoculados com amostra de vírus fixo CVS/31 e de rua (Bovino 4005-V/IP2010 e Cão 5053-V/IP2010 pelas vias: coxim plantar (CP) e intracerebral (IC). N=72 camundongos.

Grupos de inoculação	Camundongos utilizados para RT-qPCR	Camundongos utilizados para Histopatologia e IHQ
Grupo I (CVS/31-IC)	6	-
Grupo II (controle -IC)	6	-
Grupo III (CVS/31-CP)	4	4
Grupo IV (controle – CP)	4	4
Grupo V (Bovino 4005-V/IP2010 – CP)	4	4
Grupo VI (Bovino 4005-V/IP2010 – IC)	6	-
Grupo VII (Cão 5053-V/IP2010 – CP)	4	4
Grupo VIII (Cão 5053-V/IP2010 – IC)	6	-

Legenda: IHQ – Imunohistoquímica. RT-qPCR – PCR em Tempo Real

Figura 2 - Vias de Inoculação

Fonte: Gamon, T. H. M (2013)

Legenda: (A) Inoculação via intracerebral (IC); Em (B) Inoculação no coxim plantar (CP). São Paulo, 2013 – Instituto Pasteur.

3.6 COLHEITA DE AMOSTRAS DOS CAMUNDONGOS

Para a confirmação da presença do RABV no SNC dos camundongos inoculados com as amostras de vírus fixo CVS/31 e de rua, foi retirado o SNC para a confecção de lâminas com impressões de fragmentos do SNC para realização da técnica de imunofluorescência direta (item 3.7) e armazenamento dos isolados virais em freezer -80°C.

As amostras de encéfalo e medula espinhal foram coletadas de camundongos da linhagem BALB/c dos grupos: I (CVS/31-IC); II (controle-IC); III (CVS/31-CP); IV (Controle-CP); V (Bovino 4005-V/IP2010-CP); VI (Bovino 4005-V/IP2010-IC); VII (Canídeo Silvestre 5053-V/IP2010-CP) e VIII (Canídeo Silvestre 5053-V/IP2010-IC) inoculados pela via IC e CP, que ficaram doentes e foram submetidos à eutanásia por overdose de Isoflurano, e armazenados a -80°C para posterior utilização em técnicas moleculares. O processo de retirada da medula espinhal foi realizado por extração hidráulica através de uma rápida pressão sobre o êmbolo de uma seringa cheia de água acoplada a uma agulha romba inserida no canal medular na região lombar, sendo que a cabeça do camundongo foi removida por desarticulação atlanto-occipital (JORDAN et al., 2011). O processo de retirada do encéfalo e da medula espinhal estão ilustrados na figura 4 e 5, respectivamente.

As amostras dos animais inoculados por via CP para realização dos exames histopatológicos dos grupos: III (CVS/31-CP); grupo IV (Controle CP); grupo V (Bovino 4005-V/IP2010-CP) e grupo VII (Canídeo Silvestre 5053-V/IP2010 – CP) foram coletados conforme descrito acima e armazenados por 24 horas em formol 10% para fixação, após isto, foi realizado a preparação histológica, conforme item 3.7.

O encéfalo foi seccionado em três regiões, como ilustrado na figura 3:

1. Região Anterior: Bulbo olfatório e córtex cerebral
2. Região Média: Córtex cerebral
3. Região Posterior: Cerebelo e tronco encefálico

Figura 3 - Secções realizadas em encéfalo para realização dos exames histopatológicos

Fonte: <http://www.techenet.com/2014/05/novos-neuronios-apagam-memorias-antigas/>

Figura 4 - Processo de retirada do encéfalo de camundongos

Fonte: Gamon, T. H. M (2013)

Figura 5 - Processo de retirada de medula espinhal por extração hidráulica

Fonte: Gamon, T. H. M (2013)

3.7 TÉCNICA DE IMUNOFLORESCÊNCIA DIRETA (IFD) PARA ANTICORPO ANTINUCLEOPROTEÍNA DO RABV

Para a confirmação da presença do RABV, lâminas confeccionadas com impressões de fragmentos do SNC foram submetidas à técnica de imunofluorescência direta (IFD) para pesquisa de antígeno viral, de acordo com a técnica descrita por Dean et al. (1996). A IFD consiste na adição da suspensão de anticorpo anti-nucleoproteína do RABV, previamente conjugado com isoticianato de fluoresceína. A leitura foi realizada no microscópio de fluorescência LEICA DMBL (Figura 6B), no setor de virologia do Laboratório de Diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur/ SP.

A técnica de IFD foi realizada pela preparação de duas lâminas do SNC de cada camundongo pelo método de *imprint*, que consiste na impressão de fragmentos do SNC em lâminas de microscopia de maneira uniforme (Figura 6A). Para cada lote de 20 lâminas, foi incluída uma lâmina de controle negativo, (preparada a partir de impressão de SNC de camundongos saudáveis) e duas lâminas de controle positivo (preparadas através da impressão de SNC de camundongos inoculados com o vírus fixo da raiva CVS/31), apresentando título de 10^6 DLIC₅₀/0,03mL (dose letal intracerebral 50%). As lâminas foram fixadas em acetona P.A. 100% (Merck), conservada a -20°C por 45 minutos.

Figura 6 - Técnica de imunofluorescência direta

Fonte: Instituto Pasteur, (2012)

Legenda: A) Impressão de fragmentos de SNC em lâminas de microscopia. B) Lâmina com impressão de SNC de camundongo infectado com vírus da raiva corado com conjugado anti-RABV fluorescente (imunoglobulinas anti-RABV marcadas com isotiocianato de fluoresceína).

3.8 TÉCNICA HISTOPATOLÓGICA

Fragmentos do SNC e medula espinhal de camundongos inoculados por via CP dos grupos III (CVS/31-CP), IV (Controle CP), V (Bovino 4005-V/IP2010 – CP) e VII (Canídeo Silvestre 5053-V/IP2010 – CP) foram coletados e fixados conforme item 3.6. Posteriormente, os fragmentos de aproximadamente 6mm dos tecidos fixados em formol foram processados pela desidratação em soluções alcoólicas com concentrações crescentes até o álcool absoluto, diafanização em banhos de xilol, banhos de parafina líquida e, finalmente, inclusão em blocos de parafina. Os blocos foram submetidos à microtomia, sendo produzidos cortes de 5µm de espessura em lâminas de vidro, os quais foram corados por hematoxilina e eosina (HE). Dos fragmentos cerebrais, realizou-se a inclusão em blocos de parafina das seguintes estruturas: córtex, hipocampo, cerebelo e bulbo olfatório. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico Nikon Eclipse Ni no laboratório de Patologia Animal do Departamento de Patologia Veterinária da FMVZ/USP.

3.9 COLORAÇÃO FLUORO-JADE C

Secções de bulbo olfatório, córtex, cerebelo, hipocampo e medula espinhal foram confeccionadas conforme procedimentos do item 3.8 em lâminas positivas (Immuno Slide – EasyPath®). Posteriormente, os cortes foram desparafinados e hidratados por imersão em água destilada por 1 minuto. As lâminas foram colocadas em solução de permanganato de potássio 0,06% (KMnO₄) por 15 minutos, sendo agitadas suavemente utilizando um porta lâminas em um copo com uma barra de agitação lenta e lavadas em água destilada por 1 minuto. Os procedimentos seguintes foram realizados protegidos de luz, sendo cobertos por papel alumínio. As lâminas foram coradas por imersão em uma solução de Fluoro-Jade 0,001% por 30 minutos sob agitação lenta e lavadas por duas vezes por imersão em água destilada por 1 minuto. A secagem das lâminas foi realizada em local plano, seco e protegida da luz a temperatura ambiente. Após isso, as lâminas secas foram lavadas em solução de xileno 100% durante dois minutos por três vezes e depositado uma gota de resina líquida sobre o corte histológico, coberto por uma lamínula de vidro e realizado a leitura em microscópio Nikon Eclipse E800 no laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/ USP.

3.10 TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA ANTICORPO ANTINUCLEOPROTEÍNA

Para a padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva foram feitos cortes histológicos de 5µm de espessura conforme descrito no item 3.8 e aplicados sobre lâminas positivas (Immuno Slide – EasyPath®). Os cortes foram desparafinados em xilol e reidratados em graduações decrescentes de álcool até a água deionizada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela incubação das lâminas em peróxido de hidrogênio a 5% em metanol (Merck®) por 30 minutos em temperatura ambiente, sendo posteriormente lavadas em solução salina tamponada

- PBS1x (137mM NaCl; 2,7 mM KCL; 10mM Na₂HPO₄ e 2 mM KH₂PO₄, com pH 7,4) por três vezes por três minutos.

Para a recuperação antigênica, as lâminas foram tratadas com tampão citrato 10 mM. Estas foram imersas no tampão citrato em potes com tampa durante 15 minutos em banho-maria em panela de uso convencional de aço inox com capacidade de 2 litros de água previamente aquecida atingindo uma temperatura de 100°C. Logo após, as lâminas foram esfriadas por 5 minutos em temperatura ambiente.

Para a diminuição das ligações inespecíficas ("background"), os cortes histológicos foram tratados com leite desnatado (Molico[®]) 5% diluído em água destilada durante 15 minutos em agitador magnético para evitar a sedimentação do leite em pó e em seguida, lavados em PBS 1x. Os cortes foram cobertos com solução contendo o anticorpo primário. Foram utilizadas as diluições 1:500 e 1:1000 em PBS 1x contendo o anticorpo policlonal (anti-rabies policlonal Chemicon[®]#5199) e incubados em câmara úmida a 37°C por uma hora. Posteriormente, foram lavadas em água destilada e tratadas com anticorpo secundário biotinilado (DAKO LSAB 2 kit, DAKO Corp.,Carpinteria, CA) por 20 minutos em câmara úmida e temperatura ambiente. Logo após, foram lavados em água destilada e tratados com o conjugado Streptavidina-peroxidase (DAKO Corp.,Carpinteria, CA) por mais 20 minutos cada em câmara úmida e temperatura ambiente, sendo lavados novamente em água destilada e submetidos à revelação com o cromógeno vermelho (Vector[®] Nova RED) por 20 segundos. Os cortes foram lavados com água destilada e contra-corados com hematoxilina de Harris por 1 minuto, posteriormente lavados em água destilada corrente por 2 minutos e desidratados em graduação de álcool, clarificados com xilol e montados com ERV-mount (Easypath[®]). Em seguida as lâminas foram avaliadas em microscópio óptico Nikon Eclipse Ni no laboratório de Patologia Animal do Departamento de Patologia Animal da FMVZ/USP.

3.11 TÉCNICA DE RT-PCR EM TEMPO REAL COM ALVO PARA O GENE N DA NUCLEOPROTEÍNA DO RABV

3.11.1 Extração do RNA utilizando Kit *RNA spin Mini RNA isolation Kit* (GE Healthcare, UK)

A extração de RNA de aproximadamente 30mg de cada secção do encéfalo e medula espinhal foram realizadas utilizando-se o *RNAspin Mini RNA isolation Kit* (GE Healthcare, UK), seguindo o protocolo determinado pelo fabricante. As amostras de RNA extraídas foram armazenadas em microtubos de polipropileno de 1,5 mL a -80°C por um período máximo de 48 horas até a próxima etapa.

3.11.2 Oligonucleotídeos iniciadores “Primers”

Para a detecção do RABV, foram utilizados dois pares de *primers* específicos, descritos por Orciari et al.(2001), direcionados à região do gene codificador da Proteína N, considerado um gene altamente conservado. Utilizou-se o par de primers 21G e 304 para a Transcrição Reversa (item 3.11.3) e 304,504 para a RT-qPCR (item 3.11.4) (Quadro 1).

Quadro 1 - Relação de oligonucleotídeos iniciadores (primers) para a identificação do RABV direcionados à região do gene codificador da nucleoproteína N e as respectivas regiões de hibridização

Primer	Sentido	Sequência(5'-3')	Região
21G	senso	ATGTAACACCTCTACAATG	55-73
304	antissenso	TTGACGAAGATCTTGCTCAT	1514-1533
504	senso	TATACTCGAATCATGATGAATGGAGGTCTGACT	1286-1317

3.11.3 Transcrição Reversa – Síntese do DNA complementar

A transcrição reversa para DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir do RNA total utilizando-se o kit *SuperScript™III Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Neste protocolo foi adicionado ao RNA, 1 µL de *primer* senso (21G) e 1 µL de *primer* antissenso (304) na concentração de 0,5 µM (Quadro 1), 1 µL de dNTP (mix de 10 mM – 2,5 mM de cada: dATP, dTTP, dCTP e dGTP) e água tipo I tratada com 0,1% de DEPC (diethylpyrocarbonate) q.s.p 14 µL. Esta mistura foi aquecida em 65°C por cinco minutos em termociclador (T Professional TRIO Thermocycler® - BiometraProductLine) e depois mantida em gelo por, pelo menos, dois minutos. Em seguida, foram adicionados ao tubo de reação 4 µL de 5X *First-Strand Buffer*, 1 µL de ditiotreitól 0,1 M (DTT) e 1 µL de *SuperScript™III RT* (200 U/µL). As amostras foram colocadas em termociclador a 50°C por 60 minutos para extensão dos oligonucleotídeos iniciadores e, em seguida, inativou-se a enzima por 15 minutos a 70°C. Ao final da reação de transcrição, as amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos com de 1 µL (2 unidades) de enzima RNase H (para eliminar resíduos de RNA no cDNA), e o cDNA armazenado em freezer -20°C.

3.11.4 Reação em Cadeia pela Polimerase em tempo real (qPCR) pelo sistema SYBR Green

As sequências de oligonucleotídeos iniciadores *primers* senso (504) e antissenso (304) pelo sistema SYBR Green foram utilizadas para detecção de amostras de animais inoculados com os isolados de vírus de rua (Canídeo silvestre 5053-V/IP2010 e Bovino 4005-V/IP2010) e com a variante de vírus fixo CVS/31.

Para a realização da RT-PCR em tempo real foram utilizados 2 µL por amostra, acrescidos de 9 µL de água livre de nucleases, 12,5 µL de 2X *SYBR® Green PCR Master Mix* e 0,75 µL de cada *primer* senso e antissenso (504 e 304) a 10 µM (Quadro 1).

Cada amostra foi analisada em duplicata, utilizando placa de 96 orifícios *MicroAmp® Optical 96 well Reaction Plate*. A placa foi colocada no aparelho de PCR em tempo real *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System* e submetida aos ciclos descritos no quadro 2.

Os resultados foram analisados no *7500 Software v.2.0.5*. A comprovação da especificidade da reação foi realizada pela análise da curva de dissociação ou de *melting*.

Quadro 2 – Condições de temperatura e de tempo selecionadas para cada ciclo da RT-PCR em tempo real pelo sistema SYBR Green para amplificação do gene codificador da proteína *N* do RABV.

Etapas do programa	Número de Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
Ativação enzima Amplitaq Gold	1 ciclo	95°C	10 minutos
Desnaturação	40 ciclos	95°C	15 segundos
Hibridização e extensão	40 ciclos	60°C	1 minuto
	1 ciclo	95°C	15 segundos
Curva de dissociação	1 ciclo	60°C	1 minuto
	1 ciclo	95°C	15 segundos

Foram consideradas positivas pela RT-qPCR pelo sistema SYBR Green as amostras que apresentaram $Cq \leq 35$. Quando as amostras apresentaram o $Cq > 35$ ou $Cq < 40$ foram consideradas de resultado inconclusivo, sendo necessária a repetição das reações. Já quando as amostras apresentaram $Cq > 40$, foram consideradas negativas.

A fim de realizar uma análise semi-quantitativa dos valores de Cq dos diferentes segmentos do SNC dos camundongos inoculados com as diferentes variantes do RABV, foi realizado uma normalização através da subtração da média de Cq do grupo controle com a média do Cq das devidas porções do SNC, sendo denominado como valor corrigido de Cq (VC).

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos resultados referentes à perda de peso dos animais inoculados com as amostras do RABV (Grupos: I, III, V, VI, VII, VIII) comparado com a perda de peso dos animais do grupo controle (II e IV) foi utilizado o “Teste t de Student” com correção de Welch através do programa estatístico GraphPad Prism 5.

Para os dados referentes ao RT-qPCR foi realizada análise de variância (Anova) de uma via e teste de Tukey através do programa Graphpad Prism 5.

Foi considerado estatisticamente significativo as diferenças entre os grupos experimentais e controle com $P < 0,05$ ou erro α de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 CÁLCULO DA DLIC₅₀

Para o cálculo da DLIC₅₀ do vírus fixo CVS/31, foram inoculados 10 camundongos por diluição da linhagem *Swiss-Webster* com três semanas de idade, com peso corpóreo entre 11 a 14g, provenientes do Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ/USP, conforme item 3.4.3.

A mortalidade dos camundongos da linhagem *Swiss-Webster* destinados ao cálculo da DLIC₅₀ e o dia em que estes vieram a óbito das amostras inoculadas com vírus fixo CVS/31 está descrito na tabela 3.

Foi confirmada a infecção pelo RABV em todos os camundongos mortos pela técnica da IFD a partir do encéfalo.

Tabela 3 - Mortalidade de camundongos após inoculação intracerebral com a amostra de vírus fixo CVS/31 por diluição versus dia pós-inoculação (DPI). Número total n=80 animais.

Diluição da amostra de vírus fixo CVS/31								
	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
5ºDPI	9	10	4	1	-	-	-	-
6ºDPI	1	-	6	9	7	-	-	-
7ºDPI	-	-	-	-	3	2	1	-
N	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	2/10	1/10	0

N: soma de camundongos mortos pelo total de animais por concentração

O cálculo da DLIC₅₀(dose letal intracerebral 50%) para a amostra de vírus fixo CVS/31 foi realizado de acordo com o método descrito por Reed e Muench (1938), demonstrado na tabela 4.

Tabela 4 - Cálculo da DLIC₅₀ (dose letal intracerebral 50%) em camundongos por Reed e Muench inoculados com amostra de vírus fixo CVS/31.

Diluição	Sobreviventes	Óbitos	Total de Sobrevivência	Total de Mortalidade	Mortalidade (%)
10 ⁻⁵	0	10	0	23	
10 ⁻⁶	0	10	0	13	13/13=100%
10 ⁻⁷	8	2	8	3	3/11=27,3%
10 ⁻⁸	9	1	17	1	1/18= 5,5%
10 ⁻⁹	10	0			

Conforme demonstrado na tabela 4, a diluição que apresenta 50% de mortalidade dos camundongos está entre a diluição 10⁻⁶ e 10⁻⁷. Sendo assim, calculamos a diferença de logaritmo pela fórmula:

$$\frac{50\% - (\text{mortalidade abaixo de } 50\%)}{(\text{mortalidade acima de } 50\%) - (\text{mortalidade abaixo de } 50\%)} \times \text{logaritmo do fator de diluição}$$

Aplicando esta fórmula para o cálculo da diferença de logaritmo do CVS/31 temos:

$$\frac{50 - 27,3}{100 - 27,3} \times 1 = 0,31$$

Para o cálculo do título do CVS/31, seguimos a seguinte fórmula:

Logaritmo da diluição recíproca ao 50% - diferença de logaritmo = $\log 10^7 - 0,31 = 6,69$.

Portanto: a DLIC₅₀ CVS/31 é 10^{-6,69}.

4.2 SINAIS CLÍNICOS APÓS INOCULAÇÃO VIA COXIM PLANTAR E INTRACEREBRAL

Seis camundongos da linhagem BALB/c inoculados com 10^3 DLIC₅₀ de vírus fixo **CVS/31** pela via **IC (Grupo I)** apresentaram morbidade no quinto dia após inoculação (DPI). Os sintomas com evolução progressiva que caracterizaram a morbidade pelo RABV foram os seguintes: perda de peso, prostração, apatia, fraqueza em membros posteriores, movimentação assimétrica dos membros, piloereção, paralisia de membros posteriores, perda de propriocepção e postura arqueada. No sexto DPI, três animais encontravam em óbito e três estavam em estado comatoso, apresentando apenas reflexo podal e foram submetidos à eutanásia por *overdose* de anestésico isofluorano, com taxa de mortalidade de 100%. Em relação ao peso inicial, os camundongos tiveram 20% de perda de peso em média, com diferença estatística pelo “Teste t de Student” com $P < 0,0001$.

Para os oito animais inoculados com 10^5 DLIC₅₀ de vírus fixo **CVS/31** pela via **CP (Grupo III)**, a paralisia dos posteriores ocorreu no 5º DPI, sendo submetidos à eutanásia por *overdose* do anestésico isofluorano no 6º DPI, com taxa de mortalidade de 100%. Neste caso, os camundongos tiveram 22,7% de perda de peso em relação ao peso inicial, apresentando diferença estatística pelo “Teste t de Student” com correção de Welch com $P < 0,0001$.

Seis camundongos da linhagem Balb/c inoculados com 10^3 DLIC₅₀ da amostra de **Bovino 4005-V/IP2010** pela via **IC (Grupo VI)** iniciaram os sintomas de perda de peso e piloereção no 4º DPI; apatia, prostração, postura arqueada, tremor, andar cambaleante no quinto, sexto e sétimo DPI e paralisia de posteriores no sétimo e oitavo DPI, sendo submetidos à eutanásia quando apresentavam paralisia de posterior (taxa de mortalidade de 100%). A porcentagem da perda de peso final em relação ao peso inicial foi de aproximadamente 13%, sendo significativo para “Teste t de Student” com $P < 0,0001$.

Para os oito animais inoculados com 10^5 DLIC₅₀ da amostra de **Bovino 4005-V/IP2010** pela via **CP (Grupo V)**, os sintomas iniciaram no sétimo DPI, com início de perda de peso, piloereção, prostração, apatia e dificuldade de locomoção do membro posterior esquerdo (que foi o membro inoculado). No oitavo DPI, quatro

animais já apresentavam perda de propriocepção e paralisia dos posteriores e foram submetidos à eutanásia utilizando *overdose* do anestésico. No décimo terceiro DPI todos os animais já tinham sido submetidos à eutanásia (taxa de mortalidade de 100%). A perda de peso foi de 14 % de relação ao peso inicial, sendo significativo para “Teste t de Student” com $P < 0,0001$.

Os seis animais inoculados com 10^3DLIC_{50} pela via **IC** com amostra **Canídeo Silvestre5053-V/IP2010 (Grupo VIII)** iniciaram os sintomas de morbidade pelo RABV no quinto DPI com perda de peso, apatia e prostração. No 7º e 8º DPI, os animais foram submetidos à eutanásia por *overdose* de isofluorano e apresentaram paralisia dos membros posteriores (taxa de mortalidade de 100%). A perda de peso foi de 15% quando comparado o peso final ao peso inicial, sendo significativo para “Teste t de Student” com correção de Welch.

Pela inoculação em **CP** utilizando a amostra **Canídeo Silvestre5053-V/IP2010 (Grupo VII)** com 10^5DLIC_{50} , foi observado 50% de mortalidade, com aproximadamente 20,7% de perda de peso, com diferença estatística significativa para “Teste t de Student” com $P < 0,0001$, sendo que no sexto DPI, os animais estavam apresentando início dos sintomas com perda de peso, piloereção, prostração, andar assimétrico e apatia. No nono DPI, os camundongos apresentavam paralisia dos membros posteriores e foram submetidos à eutanásia por *overdose* de isofluorano.

Os dados descritos acima encontram-se organizados na tabela 5. As ilustrações dos camundongos controle e dos inoculados com as variantes do vírus fixo e de rua do RABV estão demonstradas nas figuras 7 e 8. Os gráficos referentes à perda de peso dos animais inoculados estão nos gráficos 1 a 6.

Figura 7 - Camundongos da linhagem BALB/c inoculados com a amostra CVS/31 por via intracerebral (Grupo I) no quinto dia de observação no período da manhã

Fonte: Gamon, T. H. M (2014)

Legenda: A figura (A) demonstra animais prostrados, aglomerados no mesmo ambiente, piloereção, postura arqueada. Na figura (B) observa-se piloereção e perda de propriocepção com paresia de membros posteriores - São Paulo – 2013.

Figura 8 - Comparação entre camundongo da linhagem BALB/c do grupo controle com um animal inoculado com a amostra CVS/31 por via CP no quinto dia de observação no período da manhã

Fonte: Gamon, T. H. M (2014)

Legenda: Figura (A) – camundongo sadio da linhagem BALB/c do grupo controle CP (Grupo IV). Na figura (B) observa-se piloereção e postura arqueada de camundongo da linhagem BALB/c inoculados com a amostra CVS/31 por via coxim plantar (Grupo III) no quinto dia de observação.- São Paulo – 2013.

Tabela 5 - Período de incubação, período de morbidade e principais sintomas dos animais inoculados via Coxim Plantar e Intracerebral com as amostras: CVS/31; Canídeo Silvestre (Can. Silv.) 5053-V/IP2010 e Bovino (Bov) 4005-V/IP2010

Amostras	Período de Incubação	Período de Morbidade	Sintomas Principais
CVS/31 (IC)	5 DPI	1 Dia	Perda de peso, prostração, apatia
CVS/31 (CP)	5 DPI	1 Dia	Paralisia dos posteriores
Can. Silv. 5053-V/2010 (IC)	5 DPI	2,5 Dias	Perda de peso, apatia e prostração
Can. Silv. 5053-V/2010 (CP)	6 DPI	3 Dias	Perda de peso, piloereção e prostração
Bov 4005-V/IP2010 (IC)	4 DPI	3,5 Dias	Perda de peso e piloereção
Bov 4005-V/IP 2010 (CP)	7 DPI	2 Dias	Dificuldade de locomoção do membro inoculado

Gráfico 1 - Médias de peso (em gramas) dos camundongos BALB/c inoculados por via intracerebral (IC) com a amostra CVS/31 (Grupo I) comparados com animais do grupo controle inoculados pela via IC com diluente (Grupo II)

Gráfico 2 - Médias de peso (em gramas) dos camundongos BALB/c inoculados por via intracerebral (IC) com a amostra Bovino 4005-V/IP2010 (Grupo VI) comparados com animais do grupo controle inoculados pela via IC com diluente (Grupo II)

Gráfico 3 - Médias de peso (em gramas) dos camundongos BALB/c inoculados por via intracerebral (IC) com a amostra Canídeo Silvestre 5053-V/IP2010(Grupo VIII) comparados com animais do grupo controle inoculados pela via IC com diluente (Grupo II)

Gráfico 4 - Médias de peso (em gramas) dos camundongos BALB/c inoculados por via coxim plantar (CP) com a amostra Bovino 4005-V/IP2010 (Grupo V) comparados com animais do grupo controle inoculados pela via CP com diluente (Grupo IV)

Gráfico 5 - Médias de peso (em gramas) dos camundongos BALB/c inoculados por via coxim plantar (CP) com a amostra de Canídeo Silvestre 5053-V/IP2010(Grupo VII) comparados com animais do grupo controle inoculados pela via CP com diluente (Grupo IV)

Gráfico 6 - Médias de peso (em gramas) dos camundongos BALB/c inoculados por via coxim plantar (CP) com o vírus fixo CVS/31 (Grupo III) comparados com animais do grupo controle inoculados pela via CP com diluente (Grupo IV)

4.3 COLORAÇÃO FLUORO JADE C E ANÁLISE HISTOLÓGICA PELA COLORAÇÃO HE

Foi realizada a técnica histopatológica seguida pela Coloração Fluoro JadeC e HE com o intuito de visualizar as alterações histopatológicas em SNC e medula espinhal do material coletado após a inoculação por CP das amostras: Grupo VII - Canídeo Silvestre 5053-V/2010IP; Grupo V - Bovino4005-V/2010IP e grupo III - CVS/31. Na análise das lâminas coradas por HE foi encontrado degeneração multifocal de neurônios, neuronofagia, infiltrado de células mononucleares com manguito perivascular no encéfalo e medula espinhal dos camundongos inoculados com as variantes citadas acima (Figura 9). Diferenças de lesões em relação à região do SNC para as diferentes amostras do RABV podem ser melhores visualizadas pelos quadros 3, 4 e 5.

Quadro 3 - Intensidade da distribuição de lesões em fragmentos de SNC de camundongos inoculados no coxim plantar com vírus fixo CVS/31 (Grupo III) analisadas por HE

Lesões	Fragmentos de SNC (Amostra CVS/31)				
	Tronco encefálico	Medula	Córtex	Hipocampo	Cerebelo
Manguito Perivascular	+	+++	-	-	-
Degeneração e Necrose Neuronal	-	+++	-	-	+
Meningite	Não supurativa (+)				

+++ : intensa; ++ : moderada; + : leve. - : ausência.

Quadro 4 - Intensidade da distribuição de lesões em fragmentos de SNC de camundongos inoculados no coxim plantar com a amostra Bovino4005-V/IP2010 (Grupo V) analisadas por HE

Lesões	Fragmentos de SNC (Amostra Bovino4005-V/2010IP)				
	Tronco encefálico	Medula	Córtex	Hipocampo	Cerebelo
Manguito Perivascular	+	++	++	+	-
Degeneração e Necrose Neuronal	+	+	-	-	+
Meningite	Multifocal (+)				

+++ : intensa; ++ : moderada; + : leve. - : ausência.

Quadro 5 - Intensidade da distribuição de lesões em fragmentos de SNC de camundongos inoculados no coxim plantar com a amostra Canídeo Silvestre 5053-V/IP2010 (Grupo VII) analisadas por HE

Lesões	Fragmentos de SNC (Amostra Canídeo Silvestre 5053-V/2010IP)				
	Tronco encefálico	Medula	Córtex	Hipocampo	Cerebelo
Manguito Perivascular	++	+	+	-	+
Degeneração e Necrose Neuronal	+	+	-	-	
Meningite	Multifocal (+)				

+++ : intensa; ++ : moderada; + : leve. - : ausência.

Observou-se neurônios degenerados marcados pelo Fluoro-Jade C conforme pode ser melhor visualizado na figura 10 e no quadro 6.

Quadro 6 - Intensidade da distribuição de neurônios degenerados marcados pelo Fluoro-Jade C em fragmentos de SNC de camundongos inoculados no coxim plantar com vírus fixo CVS/31 (Grupo III) e vírus de rua Bovino 4005-V/IP2010 (Grupo V) e Canídeo Silvestre 5053-V/IP2010IP (Grupo VII)

Grupos	Fragmentos de SNC				
	Tronco encefálico	Medula	Córtex	Hipocampo	Cerebelo
Grupo III - CVS/31	++	+++	+	+	+
Grupo V - Bovino 4005-V/10IP	++	+++	++	++	++
Grupo VII - Can.Silv. 5053-V/10IP	+	++	+	+	+

+++ : intensa; ++ : moderada; + : leve. - : ausência.

Figura 9 - Cortes de encéfalo em medula espinhal de camundongos inoculados com o vírus da raiva

Fonte: Gamon, T. H. M (2014)

Legenda: (A) Encéfalo. Escala de 50 micrômetros. HE: Neuronofagia (seta) (Grupo III - CVS/31); (B) Encéfalo. Escala de 20 micrômetros. HE: Neurônio apresentando degeneração vacuolar (seta) Grupo VII - Canídeo Silvestre 5053-V/IP2010; (C) Medula Espinhal. Escala de 20 micrômetros. HE: Manguito perivascular (seta) Grupo V - Bovino 4005-V/IP2010; (D) Medula espinhal. Escala de 50 micrômetros. HE: -Grupo IV - Controle.

Figura 10 - Coloração Fluoro-JadeC

Fonte: Gamon, T. H. M (2014)

Legenda: (A) Encéfalo: Grupo IV - Controle – Fluoro-JadeC; (B, C e D) Encéfalo: Neurônios degenerados marcados pelo Fluoro-JadeC. Grupo III - CVS/31, Grupo V - Bovino4005-V/IP2010, Grupo VII - Canídeo Silvestre 5053-V/IP2010. Aumento original de 400x.

4.4 TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Pela análise das lâminas de imuno-histoquímica, observou-se marcações intracitoplasmáticas para o RABV em neurônios nas regiões de córtex cerebral, hipocampo, tálamo, cerebelo, tronco encefálico e, em alguns casos, observou-se marcações em neurópilo (Figura 11). Foi constatado diferenças de intensidade e localização das lesões de acordo com a variante do RABV inoculada.

Para o grupo de camundongos inoculados com o vírus fixo CVS/31 (Grupo III) observou-se acentuada marcação em neurônios da região de tronco encefálico, marcação moderada na região do tálamo e medula espinhal e leve marcação no

córtex cerebral e nas células de Purkinje, indicando presença do antígeno viral. Não foi observada marcação na região do hipocampo.

No grupo inoculado com a amostra Bovino 4005-V/IP2010 (Grupo V) observou-se acentuada marcação no tálamo, moderada marcação em neurônios do córtex cerebral e tronco encefálico e leve marcação em hipocampo e na medula espinhal.

As lâminas do SNC do grupo inoculado com a amostra Canídeo Silvestre 5053-V/IP2010 (Grupo VII) demonstrou leve marcação em medula espinhal, sendo marcações preferencialmente intracitoplasmáticas; porém, existiam algumas marcações em neurópilo.

A intensidade de distribuição antigênica, pode ser melhor visualizada na quadro 7.

Quadro 7 - Intensidade de distribuição antigênica pela técnica de imuno-histoquímica em fragmentos de SNC de camundongos inoculados no coxim plantar com vírus fixo CVS/31 (Grupo III) e vírus de rua Bovino 4005-V/IP2010 (Grupo V) e Canídeo Silvestre 5053-V/IP2010 (Grupo VII)

Grupos	Fragmentos de SNC					
	Tronco encefálico	Medula	Tálamo	Córtex	Hipocampo	Cerebelo
Grupo III CVS/31	+++	++	++	+	-	++
Grupo V Bovino 4005-V/10IP	++	+	+++	++	+	-
Grupo VII Can.Silv. 5053-V/10IP	+	+	+	++	+	+

+++ : intensa; ++ : moderada; + : leve.- : ausência.

Figura 11 - Marcação imuno-histoquímica para RABV em cortes de cerebello e encéfalo de camundongos BALB/c infectados com o CVS/31 (Grupo III)

Fonte: Fonte: Gamon, T. H. M (2014)

Legenda: As setas indicam marcação nas células de Purkinje (A) e neurônios (B). Escala de 50 micrômetros.

4.5 RT-PCR EM TEMPO REAL

Os valores de ciclo de quantificação (Cq) e temperatura de “melting” (TM °C) das amostras acima descritas que amplificaram e deram positivo para o gene N do RABV estão descritos na tabela 6.

Tabela 6 - Valor médio por região de ciclo de quantificação (Cq), Valor de Cq corrigido (VC) e temperatura de “melting” TM (°C) referente as amostras de SNC de camundongos inoculados com vírus Bovino 4005-V/10IP (Grupos V e VI), Canídeo Silvestre (CS) 5053-V/IP2010 (Grupos VII e VIII) e CVS/31 (Grupos III e I), por via coxim plantar (CP) e intracerebral (IC)

	CVS/31			CS 5053-V/IP2010			BOV4005-V/IP2010		
	Cq	VC	TM	Cq	VC	TM	Cq	VC	TM
C1 (IC)	20,21	16,15	77,47	22,14	13,87	79,10	23,45	13,79	79,19
C2 (IC)	20,10	16,05	77,41	28,23	10,72	79,15	21,97	12,64	79,55
C3 (IC)	22,01	13,56	77,37	28,13	10,53	79,53	22,48	11,38	79,41
M (IC)	28,02	9,4	77,77	23,68	10,2	78,78	21,61	13,47	78,70
C1 (CP)	26,91	9,75	77,96	32,84	3,82	78,75	22,87	12,65	78,71
C2 (CP)	24,60	12,42	77,81	32,45	3,63	79,09	24,01	15,19	78,73
C3 (CP)	24,39	12,15	77,70	31,56	4,26	79,60	25,27	14,00	78,62
M (CP)	22,94	13,53	77,53	33,64	2,26	79,26	23,19	15,00	78,29

Cq: ciclo de quantificação. Tm: temperatura de “melting”. M – Medula Espinhal. Porções do encéfalo: C1 - Região anterior: bulbo olfatório e córtex cerebral; C2 - Região média: córtex cerebral; C3 - Região posterior: cerebelo e tronco encefálico.

A análise dos valores corrigidos (VC) de ciclo de quantificação (Cq) por região do encéfalo e medula espinhal dos camundongos inoculados por via intracerebral (IC) com a amostra CVS/31 analisados pela ANOVA e teste Tukey não foram significativos em comparação às regiões C1-C2; C1-C3; C2-C3; C3-M. Porém, ocorreu diferença estatística entre C1-M e C2-M com $P= 0,035$ (Gráfico 7). Para as demais amostras analisadas, não teve diferença estatística entre as porções C1-C2; C1-C3; C2-C3; C1-M; C2-M e C3-M. (Gráficos 7, 8, 9, 10, 11 e 12).

Gráfico 7 - Médias de valor corrigido de ciclo de quantificação (VC) por porção do encéfalo e medula espinhal de camundongos BALB/c inoculados via intracerebral (IC) com CVS/31 (Grupo I). *P=0,035

Gráfico 8 - Médias de valor corrigido de ciclo de quantificação (VC) por porção do encéfalo e medula espinhal de camundongos BALB/c inoculados via coxim plantar (CP) com CVS/31 (Grupo III)

Gráfico 9 - Médias de valor corrigido de ciclo de quantificação (VC) por porção do encéfalo e medula espinhal de camundongos BALB/c inoculados via intracerebral (IC) com a amostra de Canídeo Silvestre 5053-V/IP2010 (Grupo VIII)

Gráfico 10 - Médias de valor corrigido de ciclo de quantificação (VC) por porção do encéfalo e medula espinhal de camundongos BALB/c inoculados via coxim plantar (CP) com a amostra de Canídeo Silvestre 5053-V/IP2010 (Grupo VII)

Gráfico 11 - Médias de valor corrigido de ciclo de quantificação (VC) por porção do encéfalo e medula espinhal de camundongos BALB/c inoculados via intracerebral (IC) com a amostra de Bovino4005-V/IP2010 (Grupo VI)

Gráfico 12 - Médias de valor corrigido de ciclo de quantificação (VC) por porção do encéfalo e medula espinhal de camundongos BALB/c inoculados via CP com a amostra de Bovino4005-V/IP2010 (Grupo V)

5 DISCUSSÃO

A titulação do vírus fixo CVS/31, calculada pelo método Reed e Muench (1938) neste trabalho, apresentou DLIC₅₀ de $10^{6,69}$, sendo muito próximo ao título de infectividade obtido com o mesmo vírus por Iwasaki et al. (1977) que foi de $10^{7,1}$. Já a titulação das amostras Bovino 4005-V/IP2010 e Canídeo Silvestre5053-V/IP2010 apresentou DLIC₅₀ de 10^6 e 10^5 , respectivamente. Visando padronizar o efeito biológico das diferentes variantes do RABV, estabeleceu-se que os camundongos seriam inoculados por via intracerebral com 10^3 DLIC₅₀ e por via CP com 10^5 DLIC₅₀.

Os camundongos da linhagem BALB/c inoculados com CVS/31 por via IC (Grupo I) apresentaram no quinto dia pós-inoculação perda de peso, piloereção, postura arqueada, prostração, fraqueza dos membros posteriores. Todos os camundongos inoculados adoeceram, resultando em 100% de letalidade. A perda de peso nestes animais foi observada a partir do segundo DPI, sendo este o primeiro sintoma, condizendo com os relatos de Sugamata et al. (1992). De modo semelhante com os resultados obtidos neste experimento, Marcovitz et al. (1987) realizaram inoculação de CVS em camundongos da linhagem Swiss, em que obteve como primeiro sintoma perda de peso e prostração seguida de morte.

Em experimentos realizados por Cunha et al. (2010), os isolados de rua do RABV BR-C (cão doméstico), BR-EF1 (morcego insetívoro *Eptesicus furinalis*), BR-NL1 (morcego insetívoro *Nyctinomops laticaudatus*), BR-AL3 (morcego frugívoro *Artibeus lituratus*), BR-MM1 (morcego insetívoro *Molossus molossus*) e BR-DR1 (morcego hematófago *Desmodus rotundus*) foram totalmente patogênicos quando inoculados por via IC com 100% de mortalidade; entretanto, quando inoculados por via intramuscular na dose de 0,1mL de 500DLIC₅₀/0,03mL, a patogenicidade apresentou diferenças entre os isolados com diferentes taxas de mortalidade, sendo 60% para BR-DR1; 50% para BR-C e BRNL1; 40% para BR-AL3; 9,5% para BR-MM1 e 5,2% para BR-EF1. De modo semelhante, diferenças de neuropatogenicidade também foram observadas no presente experimento, com letalidade de 100% para os camundongos inoculados por via IC com as amostras CVS/31 (Grupo I), Bovino 4005-V/IP2010 (Grupo VI) e Canídeo Silvestre5053-V/IP2010 (Grupo VIII). Já nos animais inoculados pela via CP apresentaram

diferentes taxas de mortalidade, diferindo de acordo a variante viral do vírus de rua. Observou-se 50% de mortalidade entre o 9º e 11º dias pós-infecção (dpi), com perda de 20,7% do peso corpóreo, no grupo infectado com a variante de rua Canídeo Silvestre 5053-V/IP2010 (CP - Grupo VII). Já as variantes CVS/31 (CP - Grupo III) e de rua Bovino 4005-V/10IP (CP - Grupo V) tiveram 100% de mortalidade nos camundongos entre o 9º e 12º dpi, com 22,7% e 14% de perda de peso, respectivamente. Sendo assim, observa-se que existem diferenças em relação a patogenicidade das diferentes amostras do RABV, demonstrado neste caso pela perda de peso e taxa de mortalidade.

Segundo os resultados de Rossiter et al. (2009), em que foi inoculado CVS/11 por via CP, foi relatado paresia dos membros posteriores no quinto ao sexto DPI, inicialmente por diminuição da movimentação do membro inoculado, assemelhando-se com os resultados de inoculação por esta via obtidos nos experimentos realizados neste estudo. No presente trabalho observamos diferenças em relação ao período de morbidade dos camundongos inoculados com as diversas variantes do RABV e pela inoculação na via IC e CP, sendo: camundongos inoculados com CVS/31 (IC – Grupo I) e CVS/31 (CP – Grupo III) apresentaram os sintomas de forma aguda, com apenas um dia de morbidade; camundongos inoculados com a amostra Bovino4005-V/IP2010 (IC – Grupo VI) apresentaram de três a quatro dias de morbidade; camundongos inoculados com a amostra Bovino4005-V/IP2010 (CP – Grupo V) apresentaram aproximadamente três dias de morbidade; camundongos inoculados com a amostra Canídeo Silvestre 5053-V/IP2010 (IC – Grupo VIII) apresentaram de dois a três dias de morbidade e os camundongos inoculados via CP com a amostra de Canídeo silvestre 5053-V/IP2010 (Grupo VII) apresentaram três dias de morbidade.

Assim como nos trabalhos realizados por Langohr et al. (2003) e Bernardi et al. (2005) referente ao estudo de isolados de RABV brasileiros, neste trabalho também foi encontrado manguito perivascular com infiltrado mononuclear (linfócitos, macrófagos e alguns plasmócitos), neurônios degenerados, hemorragia, gliose focal e regional. Segundo Shuangshoti et al. (2013), o processo inflamatório poderia levar a uma diminuição da disseminação viral no SNC, particularmente nos hemisférios cerebrais, o que poderia explicar as diferenças na patogenicidade entre as diferentes variantes do RABV, ou seja, a neuroinvasividade determinada pelo grau

de disseminação viral nas diferentes estruturas do SNC pode ser dependente do grau de inflamação.

Os resultados da técnica histopatológica de Kojima et al. (2010) demonstraram semelhança aos resultados obtidos neste experimento, pois foram encontradas células inflamatórias compostas principalmente de linfócitos ao redor dos vasos sanguíneos em SNC de camundongos BALB/c inoculados pela via CP com CVS/11.

A relação entre a intensidade de lesões inflamatórias, tais como manguito perivascular, e a intensidade da distribuição antigênica parece não estar tão evidente na análise de fragmentos de SNC de camundongos inoculados via CP (Quadros 10 a 13). Observou-se manguito perivascular moderado associado com presença de antígenos leve do RABV em amostras de medula de camundongos inoculados com vírus Bovino 4005-v/10IP. Shuangshoti et al. (2013) observaram que a menor quantidade de antígeno viral e carga viral do RABV estava relacionada com intensa inflamação no tronco encefálico nos casos de raiva parálitica, que poderia levar a diminuição da disseminação viral através do SNC, particularmente nos hemisférios cerebrais. Iwasaki et al. (1977) observaram que a paralisia ascendente em camundongos inoculados com CVS no coxim plantar estava relacionada com destruição tecidual e infiltração mononuclear.

Observou-se presença antigênica moderada a intensa do RABV associada com ausência ou leve presença de lesões (inflamação, degeneração e necrose neuronal) em amostras de encéfalo de camundongos inoculados com CVS/31 pela via CP (Grupo III), concordando com o conceito de que a disfunção neuronal, mais que a morte neuronal, desempenharia um papel importante na produção da doença (SHUANGSHOTI et al., 2013). No entanto, paradoxalmente, na medula espinhal de animais inoculados com CVS/31 pela via CP (Grupo III) observa-se presença intensa de manguito perivascular, degeneração e necrose neuronal.

Até o presente momento, não foram detectados marcadores moleculares específicos nos genes da glicoproteína, fosfoproteína e do nucleocapsídeo que expliquem as diferenças de manifestações clínicas e lesões das distintas variantes do RABV (HEMACHUDHA et al., 2013).

Para as amostras de SNC de camundongos inoculados com a variante de canídeo silvestre (amostra Can. Silv. 5053-V/10IP - Grupos VII e VIII), variante 3

compatível com morcego hematófago (amostra Bovino 4005-V/IP2010 – Grupos V e VI) e CVS/31 (Grupos I e III), para obter sucesso na detecção do RNA viral foi necessária a padronização da técnica de RT-qPCR utilizando o sistema SYBR Green® utilizando primers descritos por Orciari et al. (2001). Observou-se que este sistema permite a detecção de amostras com variabilidade molecular da sequência nucleotídica do gene N das diversas variantes do RABV; no entanto, a especificidade do alvo foi verificada pelas diferenças de temperatura de “melting” (T_m), conforme segue: 1) 79,47°C para amostras inoculadas com isolados de canídeos silvestres (amostra Canídeo Silvestre 5053-V/10IP); 2) 78,01°C para amostras inoculadas com CVS/31) 78,15°C para amostras inoculadas com variante 3 (amostra Bovino 4005-V/10IP). Estas diferenças de T_m poderiam auxiliar uma genotipagem discriminatória entre amostras provenientes de canídeos e morcegos hematófagos.

Neste estudo foi observadas discrepâncias no resultado da IHQ e RT-qPCR. Shuangshoti et al. (2013) sugere que diferenças entre as expressões gênicas da proteína viral e da presença de antígeno viral pode refletir na dinâmica da transcrição e tradução viral e também pode estar relacionada com diferenças na produção de RNA.

Conclui-se, portanto, que os camundongos BALB/c foram susceptíveis à infecção pelas variantes CVS/31, Bovino 4005-V/10IP e Cão 5053-V/05IP do RABV, causando manifestações clínicas da doença compatíveis com a neuroinfecção. Os resultados do presente estudo indicam também que houve diferenças em relação à intensidade das lesões e distribuição do vírus no SNC dos camundongos infectados com as distintas variantes do RABV. Tais achados provavelmente estão relacionados às características de neurovirulência e neuroinvasividade das variantes do RABV, visto que o período de incubação e taxa de mortalidade também variou entre os grupos estudados. Além disso, foi possível a padronização da técnica de RT-PCR em tempo real pelo método de SYBR Green para a detecção do RNA viral em diferentes variantes do RABV. Salienta-se ainda, que a técnica de Fluoro-JadeC foi utilizada neste projeto, pela primeira vez na literatura para a detecção de neurônios degenerados para o RABV.

6 CONCLUSÃO

A) Não foram comprovadas diferenças na neuropatogenicidade em camundongos inoculados com as variantes do RABV provenientes de canídeo silvestre (variante compatível com isolados de canídeo silvestre) e de bovino (variante 3) – foi observada a forma clínica paralítica em camundongos inoculados com ambas as variantes pela via CP.

B) A variante 3 mostrou maior neurovirulência que a variante viral proveniente de canídeo silvestre em camundongos inoculados pela via CP.

Houve predomínio de inflamação de grau moderado em medula e córtex nos animais inoculados com variante 3 e em tronco encefálico nos camundongos inoculados com variante de canídeo silvestre.

Já em relação a observação de neurônios degenerados, todas as estruturas de SNC dos camundongos inoculados com variante 3 apresentaram lesões de grau moderado a intenso. De modo diferente, nos animais inoculados com variante de canídeo silvestre, observou-se grau de degeneração neuronal moderado apenas na medula e grau leve nas demais estruturas.

C) A variante 3 mostrou maior neuroinvasividade (distribuição e carga viral) que a variante de canídeo silvestre; nas diferentes estruturas de SNC de camundongos inoculados pela via CP.

Pela técnica de IHQ, nos animais inoculados com variante 3, observou-se intensa marcação antigênica no tálamo, moderada marcação no tronco encefálico e córtex e leve marcação no hipocampo e medula. Já nos camundongos inoculados com variante de canídeo, apresentaram marcação antigênica moderada apenas no córtex e leve marcação nas demais estruturas.

REFERÊNCIAS

- BADRANE, H.; BAHLOUL, C.; PERRIN, P.; TORDO, N. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. **Journal of Virology**, v. 75, n. 7, p. 3268–3276, 2001.
- BALACHANDRAN, A.; CHARLTON, K. Experimental rabies infection of non-nervous tissues in skunks (*Mephitis mephitis*) and foxes (*Vulpes vulpes*). **Veterinary Pathology**, v. 31, n. 1, p. 93–102, 1994.
- BANYARD, A. C.; HAYMAN, D. T. S.; FREULING, C. M.; MULLER, T.; FOOKS, A. R.; JOHNSON, N. Bat rabies. In: JACKSON, A. C. (Ed.). **Rabies: Scientific basis of the disease and its management**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 2013. p. 215–267.
- BERNARDI, F.; BARROS, A. A. de; JOSÉ, L.; HEINEMANN, M. B.; MAIORKA, P. C. Biological and immunological studies of five Brazilian rabies virus isolates. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 42, n. 4, p. 307–312, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico laboratorial de raiva**. Brasília, DF, Brasil: MS, 2008.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Casos de raiva humana, grandes regiões e unidades federadas 1990 a 2015**. 2015. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/752-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/raiva/11431-situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em: 3 jun. 2015.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Protocolo para tratamento de raiva humana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 18, n. 4, p. 385–394, 2009.
- CARNIELI, P.; BRANDÃO, P. E.; CARRIERI, M. L.; CASTILHO, J. G.; MACEDO, C. I.; MACHADO, L. M.; RANGEL, N.; DE CARVALHO, R. C.; DE CARVALHO, V. A.; MONTEBELLO, L.; WADA, M.; KOTAIT, I. Molecular epidemiology of rabies virus strains isolated from wild canids in Northeastern Brazil. **Virus Research**, v. 120, n. 1-2, p. 113–120, 2006.
- CHARLTON, K. M.; NADIN-DAVIS, S.; CASEY, G. A.; WANDELER, A. I. The long incubation period in rabies: Delayed progression of infection in muscle at the site of exposure. **Acta Neuropathologica**, v. 94, n. 1, p. 73–77, 1997.
- CUNHA, E. M. S.; NASSAR, A. F. C.; LARA, M. do C. C. S. H.; VILLALOBOS, E. C. M.; SATO, G.; KOBAYASHI, Y.; SHOJI, Y.; ITOU, T.; SAKAI, T.; ITO, F. H. Pathogenicity of different rabies virus isolates and protection test in vaccinated mice.

Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 52, n. 5, p. 231–235, 2010.

DEAN, D. J.; ABELSETH, M. K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Ed.). **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 88–95.

DIAZ, A. M.; PAPO, S.; RODRIGUEZ, A.; SMITH, J. S. Antigenic analysis of rabies-virus isolates from Latin America and the Caribbean. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B**, v. 41, n. 3, p. 153–160, 1994.

FABER, M.; PULMANAUSAHAKUL, R.; NAGAO, K.; PROSNIAK, M.; RICE, A. B.; KOPROWSKI, H.; SCHNELL, M. J.; DIETZSCHOLD, B. Identification of viral genomic elements responsible for rabies virus neuroinvasiveness. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 46, p. 16328–16332, 2004.

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

FAVORETTO, S. R.; DE MATTOS, C. C.; DE MORAIS, N. B.; CARRIERI, M. L.; ROLIM, B. N.; SILVA, L. M.; RUPPRECHT, C. E.; DURIGON, E. L.; DE MATTOS, C. A. Rabies virus maintained by dogs in humans and terrestrial wildlife, Ceará State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 12, p. 1978–1981, 2006.

FAVORETTO, S. R.; DE MATTOS, C. C.; MORAIS, N. B.; ALVES ARAÚJO, F. A.; DE MATTOS, C. A. Rabies in marmosets (*Callithrix jacchus*), Ceará, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 6, p. 1062–1065, 2001.

HEMACHUDHA, T.; WACHARAPLUESADEE, S.; LUMLERTDAECHA, B.; ORCIARI, L. A.; RUPPRECHT, C. E.; LA-ONQPANT, M.; JUNTRAKUL, S.; DENDUANGBORIPANT, J. Sequence analysis of rabies virus in humans exhibiting encephalitic or paralytic rabies. **Journal of Infectious Diseases**, v. 188, n. 7, p. 960–966, 2013.

HUANG, Y.; TANG, Q.; RAYNER, S.; GONG, K.; SONG, B.; LIANG, G. D. Pathogenicity of rabies viruses isolated in China: two fixed strains and a street strain. **Biomedical and Environmental Sciences : BES**, v. 26, n. 7, p. 552–61, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23895700>>.

ICTV. INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. 2014. Disponível em: <<http://ictvonline.org/virustaxonomy.asp>>. Acesso em: 30 maio 2015.

IWASAKI, Y.; GERHARD, W.; CLARK, H. F. Role of host immune response in the development of either encephalitic or paralytic disease after experimental rabies infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 18, n. 1, p. 220–225, 1977.

JORDAN, W. H.; YOUNG, J. K.; HYTEN, M. J.; HALL, D. G. Preparation and analysis of the central nervous system. **Toxicologic Pathology**, v. 39, n. 1, p. 58–65, 2011.

KOJIMA, D.; PARK, C.-H.; SATOH, Y.; INOUE, S.; NOGUCHI, A.; OYAMADA, T. Pathology of the spinal cord of C57BL/6J mice infected with rabies virus (CVS-11 strain). **The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 71, n. 3, p. 319–324, 2009.

KOJIMA, D.; PARK, C.-H.; TSUJIKAWA, S.; KOHARA, K.; HATAI, H.; OYAMADA, T.; NOGUCHI, A.; INOUE, S. Lesions of the central nervous system induced by intracerebral inoculation of BALB/c mice with rabies virus (CVS-11). **The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 72, n. 8, p. 1011–1016, 2010.

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

KUCERA, P.; DOLIVO, M.; COULON, P.; FLAMAND, A. Pathways of the early propagation of virulent and avirulent rabies strains from the eye to the brain. **Journal of virology**, v. 55, n. 1, p. 158–162, 1985.

LANGOHR, I. M.; IRIGOYEN, L. F.; LEMOS, R. A. A. de; BARROS, C. S. L. De. Aspectos epidemiológicos, clínicos e distribuição das lesões histológicas no encéfalo de bovinos com raiva. **Ciência Rural**, v. 33, n. 1, p. 125–131, 2003.

LENTZ, T. L.; BURRAGE, T. G.; SMITH, A. L.; CRICK, J.; TIGNOR, G. H. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? **Science**, (New York, N.Y.), v. 215, n. 4529, p. 182–184, 1982.

MAIER, T.; SCHWARTING, A.; MAUER, D.; ROSS, R. S.; MARTENS, A.; KLIEM, V.; WAHL, J.; PANNING, M.; BAUMGARTE, S.; MÜLLER, T.; PFEFFERLE, S.; EBEL, H.; SCHMIDT, J.; TENNER-RACZ, K.; RACZ, P.; SCHMID, M.; STRÜBER, M.; WOLTERS, B.; GOTTHARDT, D.; BITZ, F.; FRISCH, L.; PFEIFFER, N.; FICKENSCHER, H.; SAUER, P.; RUPPRECHT, C. E.; ROGGENDORF, M.; HAVERICH, A.; GALLE, P.; HOYER, J.; DROSTEN, C. Management and outcomes after multiple corneal and solid organ transplantations from a donor infected with rabies virus. **Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 50, n. 8, p. 1112–1119, 2010.

MARCOVISTZ, R.; GERMANO, P. M.; RIVIÈRE, Y.; TSIANG, H.; HOVANESSIAN, A. G. The effect of interferon treatment in rabies prophylaxis in immunocompetent, immunosuppressed, and immunodeficient mice. **Journal of Interferon Research**, v. 7, n. 1, p. 17–27, 1987.

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

OIE. **OIE - WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH**. Disponível em: <<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/rabies-portal/>>. Acesso em: 25 maio. 2015.

ORCIARI, L. A.; NIEZGODA, M.; HANLON, C. A.; SHADDOCK, J. H.; SANDERLIN, D. W.; YAGER, P. A.; RUPPRECHT, C. E. Rapid clearance of SAG-2 rabies virus from dogs after oral vaccination. **Vaccine**, v. 19, n. 31, p. 4511–4518, 2001.

PARK, C.-H.; KONDO, M.; INOUE, S.; NOGUCHI, A.; OYAMADA, T.; YOSHIKAWA, H.; YAMADA, A. The histopathogenesis of paralytic rabies in six-week-old C57BL/6J mice following inoculation of the CVS-11 strain into the right triceps surae muscle. **The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 68, n. 6, p. 589–595, 2006.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, n. 3, p. 493–497, 1938.

RODRIGUES, L. L.; ROEHE, P. M.; BATISTA, H. B. C. R.; KURATH, G. Rhabdoviridae. In: FLORES, E. (Ed.). **Virologia veterinária**. 2. ed. Santa Maria, RS: UFSM, 2012. p. 795–830.

ROSSITER, J. P.; HSU, L.; JACKSON, A. C. Selective vulnerability of dorsal root ganglia neurons in experimental rabies after peripheral inoculation of CVS-11 in adult mice. **Acta Neuropathologica**, v. 118, n. 2, p. 249–259, 2009.

SCHEFFER, K. C. **Detecção do vírus da raiva em órgãos de morcegos do gênero artibeus (leach, 1821) por meio de rt-pcr, hemi-nested rt-pcr e real time rt-pcr**. 2011. 145 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SHUANGSHOTI, S.; THEPA, N.; PHUKPATTARANONT, P.; JITMITTRAPHAP, A.; INTARUT, N.; TEPSUMETHANON, V.; WACHARAPLUESADEE, S.; THORNER, P. S.; HEMACHUDHA, T. Reduced viral burden in paralytic compared to furious canine rabies is associated with prominent inflammation at the brainstem level. **BMC Veterinary Research**, v. 9, p. 31, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3617073&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

SILVA, S. R.; KATZ, I. S. S.; MORI, E.; CARNIELI, P.; VIEIRA, L. F. P.; BATISTA, H. B. C. R.; CHAVES, L. B.; SCHEFFER, K. C. Biotechnology advances: A perspective on the diagnosis and research of rabies virus. **Biologicals**, v. 41, n. 4, p. 217–223, 2013.

SPIPKI, F. R.; ESTEVES, P. A.; FRANCO, A. C.; LIMA, M.; HOLZ, C. L.; BATISTA, H. B. R.; DRIEMEIER, D.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; ROEHE, P. M. Neurovirulência e neuroinvasividade de herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 em coelhos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 58–63, 2002.

SRINIVASAN, A.; BURTON, E.; KUEHNERT, M.; RUPPRECHT, C.; SUTKER, W.; KSIAZEK, T.; PADDOCK, C.; GUARNER, J.; SHIEH, W.; GOLDSMITH, C.;

HANLON, C. A.; ZORETIC, J.; FISCHBACH, B.; NIEZGODA, M.; EL-FEKY, W. H.; ORCIARI, L.; SANCHEZ, E. Q.; LIKOS, A.; KLINTMALM, G. B.; D, C.; LEDUC, J.; CHAMBERLAND, M. E.; JERNIGAN, D. B.; ZAKI, S. R. Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 11, p. 1103–1111, 2005.

SUGAMATA, M.; MIYAZAWA, M.; MORI, S.; SPANGRUDE, G. J.; EWALT, L. C.; LODMELL, D. L. Paralysis of street rabies virus-infected mice is dependent on T lymphocytes. **Journal of Virology**, v. 66, n. 2, p. 1252–1260, 1992.

THOULOUE, M. I.; LAFAGE, M.; SCHACHNER, M.; HARTMANN, U.; CREMER, H.; LAFON, M. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. **Journal of Virology**, v. 72, n. 9, p. 7181–7190, 1998.

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G.; ROUGEON, F. Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 11, p. 3914–3918, 1986.

TUFFEREAU, C.; BÉNÉJEAN, J.; BLONDEL, D.; KIEFFER, B.; FLAMAND, A. Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. **EMBO Journal**, v. 17, n. 24, p. 7250–7259, 1998.

VIGILATO, M. A. N.; CLAVIJO, A.; KNOBL, T.; SILVA, H. M. T.; COSIVI, O.; SCHNEIDER, M. C.; LEANES, L. F.; BELOTTO, A. J.; ESPINAL, M. A. 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**, v. 368, n. 1623, p. 20120143, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23798691>>.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Rabies**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/>>. Acesso em: 20 maio. 2015.

WILLOUGHBY, R. E.; TIEVES, K. S.; HOFFMAN, G. M.; GHANAYEM, N. S.; AMLIE-LEFOND, C. M.; SCHWABE, M. J.; CHUSID, M. J.; RUPPRECHT, C. E. Survival after treatment of rabies with induction of coma. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 24, p. 2508–2514, 2005.

WUNNER, H. W. Rabies virus. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, H. W. (Ed.). **Rabies**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2007. p. 23–68.

WUNNER, W. H.; LARSON, J. K.; DIETZSCHOLD, B.; SMITH, C. L. The molecular biology of rabies viruses. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 10, p. S 771–84, 1988. Supplement, 4.