EKATERINA ALEXANDROVNA DURYMANOVA ONO

**Inibição da replicação do vírus da raiva *in vitro* e *in vivo*
por meio de interferência por RNA**

São Paulo

2010

EKATERINA ALEXANDROVNA DURYMANOVA ONO

**Inibição da replicação do vírus da raiva *in vitro* e *in vivo*
por meio de interferência por RNA**

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão

São Paulo

2010

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.2301
FMVZ

Durymanova Ono, Ekaterina Alexandrovna

Inibição da replicação do vírus da raiva *in vitro* e *in vivo* por meio de interferência por RNA / Ekaterina Alexandrovna Durymanova Ono. -- 2010.
74 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2010.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão.

1. Raiva. 2. RNA interferência. 3. siRNAs. 4. Antiviral. 5. Tratamento. I. Título.

ERRATA

DURYMANOVA ONO, E. A. **Inibição da replicação do vírus da raiva *in vitro* e *in vivo* por meio de interferência por RNA.** 2010. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Folha	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	2	74 f.	71 f.
Resumo	1	74 f.	71 f.
Abstract	1	74 f.	71 f.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Interferência por RNA *in vitro* e *in vivo* como antiviral para a raiva”, protocolado sob o nº 1357/2008, utilizando 250 (duzentos e cinquenta) camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado na reunião do dia 23 de abril de 2008.

We certify that the Research “In vitro and in vivo RNA interference as antiviral against rabies”, protocol number 1357/2008, utilizing 250 (two hundred fifty) mice, under the responsibility Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 04/23/08.

São Paulo, 23 de abril de 2008

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Durymanova Ono, Ekaterina Alexandrovna

Título: Inibição da replicação do vírus da raiva *in vitro* e *in vivo* por meio de interferência por RNA.

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Ao meu pai **Alexandr Gavrilovich Durymanov** que me despertou o interesse pela
ciência,

A minha mãe **Luidmila Nikolaevna Durymanova** que nunca deixou de acreditar em
mim,

A minha irmã **Anastasia Johnson** que sempre está no meu coração.

“A ciência não é e nunca será um livro terminado”

Albert Einstein.

AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. **Paulo Eduardo Brandão**, pela excelente orientação, confiança em mim e em meu trabalho e pelos conselhos.

A minha amiga **Keila Iamamoto Nogi**, companheira das minhas aventuras científicas, por toda ajuda, conselhos e discussões.

Ao meu marido **Eduardo Eiji Ono** e a minha família brasileira pela paciência e apoio.

Ao prof. Dr **Silvio Arruda Vasconcellos** e profa. Dra **Solange Maria Gennari** pelo programa de pós-graduação do VPS.

Aos demais professores do VPS.

Ao Instituto Pasteur, em nome da sua Diretora **Neide Yumie Takaoka, Maria Luiza Carrieri, Ivanete Kotait** por oferecer todas as condições necessárias para desenvolver esta tese.

Aos pesquisadores do laboratório de Biologia Molecular do Instituto Pasteur **Juliana Galera Castilho, Rafael de Novaes Oliveira, Carla Isabel Macedo, Pedro Carnieli Junior, Silvana Regina Favoretto** pela conversas, conselhos e agradável convivência durante o tempo de estágio e do trabalho de tese.

A **Samira Maria Ashkar** e a **Fátima** pela ajuda no desenvolvimento do experimento com os camundongos.

Aos funcionários do Instituto Pasteur **Adriana Rodrigues** e **Eliana** pela ajuda no trabalho com as culturas das células e outros funcionários que não foram mencionados.

A **Sibele Pinheiro de Souza** pela ajuda de formatação da dissertação, **Giselle Ayres Razera, William de Oliveira Fahl** por toda ajuda, companheirismo e atenção.

Aos pós-graduandos **Vanessa Salgado, Camila de Oliveira, Márcio Pinotti Guirão, Thaisa Lucas Sandre, Iracema Nunes de Barros** e aos demais pós-graduandos do VPS pela agradável convivência.

Aos funcionários do VPS pela ajuda, atenção e boa convivência.

A **Elza Maria Rosa B. Faquim** pela ajuda na formatação da tese e todos os funcionários da biblioteca pela pesquisa bibliográfica.

A **FAPESP** pela bolsa concedida (Nº do processo 2008/51517-5).

RESUMO

DURYMANOVA ONO, E. A. **Inibição da replicação do vírus da raiva *in vitro* e *in vivo* por meio de interferência por RNA.** [Inhibition of replication of rabies virus *in vivo* and *in vitro* using RNA interference]. 2010. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A raiva é uma zoonose que afeta todos os mamíferos e causa cerca de 55.000 mortes humanas por ano, causada pelo vírus da raiva. O vírus da raiva pertence à Ordem *Mononegavirales*, Família *Rhabdoviridae* e o Gênero *Lissavirus*. Atualmente, o tratamento humano se baseia no uso do Protocolo de Milwaukee composto de indução do paciente ao coma e uso de massiva terapia antiviral. O protocolo, apesar de ter sido utilizado duas vezes com sucesso, inclusive em um caso brasileiro, ainda requer aprimoramentos. Neste sentido, a interferência por RNA (RNAi) é uma nova abordagem para terapia de doenças virais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a inibição da replicação do vírus da raiva *in vitro* e *in vivo* utilizando RNAi. Para tanto, foram utilizados três siRNAs (siRNA 124, siRNA 750, siRNA B) com a fita antisense complementar ao mRNA da nucleoproteína (N) do vírus da raiva. Para o ensaio *in vitro* foram utilizadas a cepa PV do vírus da raiva e as células de BHK-21 (Baby hamster kidney). As monocamadas celulares foram infectadas com a cepa PV e depois de 2 horas de incubação transfectadas com cada um dos siRNAs em combinação com Lipofectamine 2000[®]. Depois de 22 horas as placas teste e controle foram submetidas à imunofluorescência direta (IFD) com conjugado globulina de coelho anti-nucleocapsídeo do vírus da raiva/isotiocianato de fluoresceína (BIO-RADTM). Os resultados revelaram títulos de 5,71logTCID₅₀/ml, 5,56logTCID₅₀/ml e 5,65logTCID₅₀/ml para os siRNAs 124, B e 750, respectivamente, enquanto que, para a placa controle, o título foi 6,43logTCID₅₀/ml. Para o ensaio *in vivo*, foram usados camundongos albino suíços de 21 dias com peso entre 11 e 14g, infectados com a cepa PV via intracerebral. Duas horas depois da infecção foi inoculada por via intracerebral uma solução do “pool” dos três siRNAs com Lipofectamine 2000[®]. Os animais com paralisia foram sacrificados e aqueles sobreviventes foram observados até completar 30 dias de observação quando foram, então, sacrificados. O sistema nervoso central de todos os animais foi recolhido e submetido a IFD. O título viral do grupo teste foi 7,03logLD₅₀/ml e do

grupo controle 7.13logLD_{50%}/ml. O resultado do ensaio *in vitro* demonstra que os siRNAs utilizados são efetivos em inibir a replicação do vírus da raiva, com eficiências equivalentes. A utilização do “pool” dos três siRNA em camundongos resultou em 30% de animais sobreviventes frente a 100 DL_{50%} do vírus PV, enquanto que a mesma dose levou a 100% de mortalidade nos animais não tratados. Pode-se atribuir a menor eficiência em inibir a replicação do vírus da raiva *in vivo* quando se compara com os resultados *in vitro* possivelmente às elevadas doses virais utilizadas. Estes resultados, ainda que indiquem a necessidade de mais estudos, permitem concluir que a RNAi é uma tecnologia promissora como antiviral contra a raiva.

Palavras-chave: Raiva. RNA interferência. siRNAs. Antiviral.Tratamento.

ABSTRACT

DURYMANOVA ONO, E. A. **Inhibition of replication of rabies virus *in vivo* and *in vitro* using RNA interference** [Inibição da replicação do vírus da raiva *in vitro* e *in vivo* por meio de interferência por RNA]. 2010. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Rabies is a zoonotic disease that affects all mammals and causes more than 55.000 human deaths every year, caused by rabies virus (RABV) a virus of the *Mononegavirales* order, Family *Rhabdoviridae* and the *Lissavirus* genus. After the onset of the symptoms, the illness has a fast progression and the patients feel intense physical suffering. Currently, human rabies treatment has been based on the Milwaukee Protocol which consists on the induction of coma and massive antiviral therapy. Despite this protocol has been successful in two cases, including a Brazilian case (Recife State), more studies on antiviral for human rabies treatment are required. RNA interference is a new antiviral approach, which gives hope to the possibility of rabies antiviral treatment. The aim of this study was to assess the decrease in the titer of rabies virus *in vitro* and *in vivo* using short-interfering RNAs. For this purpose, three siRNAs (siRNA 124, siRNA B, siRNA 750) were used with antisense strands complementary to rabies virus nucleoprotein (N) mRNA. Pasteur virus strain (PV) of rabies virus and BHK-21 cells were used, and the monolayers were transfected with each of tree RNAs with Lipofectamine-2000. After 22 hours, the siRNA-treated and the control plates were tested by direct fluorescent antibody test (DFAT) with anti-rabies virus nucleocapsid antibody conjugate with fluorescein isothiocyanate. Virus titers were calculated by the Spearman-Kärber method. The results revealed that all three siRNAs reduced the titer of PV strain and a more intense effect was obtained with siRNA B. The titer of the PV strain in the control plate was 6.43lg TCID₅₀%/ml and 5.56lg TCID₅₀%/ml in the plate treated with siRNA B, respectively. The similar result was obtained in plates treated with siRNAs 124 and 750. The title of PV strain of these plates was 5.71lg TCID₅₀%/ml of siRNA 124 and 5.65lg TCID₅₀%/ml of siRNA750, respectively. No cytopathic or cytotoxic effect was observed in the monolayers treated with Lipofectamine-2000®. Swiss albino mice with 21 days weighing between 11 and 14g infected with strain PV by the intracerebral route used in this *in vivo* essay. After two hours of infection, a pool

solution of 3 siRNAs with lipofectamine was also inoculated by the intracerebral route. The animals with paralysis were euthanized and those which survived were observed until the 30th day when they were also euthanized. The central nervous system of all animals were collected and induced to IFD. The title viral test group was 7.03logLD_{50%}/ml and the control group was 7.13logLD_{50%}/ml. The *in vitro* test results indicate that siRNAs are effective in inhibiting the replication of rabies virus with similar efficiencies. The use of the pool of three siRNA in mice resulted in 30% of survivors for 100 LD_{50%} of PV virus, while the same dose led to 100% mortality in untreated animals. A lower efficiency in inhibiting the replication of rabies virus *in vivo* when compared with results *in vitro* could be possibly due to the high viral doses used. These results, although indicative of the need for further studies, show that RNAi is a promising technology as antiviral against rabies.

Key-words: Rabies. RNA-interference. siRNAs.Antiviral.Treatment.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	adenina
Arg	arginina
aa	aminoácidos
AChR	receptor de acetilcolina
BHK-21	(baby hamster kidney) linhagem celular de células de rim de hamster
C	citossina
°C	graus Celsius
CPPs	(cationic cell-penetrating peptides) peptídeos penetrantes catiônicos celulares
CT-26	células de carcinoma de cólon
CVS	Challenge Vírus Standard
DNase	desoxiribonuclease
ED	ectodomínio
ENDO	endodomínio
G	glicoproteína do vírus da raiva
G	guanidina
Gln	guanina
Gly	glicina
h	horas
IFD	imunofluorescência direta
IFN	interferon
JEV	(Japanese Encephalite Virus) Vírus de Encefalite Japonesa
L	proteína de polimerase –RNA-dependente-L do vírus da raiva
Le	RNA- líder
LD_{50%}	(Letal dose 50%) dose letal 50%
log	logaritmo
Lys	lisina
M	proteína matriz do vírus da raiva
MEM	meio mínimo essencial
Met	metionina
MS	Ministério da Saúde
N	nucleoproteína do vírus da raiva
N₂A	cultura de neuroblastoma murino
NC	nucleocapsídeo
NMJs	junções neuromusculares
nmol	nanomol
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
PBS	(phosphate buffer saline) solução tampão salina fosfatada

pH	Potencial hidrogeniônico
PCR	(polymerase chain reaction) reação em cadeia pela polimerase
PTGS	(post-transcriptional gene silencing) silenciamento gênico pós-transcricional
PV	Pasteur Virus
PVCV VERO- PVRV RABV	ou (Purified Vero Cell Rabies Vaccine) vacina antirábica em células Vero purificada (Rabies Virus) vírus da raiva
RI	RNA replicativo intermediário
RNA	ácido ribonucléico
RNA_m(s)	RNA(s) mensageiro(s)
RNAse	ribonucelase
RISC	(RNA induced silencing complex) complexo silenciador induzido por RNA
RITS	(RNA induced transcriptional silencing complex) complexo silenciador de transcrição induzido por RNA
RVG-9R	peptídeo quimérico de origem de glicoproteína de vírus da raiva
siRNA(s)	(short-interfering RNA) pequeno(s) RNA(s) de interferência
SFB	soro fetal bovino
shRNA	short-harpin RNA
SNC	sistema nervoso central
ssRNA	RNA de fita simples
TCID_{50%}	(tissue culture infective dosis) dose tecidual infectante 50%
TGS	(transcriptional gene silencing) silenciamento gênico transcricional
TM	complexo transmembrânico
U	uracila

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	RAIVA: UMA VISÃO GERAL.....	15
1.2.1	TAXONOMIA DE <i>LYSSAVIRUS</i>	18
1.3	VÍRUS DA RAIVA: MORFOLOGIA E GENOMA.....	19
1.4	PROTEÍNAS DO <i>RABV</i>	22
1.4.1	Nucleoproteína N.....	22
1.4.2	Fosfoproteína P, M ou NS.....	22
1.4.3	Proteína matriz M.....	23
1.4.4	Glicoproteína G.....	23
1.4.5	RNA polimerase-RNA-dependente L.....	24
1.5	O CICLO INTRACELULAR DO VÍRUS.....	24
1.5.1	A fase inicial.....	25
1.5.2	A fase intermediária.....	25
1.5.3	A fase da maturação e liberação.....	26
1.6	PROFILAXIA DA RAIVA.....	27
1.6.1	Pré-exposição.....	28
1.6.2	Pós-exposição.....	28
1.7	TRATAMENTO DOS CASOS CLÍNICOS DE RAIVA HUMANA.....	29
1.8	INTERFERÊNCIA POR RNA.....	30
1.8.1	Definição e o mecanismo.....	30
1.8.2	Desenho de siRNA e sistemas de entrega.....	32
1.8.3	Aplicações de RNAi.....	34
2	OBJETIVOS.....	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1	AMOSTRA VIRAL DE REFERÊNCIA.....	36
3.1.1	Titulação da amostra PV em células BHK-21.....	36
3.1.2	Imunofluorescência direta.....	37
3.1.3	Titulação da amostra PV em camundongos.....	37
3.2	PEQUENOS RNAs INTERFERENTES.....	38
3.3	ENSAIO DE INIBIÇÃO POR siRNAs <i>IN VITRO</i>	39
3.3.1	Preparo de “solução de trabalho” de Lipofectamina 2000® (Invitrogen).....	39
3.3.2	Preparo de combinação de siRNA com o Lipofectamina 2000® (Invitrogen).....	39

3.3.3	Inoculação da amostra PV e transfecção com siRNAs.....	40
3.3.4	Reação de Imunofluorescência direta.....	42
3.3.5	Eleição do siRNA de maior eficiência.....	42
3.4	ENSAIO DE INIBIÇÃO POR siRNAs <i>IN VIVO</i>	43
3.4.1	Preparo de combinação de siRNA e Lipofectamina 2000® (Invitrogen).....	43
3.4.2	Infecção com PV e tratamento dos camundongos com siRNAs.....	44
3.4.3	Imunofluorescência direta.....	44
3.4.4	Cálculo de títulos.....	45
3.5	AVALIAÇÃO DO EFEITO TÓXICO DE LIPOFECTAMINA 2000® (INVITROGEN) NOS CAMUNDONGOS.....	45
4	RESULTADOS	46
4.1	TITULAÇÃO DO VÍRUS PV EM CÉLULAS BHK-21.....	46
4.2	TITULAÇÃO DA AMOSTRA PV EM CAMUNDONGOS.....	46
4.3	ENSAIO DE INIBIÇÃO POR siRNAs <i>IN VITRO</i>	46
4.3.1	Descrição dos resultados de IFD em placas de células BHK-21 inoculadas com a amostra PV e tratadas com siRNA.....	47
4.3.2	Comparação de títulos virais nas placas de células de BHK-21 Inoculadas com a amostra PV e tratadas com siRNAs.....	51
4.4	ENSAIO DE INIBIÇÃO POR siRNA <i>IN VIVO</i>	51
4.4.1	Sobrevivência dos camundongos tratados com siRNAs frente a doses decrecentes do vírus PV.....	51
4.4.2	IFD das amostras de SNC dos camundongos inoculados com a amostra PV tratados com siRNAs e sem tratamento.....	52
4.5	AVALIAÇÃO DO EFEITO TÓXICO DA LIPOFECTAMINA 2000® (INVITROGEN) NOS CAMUNDONGOS.....	52
5	DISCUSSÃO	53
6	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

A seguir, são apresentados aspectos gerais da raiva e da virologia básica do vírus da raiva, bem como a terapia antiviral para esta doença e conceitos sobre interferência por RNA.

1.1 RAIVA: UMA VISÃO GERAL

A raiva é uma zoonose clássica, cujo primeiro relato foi encontrado na Mesopotâmia em 2300 a.C., onde se relatava que os cães doentes poderiam transmitir a enfermidade para o homem. Raiva, do latim *rabere*, significa fúria (WILKINSON, 2002). Apesar dos empenhos seculares para seu controle, ainda causa significativo impacto sobre a saúde pública, tanto em países em desenvolvimento quanto desenvolvidos, podendo ser definida como uma doença infecciosa aguda do sistema nervoso central de mamíferos causada por vírus do gênero *Lyssavirus*, de distribuição mundial e evolução fatal (RUPPRECHT; HONLON; HEMACHUDHA, 2002). Em geral, a transmissão ocorre por meio da mordedura através da saliva do animal infectado (ACHA; SZYFRE, 2003).

Em pacientes humanos, a raiva tem um dramático curso clínico, levando o paciente a um intenso sofrimento, o qual experimenta desde sinais inespecíficos como febre, mialgia e dores de cabeça na fase prodrômica a alterações do comportamento, disfunções do sistema autônomo e paralisia que culminam em coma e morte (BURTON et al., 2005).

A raiva é uma doença que pode ser prevenida por vacinação, mas ainda é um grave problema de saúde pública (BRIGGS; HANLON, 2007). Estima-se que a raiva leve à morte 55.000 pessoas anualmente no mundo todo (www.who.int acessado em 06 de Maio de 2010), com uma estimativa de uma morte e de 300 exposições à doença a cada 15 minutos (RUPPRECHT; HONLON; HEMACHUDHA, 2002), o que demonstra o impacto da raiva sobre a saúde pública. Aproximadamente dez milhões de pessoas/ano são submetidas à profilaxia pós-exposição (PLOTKIN, 2000;

RUPPRECHT; HONLON; HEMACHUDHA, 2002), representando um problema econômico mundial.

O vírus da raiva se mantém em vários ciclos epidemiológicos, incluindo diversas espécies de mamíferos com suas respectivas variantes virais, principalmente das Ordens *Carnivora* e *Chiroptera* (CHILDS; REAL, 2007). O homem é um dos hospedeiros finais em todos os ciclos. A epidemiologia da raiva é complexa e, para facilitar o entendimento, na literatura são descritos (Figura 1) quatro ciclos epidemiológicos: urbano, rural, silvestre terrestre e aéreo (KOTAIT; CARRIERI; TAKAOKA, 2009), descritos de modo sucinto a seguir.

Fonte: <<http://www.ceut.com.br/observatorio/edicao%2006.pdf>>. acesso em 20 de Maio de 2010

Figura 1 - Representação os ciclos epidemiológicos da raiva

O Ciclo urbano é o mais estudado, envolvendo os cães e gatos. O hospedeiro natural é o cão doméstico (*Canis canis*). Na maioria das regiões do mundo, onde é aplicada a campanha nacional da vacinação contra a raiva para os cães e gatos, essa doença é controlada. Mas nos países da Ásia (exceção a Rússia asiática) e África a raiva ainda é um grande problema de saúde pública onde cão é principal reservatório (WHO, 2005). No Norte e Nordeste do Brasil a raiva canina ainda é um problema porque nesta região a campanha de vacinação não atingiu resultados satisfatórios (BRASÍLIA, 2009).

O ciclo rural se caracteriza pela transmissão da raiva para os animais domésticos de interesse econômico, tais como: herbívoros, equídeos, caprinos,

suínos e onívoros. O reservatório desse ciclo na América Latina é o morcego hematófago *Desmodus rotundus*.

Este ciclo, além de apresentar impacto econômico, gera o perigo de transmissão do vírus para o homem, o que aconteceu em 2006 em Minas Gerais quando um veterinário foi infectado durante a manipulação de um herbívoro. Os cães podem ser envolvidos neste ciclo também (KOTAIT; CARRIERI; TAKAOKA, 2009). Além do Brasil este ciclo foi observado no México (MATTOS et al., 1999), Colômbia (PAEZ et al., 2007), Bolívia (FAVI et al., 2003), Chile (YUNG; FAVI; FERNÁNDEZ 2002), Venezuela (MATTOS et al., 1996) e Argentina (DELPIETRO et al., 1997).

O ciclo aéreo tem como transmissores os quirópteros hematófagos e não hematófagos. As agressões de seres humanos por morcegos hematófagos ocorrem devido ao deslocamento dos morcegos de seus habitats naturais para as áreas urbanas em procura dos alimentos (KOTAIT; CARRIERI; TAKAOKA, 2009).

Na Rússia (platô Siberiano) os morcegos transmissores são do gênero *Myotis* (*M. daubentoni*, *M. brandtii*), *Murina leucogaster* e *Plecotus auritus* (TERNOVOI et al., 2005).

No Canadá e nos Estados Unidos, os morcegos não hematófagos envolvidos neste ciclo são: “big brown” (*Eptesicus fuscus*), “silver-haired bat” (*Lasionycteris noctivagans*), *Lasiurus cinereus*, *L. borealis* (NUNAN et al., 2002; RUPPRECHT; HONLON; HEMACHUDHA, 2002) e, no Chile, o *L. cinereus* (YUNG; FAVI; FERNÁNDEZ, 2002).

Outra espécie que vem adquirindo importância é o *Tadarida brasiliensis* nos EUA (RUPPRECHT; HONLON; HEMACHUDHA, 2002), na Colômbia (PAEZ et al., 2007), no Chile (MATTOS et al., 2000) e no México (neste último, *Tadarida brasiliensis mexicana*) (VELLASCO-VILLA et al., 2005). No Brasil as principais espécies não hematófagas que podem transmitir a raiva para seres humanos, cães e gatos são dos gêneros *Artibeus*, *Eptesicus*, *Molossus*, *Myotis*, *Tadarida* e *Nyctinomops* (KOTAIT; CARRIERI; TAKAOKA, 2009).

No caso do ciclo silvestre terrestre, tem-se como reservatório diversas espécies de mamíferos silvestres, dependendo da região e distribuição geográfica.

No continente europeu, as espécies que ainda mantêm ciclos próprios são a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), “raccoon-dogs” (*Nyctereutes procyonoides*) e raposa ártica (*Alopex lagopus*) (BOURHY et al., 1999).

Nos EUA as espécies de animais envolvidas no ciclo silvestre terrestre da raiva são cangambás dos gêneros *Mephitis*, *Spilogale*, *Putorius*; “racoons” (*Procyon lotor*) e raposas dos gêneros *Vulpes*, *Urocyon* e *Alopex* (KREBS et al., 2003). Os mangustos (*Herpestes javanicus*) também podem manter um ciclo próprio de raiva (KELLY; SLEEMAN, 2003). Por sua vez, no Canadá, estes reservatórios são a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), coiotes (*Canis latrans*) e o cangambá (*Mephitis mephitis*) (NADIN DAVIS; CASEY; WANDELER, 1993).

Na América Latina, várias espécies de animais silvestres terrestres mantêm a raiva neste continente, tais como mangustos (*Herpestes auropunctatus*) (BLANTON et al., 2006), cangambás (gêneros *Spilogale* e *Conepatus* no México) (VELASCO-VILLA et al., 2005), raposas (gênero *Urocyon*) (no México e Colômbia) (VELASCO-VILLA et al., 2005; PAEZ et al., 2005), lincos (*Felis rufus*) e coiotes (*Canis latrans*) (VELASCO-VILLA et al., 2005).

Especificamente no Brasil, destacam-se o sagui de tufo branco (*Callithrix jacchus*) no Estado Ceará (FAVORETTO et al., 2001), o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) no Nordeste (CARNIELI et al., 2008) e a raposinha-do-mato (*Pseudoplex vetulus*) no Norte e Nordeste (BERNARDI et al., 2005; SATO et al., 2006).

1.2 TAXONOMIA DE LYSSAVIRUS

O gênero *Lyssavirus* pertence à família *Rhabdoviridae*, ordem *Mononegavirales* (LYLES; RUPPRECHT, 2007). Pela última classificação do Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV) a ordem *Mononegavirales* é composta de quatro famílias: *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae* e *Rhabdoviridae* (<http://www.ictvonline.org> acesso em 06 de Maio de 2010). Por sua vez a família *Rhabdoviridae* inclui sete gêneros:

Cytorhabdovirus – são transmitidos por artrópodes e infectam as plantas (nove espécies);

Ephemerovirus – são transmitidos por insetos hematófagos e infectam os mamíferos (três espécies);

Lyssavirus – infectam mamíferos (11 espécies);

Novirhabdovirus – infectam os peixes (quatro espécies);

Nucleorhabdovirus – infectam plantas (nove espécies);

Vesiculovirus – infectam os peixes, mamíferos e insetos (10 espécies);

Um sétimo gênero que ainda não tem identificação, mas que comporta cinco espécies virais.

Por sua vez, os *Lissavirus* são divididos em onze espécies:

Rabies virus (RABV);

Australian bat lyssavirus (ABLV);

Duvenhage virus (DUVV);

European bat lyssavirus 1 (EBLV-1);

European bat lyssavirus 2 (EBLV-2);

Lagos bat virus (LBV);

Mokola virus (MOKV);

West Caucasian bat virus (WCBV);

Aravan virus (ARAV);

Irkut virus (IRKV);

Khujand virus (KHUV).

As quatro últimas espécies foram incluídas na taxonomia em 2009 (<http://www.ictvonline.org> acesso em 06 de Maio de 2010).

Apenas a primeira espécie, *Rabies virus* ou Vírus da raiva (RABV) é associada à raiva, enquanto que as espécies de dois a sete podem ser denominadas de vírus aparentados ao Vírus da raiva (“*rabies-like viruses*”) (FAUQUET et al., 2007), causando em mamíferos doenças denominadas de lissaviroses, com sintomas semelhantes à raiva clássica (HANLON et al., 2005).

1.3 VÍRUS DA RAIVA: MORFOLOGIA E GENOMA

O vírus da raiva tem 75nm de diâmetro e 150-300nm de comprimento e morfologia aproximada de um projétil (Figura 2), com uma extremidade arredondada e outra plana (KAPLAN, 1996). O virion é envelopado por uma membrana de lipoproteína da célula hospedeira com 7,5-10 nm de espessura, com espículas de

9nm de comprimento e intervalo de 5nm entre elas, as quais se sobressaem da superfície do vírus (TORDO; POCH, 1988).

Fonte: www.utmb.edu/images/Rabies_virus.jpg

Figura 2 - Micrografia do RABV corado negativamente. A- 70000x

As espículas são formadas por trímeros de glicoproteína G (Figura 3) (GAUDIN et al., 1992). A proteína M (matriz) é inserida no envelope viral e interage com o domínio citoplasmático da superfície da glicoproteína G. A parte central do vírion é composta de ribonucleocapsídeo, ou seja, RNA genômico de fita simples de sentido negativo, nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), em associação com a proteína RNA polimerase RNA dependente (L) (WUNNER, 1991).

Fonte: Wunner. W. H. et al., (2007.)

Figura 3 - Apresentação esquemática de vírion do vírus da raiva

O vírus possui um genoma não segmentado de RNA de fita simples de polaridade negativa, o que impede a tradução direta para proteínas e a infecção da célula pelo RNA por si mesmo (WUNNER, 1991).

O primeiro evento após a infecção é a transcrição de RNA genômico para produção das moléculas complementares de RNA-mensageiro (RNAm) de sentido positivo ao RNA genômico para cada gene. As proteínas virais são sintetizadas a partir dos RNAm monocistrônicos (WUNNER, 1991).

Os primeiros 58 nucleotídeos 3' dos 11.932 nucleotídeos de RNA genômico são uma sequência- líder (Le) não codificante (WUNNER, 1991). O RNA-líder é o primeiro a ser sintetizado em processo de transcrição e, portanto, é produzido em proporções moleculares altas. Ele pode representar o elemento crucial no mecanismo de infecção, regula a transição entre a transcrição de RNAm e a replicação genômica (TORDO; POCHA, 1988) .

Os genes (Figura 4) são separados pelas sequências relativamente curtas (dinucleotídeos ou pentanucleotídeos), as quais representam as regiões intergênicas (nucleotídeos 5' do fim do gene até 3' do começo de outro gene). Uma região intergênica curta é localizada entre os N e P (dois nucleotídeos), entre os genes P e M e entre os genes M e G (cinco nucleotídeos), enquanto que a região intergênica entre os genes G e L é mais longa, com 423 nucleotídeos, denominada como pseudo-gene ou Ψ (WUNNER, 2007).

Figura 4 - Esquema da estrutura do genoma do vírus da raiva

1.4 PROTEÍNAS DO RABV

1.4.1 Nucleoproteína N

A nucleoproteína é um polipeptídeo composto por 450 aminoácidos (aa) e associada ao RNA genômico do vírus. Em contraste à nucleoproteína de Vesiculovirus, a proteína N do vírus da raiva é fosforilada. A fosforilação se localiza no resíduo de serina na posição 389 de N (TORDO; POACH, 1988).

A nucleoproteína N é o componente mais abundante do RABV e a maior proteína de nucleocapsídeo sendo a mais conservada do vírus em termos de sequência de aa, mesmo entre as espécies do gênero *Lyssavirus* (WUNNER, 2007).

Uma das razões do alto nível de conservação desta proteína é a sua função-chave na encapsidação específica de RNA-genômico, protegendo o mesmo das atividades de ribonucleases celulares e supostamente mantendo o RNA genômico em configuração adequada para a transcrição (WUNNER, 2007).

A proteína N nascente é distribuída difusamente no citoplasma das células infectadas, formando complexos homólogos (N-N) e heterólogos (N-P) associados com o ribonucleocapsídeo (RNP) viral nascente. A concentração de N com a proteína P *in vivo* forma os corpúsculos de Negri. Além disso, a proteína N é o alvo mais importante de linfócitos T-auxiliares (WUNNER, 1991).

1.4.2 Fosfoproteína P, M1 ou NS

A proteína P é multifuncional na sua interação com a proteína N e um componente-chave do complexo de RNA polimerase associado ao virion como proteína regulatória na replicação do genoma. A fosfoproteína contém 297 aa, sendo conservada entre as variantes de espécie de *RABV*, encontrada em duas formas: hipofosforilada e hiperfosforilada dentro das células infectadas e dos virions (WUNNER, 2007).

A proteína P atua como chaperone da proteína N nascente solúvel prevenindo a polimerização da mesma e a ligação não específica ao RNA genômico. Como uma subunidade de complexo de RNA-polimerase (P-L), P tem função central como co-fator em transcrição e replicação do genoma viral, estabilizando a proteína L e posicionando o complexo de polimerase no RNA- molde (WUNNER, 1991).

1.4.3 Proteína matriz M

A proteína M, composta de 202 aa é a menor proteína do virion (WUNNER, 1991), esta forma uma bainha em volta da RNP do virion produzindo o esqueleto do vírus. Esta também é uma proteína multifuncional que interage com outras proteínas virais e com os componentes das proteínas da membrana celular.

A proteína M se liga fortemente e condensa o nucleocapsídeo nascente (NC) dentro do complexo helicoidal de ribonucleocapsídeo-proteína M. Aproximadamente 1200 a 1500 cópias das moléculas da M se ligam ao RNP do vírus da raiva. Ao mesmo tempo, a M se liga à estrutura de RNP e intermedeia a ligação da parte central da estrutura do vírus à periferia da membrana celular onde se inicia o brotamento do vírus (WUNNER, 2007).

1.4.4 Glicoproteína G

A proteína G tem uma importância crucial na indução e ligação de anticorpos neutralizantes, bem como na estimulação de células T. Esta glicoproteína intermedeia a adsorção do vírus à célula hospedeira (TORDO; POCH, 1988). A G madura possui 505 aa e forma espículas localizadas na superfície do envelope viral (WUNNER, 1991).

Esta proteína tem três domínios: ectodomínio (ED), transmembrana (TM) e endodomínio (ENDO). O ED é a parte externa da proteína, a qual se estende para fora da superfície do virion. O C-terminal do ENDO estende-se desde a parte interna do envelope viral até o citoplasma da célula infectada durante a formação das

partículas virais, onde interage com a M para completar a montagem do vírus. A região TM da glicoproteína é ancorada pelos 22 aa no envelope viral (WUNNER, 2007).

A G é uma proteína de fusão que permite a entrada o vírus na célula hospedeira. Após a ligação ao seu receptor em células alvo, o vírus é internalizado e ocorre a fusão das espículas de G com a membrana endossomal, um processo dependente de pH entre 6,2 a 6,3 (GAUDIN et al., 1993).

Mutações na glicoproteína têm resultados críticos em patogênese viral; por exemplo, o aminoácido Arg-333 (ou Lys-333) na glicoproteína é responsável pelo fenótipo virulento do vírus da raiva e substituições por. glutamina (Gln), isoleucina (Ile), glicina (Gly), metionina (Met) ou serina (Ser) levam a fenótipos menos patogênicos ou avirulentos (DIETZSCHOLD et al., 1983; SEIF et al., 1985; TUFFEREAU et al., 1989).

1.4.5 RNA-polimerase RNA-dependente L

É uma proteína grande, de 2142 aa, codificado na região 5' do genoma, ocupando 54% do comprimento do mesmo, a qual processa a maioria das atividades enzimáticas necessárias para a transcrição e replicação (TORDO; POCH, 1988). A proteína L tem um papel fundamental no começo da infecção em função da iniciação da transcrição primária do RNA genômico uma vez que o NC é liberado no citoplasma da célula infectada. Outras funções putativas desta proteína multifuncional, tais como *capping* de RNAm, metilação e poliadenilação continuam a ser delimitadas e mapeadas entre proteínas L das variantes do vírus da raiva (WUNNER, 2007).

1.5. O CICLO INTRACELULAR DO VÍRUS

O ciclo intracelular do vírus da raiva não é muito diferente do ciclo dos outros vírus de ss-RNA. O ciclo inclui três fases: inicial, que inclui adsorção, penetração e

desnudamento; mediana (segunda) composta de transcrição, tradução e replicação e a terceira e última formada pela maturação e liberação (WUNNER, 2007).

1.5.1 A fase inicial

A infecção começa com a ligação do vírus à superfície da célula alvo e a adsorção provavelmente pelos receptores de tal maneira que permite a entrada de vírus nas células. Um dos primeiros candidatos a ser investigado foi o receptor de acetilcolina (AChR) que se acha em junções neuromusculares (NMJs) (WUNNER, 2007). O AChR pode concentrar partículas virais à frente de NMJs aumentando a probabilidade das partículas virais serem recebidas pelos terminais neuronais (LENTZ et al., 1982; LEWIS; FU; LENTZ, 2000). Entretanto, nem todas as culturas celulares são susceptíveis à infecção viral *in vitro* por mais que expressem o AChR (TSIANG et al., 1986; TSIANG, 1993).

A penetração viral ocorre via endocitose e pela fusão de envelope viral com a membrana celular (MARSH; HELENIUS, 1989; WHITT et al., 1991; GAUDIN et al., 1992). A liberação de RNP ocorre no interior da célula pela pressão do endossomo (WUNNER, 2007).

1.5.2 A fase intermediária

Depois que a RNP é liberada, o nucleocapsídeo relaxa e forma uma hélice flexível, concebida para facilitar a sequência dos eventos de replicação viral na célula (ISENI et al., 1998). O processo de transcrição realizada sobre o complexo de RNA com a N do genoma pelo complexo de RNA polimerase (proteína N e mais cofator P) é independente das funções da célula-hospedeira. O complexo de RNA polimerase também inicia a transcrição a partir da região 3' do RNA genômico. Cada um dos cinco RNAm monocistrônicos (Figura 5) produzidos em ordem sequencial é traduzido em uma das cinco proteínas virais (HOLLOWAY; OBEJESKY, 1980).

Figura 5 – Transcrição de RNAs mensageiros durante o ciclo do vírus da raiva

O início da replicação do genoma viral é síntese da cópia completa de RNA genômico conhecido como antígenoma ou RNA replicativo intermediário (RI). O RI serve como molde para a replicação de RNA genômico de sentido negativo. Depois que o RI e RNA progenômico são sintetizados, são encapsidados pela proteína N solúvel que está no citoplasma (BANERGEE; BARIK, 1992).

A síntese das proteínas virais ocorre nos poliribossomos da célula hospedeira. Quatro dos cinco RNAs mensageiros (RNAs) (N,-P,-M e L) são traduzidos nos ribossomos livres enquanto que o RNAm de N é traduzido no retículo endoplasmático rugoso (GAUDIN, 1997).

1.5.3 A fase da maturação e liberação

Uma vez que a quantidade suficiente de RNA progenômico viral e as proteínas N, P e L são acumuladas na célula infectada (Figura 6), o nucleocapsídeo viral é formado. A montagem de vírus começa e continua enquanto as células permanecem metabolicamente competentes. O processo da montagem do vírus começa com a encapsidação de RNA progenômico, ou seja, a adição de N ao final 5' do RNA nascente, e a formação do complexo RNA-N que protege o RNA das endonucleases celulares (WUNNER, 2007).

A próxima proteína que deve ser associada ao complexo RNP é a M e ambas migram à membrana celular. A proteína M está envolvida em todas as etapas que

1.6.1 Pré-exposição

No Brasil, para pré-exposição, é utilizada a vacina elaborada em cultura de células VERO – PVRV ou PVCV (*Purified Vero Cell Rabies Vaccine*). A vacina é indicada para os profissionais e estudantes da área de biologia, veterinária e zootecnia; os técnicos de laboratório; pelo lazer (praticantes de equitação, esportes radicais em áreas não urbanas) (KOTAIT; CARRIERI; TAKAOKA, 2009).

Onde ocorre epizootia da raiva em cães e gatos, na vacinação podem ser incluídos carteiros e outros que vão ao domicílio para entregar gás, fazer leitura da luz e água etc. (KOTAIT; CARRIERI; TAKAOKA, 2009).

O esquema da aplicação da vacina ocorre nos dias 0, 7 e 28. Depois de dez a 15 dias da última dose deve ser colhida uma amostra de soro para dosagem de títulos dos anticorpos. O título recomendado pelo OMS/OPAS é $>0,5$ UI/ml. Se o título for menor, deve ser aplicada dose de reforço e repetir-se a sorologia (KOTAIT; CARRIERI; TAKAOKA, 2009).

1.6.2 Pós- exposição

A profilaxia da Raiva em se tratando de Pós-exposição é indicada quando houve o risco da infecção pelo vírus da raiva. Pode ser utilizada vacina ou soro anti-rábico.

No Estado de São Paulo e no Brasil optou-se pelo esquema de cinco doses de vacina contra a raiva nos dias 0, 3, 7, 14 e 28 pela via intramuscular, na região do deltoide, com dose inteira da ampola. O número das doses não aumenta quando se aplica soro anti-rábico. O soro deveria ser usado além da vacina, mas nunca em sua substituição (KOTAIT; CARRIERI; TAKAOKA, 2009).

Este tratamento pós-exposição é efetivo para evitar o desenvolvimento da raiva, mas apenas quando administrado antes do vírus da raiva alcançar o sistema nervoso periférico via gânglios motores em tecido muscular; após isso o vírus não mais é acessível à neutralização por anticorpos (WUNNER et al., 2002).

Além disso, mesmo que extremamente raros, casos de falhas no tratamento pós-exposição podem ocorrer em função de elevada inervação no local da porta de entrada do vírus da raiva e de alta carga viral (WILDE, 2007) resultando na morte dos pacientes pela raiva.

1.7 TRATAMENTO DOS CASOS CLÍNICOS DE RAIVA HUMANA

A busca por antivirais em raiva é um tema que vem merecendo atenção mundial, em função da recente descrição de um protocolo baseado em associação de quetamina, ribavirina, midazolam e amantadina, que resultou em sucesso, quando aplicado a uma paciente humana em fase clínica da doença (WILLOUGHBY et al., 2005). Este protocolo, com modificações, foi utilizado no Brasil (Recife) em 2008 num caso de um paciente jovem que sobreviveu, mas teve sequelas (BRASÍLIA, 2009).

Entretanto, este protocolo, quando aplicado a outro paciente com raiva, não foi suficiente para evitar o curso fatal da doença (HEMACHUDHA et al., 2006), mostrando a necessidade de estudos continuados para aferir sua reprodutibilidade, em especial quando se consideram os múltiplos fatores que envolvem os episódios de infecção pelo vírus da raiva (variante, carga viral, porta de entrada, período de incubação, entre outros).

A quetamina, principal antiviral quimioterápico do protocolo em questão, a despeito de sua atividade anestésica dissociativa, é capaz de inibir de modo específico a transcrição de RNAs do vírus da raiva, tanto em cultivo de células quanto em camundongos, mas com efeito transiente (LOCKHART; TORDO; TSIANG, 1992; CHÁVEZ et al., 2006).

Mesmo sendo a quetamina o mais favorável candidato para a terapia antiviral em raiva, a estreita dose-dependência de seu efeito e o caráter transiente do mesmo levam à falta de suporte para que a mesma se firme como clinicamente viável, o que é embasado por demonstrações de que a mesma pode ser ineficiente para proteger neurônios de camundongos inoculados com a cepa CVS (*Challenge Vírus Standard*) do vírus da raiva (WELI et al., 2006).

A amantadina, um agente quimioterápico lipossomotrópico, é capaz de inibir a replicação do vírus da raiva por impedir o desenvolvimento durante a liberação da partícula viral presente nos lisossomos para o compartimento intracitoplasmático (SUPERTI et al., 1985), mas não se obtiveram dados a partir da experimentação com camundongos que permitissem inferir a sua efetividade para uso clínico (BUSSEREAU et al., 1988).

Outro componente do protocolo, a ribavirina inibe seletivamente a síntese viral de nucleotídeos de guanossina, sendo efetiva para a inibição da replicação do vírus da raiva *in vitro* (BUSSEREAU et al., 1983; BUSSEREAU; ERMINE, 1983), mas uma prévia tentativa de utilizar este quimioterápico em pacientes humanos com raiva não resultou em evidências de efeitos virostáticos (WARREL et al., 1989).

Uma alternativa aos antivirais clássicos para a raiva foi recentemente relatada, baseada na interferência por RNA (RNAi) por meio de short-interfering RNAs (siRNAs), a qual se mostrou efetiva quando utilizada em cultivo de células BHK-21 após a inoculação com a cepa PV (Pasteur Virus) do vírus da raiva (BRANDÃO et al., 2007).

1.8 INTERFERÊNCIA POR RNA

1.8.1 Definição e mecanismo

A interferência por RNA (RNAi) é um fenômeno que promove a inibição da tradução de um gene por RNAs curtos que tenham complementaridade ao gene em questão (WATSON et al., 2006).

A RNAi foi uma descoberta acidental em 1990. Napoli, Lemieux e Jorgensen em um trabalho com petúnias, observaram que existia algum mecanismo que promovia o silenciamento dos genes da flor, mas não sabiam exatamente qual era este mecanismo (NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990). Em 1998, Craig Mello e Andrew Fire, os vencedores do Prêmio Nobel de Medicina em 2006, descobriram o mecanismo de RNAi nos estudos com um verme *Caenorhabditis elegans* (FIRE et al., 1998).

RNAi é um mecanismo de autodefesa das células eucarióticas que previne especificamente infecções por vírus, e pode inibir a expressão das proteínas virais (FISCHER; JAMES, 2004).

Pequenas moléculas de RNA dupla fita podem silenciar os genes por dois mecanismos: silenciamento pós-transcricional (*PTGS - post-transcriptional gene silencing*) e silenciamento transcricional (*TGS – Transcriptional gene silencing*) (CASTANOTTO; ROSSI, 2009).

O mecanismo de PTGS é baseado em uma reação em cascata que leva ao silenciamento gênico de modo específico iniciado de modo sequência-dependente por uma molécula de fita dupla de RNA de cerca de 20 pares de bases (siRNA ou *short interfering RNA*), sendo que a fita anti-senso do siRNA deve ser complementar ao RNAm em questão para o desencadeamento da reação (GEWIRTZ, 2007).

Uma vez adentrando o citoplasma, a molécula de siRNA é capturada por um complexo ubiquitário de proteínas denominado RISC (*RNA-induced silencing complex* ou complexo silenciador induzido por RNA) (Figura 7), o qual possui um domínio de ligação RNA dupla-fita e um domínio com atividade de ribonuclease localizado no domínio Piwi-Argonaute-Zwille (piwi) da proteína multifuncional Argonauta 2 (AKHTAR; BENTER, 2007) .

A ligação siRNA-RISC ativa o complexo e leva à separação da fita-dupla de RNA, ficando agora a fita anti-senso do siRNA livre para se ligar à sua sequência complementar no RNAm e dirigir a ação do RISC, levando à clivagem do RNAm pela Argonauta 2, culminando com a degradação do mesmo por ribonucleases celulares, impedindo, assim, de modo direcionado e específico, a síntese da proteína codificada (GRIM ; KAY, 2007).

O mecanismo de TGS atua na modificação de cromatina que causa o silenciamento transcricional que é conservado através de mitose e meiose por gerações. Este mecanismo é semelhante à PTGS, mas o siRNA se liga a RITS (*RNA – induced Transcriptional Silencing Complex*). O silenciamento transcriptional foi observado em leveduras, plantas e recentemente em células de mamíferos (CASTANOTTO; ROSSI, 2009).

Fonte: <http://www.odec.ca/projects/2004/mcgo4s0/public_html/t3/RNA.html> Acesso em 20 de Maio de 2010)

Figura 7- Representação esquemática do mecanismo de RNAi

1.8.2 Desenho de siRNA e sistemas de entrega

A maioria das aplicações terapêuticas baseadas na RNAi propõe o uso de siRNAs sintéticos.

Um dos fatores importantes que influenciam no resultado é o desenho de siRNA. O desenho deveria obedecer a algumas “regras”, como, por exemplo:

- O sexto nucleotídeo é o A;
- Quantidade de G e C entre 30 e 52% (REN et al., 2008);
- Deve haver na porção 5' um grupo de fosfato e na 3' um grupo hidroxila (MENCK, 2007);
- Deve conter 19-23 nucleotídeos;
- Ausência de repetições internas;
- A nas posições três e 19 (fita senso);

- U na posição 10 (fita senso) ;
- Duas desoxitimidinas nas terminações 3' de cada fita senso e anti-senso, para proteger o siRNA das endonucleases celulares (REN et al., 2008).

Devido ao seu tamanho e carga negativa, um siRNA não pode facilmente atravessar a membrana celular. Atualmente, são usados dois tipos de entrega de siRNAs: vetores não virais (conjugados, lipossomos catiônicos, complexos com os peptídeos, polímeros ou anticorpos) e vetores virais ou plasmídeos de DNA modificados geneticamente que carregam shRNA (*short-harpin RNA*) e vão gerar siRNAs pela transcrição em célula hospedeira (CASTANOTTO; ROSSI, 2009).

Vários tipos de vetores sintéticos foram investigados para a estratégia de entrega de siRNA, incluindo polímeros catiônicos, lipídios catiônicos e peptídeos catiônicos penetrantes (*CPPs- cationic cell – penetrating peptides*) (WON; SUNG, 2009). Na tabela 1 são apresentados vários sistemas não virais de entrega *in vivo*.

Tabela 1 - Estudos baseados em aplicação direta de RNAi *in vivo*: estratégias de administração de siRNAs

siRNA formulation	Target tissue/organ	Administration	Target gene(s)	Target disease/aim of study
Chemically modified	Liver and jejunum	Intravenous	apoB	Reduction of apoB and total cholesterol
Chemically modified + lipid encapsulation	Liver	Intravenous	HBV	Reduced serum HBV DNA
Electropulsation	Muscle	Intramuscular	GFP	Downregulation of GFP
Histidine-lysine complex	Breast tumor xenograft	Intratumoral	Raf-1	Breast cancer
Atelocollagen	Subcutaneous prostate carcinoma xenograft	Intratumoral	VEGF	Tumor growth inhibition
Atelocollagen	Orthotopic germ cell tumor xenograft in testes	Intratumoral	HST-1/FGF-4	Tumor growth inhibition
Atelocollagen	Bone-metastatic prostate cancer	Intravenous	EZH2	Inhibition of metastatic tumor growth
Inactivated HVJ suspension	Subcutaneous HeLa xenografts	Intratumoral	Rad51	Enhancement of cisplatin anticancer effect
Protamin-antibody fusion protein	Subcutaneous melanoma xenografts	Intravenous or Intratumoral	c-myc, MDM2, VEGF	Tumor growth inhibition
PEI complexation	Subcutaneous ovarian carcinoma xenografts	Intraperitoneal	HER-2	Tumor growth inhibition
PEI complexation	Lung	Intravenous	Influenza virus genes	Influenza virus infections
Nanoplexes (RGD-PEG-PEI)	Subcutaneous N2A neuroblastoma xenografts	Intravenous	VEGF R2	Tumor growth inhibition
TransIT-TKO (polyamine)	Nose after viral infection	Intranasal	RSV-P, PIV-P	Respiratory viral diseases
Polyamine	Myocard	Intraperitoneal	Heat shock factor 1	Abrogation of HSF-induced cardioprotection
Virosomes + cationic lipids	Peritoneal cavity	Intraperitoneal	GFP	GFP downregulation

Fonte: Aigner.A.(2006).

Entre os vetores virais são usados lentivirus, adenovirus e o vírus adeno-associado (CASTANOTTO; ROSSI, 2009).

1.8.3 Aplicações de RNAi

Durante a emergência da tecnologia de RNAi, o seu uso ficou restrito ao estudo de função de genes em eucariotos, mas em pouco tempo a mesma tornou-se uma abordagem lógica para a terapia de uma grande variedade de doenças.

Experimentos *in vivo* em animais de laboratório como roedores e primatas utilizando siRNAs têm como alvo predominante doenças neoplásicas e metabólicas (AKHTAR; BENTER, 2007), mas o sucesso do uso da interferência por RNA como terapia antiviral *in vivo* já foi demonstrado em doenças como a hepatite C (WANG; NIE; FENG, 2003), hepatite B (GILADI et al., 2003; KLEIN et. al., 2003), encefalite japonesa (KUMAR et al., 2007) e infecções por herpes simples (PALLISER et al., 2006) e ebola (GEISBERT et al., 2006).

Para algumas doenças virais, o grande passo seguinte, ou seja, o teste em seres humanos, já foi iniciado em fases pré-clínica e clínica, como a pneumonia por vírus respiratório sincicial, hepatite C e influenza pandêmica (AKHTAR; BENTER; 2007).

A tecnologia de RNAi é uma abordagem antiviral poderosa e promissora em se considerando a raiva, pois, como exposto, permite inibir de um modo específico a replicação viral, reduzindo, assim, a carga e , por conseguinte, a patogenia viral.

Pesquisas nesta área permanecem um vasto campo a ser explorado em se tratando de raiva, podendo contribuir com a diminuição do impacto causado por esta terrível doença.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve os seguintes objetivos:

- Avaliar *in vitro* a eficiência de três diferentes short-interfering RNAs (siRNAs) para silenciamento gênico pós-transcricional do gene codificador da nucleoproteína do vírus da raiva.
- Testar *in vivo* um protocolo para terapia anti-rábica baseado em interferência por RNA.
- Avaliar o efeito tóxico do sistema Lipofectamina 2000[®] (Invitrogen) de entrega de siRNAs em camundongos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e metodologia utilizados neste trabalho serão descritos a seguir.

3.1 AMOSTRA VIRAL DE REFERÊNCIA

Como amostra viral de referência, foi utilizada a cepa PV (Pasteur Virus) do vírus da raiva, cultivada em células da linhagem BHK-21 (baby hamster kidney).

3.1.1 Titulação da amostra PV em células BHK-21

Para a titulação da amostra PV em cultivo de células BHK-21, foi utilizado o protocolo descrito a seguir:

1-) Para este fim foi utilizada uma placa de 96 cavidades. Em cada poço foram colocados 50 µl da suspensão das células BHK-21 (1×10^5 células por orifício) e depois acrescentados 100 µl de MEM com 10% SFB. As placas foram mantidas na estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante 24 horas para se obter o fechamento da monocamada celular.

2-) No dia seguinte, foram preparadas diluições de vírus PV na base de 10 em MEM sem SFB.

3-) O MEM com SFB foi retirado da placa e a seguir foi substituído por 200 µl de vírus PV em cada poço, correspondendo a primeira coluna à diluição 10^{-1} , a segunda a 10^{-2} e assim por diante até a décima segunda coluna com a diluição 10^{-12} .

As células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ durante 2 horas tempo suficiente para a penetração viral (SHANKAR ; KOPROWSKI, 1991).

4-) Após este período, o MEM contendo vírus de todas as diluições foi descartado por inversão das placas, aspirando-se o volume restante com pipeta multicanal, e substituído por MEM sem SFB em volume de 300 µl por poço.

5-) Posteriormente a placa foi mantida a 37°C com 5% de CO₂ durante 22 horas.

6-) A placa foi submetida à imunofluorescência direta (IFD), conforme descrito a seguir.

3.1.2 Imunofluorescência direta

1) O conteúdo líquido de todos os poços foi aspirado e as monocamadas, foram fixadas com 200µl por poço de acetona a 80% a 4°C durante 15 minutos. Após este intervalo a acetona foi descartada em recipiente apropriado e as placas secadas.

2) A reação de imunofluorescência direta foi procedida com conjugado globulina de coelho anti-nucleocapsídeo do vírus da raiva/isotiocianato de fluoresceína (Bio-Rad™) , segundo as instruções do fabricante. Foram adicionados 40µl por poço de combinação conjugado + Azul de Evans. Para que a reação pudesse ocorrer incubamos as placas durante 1 hora na estufa com a temperatura de 37°C.

3) Depois que a solução do conjugado e Azul de Evans foi descartado, as placas passaram por lavagem 3 vezes em PBS (solução de salina tamponada) e depois 3 vezes em água destilada. Em seguida foi realizada a secagem das placas.

4) Foi adicionado 50µl de glicerina a 20%.

5) A leitura das placas foi realizada no microscópio de epi-fluorescência invertido marca “Leica” no aumento 40x , considerando como positivo o poço no qual houver pelo menos 1 foco fluorescente.

O título foi calculado a partir dos dados com o método de Spearman-Kärber (MESLIN; KAPLAN; KOPROWSKI, 1996).

3.1.3 Titulação da amostra PV em camundongos

Foram usados camundongos albinos suíços de 21 dias de idade, com peso entre 11 e 14g. Para cada diluição de vírus PV foram empregados oito camundongos.

Para a titulação da amostra PV em sistema nervoso central de camundongos, foi utilizado o protocolo descrito a seguir:

1-) Para este fim o vírus PV foi diluído na base de 10 em diluente viral (17g de cloreto de sódio x 2ml de gentamicina (40mg) x 40 ml de soro fetal bovino/q.s.p.2000ml de água destilada). Para o ensaio, foram utilizadas diluições 10^{-5} a 10^{-8} .

2-) Foram inoculados 30µl de diluição de vírus por camundongo através da via intracerebral.

3-) Os camundongos foram observados durante 30 dias. Os que apresentaram sintomas de paralisia foram sacrificados. Os camundongos sobreviventes após 30 dias de observação foram sacrificados.

O título foi calculado a partir dos dados com o método de Spearman-Kärber (MESLIN; KAPLAN; KOPROWSKI, 1996).

3.2 PEQUENOS RNAs INTERFERENTES (siRNAs)

Neste estudo foram utilizados os siRNAs descritos por Brandão et al. (2007), complementares ao RNA mensageiro da nucleoproteína do vírus da raiva (Quadro 1).

siRNA	Seqüência da dupla fita		Posição inicial no gene N
RNA124	senso	5'GCCUGAGAUUAUCGUGGAG 3'	123
	antisenso	5'AUCCACGAUAAUCUCAGGC 3'	
RNA750	senso	5'GCACAGUUGUCACUGCUUC3'	749
	antisenso	5'UAAGCAGUGACAACUGUGC 3'	
RNAB	senso	5'GACAGCUGUCCUCACUCG 3'	903
	antisenso	5'AGAGUGAGGAACAGCUGUC 3'	

Quadro 1- siRNAs (Short-interfering RNAs) utilizados para o silenciamento gênico pós-transcricional do RNAm da nucleoproteína N do vírus da raiva, apresentando a seqüência de ribonucleotídeos em fita dupla e a respectiva posição no gene N da cepa PV (Pasteur Virus) do vírus da raiva

Cada siRNA foi sintetizado pela Invitrogen® no formato dupla-fita com duas desoxitimidinas nas terminações 3' de cada fita senso e anti-senso.

3.3 ENSAIO DE INIBIÇÃO POR siRNAs *IN VITRO*

No presente estudo, cada siRNA (Quadro 1) foi testado de modo individual *in vitro* em cultivo celular, diversamente do protocolo publicado por Brandão et al. (2007), com o intuito de avaliar a eficiência individual de cada siRNA.

3.3.1 Preparo de “solução de trabalho” de Lipofectamina 2000 (Invitrogen®)

Foram preparados no total 20 ml de Lipofectamina 2000® (Invitrogen) na proporção 1:50. Para isso, foram combinados 400µl de Lipofectamina 2000® (Invitrogen) e 19600µl de MEM sem SFB. Em seguida, a solução foi incubada por 5 minutos em temperatura ambiente e, posteriormente, adicionada aos siRNAs.

3.3.2 Preparo da combinação de siRNA com Lipofectamine 2000 (Invitrogen®)

A combinação Lipofectamina 2000® (Invitrogen)/ siRNAs foi preparada durante o período de 2 horas de incubação das placas de células BHK-21 com o PV (item 2.3.2), com o intuito sincronizar os períodos de combinação destes reagentes com o seu momento de uso.

O protocolo para cada placa de 96 poços está descrito a seguir.

1-) A “solução-mãe” de cada um dos siRNAs foi preparada acrescentando-se 800µl de água livre de RNase e DNase (Gibco) no tubo contendo o 80nmoles siRNA liofilizado, obtendo-se uma solução a 100 µM.

2-) A partir da “solução-mãe” foi preparada a “solução de trabalho” de 20µM. Para obter esta concentração, 800µl de “solução-mãe” foram combinados com 3200µl de MEM sem SFB.

3-) Para obter a combinação de cada siRNA individualmente com Lipofectamina 2000® (Invitrogen), foram combinados 4000µl de siRNA de 20µM e 4000µl de Lipofectamina 2000® 1:50 em MEM, obtendo-se uma concentração final de 10 µM.

Para que a Lipofectamina 2000® (Invitrogen) pudesse se complexar com os siRNAs, as soluções foram mantidas por 20 minutos em temperatura ambiente antes de serem usadas nas placas, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante.

3.3.3 Inoculação da amostra PV e transfecção com siRNAs

A eficiência de cada um dos siRNAs em silenciar o RNAm para a proteína N foi avaliada segundo o protocolo abaixo. Foram realizadas duas repetições do ensaio para cada um dos três siRNAs, com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade do ensaio.

1-) Para ensaio com os siRNAs, foram utilizadas três placas de 96 poços, sendo uma placa para o tratamento com cada dos siRNAs (placas teste) e uma sem tratamento (placa controle).

Foram adicionados nas placas, 50µL da suspensão de células BHK-21 em MEM com 10% SFB a cada poço, adicionando, a seguir, 100µL de MEM com 10% de soro fetal bovino (SFB). As placas foram mantidas a 37°C com 5% de CO₂ durante 24 horas para o fechamento das monocamadas.

2-) O vírus PV foi diluído na base de 10 nas diluições 10⁻³ a 10⁻⁷ em MEM sem SFB em volume final de 5400µL/ diluição para cada replicata de cada siRNA do ensaio, suficiente e com margem de segurança para os 28 poços no total a serem utilizados para cada diluição, contando as placas teste e a placa controle (Figura 8).

3-) O meio de crescimento das células de todas as placas foi descartado e, a seguir, foram adicionados 200 µL de cada diluição do PV em seu poço correspondente em todas as placas, com 7 poços utilizados para cada diluição dos vírus (colunas 1 a 10).

Durante a substituição do MEM e a infecção com PV, o jato da pipeta-multicanal foi direcionado na parede do poço para não danificar a monocamada celular.

4-) A incubação das placas foi realizada a 37°C/ 5% CO₂/2 horas, tempo suficiente para a penetração viral (SHANKAR; KOPROWSKI, 1991).

5-) No próximo passo, o MEM contendo vírus PV de todas as diluições foi descartado por inversão das placas, aspirando-se o volume restante com pipeta multicanal, e substituído por MEM sem SFB em volume de 200µl por poço, das colunas 1 a 12.

6-) Em seguida foram adicionados 100µL da combinação Lipofectamina 2000® 1:50 (Invitrogen) siRNA 10µM em cada poço das diluições nas placas-teste para cada um dos siRNAs até a coluna 10 .

7-) Nas colunas 11 e 12 das placas-teste, foram adicionados 100µL da solução de Lipofectamine 2000® 1:50 (Invitrogen) /MEM sem SFB na proporção 1:1(v/v), para observação de possível efeito citotóxico pela lipofetamina.

8-) Simultaneamente, nas colunas 1 a 10 da placa-controle (ou seja, aquela que não receberia tratamento com siRNAs), foram adicionados 100µL da combinação Lipofectamine 2000® 1:50 (Invitrogen)/ MEM sem SFB na proporção 1:1 (v/v).

9-) Nas colunas 11 e 12 da placa controle, foram acrescentados 100µL de MEM sem SFB (controle de células).

10-) As placas foram Incubadas a 37°C/ 5% CO₂/22 horas, completando, assim, 24 horas pós-inoculação e, portanto, pelo menos 2 ciclos de replicação do vírus da raiva (SHANKAR; KOPROWSKI, 1991).

Figura 8 – Esquema de utilização de placas de cultivo celular com células BHK-21 inoculadas com diluições de 10^{-3} a 10^{-7} da cepa PV do vírus da raiva e tratadas com o siRNA/Lipofectamina 2000 (Invitrogen®) (placa teste) ou MEM/Lipofectamine 2000 (Invitrogen®) (placa controle)

3.3.4 Reação de imunofluorescência direta (IFD)

A reação de imunofluorescência direta nas placas-teste e na placa-controle foi realizada segundo descrito no item 3.1.2.

Além do resultado positivo, para cada poço, foi contado o total de focos fluorescentes.

Os títulos foram calculados a partir dos dados com o método de Spearman-Kärber (MESLIN; KAPLAN; KOPROWSKI, 1996).

3.3.5 Eleição do siRNA de maior eficiência

A eficiência de cada siRNA foi avaliada pela queda no título da amostra de PV em comparação com a placa-controle.

3.4 ENSAIO DE INIBIÇÃO POR RNA *IN VIVO*

Para o ensaio *in vivo* foram utilizados camundongos albinos suíços de 21 dias de idade, com peso entre 11 e 14g. Os camundongos foram divididos em grupos teste e controle.

Para cada grupo, foram empregados 50 camundongos, sendo 10 camundongos para cada diluição do vírus PV a ser testada. Os animais foram mantidos sob as seguintes condições: temperatura ambiente 21 a 25°C, luminosidade 12h(dia) x 12h(escuro), ração e água *ad libitum*. Os protocolos utilizados no ensaio são descritos a seguir.

3.4.1 Preparo da combinação de siRNA e Lipofectamina 2000® (Invitrogen)

- 1-) A “solução-mãe” de siRNA foi preparada de acordo com o protocolo descrito no item 2.3.2.
- 2-) Em seguida foi preparada a “solução de trabalho” de cada um dos siRNAs de 60µM . Para isso, foram combinados 300µl de siRNA da “solução-mãe” e 200µl de MEM.
- 3-) A seguir, preparou-se um “pool” com os três siRNAs, combinando-se 500µl de cada siRNA (B,124 e 750) de 60µM, obtendo-se 1500µl de “pool” de siRNAs com a concentração de 20µM de cada siRNA.
- 4-) Os 1500µl de “pool” de siRNAs foram adicionados a 1500µl de Lipofectamine 2000® 1:50 (Invitrogen) (obtendo-se uma concentração final de 10 µM de cada siRNA) e deixando-se incubar por 20 minutos em temperatura ambiente antes de inocular em camundongos.

3.4.2 Infecção com PV e tratamento de camundongos com siRNAs

- 1-) O vírus PV foi diluído em MEM sem SFB nas diluições 10^{-3} a 10^{-7} em volume final de 1800 μ L/ diluição, além do volume efetivamente necessário como margem de segurança.
- 2-) Foram Inoculados, pela via intracerebral, de acordo com a técnica descrita por Koprowsky (KOPROWSKI, 1996), 30 μ L/camundongo de cada diluição de PV em camundongos do grupo teste, sendo 10 camundongos/ diluição.
- 3-) Identicamente, foram inoculados, pela via intracerebral, 30 μ L de cada diluição de PV em camundongos do grupo controle, sendo 10 camundongos/ diluição.
- 4-) Duas horas após a inoculação, foram injetados, pela via intracerebral, em todos os camundongos teste, 30 μ L da combinação “pool” dos siRNAs /Lipofectamina 2000[®] (Invitrogen) (item 3.4.1) para uma concentração final do siRNA de 10 μ M.
- 5-) Simultaneamente, nos camundongos controle, foram injetados, pela via intracerebral, 30 μ L da combinação de MEM sem SFB/ Lipofectamina 2000[®] (Invitrogen) (proporção 1:1 v/v).
- 6-) Os grupos teste e controle foram observados diariamente durante 30 dias quanto ao aparecimento dos seguintes sinais de raiva: pêlos eriçados, tremores, descoordenação motora, paralisia, hiperestesia e morte a partir do quinto dia após a inoculação. Após o período de 30 dias, os camundongos sobreviventes foram sacrificados de acordo com o protocolo de bioética.
- 7-) Para os animais mortos durante o período de observação ou sacrificados após o mesmo, foi colhido o conjunto encéfalo/cerebelo porção craniana da medula (sistema nervoso central, SNC), realizando-se a impressão a fresco em lâminas e conservando-se o material restante a -80°C.

3.4.3 Imunofluorescência direta

As amostras de sistema nervoso central foram submetidas à imunofluorescência direta para detecção de antígenos do vírus da raiva a partir de

impressões dos mesmos em lâminas de vidro segundo o protocolo descrito por DEAN; ABELSETH; ATANASIU, 1996.) com conjugado antirábico policlonal anti-nucleocapsídeo/ isotiocianato de fluoresceína (Instituto Pasteur). Para a leitura das lâminas, foi utilizado o microscópio de fluorescência da marca “Leica DMLB” no aumento 40x.

3.4.4 Cálculo de títulos

Foram considerados positivos para a raiva os camundongos que apresentaram os sinais descritos anteriormente e em cuja amostra de SNC foi observado ao menos um foco fluorescente.

A seguir, os títulos foram calculados a partir do número de camundongos positivos e negativos com o método de Spearman-Kärber (MESLIN; KAPLAN; KOPROWSKI, 1996).

3.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO TÓXICO DE LIPOFETAMINA 2000 (INVITROGEN®) NOS CAMUNDONGOS

Para analisar a existência do efeito tóxico de Lipofectamina 2000® nos camundongos, foram formados dois grupos: teste e controle, com cinco animais em cada grupo.

Nos camundongos do grupo teste, foram inoculados via intracerebral 30µl de combinação de Lipofectamina 2000® 1:50 (Invitrogen) /MEM sem SFB, enquanto que no grupo controle, inoculou-se apenas MEM sem o SFB usando a mesma via de inoculação em volume de 30µl.

Os animais dos dois grupos foram observados durante 20 dias e depois deste período os sobreviventes foram sacrificados de acordo com o protocolo de bioética. O SNC foi recolhido e armazenado a -20°C.

RESULTADOS

A seguir, são apresentados os resultados obtidos neste estudo.

4.1 TITULAÇÃO DO VÍRUS PV EM CÉLULAS BHK-21

O resultado de titulação do vírus PV nas células BHK-21 foi 6,0logTCID_{50%}/ml. De acordo com o resultado desta titulação, foi decidido nos experimentos com siRNAs *in vitro* utilizar as diluições 10⁻³ a 10⁻⁷, para se obterem de 0.1 a 1000 TCID_{50%} em uma faixa de concentração viral que permitisse uma mais acurada visualização da gradação de fluorescência de acordo com a concentração viral.

4.2 TITULAÇÃO DA AMOSTRA PV EM CAMUNDONGOS

O título viral obtido a partir este experimento foi 7,0logDL_{50%}/30µl. Então, foram escolhidas as diluições 10⁻³ a 10⁻⁷ para o ensaio *in vivo* com o intuito de também se obter uma gradação dos efeitos da inoculação viral em camundongos, variando de 1 a 10.000DL_{50%} por animal a ser inoculado.

4.3 ENSAIO DE INIBIÇÃO POR siRNAS *IN VITRO*

Os resultados do ensaio *in vitro* estão descritos a seguir.

4.3.1 Descrição dos resultados da imunofluorescência em placas de células BHK-21 inoculadas com a amostra PV e tratadas com siRNAs

Na placa referente ao teste com siRNA B (Quadro 2), pôde-se observar que nas colunas das diluições 10^{-6} e 10^{-7} da primeira repetição não houve poços positivos, enquanto que na coluna da diluição 10^{-5} , houve três poços positivos. Para a segunda repetição, na coluna da diluição 10^{-5} podem-se notar também três poços positivos, mas na coluna 10^{-6} há dois poços positivos com um foco fluorescente.

Linhas	Diluições									
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
A	P 16 f.	P 14 f.	N	N	N	P 31 f.	P 15 f.	N	N	N
B	P 35 f.	P 18 f.	P 3 f.	N	N	P 29 f.	P 9 f.	P 1 f.	N	N
C	P 20 f.	P 11 f.	N	N	N	P 18 f.	P 11 f.	P 2 f.	N	N
D	P 20 f.	P 12 f.	P 3 f.	N	N	P 16 f.	P 10 f.	P 2 f.	N	N
E	P 24 f.	P 10 f.	P 3 f.	N	N	P 26 f.	P 6 f.	N	P 1 f.	N
F	P 20 f.	P 5 f.	N	N	N	P 18 f.	P 3 f.	N	P 1 f.	N
G	P 30 f.	P 8 f.	N	N	N	P 33 f.	P 12 f.	N	N	N

Quadro 2 - Resultados de IFD em células BHK-21 inoculadas com o vírus PV após tratamento com o siRNA B. P= positivo, N = negativo e f= número de focos fluorescentes

Para o experimento com o siRNA 750 (Quadro 3), em duas repetições nas colunas referentes às diluições do vírus PV a 10^{-6} e 10^{-7} não houve poços positivos. Na coluna 10^{-5} da primeira repetição houve três poços positivos, mas na mesma coluna da segunda repetição houve seis poços positivos.

Linhas	Diluições									
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
A	P 22 f.	P 14 f.	P 1 f.	N	N	P 23 f.	P 11 f.	P 1 f.	N	N
B	P 33 f.	P 14 f.	N	N	N	P 22 f.	P 23 f.	P 2 f.	N	N
C	P 28 f.	P 15 f.	N	N	N	P 19 f.	P 16 f.	P 1 f.	N	N
D	P 14 f.	P 12 f.	P 4 f.	N	N	P 26 f.	P 10 f.	P 2 f.	N	N
E	P 3 f.	P 12 f.	P 1 f.	N	N	P 18 f.	P 11 f.	N	N	N
F	P 13 f.	P 12 f.	N	N	N	P 25 f.	P 7 f.	P 1 f.	N	N
G	P 21 f.	P 4 f.	N	N	N	P 12 f.	P 16 f.	P 2 f.	N	N

Quadro 3 - Resultados de IFD em células BHK-21 inoculadas com o vírus PV após tratamento com o siRNA 750. P= positivo, N = negativo e f= número de focos fluorescentes

Por sua vez, para o siRNA 124, observou-se (Quadro 4) que nas duas repetições da diluição do vírus PV a 10^{-7} não houve poços positivos. Para a diluição 10^{-6} da primeira repetição houve um poço positivo, quando na segunda repetição não houve nenhum poço positivo. Na diluição 10^{-5} da primeira repetição quatro poços positivos, em comparação da segunda repetição onde houve cinco poços positivos.

Linhas	Diluições									
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
A	^P 8 f.	^P 16 f.	^P 2 f.	N	N	^P 30 f.	^P 4 f.	N	N	N
B	^P 13 f.	^P 10 f.	N	^P 8f.	N	^P 21 f.	^P 8 f.	^P 1 f.	N	N
C	^P 22 f.	^P 15 f.	^P 1 f.	N	N	^P 14 f.	^P 12 f.	N	N	N
D	^P 15 f.	^P 6 f.	^P 3 f.	N	N	^P 12 f.	^P 12 f.	^P 3 f.	N	N
E	^P 26 f.	^P 7 f.	N	N	N	^P 25 f.	^P 12 f.	^P 1 f.	N	N
F	^P 10 f.	^P 6 f.	^P 1 f.	N	N	^P 12 f.	^P 14 f.	^P 2 f.	N	N
G	^P 21 f.	^P 4 f.	N	N	N	^P 10 f.	^P 5 f.	^P 1 f.	N	N

Quadro 4 - Resultados de IFD em células BHK-21 inoculadas com o vírus PV após tratamento com o siRNA124. P= positivo, N = negativo e f= número de focos fluorescentes

Em relação ao número de focos fluorescentes nos poços positivos por IFD, houve tendência decrescente nas duas repetições para todos os três siRNAs testados em relação à série de diluições testadas (Quadros 2, 3 e 4).

Finalmente, em relação à placa controle, na qual se inocularam diluições de vírus PV sem a realização de tratamento com siRNAs (Quadro 5), na primeira repetição houve poços positivos nas diluições 10^{-3} a 10^{-7} e 10^{-3} a 10^{-6} na segunda. Nas diluições 10^{-3} e 10^{-4} nas duas repetições os focos fluorescentes não puderam ser contados e foram considerados como incontáveis.

Linhas	Diluições									
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
A	P inc.	P in.	P 1f.	N	P 1f.	P in.	P in.	P 3 f.	N	N
B	P in.	P in.	P 1f.	P 1f.	N	P in.	P in.	P 2 f.	N	N
C	P in.	P in.	N	P 1f.	N	P in.	P in.	P 8 f.	N	N
D	P in.	P in.	P 2 f.	P 1f.	N	P in.	P in.	P 2 f.	N	N
E	P in.	P in.	P 2 f.	N	N	P in.	P in.	P 3 f.	N	N
F	P in.	P in.	P 3 f.	P 1f.	N	P in.	P in.	P 2 f.	N	N
G	P in.	P in.	P 4 f.	P 1f.	N	P in.	P in.	P 3 f.	P 3 f.	N

Quadro 5 - Resultados de IFD em células BHK-21 inoculadas com o vírus PV sem tratamento com siRNAs (placa controle). P= positivo, N = negativo, f= número de focos fluorescentes e in.= incontáveis

Para as colunas 11 e 12 das duas repetições de tratamentos com siRNAs e da placa controle, nas quais se inoculou Lipofectamina 2000[®] diluída em MEM, sem siRNAs ou vírus, não houve a detecção de qualquer foco fluorescente.

4.3.2 Comparação de títulos virais nas placas de células BHK-21 inoculadas com a amostra PV e tratadas com siRNAs

A maior queda de título viral em comparação com a placa controle foi referente à placa de células BHK-21 que receberam tratamento com siRNA B após a inoculação com o vírus PV (Quadro 6). As placas referentes aos tratamentos com os siRNAs 124 e 750 mostraram quedas de títulos próximas entre si e daquela obtida para o siRNAB quando comparados com a placa controle (Quadro 5).

Assim sendo, em função da similaridade na capacidade inibitória de replicação da amostra PV de RABV, para o experimento *in vivo* foi decidido usar

“pool” dos três siRNAs para favorecer a RNAi mediada em diferentes regiões do RNAm da nucleoproteína e reduzir o número de animais no experimento.

siRNA	Título (logTCID ₅₀ /ml)	Diferença com o controle em log ₁₀
124	5,71	0,72
B	5,56	0,87
750	5,65	0,78
Controle	6,43	

Quadro 6 - Resultados do cálculo do título viral das placas de ensaio e placa controle

4.4 ENSAIO DE INIBIÇÃO POR siRNAs *IN VIVO*

4.4.1 Sobrevivência de camundongos tratados com siRNAs frente a doses decrescentes do vírus PV

No grupo de animais inoculados com 100DL_{50%} e tratados com o “pool” de siRNAs, houve sobrevivência de 30%, enquanto que no grupo controle houve 100% de mortalidade para esta dose (Quadro 7).

Para o caso do grupo inoculado com 10DL_{50%}, no grupo controle houve 90% de sobreviventes, enquanto que o grupo inoculado com o mesmo número de doses e tratado com o pool de siRNAs apresentou sobrevivência de 70%.

Para os grupos inoculados com 1DL_{50%}, tanto nos animais controle quanto naqueles que receberam o pool de siRNAs, a sobrevivência foi de 100%.

Finalmente, para os grupos inoculados com 1000 e 10.000 DL_{50%}, houve mortalidade de 100%, tanto nos grupos controle quanto naqueles que receberam siRNAs.

Grupo	Dose inoculada	% sobreviventes
siRNAs	10,000DL _{50%}	0
	1000DL _{50%}	0
	100DL _{50%}	30
	10DL _{50%}	70
	1DL _{50%}	100
Controle	10,000DL _{50%}	0
	1000DL _{50%}	0
	100DL _{50%}	0
	10DL _{50%}	90
	1DL _{50%}	100

Quadro 7 - Sobrevivência (em porcentagem) de camundongos inoculados com 1 a 10.000 DL_{50%} do vírus PV tratados com um “pool” de siRNAs e sem tratamento (grupo controle)

4.4.2 Imunofluorescência direta das amostras de SNC dos camundongos inoculados com o vírus PV tratados com siRNAs e sem tratamento

As amostras de SNC de todos os camundongos mortos após a manifestação dos sintomas de raiva ou sacrificados após apresentarem estes sintomas foram positivas para a presença de RABV por imunofluorescência direta.

Por sua vez, as amostras de SNC dos camundongos que sobreviveram sem sintomas e depois de 30 dias foram sacrificados foram negativas para a imunofluorescência direta para RABV.

4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO TÓXICO DE LIPOFECTAMINA 2000®(INVITROGEN) NOS CAMINDONGOS

No grupo de cinco camundongos inoculados pela via intra-cerebral com Lipofectamina 2000® (Invitrogen) diluída em MEM para a avaliação do efeito tóxico do reagente de transfecção, todos os animais sobreviveram durante o período de observação de 30 dias, sem manifestação de quaisquer sinais de alteração de saúde ou bem-estar, tendo o mesmo resultado sido obtido para o grupo de cinco camundongos inoculados apenas com MEM (grupo controle).

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, a tecnologia de RNAi mediada por siRNAs contra o RNA mensageiro da nucleoproteína do vírus da raiva foi utilizada em cultivo celular e em camundongos após a inoculação com o vírus PV com o objetivo de inibir a replicação viral.

No teste de inibição in vitro, nota-se que todos os três siRNAs utilizados levaram ao decréscimo do número de focos fluorescentes nas monocamadas de células BHK-21 de modo similar nas doses de 1000 e 100 TCID₅₀% (Quadros 2 a 5) quando se comparam os resultados obtidos na placa controle, na qual, para estas doses infectantes, o número de focos fluorescentes foi classificado como incontável.

Inicialmente, estes resultados sugerem que os siRNAs e o sistema de transfecção são capazes de inibir a síntese de nucleoproteína no citoplasma das células infectadas que integrariam virions nascentes ou mesmo o corpúsculo de Negri.

Entretanto, para as diluições 10^{-6} e 10^{-5} , que correspondem a 1 e 10 TCID₅₀%, respectivamente, tanto nas placas nas quais se fez o tratamento com siRNAs quanto na placa controle, houve focos fluorescentes, ainda que em baixos números, sem diferença entre as mesmas.

Uma possível explicação para este último resultado pode ser o tipo de conjugado utilizado na imunofluorescência direta, neste caso, um conjugado contra o nucleocapsídeo do RABV.

Uma vez que o nucleocapsídeo é constituído também pelas proteínas L e P e não apenas pela N (WUNNER, 2007), é possível que a fluorescência detectada tenha sido devida à ligação de anticorpos contra as duas primeiras, que não tiveram sua síntese inibida pelos siRNAs utilizados; ou seja, a fluorescência detectada em baixas doses nas placas tratadas pode ser devida a presença de P e L no citoplasma.

Deve-se considerar, ainda, que o baixo número de focos fluorescentes detectados possa ser devido ao baixo título viral em função da elevada diluição utilizada, principalmente na placa controle, na qual não se realizou inibição da replicação viral.

Para a realização da IFD no cultivo celular, o conjugado foi utilizado na diluição 1:10, diluição esta determinada após titulação de rotina pelo Laboratório de Virologia do Instituto Pasteur para utilização em diagnóstico em impressões de sistema nervoso central de animais suspeitos de raiva.

Todavia, as instruções do fabricante do conjugado (Bio-Rad) preconizam que o mesmo seja utilizado na diluição 1:21 e, portanto, é possível que a maior concentração de conjugado utilizada no presente estudo possa ter favorecido a ocorrência de reações inespecíficas, como, por exemplo, com proteínas celulares, ou mesmo ruídos, que seriam, então, responsáveis pelos focos fluorescentes resquiciais nas maiores diluições.

Assim, pode-se propor que a utilização de um conjugado de maior título, que permitisse uma maior diluição do mesmo, ou um conjugado produzido com maior qualidade quanto à marcação em relação à proporção imunoglobulinas: isotiocianato de fluoresceína e na fase de purificação entre anticorpos marcados com fluoresceína e a fluoresceína livre poderia permitir uma mais acurada distinção entre os focos fluorescentes detectados nas diluições mais elevadas do vírus PV utilizadas.

É importante que se considere que artefatos de técnica e procedimentos, como técnica de pipetagem e calibração das pipetas utilizadas, possam ter levado a transferências de volume errôneas durante a realização das diluições, o que poderia levar a maior ou mesmo menor quantidade viral nas monocamadas.

No presente estudo, a técnica de IFD foi utilizada para medir a capacidade inibitória da síntese da proteína N com o intuito de detectar a presença do produto final do gene em questão, ou seja, a própria proteína de nucleocapsídeo, além de ser uma técnica já padronizada e de execução simples, permitindo rápida resposta.

Para uma mais acurada medida da inibição do ciclo viral em função do silenciamento gênico pós-transcricional, eliminando-se, sobretudo, a subjetividade da leitura, pode-se sugerir a substituição da imunofluorescência por uma PCR quantitativa por meio de PCR em tempo real dirigida ao RNAm da proteína em estudo, neste caso a nucleoproteína viral, utilizando-se, por exemplo, oligodTs para a síntese de DNA complementar e primers específicos para as etapas de amplificação.

A técnica de PCR em tempo real é de fato a mais largamente utilizada para a avaliação da eficiência de inibição, tanto pela maior acurácia quanto pela possibilidade da medida termos absolutos quanto relativos (WAKELEY et al., 2005).

Entretanto, considerando que no controle de Lipofectamina, para o qual este reagente foi adicionado às monocamadas de BHK-21 sem a adição de vírus da raiva, não houve qualquer detecção de focos fluorescentes, pode-se desconsiderar a probabilidade da ocorrência de reações inespecíficas ou mesmo ruído atribuídos ao conjugado, favorecendo a hipótese da parada do ciclo de replicação do RABV em função da diminuição do número de partículas virais após a inibição pelos siRNAs utilizados, que seria, então, insuficiente para uma infecção prolongada, mas suficiente para gerar algum sinal residual de IFD, incluindo a participação de possíveis partículas virais defectivas-interferentes (WUNNER, 2007).

Observando-se os títulos do vírus PV após tratamentos com os três diferentes siRNAs em células BHK-21, nota-se que houve, em comparação ao controle de células não tratadas, queda de título variando de 0,72 a 0,87log, com a maior queda de título referente ao siRNA B, mas com quedas similares entre os três siRNAs (Quadro 6).

Estes resultados demonstram que os três siRNAs utilizados são similarmente eficientes em inibir a replicação de RABV *in vitro* quando utilizados de modo separado e com eficiência similar àquela relatada para sua utilização sob o formato de *pool* (BRANDÃO et al., 2007).

Quando administrados sob a forma de pools em concentrações equimolares por via intracraniana a camundongos previamente inoculados por esta mesma via com o vírus PV, observou-se um efeito dose-dependente entre os siRNAs, os títulos virais administrados e a sobrevivência dos camundongos.

Para aqueles inoculados com 100DL_{50%}, houve três animais sobreviventes do total de 10 inoculados (Quadro 7), sendo que estes três animais sobreviveram até o 30º dia pós tratamento com inoculação com vírus PV com posterior tratamento com siRNAs quando foram, então, eutanaziados.

Neste caso, estes resultados demonstram que, frente a 100DL_{50%} do vírus PV, o pool de siRNAs dirigidos ao RNAm da proteína N foi capaz de inibir a replicação do RABV em SNC de camundongos, demonstrando sua eficiência *in vivo*.

Por sua vez, observando-se os resultados dos mesmos tratamentos para os camundongos inoculados com 10 DL_{50%}, tem-se um resultado aparentemente contraditório: entre os animais tratados com o pool de siRNAs, houve sobrevivência de 70%, enquanto que, para o grupo controle, que recebeu apenas Lipofectamina, a sobrevivência foi maior (90%) (Quadro 7).

Inicialmente, poder-se-ia atribuir estes resultados à ausência de diferença significativa entre a sobrevivência de animais nos grupos tratados e controle. Para que um estudo mais aprofundado em termos de significância estatística pudesse ser realizado, como, por exemplo, uma comparação utilizando-se testes de Qui-quadrado, seria recomendável que um número maior de camundongos fosse utilizado em um maior número de replicatas dos ensaios.

No presente estudo, entretanto, o baixo número de camundongos utilizado foi determinado inicialmente por questões de bem-estar animal, com o intuito de se utilizar o menor número possível de camundongos o qual, neste caso, foi adequado ao volume de siRNAs disponível.

Ensaio com siRNAs são, neste momento, de elevado custo, tanto para a síntese dos siRNAs propriamente ditos quanto para a aquisição dos reagentes de transfecção e estes custos podem acabar limitando, também, o número de animais em experimentação.

Além disso, deve-se considerar a possibilidade de erros de inoculação viral ou de siRNAs quando da injeção destes via intracraniana com o uso de seringas, em função da habilidade do manipulador em relação à injeção e à manipulação dos animais, que poderiam ter levado a baixa exatidão quanto às doses de fato inoculadas.

Entretanto, há uma terceira hipótese ligada à relação da concentração de RNA de RABV e a patogenicidade deste que pode ter contribuído para a maior mortalidade nos animais tratados com siRNAs no caso do grupo de 10 DL₅₀%.

É sabido que, no caso do vírus da raiva, há uma correlação inversa entre a síntese de RNA viral por transcrição e replicação e a patogenicidade viral (DIETZSCHOLD et al., 2008); ou seja, quanto maior a concentração de RNA total de RABV, incluindo RNAm, menor a patogenicidade viral.

Considerando-se este fato, pode-se especular que, no caso dos animais que receberam 10 DL₅₀% do vírus PV, a dose de siRNAs utilizada tenha de fato diminuído a contração de RNA total de RABV pela diminuição do RNAm para a nucleoproteína mas até uma concentração tal que tenha elevado a patogenicidade do vírus PV, elevando a mortalidade, ao contrário do que seria esperado após o tratamento.

Por sua vez, para os camundongos inoculados com 100DL₅₀%, pode-se propor que, nesta mais elevada concentração viral, os siRNAs podem, de fato, ter

levado a uma queda da concentração total de RNAm, mas sem alterar a relação patogenicidade/concentração de RNA de modo que a patogenicidade fosse elevada.

Para se comprovar esta hipótese, seria necessário que a concentração de RNAm em cada um dos grupos fosse medida por meio de PCR em tempo real para de fato poder-se relacionar, neste caso, a diminuição da concentração de RNA viral ao aumento da mortalidade e ao título viral inoculado em cada um dos grupos experimentais.

A realização da IFD nos SNCs de todos os animais experimentais demonstrou 100% de concordância entre a presença de sintomas de raiva e a presença de focos fluorescentes, demonstrando que os sintomas eram de fato devidos à infecção pelo RABV, enquanto que nenhum dos animais sem sintomas, incluindo os três sobreviventes após inoculação de 10DL_{50%} do vírus PV tratados com siRNAs (Quadro 7), apresentou positividade por esta prova.

Com relação aos testes de avaliação da citotoxicidade da Lipofectamina 2000[®] como reagente de transfecção, não houve, nas células BHK-21 às quais se adicionou este reagente sem a adição de RABV, qualquer alteração microscópica pelo período experimental de 22 horas.

Do mesmo modo, o teste de toxicidade de Lipofectamina realizado em camundongos inoculados com este reagente pela via intracerebral não causou mortalidade ou quaisquer sinais nestes animais.

Com isso, fica claro que a Lipofectamina, na concentração utilizada neste trabalho, não é tóxica e pode ser utilizada pela via intracerebral como reagente de transfecção de siRNAs.

Entretanto, a avaliação da toxicidade de Lipofectamina 2000 foi realizada apenas baseada em morfologia celular e observação de animais experimentais, o que poderia acabar ocultando alterações não detectáveis por estes métodos, como, por exemplo, aquelas inerentes à apoptose.

Para tanto, é interessante que estudos futuros incluam a avaliação da toxicidade baseada também em medidas de viabilidade celular, tais como uso de um corante que seletivo para células mortas e avaliação da integridade da membrana celular (LEO et al., 2008).

Além disso, a utilização de PCR quantitativa para mensuração de RNAm de proteínas constituintes das células, como, por exemplo, a beta-actina, poderia não só auxiliar na avaliação de efeitos deletérios do sistema de transfecção mas,

também, no entendimento da interferência dos siRNAs utilizados sobre os RNAs celulares ainda que, teoricamente, os três siRNAs utilizados não apresentassem complementaridade significativa com RNAs que não aquele da nucleoproteína de RABV após realização de análise por BLAST/n (BRANDÃO et al., 2007)

Outro aspecto importante a ser discutido é o sistema de entrega de siRNAs propriamente dito, o qual pode acabar modulando a intensidade da inibição obtida.

Uma vez introduzido no organismo, o siRNA pode sofrer degradação enzimática e não enzimática, causar a resposta de interferon (IFN) (AIGNER, 2006) e sofrer acumulação não específica em diversos órgãos não-alvo (HOWARD, 2009), evidenciando a necessidade da adequação do sistema de entrega a cada aplicação específica.

Neste trabalho, foi utilizado um agente de transfecção de classe dos lipídeos catiônicos. Os lipídeos catiônicos e as nanopartículas baseadas em polímeros foram desenvolvidos para melhorar o potencial terapêutico de RNAi, providenciando proteção da degradação quando inoculados na corrente sanguínea e facilitando a entrega alvo-específica, absorção pela célula e transporte entre as células (HOWARD, 2009).

Os lipídeos catiônicos formam pequenos lipossomos quando preparados em água. A superfície destes lipossomos encontra-se carregada positivamente, os quais por isso ligam-se eletrostaticamente aos grupos de fosfato de RNA ou DNA, formando complexos. Estes complexos apresentam elevada afinidade pelas cargas negativas expostas nas superfícies das membranas celulares o que transporta o siRNA dentro da célula (BOLLATI FOGOLIN; COMINI, 2008).

Um estudo comparativo entre os agentes catiônicos Lipofectamina 2000® e iFect (Neuromics) para transfecção das células de neuroblastoma murino (N2A) com siRNAs desenhados contra o gene do envelope do Vírus de Encefalite Japonesa (JEV), demonstrou que ambos lipídeos tiveram o mesmo efeito de transfecção (KUMAR et al., 2006).

A eficiência dos lipídios catiônicos como agentes de transfecção para o SNC foi também demonstrada com o uso de HiPerfect (QUAGEN) para a entrega dos siRNAs desenhados para o RNAm do Vírus de Encefalite Letal de Chandipura *in vivo* pela via intracraniana, levando a sobrevivência de 70% dos camundongos inoculados (KUMAR; ARANKALLE, 2010).

Contudo, deve-se considerar que, dependendo da concentração do lipídeo, este pode gerar efeito tóxico nas células ou organismo como um todo.

Por exemplo, um estudo de toxicidade realizado com Lipofectamina 2000 e PEI-PBLG em células CT26 demonstrou maior efeito tóxico para o primeiro, evidenciado pela coloração das células com 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), sendo que as células transfectadas com Lipofectamina 2000 tiveram 77% de viabilidade celular, enquanto que naquelas nas quais se utilizou PEI-PBLG houve 83% de viabilidade (JIE CHEN et al., 2009).

Entretanto, neste último exemplo, deve-se considerar que a massa total de siRNAs utilizada foi de 200ng (JIE CHEN et al., 2009), o que pode ter levado ao uso de concentração maior de Lipofectamina 2000, uma vez que concentração utilizada de Lipofectamina 2000 é proporcional à concentração utilizada de siRNA segundo as instruções do fabricante.

Uma idéia extremamente interessante para aprimorar a entrega de siRNAs no SNC foi a conjugação dos siRNAs com peptídeo quimérico de origem de glicoproteína do vírus da raiva (RVG-9R) para a inibição do vírus da encefalite japonesa, ou seja, a glicoproteína de RABV, sendo neurotrópica, dirigiu a entrega do siRNA diretamente *in vivo* em camundongos e em cultivo de células neuronais N2A; este sistema mostrou eficiência semelhante ao uso de Lipofectamina 2000 para transfecção *in vitro* (KUMAR et al., 2007).

No presente estudo, o uso de siRNAs dirigidos ao RNAm da nucleoproteína transfectados com Lipofectamina 2000® como agente de transfecção em células BHK-21 com siRNAs foi efetivo para silenciamento de síntese de nucleoproteína do vírus da raiva, mas com menor eficiência *in vivo* em camundongos do que *in vitro* em células BHK-21.

Uma das razões para a menor eficiência *in vivo* pode ter sido o tempo de meio-vida dos siRNAs *in vivo*, os quais poderiam ter sido mais rapidamente degradados por RNases presentes nas diversas células do SNC.

Deve-se considerar, ainda, que o tempo de incubação pós-transfecção em células foi menor (22 horas), quando comparado àquele dos camundongos, o qual foi de, no mínimo, quatro horas pós-transfecção, dependendo do início da manifestação dos sinais de raiva.

Uma das soluções para se prolongar o tempo de ação dos siRNAs é o uso de plasmídeos ou vetores virais de expressão como a sistema de entrega, levando à

produção intracitoplasmática de siRNAs de modo endógeno, o que poderia prolongar o tempo de ação dos siRNAs e elevar o nível de silenciamento gênico (AIGNER, 2006).

Além disso, deve-se considerar a influência da concentração de siRNAs utilizados na presente investigação, que foi de 10 μ M na solução de uso, e, portanto, para os volumes inoculados em células e em camundongos, o total inoculado foi de 1nmol e 0,3nmols, respectivamente, as quais levaram a uma queda de título viral de 0,87log nas células BHK-21 tratadas com siRNAB em comparação com controle, enquanto que, *in vivo*, esta concentração levou à sobrevivência de 30% dos camundongos inoculados com 100LD_{50%} de PV e tratados com um pool dos três siRNAs.

Comparativamente, um estudo no qual se inocularam 4LD_{50%} de Vírus de Encefalite Japonesa por via intracraniana seguida de transfecção com siRNAs (0,5nmol) com o lipídeo catiônico iFect como agente de transfecção 6 horas após a infecção viral levou a uma queda no título viral de 2log no grupo experimental em comparação com controle (KUMAR et al., 2006).

No mesmo trabalho (KUMAR et al., 2006) foi testada a concentração de siRNA a 3,2nmol com agente de transfecção catiônico Jetsi contra o Vírus da Encefalite do Nilo Ocidental, sendo o siRNA transfectado 6 horas após a infecção, levando a 100% de sobrevivência dos animais tratados em comparação com o controle.

Do mesmo modo, a administração por via endovenosa de 100pmol de siRNA contra RNAm do JEV conjugado ao peptídeo RVG-9R de glicoproteína de RABV resultou na sobrevivência de 80% dos camundongos tratados após inoculação de 5DL_{50%} do vírus (KUMAR et al., 2007).

Ainda, siRNA na quantidade de 200nmol, 200 vezes superior àquela utilizada em células BHK21 no presente trabalho, foi empregada para inibição de replicação de Monkeypox virus e foi atingida uma eficiência de inibição próxima de 100% (ALKHALIL et al., 2009).

Estes exemplos sugerem, na presente pesquisa, que tanto as doses virais utilizadas podem ter sido muito elevadas quanto a concentração total de siRNAs administrada pode ter sido muito baixa.

Assim, sugere-se que, para estudos futuros, a dose de siRNAs seja elevada para aprimorar a eficiência de inibição tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

Outro aspecto que pode interferir na eficiência de silenciamento é uso de siRNAs individualmente ou em um “pool”.

Em um relato do uso de siRNAs para inibição de Monkeypox vírus, não foi encontrada diferença na capacidade inibitória entre o uso de siRNAs de forma isolada e em combinação como pool nas quantidades de 100 e 200nMols (ALKHALIL et al., 2009).

Paralelamente, relata-se que a administração de siRNAs eficientes de modo individualmente podem não ter a mesma eficiência se forem utilizados sob a forma de pool, possivelmente devido à competição entre os siRNAs pelos RISCs disponíveis no citoplasma (KUMAR; ARANKALLE, 2010).

Assim, ainda que *in vitro* no presente estudo não tenha havido grande diferença na capacidade inibitória dos três siRNAs utilizados individualmente ou quando seu uso individual foi comparado ao resultado sob a forma de pools (BRANDÃO et al., 2009), é possível que nos testes *in vivo* a eficiência da inibição tenha sido diminuída em função desta mencionada competição pelos RISCs uma vez que, neste caso, utilizou-se pool dos siRNAs.

Até o momento, há poucos estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo* para antivirais para a raiva para que se possa realizar uma comparação entre os resultados aqui apresentados e outros antivirais para a raiva.

Por exemplo, o uso de quetamina já foi relatado como levando a uma queda de quase 100% nos títulos virais em cultivo células medidos em unidades formadoras de placas (LOCKHART; TORDO; TSIANG, 1992), o que representaria uma maior eficiência de inibição quando comparados os resultados aqui apresentados.

Entretanto, a mesma quetamina já foi demonstrada como não eficiente como antiviral em camundongos e mesmo em alguns dos pacientes humanos já tratados com este medicamento em casos de raiva (WELI et al., 2006).

Além disso, um trabalho publicado sobre RNAi contra a raiva utilizando plasmídeos com sequências de pré-microRNAs transfectado com lipofetamina dirigidos também ao RNAm da nucleoproteína em cultivo de células N2A demonstrou também eficiência deste sistema e deste alvo para o decréscimo do nível de RNA genômico viral em relação à amostra CVS de RABV (ISRASENA et al., 2009).

A raiva é ainda uma zoonose que se evadiu dos esforços seculares para seu controle ou para sua erradicação e segue causando mortes humanas em um crescente problema de saúde pública mundial.

Os resultados aqui apresentados sobre o uso de RNAi como terapia antiviral somam-se aos ainda poucos estudos sobre os antivirais para a raiva e, apesar dos dois casos de raiva humana no mundo que evoluíram para a cura, ainda é evidente a necessidade de pesquisa e desenvolvimento em níveis básicos e aplicados neste tema.

CONCLUSÕES

- Os três siRNAs testados na concentração de 10 μ M são equivalentemente eficientes para silenciamento gênico pós-transcricional do gene codificador da nucleoproteína do vírus da raiva *in vitro*.
- A utilização de interferência por RNA baseada em pool de siRNAs é capaz de diminuir a mortalidade em camundongos inoculados com 100DL50% da amostra PV do vírus da raiva.
- Na concentração utilizada, a Lipofectamina 2000[®] (Invitrogen) não causa efeito tóxico em camundongos inoculados pela via intracerebral.

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades comunes transmisibles al hombre y a los animales**. Washington: Pan American Health Organisation, 2003. 580 p. (Série Publicación Científica y Técnica).

AIGNER, A. Delivery Systems for the Direct Application of siRNAs to Induce RNA Interference (RNAi) In Vivo. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 4, p. 1-15, 2006.

AKHTAR, S.; BENTER, I. Toxicogenomics of non-viral drug delivery systems for RNAi: potential impact on siRNA-mediated gene silencing activity and specificity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 2-3, p. 164-182, 2007.

ALKHALIL, A.; STRAND, S.; MUCKER, E.; HUGGINS, J. W.; AHRLING, P.B.; IBRAHIM, S. M. Inhibition of Monkeypox virus replication by RNA interference. **Journal of virology**, v. 6, n. 188, p. 1-14, 2009.

BANERGEE, A. K.; BARIK, S. Gene expression of vesicular stomatitis virus genome RNA. **Journal of virology**, v. 188, p. 417-428, 1992.

BERNARDI, F.; NADIN-DAVIS, S. A.; WANDELER, A. I.; ARMSTRONG, J.; GOMES, A. A.; LIMA, F. S.; NOGUEIRA, F. R.; ITO, F. H. Antigenic and genetic characterization of rabies viruses isolated from domestic and wild animals of Brazil identifies the hoary fox as a rabies reservoir. **Journal of General Virology**, v. 86, n. 11, p. 3153-3162, 2005.

BLANTON, J. D.; MEADOWS, A.; MURPHY, S. M.; MANANGAN, J.; HANLON, C. A.; FABER, M. L.; DIETZSCHOLD, B.; RUPPRECHT, C. E. Vaccination of small Asian mongoose (*Herpestes javanicus*) against rabies. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 42, n. 3, p. 663-666, 2006.

BOLLATI FOGOLIN, M.; COMINI, M. A. Clonagem e Expressão das Proteínas Heterólogas em Células Animais. In: MORAES, A.; AUGUSTO PIRES, E.; CASTOLHO, L. **Tecnologia do cultivo de células animais de biofármacos e terapia gênica**. São Paulo: Roca, 2008, 503 p.

BOURHY, H.; KISSI, B.; AUDRY, L.; SMRECZAK, M.; SADKOWSKA-TODYS, M.; KULONEN, K.; TORDO, N.; ZMUDZINSKI, F. J.; HOLMES, C. E. Ecology and evolution of rabies virus in Europe. **Journal of General Virology**, v. 80, n. 10, p. 2545-2557, 1999.

BRANDÃO, P. E.; CASTILHO, J. G.; FAHL, W.; CARNIELI JR, P.; NOVAES OLIVEIRA, R DE ; MACEDO, C. I.; CARRIERI, M. L.; KOTAIT, I. Short-interfering RNAs as antivirals against rabies. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 224-225, 2007.

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

BRASÍLIA. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. Brasília. 2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/saude>>. Acesso em: 20 de Maio de 2010.

BURTON, E. C.; BURNS, D. K.; OPATOWSKY, M. J.; EL-FEKY, W. H.; FISCHBACH, B.; MELTON, L.; SANCHEZ, E.; RANDALL, H.; WATKINS, D. L.; CHANG, J.; KLINTMALM, G. Rabies encephalomyelitis: clinical, neuroradiological, and pathological findings in 4 transplant recipients. **Archives of Neurology**, v. 62, n. 6, p. 873-882, 2005.

BUSSEREAU, F.; CHERMANN, J-C.; DECLERCQ, E.; HANNOUN, C. Search for compounds which have an inhibitorv effect on rhabdovirus multiplication in vitro. **Annales de Virologie** (Institut Pasteur), v. 134E, p. 127-134, 1983.

BUSSEREAU, F.; ERMINE, A. Effects of heteropolyanions and nucleoside analogues on rabies virus: in vitro study of synthesis and viral production. **Annales de virologie** (Institut Pasteur), v. 134E, p. 487-506, 1983.

BUSSEREAU, F.; PICARD, M.; BLANCOU, J.; SUREAU, P. Treatment of rabies in mice and foxes with antiviral compounds. **Acta Virologica**, v. 32, n. 1, p. 33-49, 1988.

CARNIELI JR., P.; FAHL, W. O.; CASTILHO, J. G.; OLIVEIRA, R. N.; MACEDO, C. I.; DURYMANOVA, E.; JORGE, R. S.; MORATO, R. G.; SPÍNDOLA, R. O.; MACHADO, L. M.; UNGAR DE SÁ, J. E.; CARRIERI, M. L.; KOTAIT, I. Characterization of Rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. **The Virus Research**, v. 131, n. 1, p. 33-46, 2008.

CASTANOTTO, D.; ROSSI, J. J. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. **Nature**, v. 457, p. 426-433, 2009.

DEAN, D. J.; ABELSETH, M. K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: KOPROVSKY, H. **The laboratory technicies in rabies**. Geneva, 1996, 476 p.

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

DIETZSCHOLD, B.; WUNNER, W. H.; WIKTOR, T. J.; LOPES, A. D.; LAFON, M.; SMITH, C. L.; KOPROWSKI, H. Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, p. 70-74, 1983.

DIETZSCHOLD, B.; Li, J.; FABER, M.; SCHNELL, M. Concepts in the pathogenesis of rabies. **Future Virology**, v. 3, n. 5, p. 481-490, 2008.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. **Virus taxonomy**. Sand Diego: Academic Press, 2007. 34 p.

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

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.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 744-745, 1998.

FISCHER, L. T.; JAMES, Q. YIN. RNAi, a new therapeutic strategy against viral infection. **Cell Research**, v. 14, n. 6, p. 460-466, 2004.

CASTANOTTO, D.; ROSSI, J. J. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. **Nature**, v. 457, p. 426-433, 2009.

CHÁVEZ, J. H.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J.; BARARDI, C. R.; PINTO, A. R.; SIMÕES, C. M.; ZANETTI, C. R. Evaluation of antiviral activity of phenolic compounds and derivatives against rabies virus. **Veterinary Microbiology**, v. 116, n.1-3, p. 53-59, 2006.

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

GAUDIN, Y. Folding of rabies virus glycoprotein: Epitope acquisition and interaction with endoplasmic reticulum chaperones. **Jornal of Virology**, v. 71, p. 3742-3750, 1997.

GAUDIN, Y.; RULGROK, R. W. H.; KNOSSOW, M.; FLAMAND, A. Low-pH conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion. **Journal of virology**, v. 67, p. 1365-1372, 1993.

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

GEISBERT, T. W.; HENSLEY L. E.; KAGAN, E.; YU, E. Z.; GEISBERT, J. B.; DADDARIO-DICAPRIO, K.; FRITZ, E. A.; JAHRLING, P. B.; MCCLINTOCK, K.; PHELPS, J. R.; LEE, A. C.; JUDGE, A.; JEFFS, L. B.; MACLACHLAN, I. Postexposure protection of guinea pigs against a lethal ebola virus challenge is conferred by RNA interference. **Journal of Infectious Diseases**, v. 193, p. 1650–1657, 2006.

GEWIRTZ, A. M. On future's doorstep: RNA interference and the pharmacopeia of tomorrow. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 12, p. 3612-3614, 2007.

GILADI, H.; KETZINEL-GILAD, M.; RIVKIN, L.; FELIG, Y.; NUSSBAUM, O.; GALUN, E. Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. **Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 8, p. 769–776, 2003.

GRIMM, D. K.; KAY, M. A. Therapeutic application of RNAi: is mRNA targeting finally ready for prime time? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 3633-3641, 2007.

HANLON, C. A.; KUZMIN, I. V.; BANTON, J. D.; WELDON, W. C.; MANANGAN, J. S.; RUPPRECHT, C. E. Efficacy of rabies biologics against new lyssaviruses from Eurasia. **Virus Research**, v. 111, p. 44-54, 2005.

HEMACHUDHA, T.; SUNSANEEWITAYAKUL, B.; DESUDCHIT, T.; SUANKRATAY, C.; SITTIPUNT, C.; WACHARAPLUESADEE, S.; KHAWPLOD, P.; WILDE, H.; JACKSON, A. C. Failure of therapeutic coma and ketamine for therapy of human rabies. **Journal of Neurovirology**, v. 12, n. 5, p. 407-409, 2006.

HOLLOWAY, B.P.; OBEJESKY, J.F. Rabies virus-induced RNA synthesis in BHK-21 cells. **Journal of General Virology**, v. 49, p. 181-195, 1980.

HOWARD, K. A. Delivering the goods: realizing the clinical potencial of RNAi. . **Nanomedicine**, v. 4, n. 6, p. 595-598, 2009.

ISRASENA, N.; SUPAVONWONG, P.; RATANASETYUTH, N.; KHAWPLOD, P.; HEMACHUDHA, T. Inhibition of rabies virus replication by multiple artificial microRNAs. **Antiviral Research**, v. 84, n. 1, p. 76-83, 2009.

JIE CHEN; HUAYU TIAN; ZHAOPEI GUO; JIALIANG XIA, K. A.; MARUYAMA, A.; XIABIN JING; XUESI CHEN. A Highly Efficient siRNA Carrier of PBLG Modified Hyperbranched PEI. **Macromolecular Bioscience**, v. 9, n. 12, p. 1247-1253, 2009.

KAPLAN, M. M. Safety precautions in handling rabies virus. In: KOPROVSKY, H. **The laboratory technicies in rabies**. Geneva: WHO, 1996. p. 130-133.

KELLY, T. R.; SLEEMAN, J. M. Morbidity and mortality of red foxes (*Vulpes vulpes*) and gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) admitted to the Wildlife Center of Virginia, 1993-2001. **Journal of Wildlife Disease**, v. 39, n. 2, p. 467-469, 2003.

KLEIN, C.; BOCK C. T.; WEDEMEYER, H.; WÜSTEFELD, T.; LOCARNINI, S.; DIENES, H. P.; KUBICKA, S.; MANNS, M. P.; TRAUTWEIN, C. Inhibition of hepatitis B virus replication in vivo by nucleoside analogues and siRNA. **Gastroenterology**, v. 125, p. 9-18, 2003.

KOPROWSKI, H. The mous inoculation test. In: _____ **The laboratory technicies in rabies**. Geneva: WHO, 1996. p. 45-46.

KOTAIT, I.; CARRIERI, M. L.; TAKAOKA, N. Y. **Raiva - Aspectos gerais e clínica..** São Paulo: 2009. p. 1- 48. (Manual técnico do Instituto Pasteur).

- KREBS, J. W.; WILLIAMS, S. M.; SMITH, J. S.; RUPPRECHT, C. E.; CHILDS, J. E. Rabies among infrequently reported mammalian carnivores in the United States, 1960-2000. **Journal of Wildlife Disease**, v. 39, n. 2, p. 253-261, 2003.
- KUMAR, P.; LEE, S. K.; SHANKAR, P.; MANJUNATH, N. A Single siRNA Suppresses Fatal Encephalitis Induced by Two Different Flaviviruses. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 4, p. 0507, 2006.
- KUMAR, P.; WU, H.; MCBRIDE, J. L.; JUNG, K. E.; KIM, M. H.; DAVIDSON, B. L.; LEE, S. K.; SHANKAR, P.; MANJUNATH, N. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. **Nature**, v. 448, p. 39-43, 2007.
- KUMAR, S.; ARANKALLE, V. A. Intracranial Administration of P Gene siRNA Protects Mice from Lethal Chandipura Virus Encephalitis. **PloS One**, v. 5, n. 1, p.1-5, 2010.
- LENTZ, T. L.; BURRAGE, T. G.; SMITH, A. L.; CRICK, J.; TIGNOR, G. H. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? **Science**, v. 215, p. 182-184, 1982.
- LEO, P.; GALESI LIMA LAGES A.; TORRES SUAZO, C.; MORAES, A. Células Animais: Conceitos Básicos. In: MORAES, A.; AUGUSTO PIRES, E.; CASTOLHO, L. **Tecnologia do cultivo de células animais de biofármacos a terapia gênica**. São Paulo: Roca, 2008. p. 39.
- LEWIS, P.; FU, Y.; LENTZ, T. L. Rabies virus entry at the neuromuscular junction in nerve-muscle cocultures. **Muscle & Nerve**, v. 23, p. 720-730, 2000.
- LOCKHART, B. P.; TORDO, N.; TSIANG, H. Inhibition of rabies virus transcription in rat cortical neurons with the dissociative anesthetic ketamine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 8, p. 1750-1755, 1992.
- LYLES, D. S.; RUPPRECHT, C. E. Rhabdoviridae. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields virology**, Lippincott Williams & Wilkins, 2007. v. 2, 1364 p.
- MARSH, M.; HELENIUS, A. Virus entry into animal cells. **Advances in Virus Research**, v. 36, p. 107-151, 1989.
- MATTOS, C. A.; FAVI, M.; YUNG, V.; PAVLETIC, C.; MATTOS, C. C. Bat rabies in urban centers in Chile. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 36, n. 2, p. 231-240, 2000.
- MATTOS, C. C.; MATTOS, C. A.; LOZA-RUBIO, E.; AGUILAR-SETIÉN, A.; ORCIARI, L. A.; SMITH, J. S. Molecular characterization of rabies virus isolates from México: implications for transmission dynamics and human risk. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 4, p. 587-597, 1999.
- MATTOS, C. A.; MATTOS, C. C.; SMITH, J. S.; MILLER, E. T.; PAPO, S.; UTRERA, A.; OSBURN, B. I. Genetic characterization of rabies field isolates from Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 6, p. 1553-1558, 1996.

- MEBATSION, T.; KONIG, M.; CONSELMANN, K. Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein. **The Cell**, v. 84, p. 941-951, 1996.
- MENCK, C. F. M. RNA interferência. **Microbiologia in foco**, v. 01, p. 17-21, 2007.
- MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. Geneva: World Health Organization, 1996. 445-446 p.
- NADIN-DAVIS, S. A.; CASEY, G. A.; WANDELER, A. Identification of regional variants of the rabies virus within the Canadian province of Ontario. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 829-837, 1993.
- NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. **The Plant Cell**, v. 2, n. 4, p. 279-289, 1990.
- NUNAN, C. P.; TINLINE, R. R.; HONIG, J. M.; BALL, D. G. A.; HAUSCHIDT, P.; LEBERT, C. A. Postexposure treatment and animal rabies, Ontario, 1958-2000. **Emergence of Infections Disease**, v. 8, n. 2, p. 214-217, 2002.
- PÁEZ, A.; SAAD, C.; NÚÑEZ, C.; BÓSHHELL, J. Molecular epidemiology of rabies in northern Colombia 1994-2003. Evidence for human and fox rabies associated with dogs. **Epidemiology and Infection**, v. 133, n. 3, p. 529-536, 2005.
- PÁEZ, A.; VELASCO-VILLA, A.; REY, G.; RUPPRECHT, C. E. Molecular epidemiology of rabies in Colombia 1994-2005 based on partial nucleoprotein gene sequences. **Virus Research**, v. 130, n.1-2, p. 172-181, 2007.
- PALLISER, D.; CHOWDHURY, D.; WANG, Q. Y.; LEE, S. J.; BRONSON, R. T.; KNIPE, D. M.; LIEBERMAN, J. An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection. **Nature**, v. 439, p. 489-494, 2006.
- REN, Y.; GONG, W.; ZHOU, H.; WANG, Y.; XIAO, F.; LI, T. siRecords: a database of mammalian RNAi experiments and efficacies. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 1-4, 2008.
- ROBISON, C. S.; WHITT, M. A. The membrane-proximal stem region of vesicular stomatitis G protein confers efficient virus assembly. **Virology**, v. 74, p. 2239-2246, 2000.
- RUPPRECHT, C. E.; HONLON, C. A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 6, p. 327-343, 2002.
- SATO, G.; KOBAYASHI, Y.; SHOJI, Y.; SATO, T.; ITOU, T.; ITO, F.H.; SANTOS, H. P.; BRITO, C. J.; SAKAI, T. Molecular epidemiology of rabies from Maranhão and surrounding states in the northeastern region of Brazil. **Archive of Virology**, v. 151, n. 11, p. 2243-2251, 2006.

SHANKAR, V. D. B.; KOPROWSKI, H. Direct entry of rabies virus into the central nervous system without prior local replication. **Journal of Virology**, v. 65, n. 5, p. 2736-2738, 1991.

SUPERTI, F.; SEGANTI, L.; PANÀ, A.; ORSI, N. Effect of amantadine on rhabdovirus infection. **Drugs under Experimental and Clinical Research**, v. 11, n. 1, p. 69-74, 1985.

TERNOVOI, V. A.; ZAIKOVSKAIA, A. V.; TOMOLENKO, A. A.; RASSADKIN, I. N.; AKSENOV, V. I.; CHAUSOV, E. V.; SCHARF, B.; SHESTOPALOV, A. M. Lissavirus in bats residing in the South of West Siberia. **Voprosi Virusologii**, v. 50, n. 1, p. 31-35, 2005.

TORDO, N.; POCH, O. Structure of rabies virus. In: CAMPBELL, J. B.; CHARLTON, K. M. **Rabies**. London: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 26-28.

TSIANG, H.; DE la PORTE, S.; AMBROISE, D. J.; DERER, M.; KOENIG, J. Infection of cultured rat myotubes and neurons from the spinal cord by rabies virus. **Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 45, p. 28-42, 1986.

TSIANG, H. Rabies virus infection of myotubes and neurons as elements of the nervous system. **Advances in Virus Research**, v. 42, p. 375-412, 1993.

TUFFEREAU, C.; LEBLOIS, H.; BENEJEAN, J.; COULON, P.; LAFAY, F.; FLAMAND, A. Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice. **Virology**, v. 172, p. 206-212, 1989.

VELASCO-VILLA, A.; ORCIARI, L. A.; SOUZA, V.; JUAREZ-ISLAS, V.; GOMEZ-SIERRA, M.; CASTILLO, A.; FLISSER, A.; RUPPRECHT, C. E. Molecular epizootiology of rabies associated with terrestrial carnivores in Mexico. **The Virus Research**, v. 111, n. 1, p. 13-27, 2005.

WAKELEY, P. R.; JOHNSON, N.; MC ELHINNEY, L. M.; MARSTON, D.; SAWYER, J.; FOOKS, A. R. Development of a Real - Time TaqMan Reverse Transcription - PCR Assay for Detection and Differentiation of Lyssavirus Genotypes 1,5 and 6. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 2786-2792, 2005.

WANG, Q. C.; NIE Q. H.; FENG, Z. H. RNA interference: antiviral weapon and beyond. **World Journal of Gastroenterology**, v. 9, p. 1657-1661, 2003.

WARRELL, M. J.; WHITE, N. J.; LOOAREESUWAN, S.; PHILLIPS, R. E.; SUNTHARASAMAI, P.; CHANTHAVANICH, P.; RIGANTI, M.; FISHER-HOCH, S. P.; NICHOLSON, K. G.; MANATSATHIT, S.; VANNAPHAN, S.; WARRELL, D. A. Failure of interferon alfa and tribavirin in rabies encephalitis. **British Medical Journal**, v. 299, n. 6703, p. 830-833, 1989.

WATSON, J. D.; BAKER, T. A.; BELL, S. P.; GANN, A.; LEVINE, M.; LOSICK, R. **Biologia molecular do gene**. Porto Alegre: Artmed, 2006.

WELLI, S. C.; SCOTT, C. A.; WARD, C. A.; JACKSON, A. C. Rabies virus infection of primary neuronal cultures and adult mice: failure to demonstrate evidence of excitotoxicity. **Journal of Virology**, v. 80, n. 20, p. 10270-10273, 2006.

WHITT, M. A.; BUONOCORE, L.; PREHAUD, C.; ROSE, J. K. Membrane fusion activity, oligomerization, and assembly of the rabies virus glycoprotein. **Virology**, v. 185, p. 681-688, 1991.

WILDE, H. Failures of post-exposure rabies prophylaxis. **Vaccine**, v. 25, p. 7605-7609, 2007.

WILKINSON, L. History. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**, 2002. p. 1.

WILLOUGHBY JR, 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. **New England Journal of Medicine**, v. 352. n. 24, p. 2508-2514, 2005.

WON, J. K.; SUNG, W. K. Efficient siRNA delivery with Non-viral Polymeric Vehicles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 3, p. 657-666, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **WHO Expert consultation on rabies**. Geneva: 2005. p. 2-20.

WUNNER, W. H. Rabies virus. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**, 2007, p. 40-42 .

WUNNER, W. H. The chemical composition and molecular structure of rabies viruses. In: BAER, G. M. **The Natural History of Rabies**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 31-35.

YUNG, V.; FAVI, M.; FERNÁNDEZ, J . Genetic and antigenic typing of rabies virus in Chile. Brief report. **Archive of Virology**, v. 147, n. 11, p. 2197-2205, 2002.