WASHINGTON CARLOS AGOSTINHO

Transfecção de anticorpos como terapia anti-viral para a raiva

São Paulo

2019

WASHINGTON CARLOS AGOSTINHO

Transfecção de anticorpos como terapia anti-viral para a raiva

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

2019

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. 3747
FMVZ

Agostinho, Washington Carlos
Transfecção de anticorpos como terapia anti-viral para a raiva / Washington Carlos Agostinho. – 2019.
74 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.
Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão.

1. Raiva. 2. Anticorpos. 3. Transfecção. 4. Terapia. 5. Sintomas neurológicos. I. Título.

ERRATA

Agostinho, W. C. **Transfecção de anticorpos como terapia anti-viral para a raiva.** 2019. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Página	Onde se lê	Leia-se
Ficha Catalográfica	74 f.	73 f.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "TRANSFEÇÃO DE ANTICORPOS COMO TERAPIA ANTI-VIRAL PARA A RAIVA", protocolada sob o CEUA nº 9658071016, sob a responsabilidade de **Paulo Eduardo Brandão e equipe; Washington Carlos Agostinho** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 03/08/2017.

We certify that the proposal "TRANSFECTION OF ANTIBODIES AS AN ANTIVIRAL THERAPY FOR RABIES", utilizing 60 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 9658071016, under the responsibility of **Paulo Eduardo Brandão and team; Washington Carlos Agostinho** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/03/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **10/2016 a 10/2018**

Área: **Epidemiologia Experimental Aplicada As Zoonoses**

Origem: **Biotério do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **21 a 21 dias**

N: **60**

Linhagem: **CH3 ROCKFELLER**

Peso: **11 a 11 g**

Resumo: Muitas doenças infecciosas, possivelmente foram introduzidas com a domesticação de animais a milhares de anos. Para os gregos Ártemis era curadora da raiva e Homero diz que Sirius, exercia influência maligna contra a humanidade, a concepção de enfermidade no passado relacionava a Deuses, logo o conhecimento empírico trouxe sua verdadeira natureza. A raiva é uma das doenças infecciosas mais antigas com 100% de letalidade; mundialmente morrem mais de 59.000 pessoas e são gastos 1,7 bilhões de dólares anualmente com prevenção e tratamentos. O tratamento vacinal atual é uma versão simplificada e atualizada do tratamento de Pasteur, comparado ao século XIX, sua eficiência evolui consideravelmente, porém, mostra que nenhum avanço contundente e eficaz no tratamento pós exposição ao vírus da raiva surgiu desde Pasteur. Este trabalho tem como objetivo, avaliar diferentes agentes de transfecção para entrega de anticorpos Fab-RABV de modo intracelular in vivo, previamente infectados por duas amostras de campo PV isoladas de cão-RABV3006 e bovino-RABV4005, já adaptadas em camundongos, e amostra fixa PV cedidas pelo Instituto Pasteur de São Paulo. Para transfecção nos testes antivirais, serão utilizados os reagentes Pulsin[®] protein, antibody and peptide delivery (Polyplus) e Lipofectamine 2000[®] (Life Technologies), como traçador de transfecção (transfecto), será utilizado conjugado anti-RABV, as amostras de SNC serão também submetidas a imunofluorescência direta e PCR para detecção do gene N de RABV e avaliada pelo teste de chi-quadrado. Assim, propõe-se métodos com especificidade direta ao agente etiológico pós infecção para tratamento da raiva.

Local do experimento: Laboratório de Raiva e Infecção VPS

São Paulo, 19 de dezembro de 2017

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária Executiva

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: AGOSTINHO, Washington Carlos.

Título: Transfecção de anticorpos como terapia anti-viral para a raiva

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 obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos que sempre acreditaram...

RESUMO

AGOSTINHO, W, C. **Transfecção de anticorpos como terapia anti-viral para a raiva.** [Transfection of antibodies as na anti-viral therapy for rabies]. 2019. 73 f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A raiva é uma zoonose conhecida desde a Mesopotâmia, temida por milênios em todo o mundo por seu rápido e progressivo número de casos fatais, e agora é endêmica em países em desenvolvimento, com uma estimativa de 6.000.000 de mortes humanas por ano. O pequeno número de pacientes que sobreviveram a raiva ainda é motivo de debate, em meio a tentativas de estabelecer um tratamento eficaz para pacientes humanos. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de transfecção de anticorpos F (ab ')₂ anti-RABV com uso de dois agentes de transfecção catiônicos (Pulsin / Bioporter) in vivo, bem como avaliar a eficácia deste método como terapia antiviral. Camundongos foram inoculados pela via intracerebral com 30 µl de um isolado de RABV (AgV2), contendo 10 LD₅₀%. Após 48h, dois tratamentos foram realizados: Para o Tratamento-1, 180 µl de F (ab ')₂ anti-RABV foram combinados com 360 µl de Hepes 20 mM pH 7,4 e adicionados 60 µl de Pulsin® (Polyplus). Para o tratamento 2, o reagente Bioporter® foi ressuspensionado com a F (ab ')₂ anti-RABV na concentração final de 250 µg / ml. Os grupos controles foram tratados com os agentes de transfecção sem anticorpos. As soluções foram então inoculadas por via intracerebral em volume de (30 µl) em cada um dos quinze animais. No tratamento-1, comparando os grupos tratado e controle, não houve diferença significativa (p = 1). No tratamento-2, a taxa de sobrevivência foi de 70% para o grupo tratado, enquanto a mortalidade nos animais do grupo controle foi de 90% (p <0,0198). De modo a diferenciar entre o efeito antiviral pela transfecção da F (ab ')₂ anti-RABV e um possível efeito antiviral do próprio agente de transfecção Bioporter®, os camundongos foram sujeitos a infecção com 30 µl do isolado RABV acima mencionado, contendo 10 LD₅₀% . Após 48 horas, 30 µL de reagente Bioporter ressuspensionado em Hepes 20 mM, pH 7, foram inoculados pela via intracerebral em 10 camundongos, enquanto para o grupo controle (n = 10), foi utilizado somente Hepes 20 mM, pH 7,4. Houve uma taxa de sobrevivência de 50 e 20%, para os grupos Bioporter e controle, respectivamente, sem diferença significativa (p = 0,4949), mostrando que o efeito antiviral observado no primeiro experimento foi devido ao

anticorpo transfectado. A inibição da replicação de RABV pode ser obtida pela técnica de transfecção de anticorpos, uma ferramenta valiosa a ser adicionada como uma terapia antiviral para o tratamento da raiva em humanos.

Palavras-chave: Raiva. Anticorpos. Transfecção. Terapia. Sintomas neurológicos.

ABSTRACT

AGOSTINHO, W, C. **Transfection of antibodies as anti-viral therapy for rabies.** [Transfecção de anticorpos como terapia anti-viral para a raiva.]. 2019. 73 f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Rabies is a zoonosis known since Mesopotamia, which has been feared for millennia throughout the world for its rapid and progressive number of fatal cases, and now it's endemic in developing countries, with an estimated 6,000,000 human deaths per year. The small number of patients who survived the disease is still a subject of debate, amid attempts to establish an effective treatment for human patients. The objective of this study was to evaluate the transfection capacity of anti-RABV F (ab')₂ antibodies with the use of two cationic reagents (Pulsin / Bioporter) *in vivo*, as well as to evaluate the effectiveness of this method as an antiviral therapy. Mice were inoculated by the intracerebral route with 30 µl of a dog RABV isolate (AgV2), containing 10 LD₅₀%. After 48h, two treatments were performed: For Treatment 1, 180 µl of anti-RABV F (ab')₂ were combined with 360 µl of 20 mM Hepes pH 7.4 and added 60 µl of Pulsin® (Polyplus). For Treatment-2, the Bioporter® reagent was resuspended with the anti-RABV F (ab')₂ in final concentration of 250 µg / ml. Control groups were mock-treated with the transfection agents devoid of antibodies. The solutions were then inoculated (30 µl) by intracerebral route into fifteen animals each. In treatment-1, comparing the treated and control groups, there was no significant difference ($p = 1$). In treatment-2, survival rate was 70% for the treated group, while mortality in animals of the control group was 90% ($p < 0,0198$). In order to differentiate between the antiviral effect of transfected anti-RABV F (ab')₂ and a possible antiviral effect of the Bioporter® transfection agent itself, mice were subjected to infection with 30 µl of the abovementioned RABV isolate, containing 10 LD₅₀%. After 48hr, 30 µL Bioporter reagent resuspended in 20 mM Hepes, pH 7 were inoculated by the intracerebral route in 10 mice, while, for the control group (n=10), 20 mM Hepes, pH 7.4 was used instead. There was a 50 and 20% survival rate for the Bioporter and control groups, respectively, with no significant difference ($p = 0.4949$), showing that the antiviral effect observed in the first experiment was due to the transfected antibody. Inhibition of RABV

replication can be achieved by the antibody transfection technique, a valuable tool to be added as an antiviral therapy for the treatment of rabies in humans.

Key words: Anger. Antibodies. Transfection. Therapy. Neurological Symptoms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do vírus da raiva.....	24
Figura 2	Representação esquemática do vírus da raiva	26
Figura 3	Organização do genoma do vírus da raiva.....	27
Figura 4	Organograma metodológico	42
Tabela 5	Teste de transfecção do conjugado anti-RABV com reagente Pulsin ® (POLYPLUS) <i>in vivo</i>	52
Tabela 6	Teste de transfecção da F(ab') ₂ anti-RABV com BIOPORTER ® PROTEIN DELIVERY REAGENT <i>in vivo</i>	53
Tabela 7	Transfecção de anticorpos F(ab') ₂ anti-RABV com reagente Pulsin ® (POLYPLUS) como tratamento antiviral <i>in vivo</i>	54
Tabela 8	Transfecção de anticorpos F(ab') ₂ anti-RABV com BIOPORTER ® PROTEIN DELIVERY REAGENT como tratamento antiviral <i>in vivo</i>	55
Tabela 9	Avaliação da atividade do BIOPORTER ® PROTEIN DELIVERY REAGENT sobre RABV	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	RAIVA a. C.	15
2.2	SÉCULO I –X D.C.	16
2.2.1	SÉCULO X --XIX	16
2.2.2	DISTRIBUIÇÃO GLOBAL ATUAL	20
2.3	TAXONOMIA DO VÍRUS	21
2.3.1	Estrutura do vírus	21
2.3.2	Organização do genoma	22
2.4	CICLO VIRAL	24
2.4.1	Adsorção	24
2.4.2	Transcrição	25
2.4.3	Replicação	25
2.4.4	Brotamento	26
2.4.5	PROTEÍNAS N, P, M, G & L	26
2.5	PERÍODO DE INCUBAÇÃO HUMANA	28
2.5.1	Profilaxia pré-exposição	29
2.5.2	Profilaxia pós-exposição	29
2.5.3	Tratamento	29
2.6	COMPONENTES DE AÇÃO ANTI-RABV	30
2.6.1	Ribavirina	30
2.6.2	Amantadina	31
2.6.3	Quetamina	31
2.6.4	BH4	32
2.6.5	NOVAS ABORDAGENS	32

2.6.6	Interferência por RNA	32
2.6.7	Transfecção de anticorpos.....	33
2.7	AGENTES TRANSFECTANTES CATIÔNICOS	34
2.7.1	Lipídios catiônicos	34
2.7.2	Polímeros catiônicos.....	35
3	OBJETIVOS	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	CAMUNDONGOS.....	38
4.2	ANTICORPOS F(ab') ₂ CONTRA RABV	38
4.3	VÍRUS.....	38
4.4	CONJUGADO ANTI-RABV.....	38
4.5	CONJUGADO ANTI-IgG Equina.....	39
4.6	TESTE DE TRANSFEÇÃO DO CONJUGADO ANTI-RABV COM REAGENTE PULSIN® (POLYPLUS) <i>IN VIVO</i>	39
4.7	TESTE DE TRANSFEÇÃO F(ab') ₂ ANTI-RABV COM REAGENTE PULSIN® (POLYPLUS) <i>IN VIVO</i>	40
4.8	TESTE DE TRANSFEÇÃO DA F(ab') ₂ ANTI-RABV COM BIOPORTER® PROTEIN DELIVERY REAGENT <i>IN VIVO</i>	41
4.9	TRANSFEÇÃO DE ANTICORPOS F(ab') ₂ anti-RABV ANTI-RABV COMO TRATAMENTO ANTIVIRAL <i>IN VIVO</i>	42
4.10	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO REAGENTE BIOPORTER® SOBRE O RABV	43
4.11	TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA.....	44
4.12	REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT-PCR) PARA RABV.....	44
4.13	ANÁLISE DOS RESULTADOS	45
5	RESULTADOS	47
5.1	TESTE DE TRANSFEÇÃO DO CONJUGADO ANTI-RABV COM REAGENTE PULSIN® (POLYPLUS) <i>IN VIVO</i>	47
5.2	TESTE DE TRANSFEÇÃO F(ab') ₂ ANTI-RABV COM REAGENTE PULSIN® (POLYPLUS) <i>IN VIVO</i>	48

5.3	TESTE DE TRANSFEÇÃO DA F(ab') ₂ ANTI-RABV COM BIOPORTER [®] PROTEIN DELIVERY REAGENT <i>IN VIVO</i>	48
5.4	TRANSFEÇÃO DE ANTICORPOS F(ab') ₂ anti-RABV ANTI-RABV COMO TRATAMENTO ANTIVIRAL <i>IN VIVO</i>	49
5.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO REAGENTE BIOPORTER [®] SOBRE O RABV.....	51
6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença negligenciada e subnotificada principalmente em países em desenvolvimento. Aproximadamente 59.000 mortes por raiva humana ocorrem anualmente em todo o mundo, porém mais de 90% são relatadas entre a África (36,4%) e Ásia (59,6%) (OMS, 2018). A mortalidade afeta desproporcionalmente as regiões mais pobres do mundo, com impactos nos orçamentos da saúde pública e na economia da pecuária, em que somadas as perdas econômicas, chegam ao gasto anual de 8,6 bilhões de dólares. A morte prematura decorrente da raiva canina adquirida, contribui diretamente na produtividade econômica (do trabalhador), onde a vacinação limitada da população canina é o único meio efetivo de prevenção nessas áreas de risco. Para agravar a situação, os sistemas de fornecimento e distribuição de profilaxia pré-exposição são precários e muito caros (HAMPSON, et al., 2015).

Em 2005, após o sucesso no tratamento da encefalite causada por raiva em uma menina de 15 anos, o protocolo de Milwaukee, envolvendo o uso de midazolam, barbitúricos, cetamina, amantadina, ribavirina, coma induzido e suporte aos neurotransmissores até que uma resposta imune natural pudesse ser montada, obteve sucesso na recuperação da paciente (WILLOUGHBY, et al., 2005). Desde então, foi usado como protocolo para o tratamento da raiva na maioria dos conseguintes casos em que houve a recuperação do paciente (HU et al., 2007); (PROMED, 2009; RUBIN, et al., 2009; MANOJ, et al., 2016; HERRIMAN, 2018). No entanto, apesar dos poucos sobreviventes, outros casos baseados em similares tratamentos não obtiveram o mesmo sucesso (THIEL et al., 2009; ARAMBURO et al., et al., 2011; PROMED, 2018).

Considerando-se a importância do vírus da raiva como agente direto em milhares mortes humanas, faz-se necessário estudos mais contundentes quanto a fármacos ou técnicas específicas, particularmente aquelas que possam agir diretamente no foco da infecção para o tratamento pós exposição, ou seja, quando o vírus manifesta sua patogenia no sistema nervoso central. Caso contrário, nenhum protocolo combinando fármacos antivirais é capaz de inibir a replicação viral. A falta de novos dados de estudos *in vitro* e em modelos animais adequados contribuem para que a mais terrível doença já conhecida atravessasse mais um século desde que Pasteur desenvolveu a vacinação contra raiva.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RAIVA a. C.

A palavra latina *rabia* (em português *raiva*), antecede do sânscrito “*rabhas*”, termo usado para praticar violência, para os gregos *raiva* (*Lyssa* ou *Lytta*). Na França, “*rage*” é derivada do pronome “*robere*” “*ser louco*” (STEELE; FERNANDEZ, 1991). Etimologistas antigos pressupunham que a sua raiz era “*lise*”, o que significa “*perder, dissolver*”, o que levou à perda de faculdades racionais “*lykos*”, que significa “*lobo*” uma crença de que a loucura advém da aquisição de uma natureza bestial (NEVILLE, 2004).

No antigo Egito, uma fórmula mágica encontrada em um grimório cita um feitiço e terapia em caso de mordida de cão eu continha veneno ligada à saliva “*O seu cão, que é um dos dez cães pertencentes a Anúbis, seu próprio filho remove seu veneno por encantamentos, agora espalha sua saliva longe de mim... "Com alho ... aplique-o na ferida (causada por um cão) recite a fórmula [...] até que ele se cure*” (Théodoridès, 1986).

Do outro lado do continente Africano, separada pelo mar Mediterrâneo, a Grécia antiga, a quem adoravam e veneravam vários deuses, possuíam um Deus para neutralizar a raiva “*Aristeu*”, filho de *Apolo*, e a Deusa “*Ártemis*” possuía o poder para curar a raiva. O grande poeta *Homero* também fez referência a *Heitor* como “*um cão raivoso*”, e que “*Sírius*”, estrela na constelação do *Cão Maior*, exercia influência maligna sobre a humanidade (STEELE, 1975).

Aristóteles, no século IV a.C., em seu livro “*A História dos Animais*” menciona que os cães eram susceptíveis a raiva e se tornavam agressivos disseminando a doença através da mordida (NEVILLE, 2004)

Plutarco também menciona o grave risco em adquirir a doença através de mordidas de cães. *Plínio* e *Ovídio* descreve um possível verme na língua dos cães, e que a retirada do freio junto com a mucosa removê-lo-ia (STEELE, 1975).

2.2 SÉCULO I –X D.C.

No Império Romano, especialmente na Grécia e Creta, a raiva foi relatada por vários escritores onde a doença era amplamente distribuída. Um deles foi Vegetius Renatus no Século III, um dos primeiros escritores de Medicina Veterinária, o qual sugere um tratamento de imunização para gados atacados por cães raivosos, o qual se baseava em cozinhar o fígado de cães raivosos (STEELE; FERNANDEZ, 1991).

No século VI, Aetious descreve os sintomas da raiva em cães e a partir deste período, a compreensão da doença evolui junto com a Medicina, concomitante a inúmeras tentativas de curas, porém sem progresso. Médicos sírios já conformados acreditavam que a doença era incurável. Rhazes outro médico, mas desta vez árabe, relatou a hidrofobia descrevendo os sintomas clínicos, em que o paciente apresentava tremores e enrijecimento muscular quando exposto à água, já no século IX (STEELE; FERNANDEZ, 1991).

2.2.1 SÉCULO X --XIX

O Médico Italiano Girolamo Fracastoro observou vários casos de raiva, desde suas peculiaridades sobre a incubação longa e silenciosa até os primeiros sinais clínicos e seu desfecho fatal culminando em uma agonizante morte. E descreveu-o da seguinte forma: [...] *se move em todas as direções como louco*, relata a repulsão do paciente por água ou qualquer outro líquido, [...] *ele morde outras pessoas, espumando pela boca, olhos revirados, e finalmente, ele está exausto e dolorosamente dá seu último suspiro* (THÉODORIDÈS, 1986).

O conhecimento limitado sobre o agente etiológico dificultava o tratamento e várias formas para conter a doença foram propostas, sendo a mais aceita, e perdurando durante muito tempo até a descoberta da vacinação por Pasteur, a dolorosa cauterização da ferida com ferro aquecido (STEELE, 1975).

Inúmeras substâncias químicas foram aplicadas como cloreto e brometo de potássio, ácidos, amônia, arsênico ou até mesmo mercúrio era usado oralmente a partir do século XVII, como forma de expelir o vírus através da salivação, já que se pressupunha, que o mesmo era eliminado com ela. Outras tentativas com extrato de plantas alucinógenas como ópio, haxixe e nicotina também eram parte de alguns

tratamentos. Por volta de 1775, o rei da Prússia Frederico II, escreveu uma carta a farmacêuticos dizendo que ele possuía uma fórmula contra a raiva chamada “*Electuarium contra morsum canis rabidi*” e recomendou a ingestão de besouros coleópteros com mel como tratamento (THÉODORIDÈS, 1986).

Entre os séculos XII e XVIII, grandes surtos, que envolviam principalmente lobos, raposas e cães, disseminavam a doença em Países da Europa como a Espanha, França, Áustria, Hungria e Inglaterra. Ordens foram dadas para eliminar todos os cães nas cidades e cartazes expostos pela população exigiam um tratamento para a raiva (THÉODORIDÈS, 1986).

Desde as civilizações mais antigas a transmissão da raiva foi constituída por canídeos, bem como, todos relatos históricos sobre os inúmeros casos de morte e disseminação. E esta ampla distribuição cosmopolita esteve relacionada a origem das atividades humanas principalmente ao transporte de cães nas embarcações, o qual disseminou o vírus para outros continentes (BADRANE; TORDO, 2001). Há indícios que a importação de cães da Inglaterra para as colônias americanas por volta de 1640, foi provavelmente a fonte de surtos de raiva canina na América colonial (SMITH et al., 1992). Estes surtos de raiva canina até então, pareciam desconhecidos até o início do século XVIII. No entanto, a raiva transmitida por morcegos já era conhecida e provavelmente os quirópteros atuavam como reservatórios para o *Lyssavirus* (JULIEN, 2015).

A raiva transmitida por morcegos (vampiros) bem familiar na América Central (México) em 1790, tinha sua peculiaridade parálitica, diferente da raiva canina caracterizada principalmente pela agressividade (THÉODORIDÈS, 1986).

A primeira descrição de morcegos hematófagos na América Latina é referida por Oviedo no séc. XVI, em que os descreve em seu livro *Quiedo de La Natural Hystoria de Las Indias*, como “aves noturnas”. Destaca que ao saírem ao pôr do sol, voavam como aves e picavam cristãos nas orelhas, narizes e extremidades dos membros, provavelmente europeus colonizadores que já habitavam a região. Curiosamente, os índios que habitavam a região possuíam tratamento justamente para os ataques, baseado em calor em forma de brasa colocado no local, ou ingestão de água quente e lavagem da ferida (OVIEDO, 1513).

Em Cuba, a doença dizimou cães na cidade de San Juan dos Remédios. No ano de 1725, 1741, 1762 e 1788 alcança Havana, Barbados Haiti e Argentina respectivamente. No Estados Unidos, a relatos que a raiva surgiu pela primeira vez

em 1753 no Estado da Virgínia, espalhando-se pelo resto do país. Em 1769, até mesmo o futuro presidente do Estados Unidos, George Washington, relata em seu diário que ele teve que matar um de seus próprios cães, por suspeita de raiva (THÉODORIDÈS, 1986).

Com o número crescente dos surtos a raiva expandia cada vez mais a infecção entre animais, provocando várias epizootias em cães de treno com sintomatologia como hidrofobia, membros paralisados, sinais de excitação evoluindo para agressividade e morte, em regiões inóspitas desde o hemisfério Ocidental até Oriental Ártico. No início de 1950, ocorreu a mais extensa enzootia de raiva no Canadá, diagnosticada em raposas, lobos, coiote, urso, coelhos, lince, castor e alce (CRANDELL, 1991).

Sua transmissão foi estudada por Zinke em 1804, quando definiu a infecção por contato com a saliva de cães raivosos. Zinke (STEELE; FERNANDEZ, 1991) demonstrou que a doença poderia ser transmitida ao pincelar a saliva de um cão raivoso sobre a ferida de outro cão.

Galtier em 1879, começou seus estudos com a raiva concluindo importantes descobertas que futuramente embasaram trabalhos de Pasteur e colaboradores. Primeiro, demonstrou que a saliva de cães raivosos era fonte de transmissão por mordedura, e estipulou o período de incubação do vírus com sintomas clínicos da raiva furiosa em média de 18 dias, quando os coelhos eram atacados na orelha. Segundo, mostrou que o vírus permanecia infectante mesmo quando armazenado 24hr ou 72hr em placas com água, comprovando pela passagem em cobaia. E por último e não menos relevante, evidenciou que as diversas inoculações em ovelhas e cabras através da veia jugular, esses animais desenvolviam a resposta imune adquirida. Foi o primeiro a cogitar a hipótese de que *“a atenuação da virulência provavelmente era o desenvolvimento para cura da raiva e alguém iria descobrir o método”*. Estes resultados serviram de base para Pasteur em 1880, o qual contrariou a contribuição de Galtier por não ter encontrado no cão a imunidade adquirida em cabras e ovelhas (THÉODORIDÈS, 1986).

O Médico Francês Pierre Paul Émile Roux foi um dos pioneiros a desenvolver medidas preventivas para tentar evitar o ataque de cães raivosos. Tais prevenções consistiam em três passos básicos, (1) que pessoas usassem roupas como proteção para mordidas, (2) que a retirada do veneno fosse através do sangramento da ferida ou líquido antisséptico e (3), que nem sempre a saliva poderia estar excretando o

veneno, e atacar o vírus no local da ferida aplicando pomadas e atritos com antiespasmódicos, substâncias canforadas evitaria a doença (THÉODORIDÈS, 1986).

Louis Pasteur começou a trabalhar com a raiva em dezembro de 1880. Então em seus experimentos com coelhos ele usa saliva de uma criança de 11 anos à qual tinha falecido por raiva. O seu objetivo, seguindo métodos do seu trabalho sobre cólera de frango, era encontrar uma forma de atenuar a virulência da raiva. Porém, os coelhos morrem 36 horas depois de septicemia devido a pneumococos da saliva. Logo após a morte da criança, em 24 de janeiro de 1881, ele escreveu em uma nota à Academia das Ciências. *"Se a raiva pode ser atribuída à presença de um microrganismo microscópico, pode não estar além dos recursos naturais da ciência para encontrar uma maneira de mitigar a ação do vírus da doença aterradora"* (ROTIVEL, 2002).

Em 1881, Emile Roux, Charles Chamberland, Louis Thuillier juntamente com Pasteur estabeleceram a possibilidade da transmissão da raiva inoculando tecido cerebral de cães raivosos para cães saudáveis. Foi Emile Roux que desenvolveu a técnica de inoculação intracerebral com um pequeno período de incubação. Um ano meio depois, a equipe de Pasteur apresenta os resultados com mais de 200 experimentos envolvendo cães, coelhos e ovelhas e mostra que os cães eram refratários a inoculação ou ataque por outros cães raivosos. Em 1884, novos estudos descrevem a neurovirulência do vírus da raiva com a possibilidade de obter uma cepa fixa do vírus por sucessivas passagens nas mesmas espécies animais.

Em 1885, Joseph Meister, de 9 anos de idade, acompanhado por sua mãe, apresentava mordidas múltiplas e profundas. Na mesma noite, na presença do Pasteur e Dr. Vulpian, o menino Joseph recebe das mãos do Dr. Grancher a primeira injeção inativada com uma suspensão de medula de coelho mantida por 15 dias. No total ele recebe 15 injeções, uma por dia na região do abdômen, até chegar na medula virulenta de 4 dias. Três meses depois, o jovem Meister apresentava-se sadio e sem nenhum sinal clínico. Pasteur repeti a vacinação em um jovem, Jean-Baptiste, 4 dias após as mordidas e a centenas de casos que chegavam até sua porta. Pasteur comunicou à Academia das Ciências, os resultados promissores do tratamento preventivo contra a raiva aplicado ao homem em 26 de outubro de 1885, Pasteur (1885, apud Rotivel, 2002).

2.2.2 DISTRIBUIÇÃO GLOBAL ATUAL

O gênero *Lyssavirus* está amplamente distribuído em todos continentes. Atualmente 59.000 mortes ocorrem ao ano, sendo 36,4% na África, 59,6% Ásia e 0,05% ocorrem nas Américas (HAMPSON, et al., 2015). A cada quinze minutos uma pessoa morre de raiva no mundo segundo a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE, 2018).

FIGURA - 1 Raiva humana transmitida por cães.

Fonte: (WHO, 2016)

Legenda: De países classificados como “suspeitos”, conflitantes ou nenhuma informação além das estimativas disponíveis. As linhas pontilhadas em mapas representam linhas de fronteira aproximadas para as quais ainda não há um acordo completo.

2.3 TAXONOMIA DO VÍRUS

O vírus da raiva RABV pertence a ordem *Mononegavirales*. A família *Rhabdoviridae* faz parte dessa ordem e compreende os gêneros *Cytorhabdovirus*, *Ephemerovirus*, *Novirhabdovirus*, *Nucleorhabdovirus*, *Perhabdovirus*, *Sigmavirus*, *Sprivivirus*, *Tibrovirus*, *Vesiculovirus*, *Lyssavirus* www.ictvonline.org acessado em 26 de junho de 2016).

Somente o RABV é responsável pela raiva clássica, sendo as outras espécies são consideradas *rabies-like virus*, por apresentarem semelhanças antigênicas ao RABV e causarem sintomas similares (RODRIGUEZ et al., 2012). As rhabdoviroses possuem grande diversidade de hospedeiros vertebrados e invertebrados como insetos, plantas, peixes, crustáceos, répteis e mamíferos (ROSE; WITT, 2001). As diferentes localizações geográficas e/ou hospedeiro resultam em características biológicas distintas como sítios de reconhecimento, patogenicidade e indução a apoptose (BADRAME; TORDO, 2001).

Na atualidade, o gênero *Lyssavirus* está compreendido em 14 espécies (ICTV), e mais uma espécie estritamente patogênica denominada *Gannoruwa bat lyssavirus*, achada em raposas voadoras (*Pteropus medius*), no Sri Lanka (GUNAWARDENA, et al., 2016).

2.3.1 Estrutura do vírus

A estrutura morfológica dos vírions da família *Rhabdoviridae* apresenta-se em forma de bastão e possui diâmetro entre 100 nm e 430 nm de comprimento, por 40 nm a 100 nm de diâmetro (RODRIGUEZ et al., 2012). Sua organização e RNA polimerase assemelham-se ao vírus da estomatite vesicular (TORDO et al., 1988) (Figura 1).

O nucleocapsídeo é composto pelo genoma viral e pelas proteínas N (nucleoproteína 450 aa), L (large 2130 aa) e P (fosfoproteína 297 aa). O RNA é altamente compactado com o auxílio da proteína N, em que cada uma engloba 9 nucleotídeos, formando uma estrutura helicoidal com aproximadamente 35 voltas (ISENI et al., 1998). Associadas à nucleoproteína estão as proteínas L e P, sendo a primeira RNA-polimerase RNA-dependente do vírus (BALTIMORE; HUANG;

STAMPFER, 1970), sendo este complexo ribonucleico responsável pela ativação da transcrição e replicação (ROSE; WHITT, 2001).

FIGURA - 2 Esquema representando estrutura do virion com suas respectivas proteínas

Fonte: (ALBERTINI, RUIGROK; BLONDEL, 2011)

2.3.2 Organização do genoma

O RNA com 12 kb não segmentado e sentido negativo codifica cinco proteínas 3' N-M-P-G-L 5'. Em termos de massa, o RNA ocupa 2-3% do vírus, lipídeo ocupam 20-26%, componentes integrais 3% e proteínas ocupam 67-74% do vírus (TORDO et al., 1988), (WUNNER, 2007).

FIGURA- 3 Início da transcrição (TIS) em verde, e sinais de terminação da transcrição e de poliadenilação (TTP), em vermelho. Na região trailer 3' e 5', existem regiões não codificantes, com regiões intergênicas variáveis (IGRs), entre os genes.

Fonte: (ALBERTINI, RUIGROK; BLONDEL, 2011)

O genoma é transcrito sequencialmente em RNA líder no extremo 3', e cinco RNAm(s) monocistrônicos. Delimitando os monocistrôns existe uma região interna não codificante (NCR), com códons de iniciação de transcrição (TIS), e códons de poliadenilação de terminação de transcrição (TTP), no final de cada monocistro ou região (TORDO, et al., 1988).

Os nove nucleotídeos iniciais da região líder, além de serem idênticos em todos gêneros *Lyssavirus*, são particularmente bem conservados em seus 58 nucleotídeos. A região trailer são mais variáveis na extensão nos vírus e possuem sequência de até 70 nucleotídeos (CONZELMANN; SCHNELL, 1994), (TORDO et al., 1988).

2.4 CICLO VIRAL

Vários processos para formação de novos vírions ocorrem simultaneamente como adsorção, transcrição, replicação, montagem da progênie viral e brotamento (ROSE; WHITT, 2001).

2.4.1 Adsorção

O mecanismo de adsorção requer a interação dos trímeros da glicoproteína G a receptores da célula alvo. Inicialmente a ligação vírus-célula acontece no tecido muscular esquelético e sua replicação pode ser necessária para produzir quantidades suficientes de vírus para a entrada no sistema nervoso periférico (SHANKAR; DIETZSCHOLD; KOPROWSKI, 1991).

Um dos primeiros receptores abordados foi a acetilcolina (AChR), (WUNNER, 2007), localizado em junções neuromusculares (NMJs) e a concentração preferencial do vírus nesta região sugere uma alta concentração de receptores do vírus da raiva neste sítio (LEWIS; FU; LENTZ, 2000).

Outro receptor associado é o (p75-NTR), o vírus interage com o primeiro domínio rico em cisteína (CRDI) deste receptor e sequestra mecanismos de transporte via axônio, manipulando-os durante a infecção a nervos terminais. Essa interação (p75-NTR- dependente) aumenta a velocidade do virion dentro da célula facilitando seu transporte retrógrado (GLUSKA, et. al., 2014). Em cultivo celular NSC-34, que expressam vários marcadores neuronais, como neurofilamentos-200, (NCAM) e p75NTR (HISLOP, 2014), o deslocamento demonstrou maior eficiência em razão a rede de microtúbulos mais polarizada em neurônios motores e interação com complexo dineína (RASALINGAM, et al., 2005).

Outro receptor descrito como porta de entrada para o vírus é a Molécula de adesão celular neural (NCAM) conhecida como CD56, D2CAM, Leu19 ou NKH-1. É uma glicoproteína de adesão celular da superfamília de imunoglobulina (Ig) descrita para neurônios, mioblastos, astrócitos, miotubos, células T ativadas e células NK. Testes *in vivo* com a infecção de camundongos deficientes em NCAM demonstraram que a mortalidade foi tardia e a infecção cerebral foi drasticamente restrita (THOULOZE, et al., 1998).

2.4.2 Transcrição

Um fator importante no evento de transcrição é a dissociação da proteína M do componente viral, o qual garante a eficiência de entrega do ribonucleocapsídeo no meio citoplasmático antes que seja degradado por proteases ou enzimas lisossomais (LYLES; RUPPRECHT, 2007).

O processo de replicação produz nucleocapsídeo contendo genoma RNA anti-senso completo, que serão usados como moldes para a síntese de RNA de sentido genoma. (WUNNER, 2007); (MIRAKHUR; PELUSO, 1988). A RNP genômica recém-sintetizada é conduzido então para a membrana celular e se congrega com a proteína M, recém-sintetizada na sua forma solúvel (LYLES; RUPPRECHT, 2007).

2.4.3 Replicação

A replicação viral é intensa, sendo que o processo metabólico permanece enquanto a célula estiver apta a suprir a maquinaria viral (WALSH; MATHEWS; MOHR, 2013). Os RNAs mensageiros são traduzidos produzindo cinco proteínas estruturais do virion (BANERJEE; BARIK, 1992), (ALBERTINI; RUIGROK; BLONDEL, 2011), porém, somente os RNAs N, P, M e L, são sintetizados através de ribossomos livres, enquanto a proteína G, é sintetizada via retículo endoplasmático rugoso (GAUDIN, 1997).

Após os ribonucleocapsídeos (RNPs) atingirem um limiar suficiente, os mesmos serão usados como modelos de replicação para síntese de (RNPs) de sentido antígenômico completo, com a função exclusivamente para replicação de grandes quantidades de genomas (RNPs), 50 vezes mais que os antígenomas (FINKE; CONZELMANN, 1997), neste ínterim, ambos genomas, sentidos positivo e negativo, são encapsidados pela proteína N, com rápido processo através da oligomerização de proteínas adjacente. Desta forma, somente RNPs negativos são empacotados e sofrem processo de maturação estrutural em novos virions, indicando o mecanismo de seleção da maquinaria viral (BANERJEE; BARIK, 1992).

2.4.4 Brotamento

O nucleocapsídeo interage firmemente com domínios específicos da membrana plasmática (RODRIGUEZ BOULAN; SABATINI, 1978) e se associa com a proteína M formando o complexo M-RNP. Uma vez constituída a comunicação com a proteína G, que se encontra proporcionalmente distribuída no eixo circundante, a conformação em forma de espiral do nucleocapsídeo continua até sua estrutura altamente compactada. Essas interações sugerem o início da montagem viral com surgimento de novos virions (MEBATSION; WEILAND; CONNZELMANN, 1999). seguido do brotamento (ALBETINI, RUIGROK; BLONDEL, 2011), (ROSE; WHITT, 2011).

2.4.5 PROTEÍNAS N, P, M, G & L

Com aproximadamente 1.200 cópias no virion a proteína (N) envolve cerca de 9 nucleotídeos, desta forma tornando-o resistente a Rnase. Sua estrutura é formada por dois lobos, o qual o RNA ao ser introduzido entre o sítio de ligação confere a estabilidade (LYLES; RUPPRECHT, 2007).

Dentre as espécies do gênero *Lyssavirus* sua sequência de amino ácidos é a mais conservada em razão de sua importante função para encapsidação do RNA-genômica (WUNNER, 2007). Encontrada difusamente no citoplasma, em sua forma recém-sintetizada constitui complexos homólogos formando (N-N) ou heterólogos (N-P) interligados com o ribonucleocapsídeo (RNP) nascente (WUNNER, 1991).

No *Lyssavirus* o gene da fosfoproteína em combinação com gene (L) constituem o complexo replicase viral. Como o evento da fosforilação acontece em pontos diferentes, existe duas polimerases atuando em pontos opostos, uma como transcriptase e outra como replicase. Logo após a fosforilação ocorre a formação de trímeros, que se liga a proteína L e permiti sua junção ao complexo N-RNA ativando a transcriptase (ROSE; WHITT, 2001).

A proteína M, contém 202 aminoácidos e aproximadamente 1200 a 1500 cópias, que se conectam o RNP do vírus da raiva. Após a dissociação entre as suas ligações induz ao rompimento do citoesqueleto e consequentemente a liberação do genoma para produção de proteínas (ROSE; WHITT, 2001).

Uma das propriedades atribuídas a proteína M é o papel estrutural na formação do esqueleto viral e a capacidade de regular a transcrição e tradução de proteínas virais (FINKE; MUELLER-WALDECK; CONZELMANN, 2003). Apesar da sua associação com envelope viral na fase madura do virion, está intimamente associada a nucleoproteína N, formando complexos M-RNPs altamente compactados conferindo aos vírions o formato similar a um projétil. Ao mesmo tempo, intermedia a ligação dos novos virions com a membrana celular, mesmo que a glicoproteína G esteja ausente (MEBATSION; KONIG; CONZELMANN, 1996), (MEBATSION; WEILAND; CONZELMANN, 1999).

A fração externa do virion é revestida pela glicoproteína em forma de espículas com aproximadamente 400 trímeros, de 5 a 10 nm de comprimento por 3nm de diâmetro (DE MATTOS; RUPPRECHT et al., 2001). No processo de conformação estrutural a proteína assume no mínimo três estados diferentes. O estado nativo encontrado na superfície do vírus, que possivelmente é o responsável pela ligação ao receptor, o estado hidrofóbico ativado, ao que parece interagir com a membrana alvo, sendo um o primeiro passo do processo de fusão e por último a conformação fusão-inativa (GAUDIN et al., 1999).

A proteína G desempenha um papel importante na patogênese do vírus raiva ao se ligar a receptores neurais como o receptor de acetilcolina (LENTZ, 1985), moléculas de adesão celular neural (NCAM) e receptor (p75-NTR), expresso no início do desenvolvimento pós-natal em várias células neurais SNC e SNP (IBÁÑEZ; SIMI, 2012). Sua espícula composta em trímeros possui três domínios. O ectodomínio (ED), localizado para fora do envelope, domínio trans-membrana e o endo-domínio (WUNNER, 2007). A dependência do pH para que ocorra a fusão tem sido demonstrada por vários rhabdovírus, em torno do pH 6 a 6,5 (ROCHE; GAUDIN, 2004).

A última proteína no genoma é a maior e mais complexa proteína presente no vírus, possui 2.142 aminoácidos e ocupa 54% de todo genoma viral, o que é justificado pela complexidade das reações enzimáticas que catalisa e a multifuncionalidade que ela apresenta como, transcrição e replicação (TORDO, et al., 1998). A proteína L, executa a função de síntese de RNA, metilação, poliadenilação do RNA viral e capping no RNAm. As duas proteínas juntas L e P, ativam a RNA polimerase que produz cópias de RNAm a partir do modelo N-RNA, ou completa a fita antígenoma e genoma (DE MATTOS; RUPPRECHT, 2001).

2.5 PERÍODO DE INCUBAÇÃO HUMANA

A raiva quase sempre é atribuída diretamente a mordida de um animal raivoso normalmente canídeos (PORRAS, et al., 1976); (HEMACHUDHA, et al., 2006); (WEYER, et al., 2016). Entretanto, transmissões por ataques morcegos tem sido frequentemente relatado (WILLOUGHBY, et al., 2005), (PROMED, 2009), (THIEL, et al., 2009). Outras vias de infecção podem ocorrer como inalação de aerossóis em cavernas onde morcegos mantêm seu nicho (CONSTANTINE, 1962), inalação de aerossóis na produção de vacinas anti-rábica ((WINKLER; BAKER; HOPKINS, 1972), transplantes de órgãos (IWAMOTO et al., 2003) e possível transmissão peri-parto (AGUÈMON, et al., 2016).

O desenvolvimento da doença envolve a quantidade e local em que o vírus entra em contato com hospedeiro, normalmente variando de 1 a 2 meses entre a exposição e os primeiros sintomas clínicos. Em raros casos o vírus se manifestou após anos), (JOHNSON; CUNNINGHAM; FOOKS, 2010).

O desenvolvimento pode ser dividido em três estágios, prodrômica; neurológico agudo e coma que induz o paciente a morte. No primeiro período, o paciente começa a sentir dores no corpo com manchas vermelhas, dores de cabeça, febre, dor de garganta, calafrios, vômitos e fotofobia. Com a disfunção do sistema nervoso, episódios de delírios e o aumento do libido são comuns. Os sintomas podem perdurar de 2 a 10 dias, prevalecendo até a fase neurológica aguda (DE MATTOS; RUPPRECHT, 2001).

No segundo estágio, a duração pode ocorrer de 2 a 7 dias, a intensa replicação do vírus no SNC aumenta a ansiedade, nervosismo, insônia e a alteração do comportamento varia conforme a personalidade do indivíduo. Os estímulos externos intensificam a manifestação de fobias, hipóxia, afasia. O quadro clínico se agrava com convulsões, delírios e paralisia. Desta forma o paciente deve ser sedado e mantido longe de ruídos e luminosidade sob cuidado intensivo (KOTAIT; CARRIERI; TAKAOKA, 2009). Por último o paciente desenvolve os sintomas paralíticos o período pode se estender por mais de 30 dias, resultando em coma seguido de morte (DE MATTOS; RUPPRECHT, 2001).

2.5.1 Profilaxia pré-exposição

Devem-se submeter à vacina antirrábica (inativada e produzida em células diploides humanas ou células pulmonares de macaco rhesus) as pessoas que possuem atividades relacionadas ao risco de infecção pelo vírus da raiva. Profissionais e estudantes veterinários, biólogos, zootecnistas, técnicos laboratoriais, viajantes para locais com endemia de raiva *etc.* A norma de profilaxia estabelece três aplicações com 0, 7, e 28 dias, posteriormente 15 dias da última dose deve ser feita sorologia. Quando o título de anticorpos for $<0,5$ UI/ml, faz-se necessário aplicar reforço e auferir nova sorologia. Para profissionais com maior risco a exposição recomenda-se teste sorológico a cada 6 meses (KOTAIT; CARRIERI; TAKAOKA, 2009).

2.5.2 Profilaxia pós-exposição

A vacina é administrada em cinco doses em pessoas expostas a infecção, mesmo aquelas com esquema pré-exposição completos, normalmente associada com soro aplicado a metade da dose no local da lesão e o restante intramuscular. Para que os componentes antivirais possam surtir efeito neutralizando o vírus, é essencial que o mesmo não alcance o sistema nervoso periférico através dos gânglios motores (WUNNER et al., 2007).

2.5.3 Tratamento

O primeiro tratamento testado e sem garantias de sucesso ficou conhecido como Tratamento de Milwaukee. Foi realizado em Jeanna Giese, uma menina de 15 anos, atacada por um morcego. A paciente foi induzida ao coma com suporte intenso para manter as funções vitais e submetida a transfusão de glóbulos vermelhos. A parte medicamentosa envolveu quetamina, midazolan, heparina, ribavirina e amantadina para tentar neutralizar o vírus, além de altas doses de benzodiazepínicos com barbitúricos. O comprometimento neurológico e sequelas deixados pelo vírus

acometeu os membros esquerdos do corpo e foi gradativamente recuperado após intensa fisioterapia (WILLOUGHBY, et al., 2005).

Contudo, a recuperação desta paciente, dentre outros que foi aplicado o mesmo protocolo não altera as esmagadoras estatísticas sobre a raiva, que tem a maior proporção de casos fatais que qualquer outra doença infecciosa já conhecida.

2.6 COMPONENTES DE AÇÃO ANTI-RABV

2.6.1 Ribavirina

Foi sintetizado em 1972, pela química da combinação derivada de 1-Beta-D-Ribofuranosil 1.2.4-Triazole-3-Carboxamide. Ao longo dos anos, através de diversos estudos, mostrou ter promessa como um largo espectro agente antiviral, sendo menos tóxica em forma de aerossol (SIDWELL, 1972).

Outra composição química, ribavirina triacetato, tem demonstrado ser mais eficiente em encefalites virais e contra vírus da dengue. Sua região hidrofóbica permite que permaneça mais tempo nos tecidos e atravesse a barreira encefálica (GILBERT; KNIGHT, 1986). Camundongos inoculados via intracerebral com vírus rábico e posteriormente tratado com ribavirina via intramuscular não obtiveram o efeito positivo no quadro clínico (BUSSEREAU, et al., 1988a). (Appolinario, 2010), também demonstrou que embora em cultivo celular a ribavirina tenha mostrado efeito positivo, quando testada pós-exposição *in vivo* a resposta ao tratamento oral não demonstrou eficácia como tratamento contra o vírus da raiva.

Embora ela atue em algumas viroses, inibindo a replicação pela RNA polimerase, pode ter efeito imunossupressor relacionado a dosagem e período, em respostas primárias e secundárias do sistema imune interferindo diretamente nas funções linfocitárias (POWERS; PEAVY; KNIGHT, 1982)

2.6.2 Amantadina

A amantadina possui um amplo aspecto em tratamentos virais. Em 1964, foi aplicado contra a influenza com testes *in vitro*, sem eficácia virulicida. A adsorção do vírus à membrana celular não é inibida, porém uma vez adsorvido o vírus permanece endocitado de forma infecciosa (HOFFMANN, et al., 1965). Quando foi realizado tratamento pré exposição *in vivo* com intervalo de 30 minutos antes, conferiu maior tempo de sobrevivência aos camundongos (DAVIES, et al., 1964). Em cultivo celular a amantadina inibiu a replicação viral do vírus da raiva, com dose dependente de 250µg/ml (99,9%), (BUSSEREAU; ERMINE, 1983b).

Grande parte dos estudos com a amantadina foi realizado em *in vitro* e com menor eficácia *in vivo*. Contudo, a maior implicação da amantadina é sua interação com o receptor NMDA (N-metil D-Aspartato), induzindo mudanças de conformação da membrana celular da porta do canal externo dos receptores NMDA através da despolarização bloqueando a passagem logo a baixo do canal e interrompendo o fluxo contínuo de íons. Estes receptores ionotrópicos NMDA desempenham um papel fundamental no desenvolvimento neuronal (QIAN; JOHNSON, 2002).

2.6.3 Quetamina

Usado como agente anestésico para procedimentos cirúrgicos, foi aplicada em ensaios de cultivo celular e *in vivo*, visando ação contra replicação viral do vírus da raiva. Em ensaios *in vitro* constatou-se a inibição do vírus em células corticais neurais primárias de rato, 100-1000 vezes, e cerca de 500 vezes após a adsorção do vírus até 4 dias pós-infecção. Em testes *in vivo*, houve uma significativa diminuição da infecção viral em algumas partes do cérebro, como tálamo e córtex. Também possui ação antagonista não competitiva com o canal NMDA, mas na época ofereceu um novo caminho na terapia pós-exposição do vírus da raiva (LOCKHART, et al., 1991). Estudos posteriores mostraram a atuação da quetamina na diminuição da transcrição dos genes N, M e G, e virions extracelular desempenhando ação neural protetiva contra infecção viral (LOCKHART; TORDO; TSIANG, 1992).

2.6.4 BH4

A 6R-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin-BH4 é uma pteridina e participa de vários processos biológicos associados com formação de neurotransmissores, desempenhando função de cofator em importantes sistemas enzimáticos como Fenilalanina, Tirosina e Triptofano hidroxilase presentes em todas as células (OPLADEN, et al., 2011). A presença de BH4 também é essencial como cofator para a produção de óxido nítrico (NO), pelas três isoformas NOS, óxido nítrico sintase neuronal (NOS), óxido nítrico sintase induzida (NOS) e óxido nítrico sintase endotelial (NOS), (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002).

Pacientes com vírus da raiva foi diagnosticado a perda de BH4, e diminuição de neurotransmissores dopaminérgicos, serotoninérgicos associados com quadro de isquemia cérebro vascular, possivelmente relacionada com a deficiência de óxido nítrico sintase neuronal. Entretanto, quando foram suplementados com BH4 os metabolitos de neurotransmissores aumentaram (WILLOUGHBY, et al., 2009).

2.6.5 NOVAS ABORDAGENS

2.6.6 Interferência por RNA

A partir da década de 90, a técnica de silenciamento gênico foi descoberta por meio de plantas (NAPOLI et al., 1990), e Fire e colaboradores (1998), descrevem interferência por RNA (RNAi) na expressão gênica em nematódeo *Caenorhabditis elegans*, mostrando que a interferência em fita dupla de RNA era mais suscetível que a fita simples. Isto norteou caminho para os primeiros trabalhos envolvendo RNAis contra o vírus da raiva.

O primeiro estudo envolvendo RNAi contra RNAm da nucleoproteína do vírus da raiva, através de transfecção, foi realizado por Brandão e colaboradores (2007). Eles demonstraram que a transfecção do RNAi pelo reagente lipofectamina 2000 diminuiu cinco vezes o título viral, deixando claro a importância de estudos *in vivo*.

ONO (201) utilizou *pool* de RNAs como terapia antiviral, que atuou como silenciador gênico pós-transcricional para nucleoproteína *in vitro* e *in vivo*, evidenciando a importância para continuidade nesta linha de tratamento para raiva.

2.6.7 Transfecção de anticorpos

Outra possibilidade inovadora para tentar inibir o vírus em seu estágio pós replicação foi aplicado por Kawai (2012), que demonstrou a possibilidade de introduzir anticorpos Fab-RABV através do reagente de transfecção Lipofectamine-2000, de forma intracelular *in vitro*, inibindo com sucesso quatro diferentes isolados do RABV. Consequente, Castilho e colaboradores (2013) confirmam a eficácia deste mesmo agente de entrega em linhagem celular murina de neuroblastoma (Neuro-2a) e *in vivo* com inibição da replicação viral de 100% nas concentrações de (01 e 0,1 LD50%).

Estudos há décadas evidenciaram uso de anticorpos muito além de sua função primária. Seja para inibir expressão gênica (RIABOWOL, et al., 1988), marcadores de proteínas endógenas (NIZAK, 2003), ou para o desligamento de moléculas de adesão responsáveis pela regulação de neurônios (LESHCHYNS'KA, 2006).

Como mencionado anteriormente, a transfecção de ácidos nucleicos ou proteínas a décadas tem sido usado para o tratamento de desordens genéticas e adquiridas. E neste âmbito as abordagens para transferência de genes com vetores não virais vem substituindo os vetores virais e tem demonstrado um grande avanço no tratamento de muitas doenças neuro-degenerativas (AL-DOSARI; GAO), (MAGUIRE, et al., 2014). Entretanto, devido à altamente seletiva da barreira hematoencefálica (PERSIDSKY, et al., 2006), tratamentos eficazes para combater desordens no SNC dependem principalmente da eficiência do meio de entrega e integridade do composto atingir seu alvo específico (LOCHHEAD; THORNE, 2012). Dentre os vetores não virais incluem a classe como os polímeros catiônicos (poli complexos), lipídios catiônicos (lipo complexo) e polímero catiônico estruturalmente ligado aos lipídios catiônicos formando um (lipopoli complexo) como sistemas de transfecção de DNA, siRNA e miRNA (MIDOUX, et al., 2009).

Frente ao combate contra a fatal encefalite causada pelo vírus da raiva novos métodos estão sendo incorporados na tentativa de frear esta terrível doença. Dentre estas novas estratégias, os vetores sintéticos não virais que a muito tempo já eram

usados para entrega gênica estão representando uma alternativa mais segura aos vetores virais.

Entre estes agentes de transfecção atualmente em uso os lipídios catiônicos são normalmente os mais comumente usados. Este trabalho aborda superficialmente a classe de alguns compostos, porém não é discutido com ênfase as propriedades físico-químicas, macroestrutura e princípios intrínsecos de sua interação com a membrana plasmática. O entendimento da otimização para cada classe desses agentes catiônicos requer amplo conhecimento dos processos biológicos envolvidos na transfecção que envolvem muitas variáveis químicas para cada lipídio ou polímero catiônico. Por isso, não será abordado neste presente estudo.

2.7 AGENTES TRANSFECTANTES CATIÔNICOS

2.7.1 Lipídios catiônicos

Atualmente, centenas de lipídios foram desenvolvidos para a condução de genes, compartilhando características comuns na sua estrutura, com a cabeça carregada positivamente, exibindo uma ou mais cargas que interagem com o grupo fosfato dos ácidos nucleicos por meio de interações eletrostáticas. A cauda varia entre seu tamanho e característica hidrocarboneto alifática o qual determina a fluidez entre a bicamada lipídica. A região Linker está localizada entre os dois domínios cabeça e cauda. Varia entre agrupamentos como éter, éster, amida ou dissulfeto, estes grupos lhe conferem o controle da flexibilidade conformacional, estabilidade e a biodegradabilidade do próprio lipo complexo, importantes para eficiência da transfecção. (ZHI, et al., 2017). Assim como os polímeros catiônicos os lípidos catiônicos também condensam os ácidos nucleicos em partículas menores formando lipo complexos com polaridade positiva e interagem com a membrana celular carregada negativamente, protegendo-os da degradação enzimática o que lhes confere entregar os ácidos nucleicos no citoplasma das células de forma integra (GASCÓN; POZO-RODRÍGUEZ; ÁNGELES, 2013), (GASCÓN; PEDRAZ, 2008).

2.7.2 Polímeros catiônicos

Os polímeros catiônicos, conseguem condensar de forma eficaz polinucleótidos aniônicos, ocultando assim a sua carga negativa formando poli complexos em escala nanométrica carregados positivamente. Os poliésteres biodegradáveis, Poli (ácido láctico co-glicólico) (PLGA) e ácido láctico poli (PLA), são constituídos por unidades de ácido láctico e ácido glicólico ligados através de ligação éster. Normalmente são os polímeros mais usados para a entrega de biomoléculas incluindo os ácidos nucleicos (BASARKAR; SINGH, 2007). O uso de polímeros como (PLGA) e (PLA) tem sido aplicado em suturas, processos de implantes e parafusos ósseos, fixação e reparo em tendões e ligamentos no uso humano (ATHANASIOU; NIEDERAUER; AGRAWA, 1996).

Por meio do trabalho realizado por Kawai (2012), Castilho e colaboradores (2013), foi possível constatar experimentalmente a eficiência de um reagente de transfecção em conduzir anticorpos contra o vírus da raiva intracelularmente. Porém, a efetividade foi constatada quando aplicado *in vitro*. Consequente, essa perspectiva norteou e encorajou este presente estudo em aplicar e avaliar a tecnologia de transfecção de anticorpos para dentro de células neurais em modelo murino *in vivo*.

3 OBJETIVOS

3.1 Avaliar tratamentos de transfecção para entrega de anticorpos de modo intracelular *in vivo* via intracerebral.

3.2 Testar os efeitos da transfecção de anticorpos anti-RABV sobre a letalidade e o período de incubação viral em camundongos infectados por amostra de campo do RABV isolado de cão.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios de transfecção e tratamento foram realizadas no Laboratório de Raiva da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS).

O estudo foi realizado conforme o organograma a seguir.

Figura - 4 Teste de transfecção de anticorpos utilizando conjugado anti-RABV + reagente Pulsin (A), transfecção da fração $F(ab')_2$ anti-RABV + reagente Pulsin seguida de imunofluorescência direta para detecção de IgG equina (B), ambos avaliados 24hr e 48hr com microscopia de fluorescência como traçador de transfecção em SNC de camundongos. Tratamento-1 realizado 48hr p.i. com $F(ab')_2$ anti-RABV + reagente Pulsin, após o período de trinta dias os animais foram submetidos a IFD e PCR (C). Teste de transfecção de anticorpos utilizando conjugado FITC-antibody control protein Genlantis + reagente Bioporter (D), transfecção da fração $F(ab')_2$ anti-RABV + reagente Bioporter seguida de imunofluorescência direta para detecção de IgG equina (E), ambos avaliados 4hr e 6hr através da microscopia de fluorescência como traçador de transfecção em SNC de camundongos. Tratamento-2 realizado 48hr p.i. com $F(ab')_2$ anti-RABV + reagente Bioporter, após o período de trinta dias os animais foram submetidos a IFD e PCR (F).

4.1. CAMUNDONGOS

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem CH3 ROCKEFELLER, recém-desmamados com idade de vinte e um dias, sexo feminino provenientes do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos com água e ração a “*ad libitum*”. T

Todos os procedimentos foram realizados com os camundongos anestesiados com isoflurano.

4.2 ANTICORPOS F(ab')₂ CONTRA RABV

Foi utilizado soro antirrábico constituído de solução isotônica de imunoglobulinas específicas de origem equina (IgG), imunizados com vírus da raiva fixo, amostra PV, replicada em células BHK-21, purificada por digestão enzimática não pirogênica, contendo a fração F(ab')₂, produzido e cedido pela FUNED (Fundação Ezequiel Dias) de Minas Gerais, contendo 200/UI por mL. A concentração final de proteínas utilizada para as diluições foi de 11.827µg/ml, aferido em equipamento nanodrop 2000.

4.3 VÍRUS

Foi utilizada amostra isolada de cão do Brasil (IP3629/11), variante antigênica 2 (AgV2), cedida pela Seção de Diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur, com título 10^{3,8} em suspensão a 20% e armazenada a -80° C:

4.4 CONJUGADO ANTI-RABV

Para teste de transfecção, bem como para a pesquisa da presença de antígenos de RABV nos animais experimentais com imunofluorescência direta, foi utilizado o conjugado antinucleocapsídeo de RABV com imunoglobulinas totais marcadas com

isotiocianato de fluoresceína, produzido a partir de soro hiperimune de coelhos imunizados com a cepa PV, fornecido pelo Instituto Pasteur de São Paulo, com título igual a 100 (T=100).

4.5 CONJUGADO ANTI-IgG EQUINA

Para avaliação da transfecção de F(ab')₂ equina contra RABV por imunofluorescência direta, foi utilizado Anti-Horse IgG (whole molecule)-FITC antibody (Sigma-Aldrich).

4.6 TESTE DE TRANSFECÇÃO DO CONJUGADO ANTI-RABV COM REAGENTE PULSIN® (POLYPLUS) *IN VIVO*

Para avaliar a eficiência da transfecção intracelular previamente ao teste antiviral propriamente dito, utilizou-se o conjugado anti-RABV como transfecto (apenas como marcação de transfecção, sem envolvimento de vírus da raiva) e o reagente comercial de transfecção de proteínas Pulsin® (Polyplus).

Inicialmente foi preparada a diluição do conjugado a 1:100 em água ultrapura Mili-Q® em volume de 1mL. Em seguida, para cada 1µg de proteína de conjugado foram adicionados 100 µL Hepes 20 mM pH 7,4 e 4 µL Pulsin® (Polyplus), seguindo-se homogeneização em vortex suavemente e incubação por 15 minutos a temperatura ambiente, conforme recomendações do fabricante.

Logo em seguida, dois camundongos (grupo transfectado) foram inoculados por via intracerebral, utilizando seringa de 0,5 mL, BD Ultra-Fine para insulina, agulha 8mm/30G, na dose de 0,03 mL da solução Pulsin+ Conjugado anti-RABV, enquanto que em outros dois camundongos (grupo controle) foram inoculados do mesmo modo 0,03 mL de solução contendo 1 µg de proteína de conjugado, 100 µL Hepes 20 mM, pH 7,4 e 4 µL MEM em substituição ao Pulsin, previamente combinados e mantidos por 15 minutos a temperatura ambiente.

A cada 24hr, um animal por grupo foi eutanasiado, sendo o encéfalo processado em corte sagital e utilizado para realizar impressão por fragmentos de tecido em

lâmina para microscopia. Em seguida, as lâminas foram fixadas em acetona a -20°C por 2 horas.

Para eliminar os resíduos de conjugado, foram realizadas duas lavagens sucessivas de 5 minutos com solução 1X PBS PO_4 0,01 M, NaCl 0,14 M, pH 7,4, e uma vez com água destilada a 5 minutos. Após secas em temperatura ambiente, as lâminas foram cobertas com glicerina tamponada (pH 8.4) e lamínula para observação direta em microscópio de fluorescência com aumento de 200 x modelo OLYMPUS® BX53.

Foram consideradas transfectadas as amostras que apresentassem fluorescência intracitoplasmática.

4.7 TESTE DE TRANSFEÇÃO F(ab')_2 ANTI-RABV COM REAGENTE PULSIN® (POLYPLUS) *IN VIVO*

Para a avaliação da eficácia de transfecção da fração F(ab')_2 anti-RABV em sistema nervoso central de camundongos, foi realizado o protocolo de transfecção com Pulsin® (Polyplus) e F(ab')_2 seguida de imunofluorescência direta para detecção de IgG equina.

Inicialmente foi preparada a diluição da fração F(ab')_2 anti-RABV em concentração final de $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína, aferida no equipamento Nanodrop 2000®. As diluições foram preparadas de acordo com protocolo de otimização do fabricante contendo 2 μg de F(ab')_2 , 100 μL Hepes 20 mM, pH 7,4, para volumes de 2 μL , 3 μL e 4 μL de PULSIN® (Polyplus) e 4 μg de proteína de F(ab')_2 anti-RABV, 100 μL Hepes 20 mM, pH 7,4 para volumes de 2 μL , 3 μL e 4 μL de Pulsin® (Polyplus), previamente combinados e mantidos por 15 minutos a temperatura ambiente.

Em seguida, dois camundongos para cada reação (grupo transfectado) foram inoculados por via intracerebral, utilizando seringa de 0,5 mL, BD Ultra-Fine para insulina, agulha 8mm/30G na dose de 0,03 mL.

Em outros dois camundongos para cada uma das reações (grupo controle) foram inoculados por via intracerebral, utilizando seringa de 0,5 mL, BD Ultra-Fine para insulina, agulha 8mm/30G, na dose de 0,03 mL de solução contendo 2 μL de NaCl 9%, 100 μL Hepes 20 mM, pH 7,4 para volumes de 2 μL , 3 μL e 4 μL de Pulsin® (Polyplus), e 4 μL de NaCl 9%, 100 μL Hepes 20 mM, pH 7,4 para volumes de 2 μL , 3

μL e 4 μL de Pulsin[®] (Polyplus), previamente combinados e mantidos por 15 minutos a temperatura ambiente. A cada 24hr, um animal de cada grupo tratado e controle foram eutanasiados, sendo o encéfalo retirado e armazenados a temperatura de -20°C.

Posteriormente, cada encéfalo congelado foi processado em criostato LEICA CM 1860 UV, com cortes na espessura de 10 micrômetros para realizar-se impressão por fragmentos de tecidos em lâmina de microscopia. Em seguida, as lâminas foram fixadas em acetona a -20° por 2 horas.

Após a secagem, foi aplicado sobre as lâminas o conjugado anit-IgG equina, diluído na proporção de 1:50, brevemente homogeneizado e centrifugado 12.000 g/5min; então, as lâminas foram incubadas a 37°C/30min.

Para eliminar os resíduos de conjugado, foram realizadas duas lavagens sucessivas de 5 minutos com solução 1X PBS PO⁴ 0,01M, NaCl 0,14M, pH 7,4, e uma vez com água destilada a 5 minutos. Após secas em temperatura ambiente, as lâminas foram cobertas com glicerina tamponada (pH 8.4) e lamínula para observação direta em microscópio de fluorescência com aumento de 200 x modelo OLYMPUS[®] BX53.

4.8 TESTE DE TRANSFEÇÃO DA F(ab')₂ ANTI-RABV COM BIOPORTER[®] PROTEIN DELIVERY REAGENT *IN VIVO*

Para a avaliação da eficácia de transfecção da fração F(ab')₂ anti-RABV em sistema nervoso central de camundongos, foi realizado o protocolo de transfecção com BioPORTER[®] Protein Delivery Reagent e F(ab')₂ anti-RABV seguido de imunofluorescência direta para detecção de IgG equina.

Primeiramente, Bioporter[®] Protein Delivery Reagent (Genlantis) liofilizado foi ressuspenso com 250 μL de clorofórmio, sendo em seguida homogeneizado levemente em vortex de 10 a 20s.

Cinco μL de Bioporter[®] previamente eluido em clorofórmio foram distribuídos em três tubos de 1,5 ml e aguardou-se aproximadamente 2 hr em temperatura ambiente até que o solvente evaporasse totalmente.

O F(ab')₂ anti-RABV foi diluído em Hepes 20 mM, pH 7,4 para o uso nas concentrações de 50 e 250 $\mu\text{g/mL}$ de proteína total, então utilizadas para hidratar a

formulação do Bioporter® seca para cada tubo em volume de 100 µl, sendo que, para o terceiro tubo, foi utilizado o mesmo volume de FITC-antibody control protein (Genlantis), um controle positivo de transfecção constituído por IgG marcada com fluoresceína que acompanha o kit Bioporter conforme recomendação do fabricante, seguindo-se incubação a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Uma vez que este kit trazia seu próprio conjugado para avaliação de transfecção, não foi utilizado como traçador de transfecção o conjugado anti-RABV como descrito no item 3.6.

A seguir, dois camundongos para cada uma das três soluções foram inoculados por via intracerebral, utilizando seringa de 0,5 mL, BD Ultra-Fine para insulina, agulha 8mm/30G, na dose de 0,03 mL. Em seguida, um animal de cada grupo foi eutanasiado as 4 e 6hr pós-inoculação, sendo o encéfalo retirado e armazenados a temperatura de -20°:

Posteriormente, cada encéfalo congelado foi processado em criostato LEICA CM 1860 UV, com cortes na espessura de 10 micrômetros para realizar-se impressão por fragmentos de tecidos em lâmina de microscopia, em seguida fixados em acetona a -20° por 2 horas.

Para as lâminas referentes aos camundongos inoculados com F(ab')₂ anti-RABV 50 e 250 µg/mL, foi realizada a imunofluorescência direta com conjugado anti-IgG equina como descrito no item 3.7, enquanto que as lâminas referentes aos camundongos transfetados com FITC-antibody control protein Genlantis foram observadas diretamente após a fixação

4.9 TRANSFECÇÃO DE ANTICORPOS F(ab')₂ anti-RABV ANTI-RABV COMO TRATAMENTO ANTIVIRAL *IN VIVO*

Após a realização do teste de transfecção, para cada reagente foi realizado um tratamento antiviral com F(ab')₂ anti-RABV, os dois sob o modo de duplo-cego.

Cinquenta camundongos foram inoculados pela via intracerebral no córtex frontal com 30 µL da amostra de RABV +BV, contendo 10 DL₅₀%. Após 48 de incubação, foram realizados dois tratamentos:

Para o Tratamento 1, foram combinados 180 µl de F(ab')₂ anti-RABV com 360 µl de Hepes 20 mM pH 7,4 vortex suavemente e adicionados 60 µl de Pulsin® (Polyplus), seguindo-se vórtex e spin.

A solução foi incubada durante 20 minutos à temperatura ambiente, inoculando-se 30 µl da mesma por via intracerebral em quinze animais destinado ao grupo tratado. No mesmo momento, para o grupo controle (n=15 animais) foram combinados 180 µl de MEM (em substituição a F(ab')₂ anti-RABV) em 360 µl de Hepes 20 mM, pH 7,4 adicionados de 60 µl de Pulsin® (Polyplus)

Para o Tratamento 2, o reagente Bioporter® após secagem total do clorofórmio foi ressuspensão em 400 µl de Hepes 20 mM, pH 7,4 contendo F(ab')₂ anti-RABV em concentração final de 250 µg/mL.

A solução foi então homogeneizada levemente por 10 a 20s e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, inoculando-se 30 µL da mesma por via intracerebral em dez animais para o grupo tratado. Em seguida, para o grupo controle (n= 10 animais) foram utilizados 400 µL de Hepes 20 mM, pH 7,4 contendo F(ab')₂ anti-RABV em concentração final de 250 µg/mL.

Os animais foram observados por um período de 30 dias quanto ao aparecimento de sinais de raiva (anorexia, piloereção, hiperestesia, agressividade, paralisia e morte). Os sobreviventes após este período foram eutanasiados e submetidos a PCR e IFD.

O número diferente de animais utilizados para os Tratamentos 1 e 2 justifica-se pelo fato de os mesmos terem sido realizados em momentos diferentes, nos quais a disponibilidade de camundongos não era a mesma. Entretanto, foram descritos em conjunto neste item para fins de maior clareza textual.

4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO REAGENTE BIOPORTER® SOBRE O RABV

Mediante os resultados obtidos após o teste de transfecção de anticorpos anti-RABV como tratamento antiviral *in vivo* (item 5.4), o experimento a seguir foi realizado com o objetivo de diferenciar entre efeito antiviral do F(ab')₂ anti-RABV transfectado e algum possível efeito antiviral do próprio agente de transfecção Bioporter®.

Vinte camundongos foram submetidos a infecção com a suspensão viral da amostra DOG-IP3629/11 por via intracerebral no córtex frontal em volume de 30µL, contendo 10 DL₅₀%.

Após 48hr, O reagente Bioporter liofilizado em volume de 25 µL foi ressuspenso em 400 µl de Hepes 20 mM, pH 7,4, homogeneizado levemente por 10 a 20s e incubado por 5 min a temperatura ambiente, inoculando-se 30 µL da mesma por via intracerebral em dez animais destinado grupo teste.

Paralelamente, para o grupo controle foi usado somente Hepes 20 mM, pH 7,4 como solução inoculada em volume de 30 µl por via intracerebral em dez animais.

Os animais foram observados durante 30 dias, verificando a presença de sintomas como anorexia, pelos eriçados, agressividade, paralisia e morte. Os sobreviventes após este período foram eutanasiados e submetidos a IFD e PCR.

4.11 TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

A técnica usada para detecção de antígenos de RABV foi realizada conforme descrito Gowasser, Kissling (1958), e modificado por Dean, Abelseth e Atanasiu (1996) com conjugado anti-nucleocapsídeo do vírus da raiva, produzido a partir de soro hiperimune de coelhos imunizados com o vírus PV (cedido pelo Instituto Pasteur). Foram consideradas positivas as amostras com fluorescência intracitoplasmática em qualquer área da impressão ou corpúsculos de Negri.

4.12 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT-PCR) PARA RABV

Para as amostras negativas por Imunofluorescência Direta para RABV, foi realizada a RT-PCR para detecção da presença de RABV como teste confirmatório.

Foi realizada a extração de RNA total a partir do fragmento de Sistema Nervoso Central (SNC) de cada amostra utilizando o TRIzol (Invitrogen *Life Technologies*®), conforme as instruções do fabricante. Para controle positivo e negativo, foram

utilizados SNC de cérebros de camundongos inoculados com RABV e não-inoculados, respectivamente.

Para a reação de transcrição reversa (RT), 3,5 µL de RNA total extraído foi desnaturado a 95°C/5 minutos e adicionado 1X *First Strand*® *Buffer* (Life Technologies), 1mM de dNTPs, 10mM de DTT, 25 ng de primer randômicos, 100U de M-MLV *Reverse Transcriptase*® (Life Technologies) e 1 µL de água tratada com DEPC estéril para um volume final de 10 µL, realizando a transcrição reversa a 37°C por 60 minutos.

A seguir, foi realizada a reação de PCR adicionando, 2,5 µL de cada respectiva amostra de cDNA ao mix de PCR contendo 1,25 U de *Platinum*® *Taq DNA Polymerase* (Life Technologies), 1X *PCR Buffer*® (Life Technologies), 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de cada *primer* 504 e 304 (ASANO, 2014), 1,5 mM de MgCl₂, água tratada com DEPC q.s.p. volume final de 25 µL, levado ao termociclador e submetidos ao ciclo de 94°C/3min para desnaturação inicial da fita dupla de cDNA, seguida de 35 ciclos de 94°C/20s, 37°C/45s, 72°C/45s, terminando com um ciclo de 72°C/7min.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose em 1,5%, em tampão TBE 1X (0,1M de Tris, 0,09M de ácido bórico e 0,001M de EDTA), contendo SYBR® Safe DNA.

Foram consideradas positivas as amostras que resultaram em fragmentos de 250 pares de bases (pb) para o gene N.

Quadro – 1 Relação dos *primers* utilizados na reação da PCR

<i>Primers</i>	Sentido	Sequência	Gene
504	Senso	5' TATACTCGAATCATGATGAATGGAGGTCGACT 3'	N
304	Antisenso	5' TTGACGAAGATCTTGCTCAT3'	N

4.13 ANÁLISE DOS RESULTADOS

A tabulação dos dados foi realizada no programa Microsoft Excel® 2010, aferindo a letalidade pela confecção de curvas de sobrevivência, comparando-se os

dias da primeira morte por raiva e a frequências de animais mortos ao final do experimento, baseando-se a definição de caso de raiva em positividade por imunofluorescência direta ou PCR.

Para a análise estatística foi utilizado teste de Fisher com $\alpha = 0,05$ com o aplicativo *Fisher Exact Test Calculator* on line¹.

1 Disponível em: < <https://www.socscistatistics.com> >

5 RESULTADOS

Seguindo a ordem metodológica, seguem os seguintes resultados.

5.1 TESTE DE TRANSFEÇÃO DO CONJUGADO ANTI-RABV COM REAGENTE PULSIN® (POLYPLUS) *IN VIVO*

Para os dois camundongos que sofreram o teste de transfecção com conjugado anti-RABV sem o uso de Pulsin e eutanasiados 24h e 48h após a inoculação, não foi observada fluorescência através dos fragmentos de tecidos fixados em lâmina de microscopia (Figura 4A), similarmente ao que se encontra em um sistema nervoso central de camundongo que não recebeu nenhuma inoculação (Figura 4B).

Para o Grupo tratado, inoculado com conjuntado anti-RABV associado a Pulsin, 24h após a transfecção, igualmente ao grupo controle, não foi encontrada fluorescência intracitoplasmática.

Já em 48h após a transfecção, foi possível visualizar inclusões em partes intracitoplasmáticas mostrando alguns pontos fluorescentes com baixa intensidade (Figura 4C).

Figura - 4 Teste de transfecção de anticorpos utilizando conjugado anti-RABV como traçador de transfecção em sistema nervoso central de camundongos. A: 48hr após inoculação de MEM + conjugado, com ausência de fluorescência. B: camundongo não inoculado. C: 48hr após inoculação de conjugado+ Pulsin, com focos fluorescentes distribuídos no citoplasma. Aumento de 200x.

5.2 TESTE DE TRANSFEÇÃO F(ab')₂ ANTI-RABV COM REAGENTE PULSIN[®] (Polyplus) *IN VIVO*

O teste de imunofluorescência direta com conjugado anti-IgG equina foi negativo para os sistemas nervosos centrais dos camundongos amostrados 24 e 48hr após o teste de transfecção com a F(ab')₂ anti-RABV. Todos os camundongos que sofreram o teste de transfecção não demonstraram reação ao teste ou comportamento anormal que indicasse como origem a inoculação.

5.3 TESTE DE TRANSFEÇÃO De F(ab')₂ ANTI-RABV COM BIOPORTER[®] PROTEIN DELIVERY REAGENT *IN VIVO*

A técnica de fluorescência realizada com impressão por fragmentos de tecidos em lâmina de microscopia mostrou ausência de focos fluorescentes utilizando-se conjugado anti-IgG equina para os camundongos inoculados com o complexo F(ab')₂ anti-RABV + Bioporter nas concentrações de 50 e 250 µg/mL e Bioporter, bem como para os controles negativos, para os períodos pós-inoculação de 4 e 6hr.

Entretanto, para a impressão de sistema nervoso central dos camundongos que foram inoculados com FITC-controle Bioporter[®] como traçador de transfecção, sem o uso de F(ab')₂ ou de reação de imunofluorescência, eutanasiados 4h e 6h após a inoculação, evidenciaram-se focos fluorescentes intracitoplasmáticos pela microscopia de fluorescência em alguns pontos teciduais delimitados, evidenciando transfecção (Figura 5).

Figura - 5 Teste de transfecção de anticorpos utilizando conjugado FITC-antibody control protein Genlantis como traçador de transfecção em sistema nervoso central de camundongos, mostrando focos fluorescentes no citoplasma A e B: 4h após inoculação do conjugado + Bioporter. C: 6h após inoculação do conjugado + Bioporter. Aumento de 200x.

5.4 TRANSFEÇÃO DE ANTICORPOS $F(ab')_2$ anti-RABV COMO TRATAMENTO ANTIVIRAL *IN VIVO*

Os protocolos de tratamento descritos a seguir foram realizados em modo duplo cego.

Para o Tratamento 1, no grupo tratado com a $F(ab')_2$ anti-RABV + Pulsin®, houve sobrevivência de 20%, enquanto que no grupo controle a mesma foi de 26,6% (Figura 6). Todos os animais mortos foram positivos para imunofluorescência direta para RABV, sem diferença na intensidade da fluorescência entre os grupos.

Para ambos os grupos, o início dos sintomas deu-se no mesmo momento (5º dia p.i.) no grupo tratado e controle demonstrando a doença seguido de morte até o 9º e 13º dia; para o grupo tratado e controle, respectivamente.

Os sinais clínicos observados foram anorexia, piloereção, arqueamento de dorso, e paralisia de membros antes do óbito. Trinta dias após a inoculação viral, todos os animais sobreviventes foram eutanasiados, tendo sido negativos por imunofluorescência direta e RT-PCR para RABV

Comparando-se os grupos tratado e controle pelo teste de Fisher, não houve diferença significativa com ($p= 1$).

Figura – 6 Sobrevivência dos camundongos inoculados com amostra de RABV DOG-(IP3629/11) 10 DL 50% em dose de 30 nl, Azul: Grupo tratado 48hr p.i., com a $F(ab')_2$ anti-RABV + Pulsin®; laranja: Grupo controle, inoculado 48hr p.i. com MEM + Pulsin®.

Após o Tratamento 2, os camundongos do grupo controle tiveram início de sintomas para raiva aos 5 dias p.i. Cerca de 90% dos camundongos manifestaram sintomas de 2 a 3 dias, seguido de morte, com apenas um camundongo não apresentando sintomas ao longo de todo o experimento, resultado em mortalidade de 90%. Somente um camundongo apresentou sintomas tardiamente, aos 9 dias p.i., consolidando sobrevivência de 10% (Figura 7).

Todos os animais mortos foram positivos para imunofluorescência direta para RABV, sem diferença na intensidade da fluorescência entre os grupos.

Trinta dias após a inoculação viral, todos os animais sobreviventes foram eutanasiados, tendo sido negativos por imunofluorescência direta e RT-PCR para RABV.

Por sua vez, no grupo tratado, a sobrevivência foi de 70% ao final dos 30 dias de observação, notando-se, ainda, o início dos sintomas apenas a partir do 7º p.i., com diferença significativa quando comparado ao grupo controle pelo teste exato de Fisher ($p < 0,0198$).

Figura – 7 Sobrevivência dos camundongos inoculados com amostra de RABV DOG-IP3629/11 em dose de $10^{3,8}$ DL50%/30µL. Azul: Grupo tratado 48hr p.i., com a $F(ab')_2$ + Bioporter®; laranja: Grupo controle, inoculado 48hr p.i. com MEM + Bioporter®.

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO REAGENTE BIOPORTER® SOBRE O RABV

Tanto no grupo controle, inoculado apenas com sais de Hepes, quanto para o grupo tratado com Bioporter, ambos 48h após inoculação com RABV, houve início de sintomas compatíveis com raiva a partir do 5º dia p.i., com os camundongos vindo a óbito 24hr após o início dos sintomas, resultando em sobrevivências de 50 e 20%, respectivamente, sem diferença significativa como demonstrado pelo teste de Fisher ($p= 0,3498$).

Todos os animais mortos foram positivos para imunofluorescência direta para RABV, sem diferença na intensidade da fluorescência entre os grupos.

Trinta dias após a inoculação viral, todos os animais sobreviventes foram eutanasiados, tendo sido negativos por imunofluorescência direta e RT-PCR para RABV.

Figura – 8 Sobrevivência dos camundongos inoculados com amostra de RABV DOG-IP3629/11 em dose de 10 DL50%/30µL. Azul: Grupo tratado 48hr p.i., com Bioporter®; laranja: Grupo controle, inoculado 48hr p.i. com sais de Hepes.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, a transfecção do conjugado anti-RABV com reagente Pulsin ® foi efetiva após 48 hr, contudo sua eficiência em carrear o conjugado anti-RABV foi baixa, sendo detectado somente em regiões delimitadas do fragmento tecidual fixado. De maneira inversa, em trabalho realizado com células murinas de neuroblastoma (Neuro-2a) empregando o mesmo conjugado a eficiência foi maior, contudo, o reagente de transfecção utilizado foi a Lipofectamina 2000, atestando a viabilidade de transfecção deste conjugado por meio de agentes catiônico (KAWAI, 2012).

Em outros estudos, o reagente Pulsin transfectou com sucesso proteínas (WEILL et al., 2008a); (NAKAHIRA, et al., 2010), incluindo anticorpos (WEILL; BIRI; ERBACHER, 2008b) confirmando as entregas *in vitro* em apenas 4hr horas após a transfecção, diferente do resultado deste presente trabalho realizado *in vivo*.

A rápida e eficiente internalização de anticorpos transfectados pelo reagente R8-GALA-Lip (IgG), é outro exemplo de como anticorpos podem ser internalizados em minutos com entrega total no citoplasma em menos de 1 hr, em sistema *in vitro* (YAMADA, et al., 2014). O resultado destes trabalhos, no entanto, contrasta com a baixa e lenta transfecção *in vivo* dos lipo complexos formados por Pulsin/conjugado anti-RABV aqui apresentados e corrobora com outros trabalhos anteriores, que indicaram a baixa eficiência deste sistema de transfecção *in vivo* (REHMAN; ZUHORN; HOEKSTRA, 2013), mesmo quando foi usado DNA como molécula, o qual favorece a alta interação eletrostática devido ao seu grupo fosfato (NICULESCU-DUVAZ; HEYES, SPRINGER, 2003).

Neste estudo, a técnica de IFD usada com conjugado anti-IgG equina para o teste de transfecção da F(ab')₂ anti-RABV com reagente Pulsin ® realizado em 24-48hr e Bioporter ® realizado 4-6hr após sua injeção intracerebral não apresentaram fluorescência, o que pode indicar que (a) a transfecção da F(ab')₂ anti-RABV ocorreu com baixa eficiência, (b) a sua dispersão intracitoplasmática evita grandes agrupamentos de acúmulos da F(ab')₂ anti-RABV, desta maneira a fluorescência do conjugado anti-IgG equina é inibida pela microscopia de fluorescência caso esteja

associado a $F(ab')_2$ anti-RABV e (c), o resultado pode estar relacionado a falta de afinidade do conjugado anti-IgG equina pela fragmentação da IgG-anti-RABV.

Se este último for o caso, a ausência de fluorescência deve ser resultado da purificação da $F(ab')_2$ anti-RABV pela digestão enzimática da pepsina, que produz dois fragmentos de $F(ab')_2$ ligados por ponte dissulfeto, o qual reduz o seu peso molecular da IgG de 160 kDa para 90 a 100 kDa, eliminando da molécula a fração Fc responsável pela ativação do sistema complemento por via clássica.

Curiosamente, no trabalho realizado por Weill e colaboradores (2008a), dentre os três anticorpos transfectados *in vitro* pelo reagente Pulsin®, o único que não demonstrou a sinalização esperada foi a IgG anti-camundongo, visto que um anticorpo secundário extravasou rapidamente do citoplasma quando as células foram tratadas com digitonina (solubilizante de lipídeos) revelando que não estava ligado a qualquer alvo, enquanto os anticorpos primários permaneceram dentro do citoplasma por 15 minutos.

Este resultado ajuda a apoiar a hipótese (b), em que a dispersão da $F(ab')_2$ anti-RABV no citoplasma implique na não visualização de sua localização através da sinalização pelo conjugado anti-IgG equina realizado pela técnica de IFD.

DIDENKO; NGO; BASKIN, (2005) transfectaram anticorpos anti-lâmina nucleares usando o reagente de transfecção Polyethyleneimine (PEI), detectado intracelularmente em 4hr e com forte sinal depois de 24hr, sinalizado por um anticorpo secundário em cultivo celular de fibroblastos humanos. Anticorpos contra a lâmina nuclear poderiam ser uma alternativa para o uso do conjugado anti-RABV para validação dos reagentes neste estudo. Mas não validaria a presença da $F(ab')_2$ anti-RABV intracelular a qual implicaria em proteínas viral no citoplasma para se ligar.

Segundo Ho; White; Pouton (2018), a microscopia por fluorescência depende da detecção do fluoróforo acima do seu limite efetivo de detecção. E, eventualmente, falsos negativos podem acontecer ao tentar estudar a dispersão de moléculas marcadas com fluoróforo, de modo que um baixo nível de fluorescência poderia refletir a ausência naquela área de tecido ou um alto grau de dispersão diminuiria a fluorescência a ponto de não ser distinguida da autofluorescência do próprio tecido fixado na lâmina.

Embora não tenha sido detectada a fluorescência pelo conjugado anti-IgG equina, a fluorescência do FITC-controle Bioporter® foi observado em 4-6 hr pós transfecção, com focos fluorescentes delimitados a um determinado campo em que o

fragmento de tecido foi fixado, similar ao descrito em outros estudos com períodos de 4-24 hr para a captação celular e liberação do complexo no citoplasma (DIDENKO; NGO; BASKIN, 2005); (LEE, et al., 2010). Importante ressaltar que a visualização através da técnica de IFD com conjugado anti-IgG equina somente permite confirmar a entrega do agente no citoplasma, massa não a liberação do endossoma.

Contudo, a abundância do FITC-controle Bioporter®, produto da transfecção, possibilitou a confirmação de entrega pelo reagente, mesmo que intracelularmente não fosse encontrado alvo específico. Isso levanta uma questão, sobre a baixa eficiência da transfecção do conjugado anti-RABV pelo reagente Pulsin® a qual foi visualizado. Pressupõe-se que a eficiência de entrega por este reagente é efetiva somente quando realizada em *in vitro*.

Como mostrado nos resultados, o tratamento-1, a transfecção de F(ab')₂ anti-RABV realizado 48 hr p.i. como método de inibição contra RABV através do reagente Pulsin® tinha sido eficiente, o que condiz com a baixa eficiência na transfecção do conjugado anti-RABV.

Uma vez que, a eficácia do tratamento pós-exposição diminui progressivamente quando iniciada tardiamente, a atuação dos anticorpos ainda é significativa caso o tratamento seja realizado nas primeiras 24hr. Neste estágio inicial, o tratamento com anticorpos realizado diretamente no SNC ainda pode prevenir ou postergar a disseminação para o restante do cérebro. Em fases posteriores, nenhuma proteção é efetiva, pois o vírus se espalhou por partes maiores do cérebro (TERRY, 2016)

Terry (2016), em seu trabalho optou pela via de infecção com RABV intranasal e verificou que em 24hr o vírus já se encontrava no bulbo olfatório e em 48 hr era possível encontrar RNA viral no diencéfalo, até a infecção chegar ao cerebelo em 72 hr. A metade dos camundongos tratados 24 hr p.i. com os menores fragmentos funcionais de camelídeos (VHH-15kDa), também chamados Nanobodies® foram capazes de prolongar a sobrevivência ou inibir a replicação viral dos camundongos.

Comparando a inoculação intranasal com a intracerebral realizada na parte frontal do cérebro neste presente estudo, pode-se pressupor que em 24 hr o vírus já havia se espalhado difusamente para todas regiões do cérebro e segundo Terry (2016), o tratamento com Nanobodies® é incapaz de conter a infecção do vírus célula-célula. Isto poderia explicar o resultado do tratamento-1 caso houvesse a

transfecção da $F(ab')_2$ anti-RABV pelo reagente Pulsin ® a cobertura pelo inoculo seria insuficiente para inibir a replicação em outras áreas do encéfalo.

Porém, de maneira inversa, o tratamento-2 realizado 48 hr com o reagente Bioporter ®, 70% dos camundongos do grupo tratado se mostraram sadios após a infecção viral, sugerindo uma intensa inibição do vírus pela $F(ab')_2$ anti-RABV e, ademais, houve o aumento da sobrevivência em 48 hr para o restante dos camundongos que vieram a óbito (Figura 4).

A possibilidade do reagente Bioporter ® contribuir com a ação antiviral em conjunto com a $F(ab')_2$ anti-RABV necessitou de uma investigação adicional. Ao testar-se esta possibilidade, o reagente Bioporter ® foi inoculado em camundongos no SNC sem adição de $F(ab')_2$ anti-RABV. Esta abordagem levou ao resultado de 50 e 20% de sobrevida entre o grupo tratado com Bioporter ® e sais de Hepes, respectivamente, sem diferença significativa ($p= 0,3498$), demonstrando que o efeito inibitório do tratamento-2 foi decorrente apenas da ação neutralizante da $F(ab')_2$ anti-RABV.

Neste estudo, conseguiu-se transfectar a $F(ab')_2$ anti-RABV usando uma única inoculação intracerebral com ótimo resultado. Entretanto, é possível que sucessivas inoculações através de bomba osmótica introduzida no SNC aumentem a eficiência do agente quando comparado a uma única injeção (MALMEVIK, et al., 2014).

Estudos usando cirurgia extereotóxica demonstram a eficiência para a entrega de drogas via ventricular sendo uma rota segura (COHEN-PFEFFER, et al., 2016). Trabalho realizado com o agente de transfecção jetSI Polyplus ® transfetou siRNA via intraventricular, afim de modular a expressão do gene Transtirretina (TTr) após a inserção de próteses neurais diminuindo de forma significativa a expressão para (TTr) notado durante uma semana (SMITH, et al., 2012).

O uso desta técnica exigiria modificações na metodologia do presente trabalho, mas que eliminariam as diferenças da localização entre o ponto de inoculação viral e aquele utilizado para injeção do tratamento, permitindo aumentar a eficiência da transfecção no foco da replicação viral. Por outro lado, a inoculação cerebral intraventricular abrangeria com maior eficiência todo encéfalo, já que o líquido cefalorraquidiano (LCR), é encarregado pelo transporte de hormônios, anticorpos, linfócitos ao tecido nervoso, nutrição e eliminação dos resíduos metabólicos neurais.

Embora, o camundongo ou rato usado como modelo eletivo para tais fins suporte muito bem o procedimento da cirurgia extereotóxica (MESSIER; ÉMOND;

ETHIER, 1998), outras implicações limitam o uso para o tratamento contra a raiva. Uma delas é a rápida expressão da patogenia produzida pelo vírus da raiva, que diminui consideravelmente qualquer suporte terapêutico para esses roedores durante a fase aguda da morbidade, já que o curso clínico relativo a maioria dos isolados do vírus da raiva em camundongos tem um período muito curto, entre (5 a 6 dias) p.i., dificultando a realização do tratamento pós-exposição.

Modelos poucos convencionais como ferret (*Mustela putorius*), sobreviveu cem dias p.i. mas, ao longo do curso clínico da doença, demonstrou-se severa perda de peso corporal (1,4 a 1,0 kg) e incapacidade de comer e beber, (HAMIR; NIEZGODA; RUPPRECHT, 2011).

O desenvolvimento de um tratamento definitivo para a raiva requer um modelo animal apropriado seguido por ensaios clínicos controlados, pois até mesmo em casos de raiva humana as complicações secundárias como desnutrição e anemia podem levar o paciente à óbito depois do *clearance* viral no SNC (RUBIN, 2009).

Alguns autores alternativamente optam pelo uso de hamster, no qual o período de incubação é muito maior (10 a 14 dias), permitindo a aplicação de tratamento p.i. (SCHUMACHER; RUPPRECHT; KOPROWSKI, et al., 1989).

Embora a depuração de RABV seja dependente de anticorpos, outros mecanismos são direcionados ao SNC, por exemplo, células T, que contribuem para o controle da replicação do vírus. Animais deficientes em células B, porém com função intacta para células T, mostram uma forte inibição na replicação viral no SNC, e apesar de não eliminarem o vírus, sobreviveram por período prolongado (HOOPER, et al., 2011).

Segundo Hooper et al., (2009), as infecções no SNC são contidas pela ação de diversos efetores imunes como anticorpos, células-T citotóxica e fatores solúveis que estão envolvidos na geração e controle da resposta imune como IFNs tipo-1. No entanto, após a infecção cerebral por um patógeno, a expressão do MHC II é surpreendentemente regulada positivamente em aproximadamente 90% pelas células da glia, inclusive em áreas difundidas distais à infecção viral. Em murinos a infecção cerebral demonstra a ativação prolongada da micróglia associada à presença contínua de células T de memória de longa duração no cérebro.

Assim, está claro que este pequeno número de células-T de memória de longa duração pode adiantar o controle da reinfecção ou reativação de patógenos no SNC

direcionando células imunes inatas como a micróglia (PRASAD; LOKENSGARD, 2018).

Embora a imunidade celular e IFNs possam diminuir a carga viral, ainda assim é atribuído aos anticorpos o papel fundamental no controle da maioria das infecções virais do SNC, se não de todas. Dietzschold e colaboradores (1992), também confirmaram o *clearance* viral no SNC, em ratos infectados via intranasal com RABV e tratado por via intramuscular com anticorpos monoclonais neutralizantes. Curiosamente, o cultivo celular demonstrou que as células infectadas haviam endocitado esses anticorpos sem a necessidade de agentes carreadores, sugerindo que além da neutralização viral célula-célula, possuíam atividade protetiva inibindo a replicação do RNA.

A alta especificidade neutralizante de anticorpos como a F(ab')₂ anti-RABV foi demonstrado em células N2A inoculadas com os isolados IP3629/11 (cão), IP4005/10 (bovino), IP964/06 (*Eptesicus furinalis*) e vírus PV, 10 DICC50 com 94%, 89,6%, 82,6%, 86,6%, respectivamente (KAWAI, 2012), ainda assim necessitando de agente de transfecção, o que torna possível que a transfecção de F(ab')₂ anti-RABV *in vivo* com outras variantes também possua o mesmo resultado confirmado para o IP3629/11 (cão) neste estudo.

Entretanto, é importante ressaltar que a IgG completa como no caso de coquetel composto por anticorpos monoclonais específicos contra proteína-G e RNP tem demonstrado maior atividade protetiva em relação a fração constituída por F(ab')₂. Esta discordância entre diferentes modelos de anticorpos sugere que a neutralização intracelular de vírions é mediada também por outros mecanismos relacionados a resposta imune, ligando fragmentos de RNP via receptor de células fagocitárias (dendríticas, macrófagos) e estimulando a produção de (IFN) que podem inibir a replicação viral (SCHUMACHER; RUPPRECHT; KOPROWSKI, et al., 1989).

Anticorpos monoclonais também demonstraram ser efetivos na infecção pelo vírus no SNC de roedores quando administrado antes dos primeiros sinais clínicos, resultando na sobrevivência. Isto sugere que a terapia com anticorpos futuramente pode ser eficaz no tratamento da raiva (DIETZSCHOLD; KAO; ZHENG, 1998).

Em alguns relatos, o quadro sorológico dos pacientes mostra que o a produção de anticorpos tem papel chave na depuração viral. Antes do Potocolo de Milwarkee , apenas cinco casos humanos de sobrevivência à raiva receberam a profilaxia pós-exposição somente com administração de vacina (HATTWICK et al., 1972); (PORRAS

et al., 1966); (TILLOTSON; AXELROD, 1977); (ALVAREZ; et al., 1994); (MADHUSUDANA et al., 2002); (PROMED, 2009), com sequelas severas na maioria dos casos.

A recuperação completa em pacientes com raiva é limitada a poucos casos na literatura. Contudo, esses casos estão atrelados ao histórico de imunização com a combinação de vacinas e imunização passiva de anticorpos no início dos sintomas (KARAHOCAGIL, et al., 2011); (WILLOUGHBY, et al., 2005). Isto indica que, anticorpos neutralizantes podem ser capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, representando um aumento na expectativa em dias de sobrevida do paciente até que a imunoterapia possa estabelecer a resposta contra o vírus (HOOPER, et al., 2011).

Com o resultado obtido neste estudo, foi evidente que a $F(ab')_2$ anti-RABV tem alta atividade neutralizante *in vivo*. Além disso, pressupõe-se que o uso de $F(ab')_2$ anti-RABV seja também eficiente em humanos, uma vez que o componente foi originalmente desenvolvido para uso da profilaxia pré e pós-exposição humana, porém testes com a fração Fc deve ser realizados, pois a depuração mediada por efetores imunes também parece ser um pré requisito para a sobrevivência do paciente (SCHUMACHER, 1989).

É necessário que a $F(ab')_2$ anti-RABV quer seja ela entregue por um vetor não viral, deva primeiramente ser testado em um modelo animal que possa aproximar-se o mais perto possível do protocolo humano antirrábico, concedendo todo um suporte terapêutico para que o indivíduo não seja afligido por patologias secundárias.

Abordagens com diferentes métodos pode ajudar a superar a barreira imposta pelo vírus da raiva onde a prevalência do óbito em pacientes chega a cem por cento, caso seja comparado as dezenas de sobreviventes contra as milhões de mortes que ocorrem até os dias atuais. Desde que, recursos sejam destinados não somente a manutenção do tratamento pré-exposição, mas também para o desenvolvimento do tratamento pós-exposição.

Com isto, futuros estudos focando a otimização da entrega de anticorpos neutralizantes de forma intracelular podem ser uma das principais bases para uma terapia contra raiva mais eficiente para outras doenças causadas virais.

.....

6 CONCLUSÕES

Tratamentos de transfecção para entrega de anticorpos de modo intracelular *in vivo* via intracerebral são eficientes na dependência do agente de transfecção utilizado.

A transfecção de anticorpos anti-RABV diminui a letalidade e aumenta o período de incubação viral em camundongos infectados por RABV.

REFERÊNCIAS

AGUÉMOM, C. T.; TARANTOLA, A.; ZOUMÈNOU, E.; GOYET, S.; ASSOUTO, P.; LY, S.; MEWANOU, S.; BOURHY, H.; DODET, B.; AGUÉMOM, A. R. Rabies Transmission Risks during Peripartum - Two Cases and a Review of the Literature. **Vaccine**, 2016.

ALBERTINIA, A. V.; RUIGROK, R. W. H.; BLONDEL, D. Rabies Virus Transcription and Replication. **Advances in Virus Research**, cap. 1, v. 79, 2011.

AL-DOSARI, M. S.; GAO, X. Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress. **Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**. v. 11, n. 4, p. 671–681, 2009.

APPOLINÁRIO, C.M. **Eficácia pós-expositiva de RNAs de interferência (siRNAs) e ribavirina em camundongos infectados com o vírus rábico de origem canina**. 78F. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

ARAMBURO, A.; WILLOUGHBY, R. E.; BOLLEN, A. W.; GLASER, C. A.; HSIEH, C. J.; DAVIS, S. L.; MARTIN, K. W.; ROY-BURMAN, A. Failure of the Milwaukee Protocol in a Child with Rabies. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 6, p. 572–574, 2011.

ASANO, K. M. **Ocorrência e caracterização molecular de coronavírus e rotavírus do grupo A em quirópteros do Estado de São Paulo**. Tese Doutorado - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

ATHANASIOU, K. A.; NIEDERAUER, G. G.; AGRAWA, C. M. Sterilization, Toxicity, Biocompatibility and Clinical Applications of Polylactic Acid/ Polyglycolic Acid Copolymers. **Biomaterials**, v. 17, n. 2, p. 93–102, 1980.

BADRAME, H.; TORDO, N. Host Switching in Lyssavirus History from the Chiroptera

to the Carnivora Orders. **Journal of Virology**, 2001.

BALTIMORE, D.; HUANG, A. S.; STAMPFER., M. Ribonucleic Acid Synthesis of Vesicular Stomatitis Virus. VI. Correlation of Defective Particle RNA Synthesis with Standard RNA Replication. **Journal of Molecular Biology**, v. 85, n. 1, p. 127–136, 1970.

BANERJEE, A. K.; BARIK, S. Gene Expression of Vesicular Stomatitis Virus Genome RNA. **Virology**, v. 188, n. 2, p. 417–28, 1992.

BASARKAR, A.; SINGH, J. Nanoparticulate Systems for Polynucleotide Delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 2, n. 3, p. 353–360, 2007.

BOTVINKIN, A.; KOSENKO, M. Rabies in the european parts of Russia, Belarus and Ukraine In: KING, A. A.; FOOKS, M. A.; WANDELER, A. I. Historical Perspective of Rabies in Europe and the Mediterranean Basin. p. 47-51. Paris, France, 2004.

BRANDÃO, P.; GALERA CASTILHO, J.; FAHL, W.; CARNIELI JR, P.; DE NOVAES OLIVEIRA, R.; ISABEL MACEDO, C.; LUIZA CARRIERI, M.; KOTAIT, I. Short-Interfering RNAs as Antivirals Against Rabies. **BJID The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 1111, n. 2, p. 224–225, 2007.

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

BUSSEREAU, F.; ERMINE, A. Effects and heteropolyanions analogues study viral on rabies virus of syntheses and viral productions. **Annales of Virologie, (Institute Pasteur)**. n. 1, p. 487–506, 1983b.

CASTILHO, J. G.; RODRIGUES, A. C.; CARNIELI, P. J. R.; R.N., O.; SILVA, A. C. R.; CAPOALE, G. M. M.; BRANDÃO, P. E.; BATISTA, H. B. C. Comparison of *in vivo* and *in vitro* transfection of antibodies against rabies. **XXIV RITA Canada - Rabies in the Americas Meeting Abstracts**, Toronto, Canadá. 2013.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido Nítrico: Revisão. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 17, n. 6, p. 417–423, 2002.

CONSTANTINE, D. G. Rabies Transmission by Nonbite Route. **Public Health Reports**, v. 77, n. 4, p. 287–289, 1962.

CONZELMANN, K. K.; SCHNELL, M. Rescue of Synthetic Genomic RNA Analogs of Rabies Virus by Plasmid-Encoded Proteins. **Journal of virology**, v. 68, n. 2, p. 713–719, 1994.

CRANDELL, R.A. Artic fox rabies. In: Baer G.M. **The natural history of rabies**. 2. Ed. New York: Academic Press; 1991.

DAVIES, W. L.; GRUNERT, R. R.; HAFF, R. F.; MCGAHEN, J. W.; NEUMAYER, E. M.; PAULSHOCK, M.; WATTS, J. C.; WOOD, T. R.; HERMANN, E. C.; HOFFMANN, C. E. Antiviral Activity of 1-Adamantanamine. **Science**, v. 144, n. 3620, p. 862–863, 1963.

DE SOUZA, A.; MADHUSUDANA, S. N. Survival from Rabies Encephalitis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 339, n. 1–2, p. 8–14, 2014.

DIDENKO, V. V.; NGO, H.; BASKIN, D. S. Polyethyleneimine as a Transmembrane Carrier of Fluorescently Labeled Proteins and Antibodies. **Analytical Biochemistry**, v. 344, n. 2, p. 168–173, 2005.

DIETZSCHOLD, B.; KAO, M.; ZHENG, Y. M.; CHEN, Z. Y.; MAUL, G.; FU, Z. F.; RUPPRECHT, C. E.; KOPROWSKI, H. Delineation of Putative Mechanisms Involved in Antibody-Mediated Clearance of Rabies Virus from the Central Nervous System. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 15, p. 7252–7256, 1992.

FINKE, S.; CONZELMANN, K. K. Dissociation of Rabies Virus Matrix Protein Functions in Regulation of Viral RNA Synthesis and Virus Assembly. **Journal of Virology**, v. 77, n. 22, p. 12074–12082, 2003.

FIRE, A.; XU, S. X.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. M. Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806–811, 1998.

GASCÓN, A. R.; PEDRAZ, J. L. Cationic Lipids as Gene Transfer Agents: A Patent Review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 18, n. 5, p. 515–524, 2008.

GASCÓN, A. R.; POZO-RODRÍGUEZ, A. del; ÁNGELES, M. S. Non-Viral Delivery Systems in Gene Therapy. **Gene Therapy-Tools and Potential Applications**, p. 3–34, 2013.

GAUDIN, Y. Rabies Virus-Induced Membrane Fusion Pathway. **Journal of Cell Biology**, v. 150, n. 3, p. 601–611, 2000.

GILBERT, B. E.; KNIGHT, V. Biochemistry and Clinical Applications of Ribavirin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 30, n. 2, p. 201–205, 1986.

GLUSKA, S.; ZAHAVI, E. E.; CHEIN, M.; GRADUS, T.; BAUER, A.; FINKE, S.; PERLSON, E. Rabies Virus Hijacks and Accelerates the P75NTR Retrograde Axonal Transport Machinery. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 8, 2014.

GUNAWARDENA, P. S.; MARSTON, D. A.; ELLIS, R. J.; WISE, E. L.; KARAWITA, A. C.; BREED, A. C.; MCELHINNEY, L. M.; JOHNSON, N.; BANYARD, A. C.; FOOKS, A. R. Lyssavirus in Indian Flying Foxes, Sri Lanka. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 8, p. 1456–1459, 2016.

HAMIR, A. N.; NIEZGODA, M.; RUPPRECHT, C. E. Recovery from and Clearance of Rabies Virus in a Domestic Ferret. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 50, n. 2, p. 248–51, 2011.

HEMACHUDHA, T.; SUNSANEWITAYAKUL, 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.

HERRIMAN, R. 2018. Disponível em: <<http://outbreaknewstoday.com/rabies-survivor-milwaukee-protocol-saves-brazilian-teen-96855/>>. Acesso em 13 jan. 2019.

HISLOP, J. N.; ISLAM, T. A.; ELEFThERiADOU, I.; CARPENTIER, D. C. J.; TRABALZA, A.; PARKINSON, M.; SCHIAVO, G.; MAZARAKIS, N. D. Rabies Virus Envelope Glycoprotein Targets Lentiviral Vectors to the Axonal Retrograde Pathway in Motor Neurons. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 23, p. 16148–16163, 2014.

HO, J. K.; WHITE, P. J.; POUTON, C. W. Self-Crosslinking Lipopeptide/DNA/PEGylated Particles: A New Platform for DNA Vaccination Designed for Assembly in Aqueous Solution. **Molecular Therapy: Nucleic Acids**, v. 12, n. September, p. 891–892, 2018.

HOFFMANN, C. E.; NEUMAYER, E. M.; HAFF, R. F.; GOLDSBY, R. A. Mode of Action of the Antiviral Activity of Amantadine in Tissue Culture. **Journal of bacteriology**, v. 90, n. 3, p. 623–628, 1965.

HOOPER, D. C.; PHARES, T. W.; FABIS, M. J.; ROY, A. The Production of Antibody by Invading B Cells Is Required for the Clearance of Rabies Virus from the Central Nervous System. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 10, p. 1–8, 2009.

HU, W. T.; WILLOUGHBY, R. E.; DHONAU, H.; MACK, K. J. Long-Term Follow-up after Treatment of Rabies by Induction of Coma. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 9, p. 945–946, 2007.

IBÁÑEZ, C. F.; SIMI, A. P75 Neurotrophin Receptor Signaling in Nervous System Injury and Degeneration: Paradox and Opportunity. **Trends in Neurosciences**, v. 35, n. 7, p. 431–440, 2012.

ISENI, F.; BARGE, A.; BAUDIN, F.; BLONDEL, D.; RUIGROK, R. W. H. Characterization of Rabies Virus Nucleocapsids and Recombinant Nucleocapsid-like Structures. **Journal of General Virology**, v. 79, n. 12, p. 2909–2919, 1998.

IWAMOTO, M.; JERNIGAN, D. B.; GUASCH, A.; TREPKA, M. J.; BLACKMORE, C. G.; HELLINGER, W. C.; PHAM, S. M.; ZAKI, S.; LANCIOTTI, R. S.; LANCE-PARKER, S. E.; DIAZGRANADOS, C. A.; WINQUIST, A. G.; PERLINO, C. A.; WIERSMA, S.; HILLYER, K. L.; GOODMAN, J. L.; MARFIN, A. A.; CHAMBERLAND, M. E.; PETERSEN, L. R. Transmission of West Nile Virus from an Organ Donor to Four Transplant Recipients. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 22, p. 2196–2203.

JACKSON, A. C.; WARRELL, M. J.; RUPPRECHT, C. E.; ERTL, H. C. J.; DIETZSCHOLD, B.; O'REILLY, M.; LEACH, R. P.; FU, Z. F.; WUNNER, W. H.; BLECK, T. P.; WILDE, H. Management of Rabies in Humans. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 1, p. 60–63, 2003.

JOHNSON, N.; CUNNINGHAM, A. F.; FOOKS, A. R. The Immune Response to Rabies Virus Infection and Vaccination. **Vaccine**, v. 28, n. 23, p. 3896–3901, 2010.

JULIEN, P. La Rage à Travers Les Siècles : Jean Théodoridès , **Histoire de La Rage**. Cave Canem. p. 244–247, 2015.

KARAHOCAGİL, M. K.; AKDENİZ, H.; AYLAN, O.; SÜNNETÇİOĞLU, M.; ÜN, H.; YAPICI, K.; BARAN, A. İ. Complete Recovery from Clinical Rabies: Case Report. **Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences**, v. 33, n. 2, p. 547–552, 2013.

KAWAI, J. G. C. Transfecção de anticorpos anti-vírus da raiva em células de linhagem N2A (Neuroblastoma de camundongos) e neutralização intracelular para uso como antiviral. 2012. 42f. Relatório de Pesquisa de Pós-Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

KESDANGSAKONWUT, S.; SUNDEN, Y.; AOSHIMA, K.; IWAKI, Y.; OKUMURA, M.; SAWA, H.; UMEMURA, T. Survival of Rabid Rabbits after Intrathecal Immunization. **Neuropathology**, v. 34, n. 3, p. 277–283, 2014.

KOTAIT, I.; CARRIERI, M. L.; TAKAOKA, N. Y. Manual técnico do Instituto Pasteur.

São Paulo, **Instituto Pasteur**. n. 8, 2009.

LEE, Y.; ISHII, T.; KIM, H. J.; NISHIYAMA, N.; HAYAKAWA, Y.; ITAKA, K.; KATAOKA, K. Efficient Delivery of Bioactive Antibodies into the Cytoplasm of Living Cells by Charge-Conversional Polyion Complex Micelles. **Angewandte Chemie**, v. 49, n. 14, p. 2552–2555, 2010.

LENTZ, T. L. Rabies Virus Receptor. **Tins**, p. 360–364, 1985.

LEWIS, P.; FU, Y.; LENTZ, T. L. Rabies virus entry at the neuromuscular junction in nerve-muscle cocultures. **Muscle & Nerve**. V. 23, n. 5, p. 720–30, 2000.

LESHCHYNS'KA, I.; SYTNYK, V.; RICHTER, M.; ANDREYEVA, A.; PUCHKOV, D.; SCHACHNER, M. The Adhesion Molecule CHL1 Regulates Uncoating of Clathrin-Coated Synaptic Vesicles. **Neuron**, v. 52, n. 6, p. 1011–1025, 2006.

LOCHHEAD, J. J.; THORNE, R. G. Intranasal Delivery of Biologics to the Central Nervous System. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 7, p. 614–628, 2012.

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.

LOCKHART, B. P.; TSIANG, H.; CECCALDI, P. E.; GUILLEMER, S. Ketamine-Mediated Inhibition of Rabies Virus Infection *in Vitro* and in Rat Brain. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 2, n. 1, p. 9–15, 1991.

LYLES, D. S.; RUPPRECHT, C. E. Rhabdoviridae. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields virology**, Lippincott Williams & Wilkins, v. 2, p. 1364, 2007.

MADHUSUDANA, S. N.; NAGARAJ, D.; UDAY, M.; RATNAVALLI, E.; VERENDRA KUMAR, M. Partial Recovery from Rabies in a Six-Year-Old Girl. **Journal of Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, p. 85–86, 2002.

MAGUIRE, C. A.; RAMIREZ, S. H.; MERKEL, S. F.; SENA-ESTEVEZ, M.; BREAKEYFIELD, X. O. Gene Therapy for the Nervous System: Challenges and New Strategies. **Neurotherapeutics**, v. 11, n. 4, p. 817–839, 2014.

MALMEVIK, J.; ROGERS, M. L.; NILSSON, M.; NAKANISHI, Y.; RUSH, R. A.; SIMS, N. R.; MUYDERMAN, H. Selective Transfection of Microglia in the Brain Using an Antibody-Based Non-Viral Vector. *Brain Research*, v. 1586, p. 12–22, 2014.

MANOJ, S.; MUKHERJEE, A.; JOHRI, S.; KUMAR, K. V. S. H. Recovery from Rabies, a Universally Fatal Disease. **Military Medical Research**, v. 3, n. 1, 2016.

MATTOS, C. A.; MATTOS, C. C.; RUPPRECHT, C. E. Rhabdoviruses. In: Knipe DM e Howley PM, editors-in-chief. Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, associate editors. *Field's virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. cap. 39. p.1245-78.

MEBATION, T.; KONIG, M.; CONZELMANN, K. K. Budding of Rabies Virus Particles in the Absence of the Spike Glycoprotein. **Cell**, v. 84, n. 6, p. 941–951, 1996.

MEBATION, T.; WEILAND, F.; CONZELMANN, K.-K. Matrix Protein of Rabies Virus Is Responsible for the Assembly and Budding of Bullet-Shaped Particles and Interacts with the Transmembrane Spike Glycoprotein G. **Journal of Virology**, v. 73, n. 1, p. 242–250, 1999.

MESSIER, C.; ÉMOND, S.; ETHIER, K. New Techniques in Stereotaxic Surgery and Anesthesia in the Mouse. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 63, n. 2, p. 313–318, 1998.

MIDOUX, P.; PICHON, C.; YAOUANG, J. J.; JAFFRÈS, P. A. Chemical Vectors for Gene Delivery: A Current Review on Polymers, Peptides and Lipids Containing Histidine or Imidazole as Nucleic Acids Carriers. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 2, p. 166–178, 2009.

MIRAKHUR, B.; PELUSO, R. W. In Vitro Assembly of a Functional Nucleocapsid from the Negative-Stranded Genome RNA of a Defective Interfering Particle of Vesicular Stomatitis Virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 20, p. 7511–7515, 1988.

NAKAHIRA, K.; HASPEL, J. A.; RATHINAM, V. A. K.; LEE, S. J.; DOLINAY, T.; LAM, H. C.; ENGLERT, J. A.; RABINOVITCH, M.; CERNADAS, M.; KIM, H. P.; FITZGERALD, K. A.; RYTER, S. W.; CHOI, A. M. K. Autophagy Proteins Regulate Innate Immune Responses by Inhibiting the Release of Mitochondrial DNA Mediated by the NALP3 Inflammasome. **Nature Immunology**, v. 12, n. 3, p. 222–230, 2011.

NAPOLI, C. 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.

NEVILLE, J. Rabies in the ancient world. In: KING, A. A; FOOKS, A.R; AUBERT, M; WANDELER, A. I. **Historical Perspective of Rabies in Europe and the Mediterranean Basin**, p. 1-12, 2004.

NICULESCU-DUVAZ, D.; HEYES, J.; SPRINGER, C. Structure-Activity Relationship in Cationic Lipid Mediated Gene Transfection. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 14, p. 1233–1261, 2003.

NIZAK, C.; MARTIN-LLUESMA, S.; MOUTEL, S.; ROUX, A.; KREIS, T. E.; GOUD, B.; PEREZ, F. Recombinant Antibodies against Subcellular Fractions Used to Track Endogenous Golgi Protein Dynamics in Vivo. **Traffic**, v. 4, n. 11, p. 739–53, 2003.

OIE, WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. **What is rabies**. Disponível em < <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/rabies-portal/about-rabies/>> Acesso em nov 2018.

ONO, E. A. D. **Inibição da replicação do vírus da raiva *in vitro* e *in vivo* por meio de Interferência por RNA**. 2010. 74 f. Dissertação (Mestrado em epidemiologia aplicada a zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da

Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

OPLADEN, T.; ABU SEDA, B.; RASSI, A.; THÖNY, B.; HOFFMANN, G. F.; BLAU, N. Diagnosis of Tetrahydrobiopterin Deficiency Using Filter Paper Blood Spots: Further Development of the Method and 5 Years Experience. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 34, n. 3, p. 819–826, 2011.

PERSIDSKY, Y.; RAMIREZ, S. H.; HAORAH, J.; KANMOGNE, G. D. Blood-Brain Barrier: Structural Components and Function under Physiologic and Pathologic Conditions. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 1, n. 3, p. 223–236, 2006.

POWERS, C. N.; PEAVY, D. L.; KNIGHT, V. Selective Inhibition of Functional Lymphocyte Subpopulations by Ribavirin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 22, n. 1, p. 108–114, 1982.

PROMED. Rabies, human survival, bat-Brazil: (Pernambuco). 2009; 14 Nov: 20081114.3599. Disponível em: < <https://www.promedmail.org/post/20090919.3292>> Acessado em 17 nov. 2019.

QIAN, A.; JOHNSON, J. W. Channel Gating of NMDA Receptors. **Physiology and Behavior**, v. 77, n. 4–5, p. 577–582, 2002.

RABINOVITCH, M.; CERNADAS, M.; KIM, H. P.; FITZGERALD, K. A.; RYTER, S. W.; CHOI, A. M. K. Autophagy Proteins Regulate Innate Immune Responses by Inhibiting the Release of Mitochondrial DNA Mediated by the NALP3 Inflammasome. **Nature Immunology**, v. 12, n. 3, p. 222–230, 2011.

RASALINGAM, P.; ROSSITER, J. P.; MEBATSION, T.; JACKSON, A. C. Comparative Pathogenesis of the SAD-L16 Strain of Rabies Virus and a Mutant Modifying the Dynein Light Chain Binding Site of the Rabies Virus Phosphoprotein in Young Mice. **Virus Research**, v. 111, n. 1, p. 55–60, 2005.

REHMAN, Z. U.; ZUHORN, I. S.; HOEKSTRA, D. How Cationic Lipids Transfer Nucleic Acids into Cells and across Cellular Membranes: Recent Advances. **Journal of Controlled Release**, v. 166, n. 1, p. 46–56, 2013.

RIABOWOL, K. T.; J., V. R.; ZIFF, E. B.; LAMB, N. J.; FERAMISCO, J. R.
Microinjection of Fos Specific Antibodies Blocks DNA Synthesis in Fibroblast Cells.
Mol. Cell Biol, v. 8, n. 4, p. 1670–1676, 1988.

ROCHE, S.; GAUDIN, Y. Evidence that rabies virus forms different kinds of fusion machines with different pH thresholds for fusion. **Journal of Virology**, v. 78, n. 16, p. 8746–8752, ago. 2004.

RODRIGUEZ, BOULAN, E.; SABATINI, D. D. Asymmetric Budding of Viruses in Epithelial Monolayers: A Model System for Study of Epithelial Polarity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, n. 10, p. 5071–5, 1978.

RODRIGUEZ, L.L.; ROEHE, P. M.; BATISTA, H.; KURATH, G. *Rhabdoviridae* In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. 2 ed. Santa Maria, UFSM, pag.807, 2012.

ROSE, J. K.; WHITT, M. A. Rhabdoviridae: The viruses and their replication. In: **Fields Virology**, 4 ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA, p. 1221–1224. 2001

ROTIVEL, Y; M. GOUDAL; P. PERRIN; N. TORDO. The epic of the vaccination against rabies. **John libbey eurotext virologie**. v.6, n.2, p.89-104, abr.2002.

RUBIN, J.; DAVID, D.; WILLOUGHBY, R. E.; RUPPRECHT, C. E.; GARCIA, C.; GUARDA, D. C.; ZOHAR, Z.; STAMLER, A. Applying the Milwaukee Protocol to Treat Canine Rabies in Equatorial Guinea. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 41, n. 5, p. 372–375, 2009.

SCHUMACHER, C. L.; DIETZSCHOLD, B.; ERTL, H. C. J.; NIU, H. S.; RUPPRECHT, C. E.; KOPROWSKI, H. Use of Mouse Anti-Rabies Monoclonal Antibodies in Postexposure Treatment of Rabies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 84, n. 3, p. 971–975, 1989.

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.

SHANKAR, V.; DIETZSCHOLD, 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.

SIDWELL, R. W.; HUFFMAN, J. H.; KHARE, G. P.; ALLEN, L. B.; WITKOWSKI, J. T.; ROBINS, R. K. Broad-Spectrum Antiviral Activity of Virazole: 1-Beta-D-Ribofuranosyl-1,2,4-Triazole-3-Carboxamide. **Science (New York, N.Y.)**, v. 177, n. 4050, p. 705–6, 1972.

SMITH, J. S.; ORCIARI, L. A.; YAGER, P. A.; DAVID SEIDEL, H.; WARNER, C. K. Epidemiologic and Historical Relationships among 87 Rabies Virus Isolates as Determined by Limited Sequence Analysis. **Journal of Infectious Diseases**, 1992.

SMITH, K. L.; HERRON, B.; DOWELL-MESFIN, N.; WU, H.; KIM, S. J.; SHAIN, W.; HYND, M. R. Knockdown of cortical transthyretin expression around Implanted neural prosthetic Devices Using intraventricular siRNA injection in the brain. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 203, n. 2, p. 398-406, 2012.

STEELE, J. H. History of rabies. In: Baer G.M. The natural history of rabies. New York: Academic Press; p.1-28, 1975.

STEELE; J.H.; FERNANDEZ, P; J. History of rabies and global aspects. In: BAER, G; M. The natural history of rabies. 2 ed. Boston: CRC Press. p.1-26., 1991.

TERRY, S. Development and evaluation of antiviral immunoglobulin single variable domains for prophylaxis of rabies in mice. 2016. 186f. Tese (Doutorado)- Laboratory of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan Merelbeke, Belgium, 2016.

THÉODORIDÈS, J. **Histoire de la rage. cave canem.** Paris : Masson, 1986.

THIEL, P.-P. A. M. V.; BIE, R. M. A.; EFTIMOV, F.; TEPASKE, R.; ZAAIJER, H. L.; DOORNUM, G. J. J. V.; SCHUTTEN, M.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; MAJOIE, C. B. L. M.; ARONICA, E.; FEHLNER-GARDINER, C.; WANDELER, A. I.; KAGER, P. A. Fatal Human Rabies Due to Duvenhage Virus from a Bat in Kenya: Failure of Treatment with Coma-Induction, Ketamine, and Antiviral Drugs. **Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 7, p. E428, 2009.

THOULOUE, M. I.; LAFAGE, M.; SCHACHNER, M.; HARTMANN, U.; CREMER, H.; LAFON, M. The Neural Cell Adhesion Molecule Is a Receptor for Rabies Virus. **Journal of virology**, v. 72, n. 9, p. 7181–90, 1998.

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G.; ROUGEON, F. Completion of the Rabies Virus Genome Sequence Determination: Highly Conserved Domains among the L (Polymerase) Proteins of Unsegmented Negative-Strand RNA Viruses. **Virology**, v. 165, n. 2, p. 565–576, 1988.

WALSH, D.; MATHEWS, M. B.; MOHR, I. Tinkering with Translation: Protein Synthesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 1, p. 1–30, 2013.

WASUNGU, L.; HOEKSTRA, D. Cationic Lipids, Lipoplexes and Intracellular Delivery of Genes. **Journal of Controlled Release**, v. 116, n. 2 SPEC. ISS., p. 255–264, 2006.

WEILL, C. O.; BIRI, S.; ADIB, A.; ERBACHER, P. A Practical Approach for Intracellular Protein Delivery. **Cytotechnology**, v. 56, n. 1, p. 41–48, 2008a.

WEILL, C. O.; BIRI, S.; ERBACHER, P. Cationic Lipid-Mediated Intracellular Delivery of Antibodies into Live Cells. **BioTechniques**, v. 44, n. 7, p. 7–11, 2008b.

WEYER, J.; MSIMANG-DERMAUX, V.; PAWESKA, J. T.; LE ROUX, K.; GOVENDER, P.; COERTSE, J.; MARKOTTER, W.; NEL, L. H.; BLUMBERG, L. H. A Case of Human Survival of Rabies, South Africa. **Southern African Journal of Infectious Diseases**, v. 31, n. 2, p. 66–68, 2016.

WILLOUGHBY, R. E.; OPLADEN, T.; MAIER, T.; RHEAD, W.; SCHMIEDEL, S.;

HOYER, J.; DROSTEN, C.; RUPPRECHT, C. E.; HYLAND, K.; HOFFMANN, G. F. Tetrahydrobiopterin Deficiency in Human Rabies. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 32, n. 1, p. 65–72, 2009.

WINKLER, W. G.; BAKER, E. F.; HOPKINS, C. C. An Outbreak of Non-Bite Transmitted Rabies in a Laboratory Animal Colony. **American Journal of Epidemiology**, v. 95, n. 3, p. 267–277, 1972.

YAMADA, Y.; PEREZ, S. M. V.; TABATA, M.; ABE, J.; YASUZAKI, Y.; HARASHIMA, H. Efficient and High-Speed Transduction of an Antibody into Living Cells Using a Multifunctional Nanocarrier System to Control Intracellular Trafficking. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 9, p. 2845–2854, 2015.