

EKATERINA ALEXANDROVNA DURYMANOVA ONO

**Silenciamento gênico pós-transcricional por interferência por RNA
(RNAi) como terapia antiviral para a raiva**

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada as Zoonoses

Orientador:

Prof.Dr. Paulo Eduardo Brandão

São Paulo

2015

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.3095
FMVZ

Durymanova Ono, Ekaterina Alexandrovna

Silenciamento gênico pós-transicional por interferência por RNA (RNAi) com terapia antiviral para a raiva / Ekaterina Alexandrovna Durymanova Ono. -- 2015.
92 f. :il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada as Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada as Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão.

1. Raiva. 2. Tratamento. 3. RNA interferência. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Silenciamento gênico pós-transcricional por interferência por RNA (RNAi) como terapia antiviral para a raiva", protocolado sob o nº 2176/2011, utilizando 140 (cento e quarenta) camundongos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 04/5/2011.

We certify that the Research "Post-transcriptional gene silencing with RNA interference (RNAi) as an antiviral therapy for rabies", protocol number 2176/2011, utilizing 140 (one hundred and forty) mice, under the responsibility Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/04/2011.

São Paulo, 1º de junho de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Durymanova Ono, Ekaterina Alexandrovna

Título: Silenciamento gênico pós-transcricional por interferência por RNA (RNAi) como terapia antiviral para a raiva

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Ao meu pai **Alexandr Gavrilovich Durymanov**, pesquisador, cientista e virologista que me despertou o interesse pela ciência e me ensinou a ter um senso crítico de tudo que você lê.

Ao meu querido marido **Eduardo Eiji Ono** que teve a toda paciência do mundo nesse período difícil durante o desenvolvimento do projeto, por todo apoio e o amor.

A minha mãe **Lyidmila Nikolaevna Durymanova** que me sempre me apoiou e não deixou de acreditar em mim.

A minha querida irmã **Anastasia Alexandrovna Johnson** que é um exemplo de superação das dificuldades e otimismo.

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

Albert Einstein.

AGRADECIMENTOS

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

A minha família brasileira **Massumi Habe Ono**, **Ricardo Masão Ono** e **Cristiane Midori Ono** pelo apoio e paciência durante todos estes anos de desenvolvimento do projeto.

Aos demais professores do VPS.

Aos pesquisadores do Instituto Pasteur de São Paulo, a Dra. **Juliana Galera Castilho** pela ajuda neste projeto e **Rafael de Novais Oliveira** pelo fornecimento da sequência completa das amostras utilizadas.

A **Rosana Cleide Pack Utiyama** pelo acolhimento no laboratório da raiva durante o todo doutorado e ajuda na parte experimental *in vivo*.

Às técnicas do LabMas, **Sheila Oliveira de Souza** pela ajuda diária no laboratório e **Sueli Akemi Tanivaki** pela grande ajuda na padronização da técnica qPCR.

Aos pós-graduandos do VPS pela ajuda, conselhos e agradável convivência.

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

A **FAPESP** pela bolsa concedida (N° do processo 2011/00439-7)

RESUMO

DURYMANOVA ONO, E. A. **Silenciamento gênico pós-transcricional por interferência por RNA (RNAi) como terapia anti-viral para a raiva.** [Post-transcriptional gene silencing by RNA interference (RNAi) as antiviral therapy for rabies]. 2015.92 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A raiva é uma zoonose que afeta todos os mamíferos e causa cerca de 55.000 mortes humanas por ano, causada pelo vírus da raiva. O vírus da raiva pertence à Ordem *Mononegavirales*, Família *Rhabdoviridae* e o Gênero *Lyssavirus*. Ultimamente, o Protocolo de Milwaukee é a base do tratamento humano, com indução do paciente ao coma e uso de massiva terapia antiviral. O protocolo, embora tenha sido utilizado duas vezes com sucesso, inclusive em um caso brasileiro, ainda requer aperfeiçoamentos. Neste sentido, a interferência por RNA (RNAi) é uma nova abordagem para terapia de doenças virais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a inibição da replicação do vírus da raiva *in vitro* e *in vivo* utilizando RNAi. Para este fim, foram utilizados três siRNAs (siRNA 360, siRNA 652, siRNA 649) com a fita antisense complementar ao mRNA da fosfoproteína (P) e três siRNAs (Le 1, Le 2, Le 3) contra o RNA líder do vírus da raiva. Para o ensaio *in vitro* foram utilizadas as amostras PV e 4005 (AgV3) do vírus da raiva e as células de BHK-21 (*Baby hamster kidney*). As monocamadas celulares foram infectadas com as amostras PV ou 4005 e depois de 2 horas de incubação transfectadas com cada um dos siRNAs em combinação com Lipofectamine 2000™. Depois de 24 e 48 horas as placas teste e controle foram submetidas à imunofluorescência direta (IFD) com conjugado globulina de coelho anti-ribonucleocapsídeo do vírus da raiva/isotiocianato de fluoresceína (Instituto Pasteur de São Paulo). Os resultados revelaram que os siRNAs contra o RNA líder do vírus não foram capazes de inibir a replicação do vírus. A utilização dos siRNAs contra mRNA P resultaram em títulos de 3,625logTCID₅₀/ml, 3,875logTCID₅₀/ml e 4,125logTCID₅₀/ml para os siRNAs 360, 649 e 652, respectivamente, enquanto que, para a placa controle, o título foi 4,0logTCID₅₀/ml nas placas infectadas com PV e

período de incubação de 24h. Nas placas infectadas com a amostra 4005 e tratadas com siRNAs, a maior queda de título viral foi na placa tratada com siRNA 360, de 1,0 log, comparando-se com a placa controle de incubação de 24 para a amostra 4005. Nas placas tratadas com siRNA 649 e siRNA 652, também houve a diminuição de título viral, mas em uma escala menor (0,25log e 0,125log, respectivamente) comparando-se com o controle. Nas placas infectadas com PV e incubadas durante 48h, os títulos apresentados foram de 5,625logTCID₅₀/ml, 4,625logTCID₅₀/ml e 4,75logTCID₅₀%/ml para os siRNAs 360, 649 e 652, respectivamente, enquanto que na placa controle o título foi 6,0logTCID₅₀C%/ml. A placa com período de incubação de 48h com a amostra 4005 e tratada com siRNA 360 apresentou a maior queda de título viral entre os três siRNAs, o que resultou em 1,125log de diferença. Nas monocamadas onde foram administrados siRNA 649 e siRNA 652, observou-se também uma pequena queda de título viral igual a 0,875log e 0,295log, respectivamente, comparando-se com a placa não tratada. Para o ensaio *in vivo*, foram usados camundongos albino suíços de 21 dias com peso entre 11 e 14g, infectados com a cepa PV e AgV3 em 10DL₅₀% via intracerebral. Duas horas depois da infecção, foi inoculada por via intracerebral uma solução do siRNA 360 com Lipofectamine 2000™. Os animais com paralisia foram eutanasiados e aqueles sobreviventes foram observados até completar 30 dias de observação quando foram, então, eutanasiados. O sistema nervoso central de todos os animais foi recolhido e submetido a IFD. A utilização do siRNA 360 em camundongos resultou em 30% de animais sobreviventes frente amostra 4005, enquanto que a mortalidade nos animais não tratados foi de 90%. Nos animais inoculados com a amostra PV e tratados com este siRNA, a sobrevivência foi de 40%, enquanto que no grupo controle a mortalidade foi de 100%. O resultado do ensaio *in vitro* demonstra que os siRNAs utilizados são capazes de inibir a replicação do vírus da raiva, com eficiência mais pronunciada para o siRNA 360. *In vivo*, este siRNA foi capaz de induzir a proteção parcial dos animais inoculados com as duas variantes virais. Estes resultados, ainda que indiquem a necessidade de mais estudos, permitem concluir que a RNAi é uma tecnologia promissora como antiviral contra a raiva.

Palavras-chave: Raiva. Tratamento. RNA interferência.

ABSTRACT

DURYMANOVA ONO, E. A. **Post-transcriptional gene silencing by RNA interference (RNAi) as antiviral therapy for rabies.** [Silenciamento gênico pós-transcricional por interferência por RNA (RNAi) como terapia anti-viral para a raiva]. 2015.92 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Rabies is a zoonotic disease that affects all mammals and causes more than 55.000 human deaths every year, caused by rabies virus (RABV) a virus of the *Mononegavirales* order, Family *Rhabdoviridae* and the *Lyssavirus* genus. After the onset of the symptoms, the illness has a fast progression and the patients feel intense physical suffering. Currently, human rabies treatment has been based on the Milwaukee Protocol which consists on the induction of coma and massive antiviral therapy. Despite this protocol has been successful in two cases, including a Brazilian one, more studies on antivirals for human rabies treatment are required. RNA interference is a new antiviral approach, which gives hope to the possibility of rabies antiviral treatment. The aim of this study was to assess the decrease in titres of rabies virus *in vitro* and *in vivo* using short-interfering RNAs. To this end, three siRNAs (siRNA 360, siRNA 652, and siRNA 649) were used with antisense strands complementary to rabies virus phosphoprotein (P) mRNA and three other (Le 1, Le 2, Le 3) to the leader RNA. Pasteur virus strain (PV) and strain 4005 (AgV3) of rabies virus and BHK-21 cells were used, and the monolayers were transfected with each of the RNAs with Lipofectamine-2000™. After 22 hours, the siRNA-treated and the control plates were tested by direct fluorescent antibody test (DFAT) with anti-rabies virus nucleocapsid antibody conjugate with fluorescein isothiocyanate (Pasteur Insitutte, Brazil). The plates transfected with siRNA against phosphoprotein mRNA were also incubated for 48 hours and subjected to IFD assay. Virus titres were calculated by the Spearman-Karber method. The results showed that siRNAs against virus leader RNA were not able to inhibit the replication of the virus. The use of siRNAs against P mRNA resulting titres of 3.625logTCID50/ml 3.875logTCID50/ml and 4.125logTCID50/ml for siRNAs 360, 649 and 652, respectively, while, for the control plate, the titre was 4.0logTCID50/ml in plates with PV and 24h incubation period. In plates with strain 4005 and treated with siRNAs, the highest viral titre decrease was obtained with siRNA 360, with a 1.0 log difference compared to the control plate of strain 4005 incubated for 24h. The plates treated with siRNA 649 and

siRNA 652 have was also shown a decrease in viral titres, but on a smaller scale (0.25log and 0.125log, respectively) compared to the control. The plates infected with PV and incubated for 48 hours showed titre of 5.625logTCID50/ml, 4.625logTCID50/ml and 4.75logTCID50%/ml for siRNAs 360, 649 and 652, respectively, while for the control plate the titre was 6.0logTCID50C%/ml. The plate with strain 4005 and then treated with siRNA360 and incubated for a total of 48h had the highest viral titre decrease among the three siRNAs, which resulted in a 1.125log difference compared to the control plate. In monolayers treated with siRNA649 and siRNA652 there was also a discrete drop in viral titres (0.875log and 0.295log, respectively) compared to the control plate. For the *in vivo* assay, 21-day old Swiss albino mice weighing between 11 and 14g were intracerebrally inoculated with PV or 4005 strains (10DL50%). Two hours after inoculation, a solution of siRNA360 with Lipofectamine 2000™ was also intracerebrally injected. Mice presenting paralysis and those that survived the 30 days of observation were euthanized. The central nervous system of all animals was collected and submitted to IFD. The use of siRNA360 in mice resulted in survival of 30% of animals in the group inoculated with strain 4005, whereas 90% mortality was observed in the control group. In animals inoculated with the PV strain, and treated with siRNA360, the survival rate was 40% and in the control group the mortality was 100%. The results of the *in vitro* assay demonstrate that the siRNAs used are effective in inhibiting the replication of rabies virus with a more intense inhibition regarding siRNA 360. *In vivo*, this siRNA was able to induce partial protection of animals infected with both viral variants. These results also indicate that, despite the need for further studies, RNAi is a promising technology as antiviral against rabies.

Keywords: Rabies. Treatment. RNA interference.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABLV	<i>Australian Bat Lyssavirus</i>
ARAV	Aravan vius
aa	aminoácidos
Arg	aminoácido arginina
AChR	receptor de acetilcolina
AgV2	variante antigênica dois do vírus da raiva, origem de cão doméstico
AgV3	variante antigênica três do vírus da raiva, proveniente de <i>Desmodus Rotundus</i>
<i>ad libitum</i>	do latim “a vontade”
A	nucleotídeo adenina
BBLV	<i>Bokeloh Bat Lyssavirus</i>
BHK-21	(baby hamster kidney cells) células de rim de filhote de hamster
BLAST/n	Basic Local Alignment Search Tool
CRU	(cellular receptor unit) unidade receptora celular
CVS	<i>Challenge Virus Standard</i>
cDNA	DNA complementar
Cq	ciclo quantitativo
C	nucleotídeo citosina
CPPs	(cationic cell-penetrating peptides) peptídeos catiônicos penetrantes
DUVV	<i>Duvenage virus</i>
DNTPs	desoxirribonucleotídeos fosfatados
EC	ectodomínio de glicoproteína do vírus da raiva
ENDO	endodomínio de glicoproteína do vírus da raiva
EBLV-1	<i>European bat lyssavirus -1</i>
EBLV-2	<i>European bat lyssavirus -2</i>
EUA	(United States of America) Estados Unidos da América
G	glicoproteína do vírus da raiva
Gln	aminoácido glutamina
Gly	aminoácido glicina
GAPDH	gene de glyceraldehyde -3- phosphate de hydrogenase
h	horas

HSV-2	herpes simplex vírus – 2
HIV-1	(human immunodeficiency vírus), vírus da imunodeficiência humana
HCV	(hepatite C vírus) vírus de hepatite C
IKOV	<i>Ikoma vírus</i>
IRF 3	(interferon regulatory fator) fator de regulação de expressão de interferon
IFN	interferon
IFD	reação de imunofluorescência direta
IDT	Integrated DNA Technology
Ile	aminoácido isoleucina
JEV	(Japanese Encephalite Virus) Vírus de Encefalite Japonesa
KHUV	Khujand virus
L	proteína de polimerase-RNA-dependente-L do vírus da raiva
LBV	<i>Lagos Bat Lyssavirus</i>
Le (RNA Le)	RNA líder do vírus da raiva
LD 50%	dose letal de 50%
Lys	aminoácido lisina
M	proteína da matriz do vírus da raiva
MEM	meio mínimo essencial ao Eagle
Met	aminoácido metionina
miRNA	microRNA
µl	microlitro
MMLV	Transcript reversa de Moloney Murine leucemia virus
MOKV	Mokola virus
N	nucleoproteína do vírus da raiva
N2A	neuroblastoma murino
NC	nucleocapsídeo
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NHJs	junções neuromusculares
NS	proteína não estrutural
nm	nanômetro
nmol	nanomoles
nt	nucleotídeos

OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
P	fosfoproteína do vírus da raiva
p75NTR	receptor neurotrópico
pH	potencial hidrogeniônico
PTGS	post transcriptional gene silencing
PV	Pasteur virus
pVRV ou pVCV	purified verocell rabies vaccine
qPCR	reação de PCR em tempo real
qsp	quanto é suficiente para
RABV	(rabies virus) vírus da raiva
RI	RNA replicativo intermediário
RISC	RNA induced silencing complex
RITS	complexo de silenciamento transcricional induzido por RNA
RNA	ácido ribonucléico
RNAi	RNA de interferência
RNAm	RNA mensageiro
RNases	ribonucleases
RNC	ribonucleocapsídeo
RT-qPCR	transcrição reversa de PCR quantitativa
Ser	aminoácido serina
SHIBV	Shimoni bat virus
shRNA	short hairpin RNA
SNC	sistema nervoso central
ssRNA	RNA sentido negativo fita simples
TGS	transcriptional gene silencing
TM	domínio transmembrana
UDG	uracil DNA glycosylase
VCV	vesiculovírus
VERO	células de rim de macaco Vera
VSR	vírus respiratório sincicial
WCBV	(west caucasian bat virus) virus de morcego caucasiano do oeste
WHO	(World Health Organization) Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	RAIVA: ASPECTOS GERAIS.....	18
1.2	TAXONOMIA DO VÍRUS DA RAIVA.....	22
1.3	MORFOLOGIA DO VIRION.....	23
1.4	GENOMA VIRAL.....	24
1.5	PROTEÍNAS DE RABV.....	25
1.5.1	Nucleoproteína N	25
1.5.2	Fosfoproteína P, M ou NS	26
1.5.3	Proteína de matriz M	27
1.5.4	Glicoproteína ou G	28
1.5.5	RNA polimerase-RNA-dependente L ou proteína extensa L	28
1.6	O CICLO INTRACELULAR DO VÍRUS.....	29
1.6.1	A fase inicial	29
1.6.2	A fase intermediária	30
1.6.3	A fase da maturação e liberação	32
1.7	PROFILAXIA DA RAIVA HUMANA.....	33
1.7.1	Pré-exposição	33
1.7.2	Pós-exposição	34
1.8	CASOS CLÍNICOS DE RAIVA HUMANA E O TRATAMENTO APLICADO.....	34
1.9	INTERFERÊNCIA POR RNA.....	36
1.9.1	Definição e o mecanismo	36
1.9.2	Desenho de siRNA	39
1.9.3	Sistemas de entrega dos siRNAs	40
1.9.4	Aplicações de RNAi	42
2	OBJETIVOS	45
3	MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1	AMOSTRAS VIRAIS.....	46
3.2	CULTIVO CELULAR.....	46
3.3	TITULAÇÃO DAS AMOSTRAS VIRAIS EM CULTIVO CELULAR.....	47
3.3.1	Imunofluorescência direta	48
3.4	TITULAÇÃO DAS AMOSTRAS VIRAIS EM CAMUNDONGOS	48
3.4.1	Imunofluorescência direta em camundongos	49
3.5	AVALIAÇÃO DOS AGENTES DE TRANSFEÇÃO EM CÉLULAS BHK- 21.....	49
3.6	OS PEQUENOS RNAs INTERFERENTES.....	50
3.6.1	siRNAs para a sequencia líder de RABV	50
3.6.2	siRNAs para o mRNA do gene P de RABV	51
3.7	ENSAIO DE SILENCIAMENTO DE RNA LÍDER DO VÍRUS E DE mRNA DE FOSFOPROTEÍNA VIRAL POR siRNA <i>IN VITRO</i>	52
3.8	TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDO PELA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLÍMERASE QUANTITATIVA (qRT - PCR) PARA O mRNA DE β - ACTINA E mRNA DE FOSFOPROTEÍNA DO VÍRUS DA RAIVA.....	55
3.8.1	Experimento <i>in vitro</i> para avaliação pelo método qPCR	55
3.8.2	Extração de mRNA total	56

3.8.3	Síntese de cDNA complementar (cDNA) e RT – PCR para mRNA de β –actina e de mRNA da fosfoproteína de RABV.....	56
3.8.4	PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR) para a quantificação relativa de mRNA de β – actina e mRNA de fosfoproteína de RABV.....	58
3.9	ENSAIO DE INIBIÇÃO POR RNA <i>IN VIVO</i>	59
4	RESULTADOS	61
4.1	TITULAÇÃO DAS AMOSTRAS PV E 4005 EM CÉLULAS BHK-21.....	61
4.2	TITULAÇÃO DAS AMOSTRAS PV E 4005 EM CAMUNDONGOS.....	61
4.3	Avaliação de agentes de transfecção em células BHK – 21.....	61
4.4	ENSAIO DE SILENCIAMENTO DE RNA LÍDER DO VÍRUS E DE mRNA DE FOSFOPROTEÍNAVIRAL POR siRNA <i>IN VITRO</i>	62
4.5	ENSAIO DE INIBIÇÃO POR RNAi <i>IN VIVO</i>	65
4.5.1	Sobrevivência dos camundongos tratados com siRNA 360 frente a 10DL50% das amostras de PV e 4005 de RABV	65
4.5.2	Imunofluorescência das amostras de SNC dos camundongos inoculados com as amostras PV e 4005 de RABV tratados com siRNA 360 e sem o tratamento	67
5	QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE mRNA DE FOSFOPROTEÍNA DO RABV	67
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÕES	78
	REFERÊNCIAS	79

1. INTRODUÇÃO

Nesta introdução serão apresentados os aspectos gerais da raiva, virologia básica, a terapia anti-rábica, o fenômeno de RNA interferência e a aplicação do mesmo.

1.1. RAIVA: ASPECTOS GERAIS

A palavra raiva originou-se do latim *rabere* o que significa “fúria”. Já os gregos chamaram *lyssa* (loucura) e os indianos *rabhas* (violência). Todos estes nomes refletem as manifestações causadas pela doença em seres humanos e em outros animais. O primeiro relato sobre a raiva foi registrado na Mesopotâmia em 2300 a.C. (Código de Eshnunna) onde descrevia que os cães doentes poderiam transmitir a doença para o homem. Este mesmo relato descreve que em caso de um animal causar a morte de um cidadão ou escravo, seu dono deveria pagar uma multa para os cofres públicos.

Isso demonstra que a raiva já era um problema de saúde pública desde os tempos da antiguidade (WILKINSON, 2002). Apesar dos esforços seculares para controle da raiva, ela ainda causa problemas significativos na área da saúde tanto em países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos. A raiva pode ser definida como uma doença aguda de origem infecciosa do sistema nervoso central causada pelo vírus do gênero *Lyssavirus* que acomete todos os mamíferos e tem evolução fatal e distribuição mundial (RUPPRECHT; HONLON; HEMACHUDHA, 2002). Geralmente, a transmissão acontece por meio da mordedura de um animal doente através da saliva infectada (ACHA; SZYFRE, 2003).

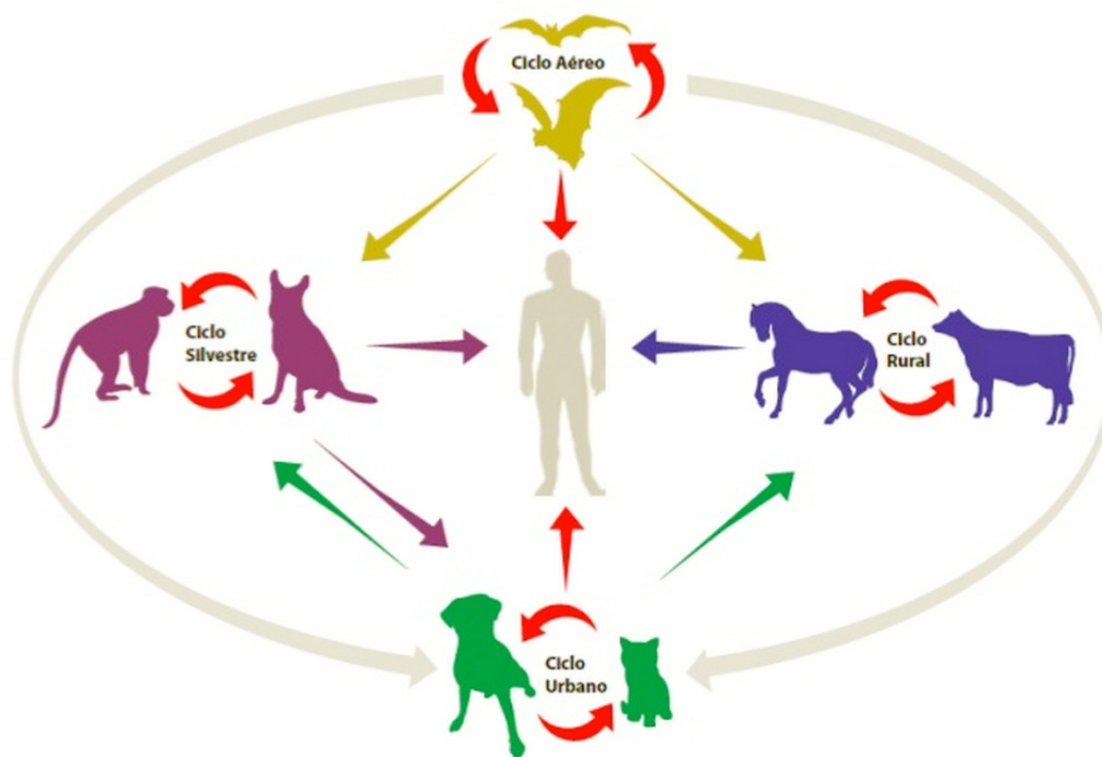
Em pacientes humanos, o período prodrômico da doença é caracterizado pelos sintomas inespecíficos, tais como: vômitos, dor de cabeça, febre, mialgia, alterações do comportamento, disfunções do sistema autônomo e paralisia trazendo para o doente um intenso sofrimento que tem a evolução dramática para o coma e depois a morte (BURTON et al., 2005).

Mesmo que a raiva possa ser prevenida através da vacinação, sua ocorrência é registrada em 150 países e territórios (WHO, www.who.int acessado em 16 de Dezembro de 2014) o que demonstra que ela é ainda um grave problema na saúde pública mundial. (BRIGGS; HANLON, 2007). A cada ano morrem de raiva dezenas

de milhares de pessoas na África e Ásia e a maioria das vítimas são crianças menores de 15 anos (WHO, www.who.int acessado em 16 de dezembro de 2014). Existe uma estimativa de 300 exposições da doença a cada 15 minutos. Mais de 15 mil pessoas mundialmente recebem a vacinação pré-expositiva (RUPPRECHT; HONLON; HEMACHUDHA, 2002) que representa um grande gasto para os cofres públicos.

Diversas espécies de mamíferos são suscetíveis ao vírus da raiva que permite a manutenção deste agente infeccioso em ciclos epidemiológicos dos quais os principais são da ordem *Chiroptera* e *Carnívora* (CHILDS; REAL, 2007).

O ser humano é um dos hospedeiros finais em todos os ciclos. Para facilitar o entendimento da epidemiologia da raiva na literatura são descritos quatro ciclos epidemiológicos (Figura 1): rural, urbano, silvestre terrestre e aéreo (KOTAIT; CARRIERI; TAKAOKA, 2009), apresentados de modo resumido em seguir.



Fonte: (INSTITUTO PASTEUR – SES/SP)

Figura 1 - Representação os ciclos epidemiológicos da raiva.

O mais estudado é o ciclo urbano que envolve cães e gatos. Neste ciclo o hospedeiro natural é o cão doméstico (*Canis canis*). Na maioria dos países do

mundo que aplicam a campanha nacional de vacinação de cães e gatos, a doença é controlada. Mas nos países da África e da Ásia (exceto a Rússia asiática), onde o cão é o reservatório principal, a raiva ainda é um problema de saúde pública (WHO, 2005). Em território nacional, na região Norte e Nordeste, a campanha de vacinação não atingiu a abrangência satisfatória e, por isso, a raiva canina ainda é um problema (BRASÍLIA, 2009). Nas regiões onde a vacinação é aplicada em cães e gatos, o ciclo urbano se faz presente com variantes de morcegos. (KOTAIT; CARRIERI; TAKAOKA, 2009).

No ciclo rural, ocorre a transmissão da raiva em animais domésticos de interesse econômico, tais como: suínos, caprinos, onívoros, herbívoros e equídeos. Na América Latina o reservatório desse ciclo é o morcego hematófago *Desmodus rotundus*.

Este ciclo, além de apresentar impacto econômico, proporciona um perigo de transmissão do vírus para o ser humano, o que ocorreu em 2006 em Minas Gerais quando um veterinário foi infectado durante a manipulação de um herbívoro. Os cães podem ser envolvidos neste ciclo também (KOTAIT; CARRIERI; TAKAOKA, 2009). Fora do Brasil este ciclo foi observado na Colômbia (PAEZ et al., 2007), Chile (YUNG; FAVI; FERNÁNDEZ 2002), Argentina (DELPIETRO et al., 1997), Venezuela (MATTOS et al., 1996), Bolívia (FAVI et al., 2003) e México (MATTOS et al., 1999).

No ciclo aéreo, os transmissores são quirópteros hematófagos e não hematófagos. O desmatamento do habitat natural dos morcegos pelo ser humano resulta na vinda destes quirópteros a áreas urbanas em busca de alimentos, o que por sua vez, causa ataques dos morcegos a humanos (KOTAIT; CARRIERI; TAKAOKA, 2009).

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

Nos Estados Unidos e no Canadá os morcegos não hematófagos responsáveis pela manutenção deste ciclo na natureza são: *Eptesicus fuscus*, *Lsionycteris noctivagans*, *Lasiurus cinereus*, *L. borealis* (NUNAN et al., 2002; RUPPRECHT; HONLON; HEMACHUDHA, 2002).

A *Tadarida Brasilensis* é mais uma espécie de morcego que tem um papel importante neste ciclo nos Estados Unidos (RUPPRECHT; HONLON; HEMACHUDHA, 2002), no Chile (MATTOS et al., 2000), no México (*Tadarida*

brasilensis mexicana) (VELASCO-VILLA et al., 2005) e na Colômbia (PAEZ et al., 2007).

Os gêneros *Artibeus*, *Eptesicus*, *Molossus*, *Myotis*, *Tadarida* e *Nyctinomops* são de morcegos não hematófagos que podem transmitir a raiva para seres humanos e animais de companhia (KOTAIT; CARRIERI; TAKAOKA, 2009).

No caso do ciclo silvestre terrestre, diferentes espécies de mamíferos podem transmitir a raiva. A variante viral depende da região e das características geográficas de cada país.

A raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), a raposa ártica (*Alopex lagopus*) e o “raccoon-dogs” (*Nyctereutes procyonoides*) são espécies de animais silvestres que são reservatórios do vírus no continente europeu (BOURHY et al., 1999). Depois da implantação da vacinação oral das raposas vermelhas, o “raccoon-dog” é o reservatório principal nesta região (KOTAIT; CARRIERI; TAKAOKA, 2009).

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

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

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

1.2. TAXONOMIA DO VÍRUS DA RAIVA

Pela classificação do Comitê Internacional de Taxonomia Viral, o vírus da raiva pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae* e gênero *Lyssavirus*.

A ordem *Mononegavirales* é composta de cinco famílias: *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Nyamiviridae*, *Paramyxoviridae* e *Rhabdoviridae* (<http://www.ictvonline.org> acesso em 18 de Dezembro de 2014). Por sua vez a família *Rhabdoviridae* inclui os seguintes gêneros: *Cytorhabdovirus*, *Ephemerovirus*, *Lyssavirus*, *Novirhabdovirus*, *Nucleorhabdovirus*, *Perhabdovirus*, *Sigmavirus*, *Sprivivirus*, *Tibrovirus*, *Tupavirus*, *Vesiculovirus* e um gênero sem nomenclatura.

O gênero *Lyssavirus* é composto por quatorze espécies:

1. *Aravan virus (ARAV)*;
2. *Australian bat lyssavirus (ABLV)*;
3. *Bokeloh bat lyssavirus (BBLV)*;
4. *Duvenhage virus (DUVV)*;
5. *European bat lyssavirus 1 (EBLV-1)*;
6. *European bat lyssavirus 2 (EBLV-2)*;
7. *Ikoma vírus (IKOV)*;
8. *Irkut virus (IRKV)*;
9. *Khujand virus (KHUV)*
10. *Lagos bat virus (LBV)*;
11. *Mokola virus (MOKV)*;
12. ***Rabies virus (RABV)***;
13. *Shimoni bat virus (SHIBV)*;
14. *West Caucasian bat virus (WCBV)*;

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

1.3. MORFOLOGIA DO VIRION

O vírus da raiva como outros *Rhabdovirus* tem a forma de uma bala de revólver com uma extremidade plana e outra esférica. A partícula viral tem a largura média de 180nm e o diâmetro aproximadamente de 75nm (KAPLAN, 1996) (Figura 2).

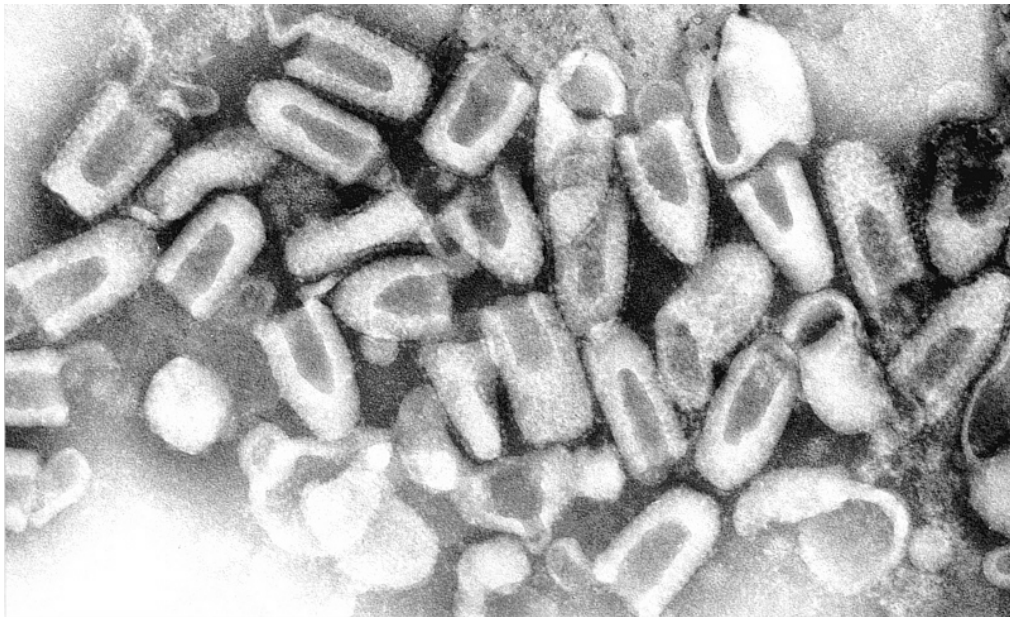


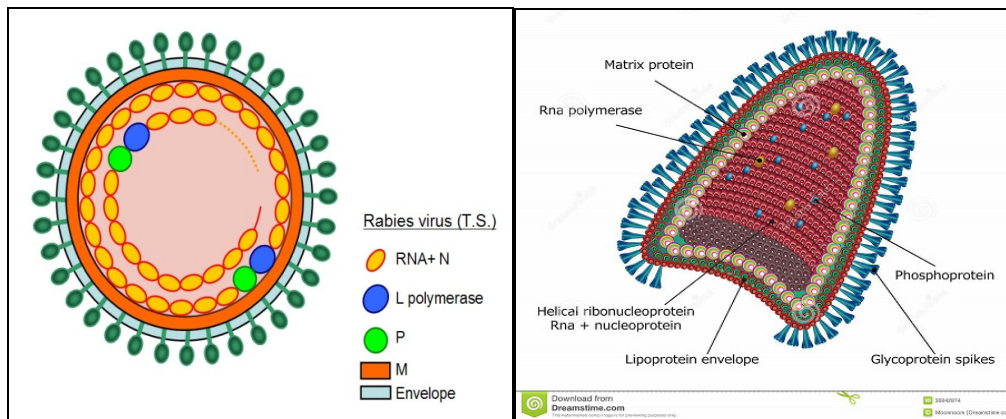
Figura 2 - Imagem de microscopia eletrônica do RABV corado negativamente.

A- 70000x

Fonte:

<http://web.stanford.edu/group/virus/rhabdo/2004bischoffchang/Rabies%20Profile.htm>

O vírus é envelopado por uma camada lipoprotéica da célula hospedeira com a espessura de 7-10nm com espículas que sobressaem da superfície do virion. As espículas têm 9nm de comprimento e 5nm de intervalo entre eles (TORDO; POCH, 1988).



<http://pixgood.com/rabies-virus-cell-structure.html>

Figura 3 - Apresentação esquemática do virion do vírus da raiva.

Os trímeros de glicoproteína G formam as espículas do virion (Figura 3) (GAUDIN et al., 1992). O domínio citoplasmático da glicoproteína G interage com a proteína M (matriz) que é inserida no envelope viral e forma o “esqueleto” do vírus. O ribonucleocapsídeo compõe a parte central do virion, ou seja, RNA genômico de fita simples de sentido negativo que é envolvida em sua maioria pela nucleoproteína (N), fosfoproteína (P) em associação com a proteína RNA polimerase RNA dependente (L) (WUNNER , 1991).

1.4. GENOMA VIRAL

O genoma do vírus não é segmentado, representado pelo RNA sentido negativo fita simples (ssRNA-) o que impede a síntese direta das proteínas virais e a infecção da célula por RNA por si mesma (WUNNER , 1991).

Após a infecção da célula ocorre a transcrição do genoma para síntese individual de RNA-mensageiro (RNAm) sentido positivo complementar ao RNA genômico para cada gene. Os RNAs monocistrônicas dão origem às proteínas virais (WUNNER, 1991).

O genoma viral é composto de 11.932 nucleotídeos (nt). Os primeiros 58nt de 3' do genoma faz referência a sequência de RNA líder (Le) não codificante (WUNNER, 1991). A 3' do RNA Le é representada pela sequência específica, chamando-se *cis-sinal* que funciona como um promotor para RNA transcriptase (L) iniciando a transcrição de RNA genômico. Por isso a RNA Le tem um papel crucial

no regulamento da transição entre a transcrição de RNAs e a replicação genômica (TORDO; POCHA, 1988).

Depois do RNA Le, a sequência do genoma composto pelos cinco genes estruturais (Figura 4) que codificam as proteínas virais são: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), matriz (M), glicoproteína (G) e RNA-polimerase RNA-dependente L (L). As regiões intergênicas (nucleotídeos 5' do fim do gene até 3' do começo de outro gene) estão representadas pelas sequências relativamente curtas (dinucleotídeos ou pentanucleotídeos). Uma região intergênica curta é localizada entre os N e P (dois nucleotídeos), entre os genes P e M e entre os genes M e G (cinco nucleotídeos), enquanto que a região intergênica entre os genes G e L é mais longa com 423 nucleotídeos denominada como pseudo-gene ou Ψ (WUNNER, 2007).

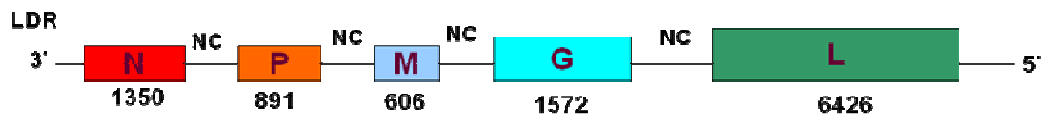


Figura 4 – Esquema da estrutura do genoma do vírus da raiva.

1.5. PROTEÍNAS DE RABV

Os cinco genes virais codificam as cinco proteínas estruturais.

1.5.1. Nucleoproteína (N)

A nucleoproteína contém 450 aminoácidos (aa) e tem a estrutura de um polipeptídeo que está associado com o RNA genômico do vírus. No caso do RABV esta proteína é fosforilada no resíduo de serina na posição 389 ao contrário do vesiculovírus (VCV) (TORDO; POACH, 1988).

É também um componente principal do virion e maior proteína de nucleocapsídeo, além de ser a proteína mais conservada entre as espécies de *Lissavirus* em termos de sequências de aa (WUNNER, 2007).

Uma das razões do alto nível de conservação desta proteína, particularmente em algumas regiões entre as espécies, é a sua função. Uma das funções-chave é N-específica encapsidação de RNA-genômico e a proteção dela contra as ações de ribonucleases celulares. Outro papel importante é a regulação da transcrição de RNA mantendo-o em uma configuração adequada para a transcrição (WUNNER, 2007).

Distribuída difusamente no citoplasma das células infectadas, a proteína N nascente forma os complexos homólogos (N-N) e heterólogos (N-P) coligados com o ribonucleocapsídeo (RNP) viral nascente (WUNNER, 1991).

Esta proteína viral juntamente com a fosfoproteína (P) e os RNAs virais (genômico, antígenômico e mRNAs) formam os Corpúsculos de Negri que aparecem no citoplasma celular durante a replicação viral (LAHAYE et al., 2010). Além disso, a N contém os epítomos antigênicos para B e T-linfócitos (WUNNER, 1991).

1.5.2. Fosfoproteína (P), M2 ou NS

Na literatura poderemos encontrar vários nomes relacionados a esta proteína: M2, NS e P. Os pesquisadores no passado chamaram esta proteína de M2 porque ela é associada à membrana do virion e é parecida com a proteína da matriz (M1) (GYORGY et al., 1971). Esta proteína já foi denominada de não estrutural (NS) porque tem a aparência da mesma proteína do vesiculovírus (VSV) e também foi encontrada em extrato de células infectadas, mas não em virions purificados (KANG; PREVEC, 1971).

Mais tarde esta proteína do RABV e outros vírus da ordem *Mononegavirales* foram denominados como fosfoproteína ou P. No entanto, esta proteína é única do RABV fosforilada que compartilha esta modificação pós-transcricional com a proteína N (WUNNER, 2002).

A proteína P contém 297 aa, sendo conservada entre as espécies de *Lyssavirus* com identidade de aminoácidos de 97% e tem várias formas de fosforização. Ela encontra-se em duas formas: hiperfosforilada e hipofosforilada em virions e em células infectadas (GUPTA et al., 2000).

A fosfoproteína tem um papel multifuncional. Uma dessas funções ocorre durante a síntese da nucleoproteína, onde a P liga-se na N prevenindo a autopolimerização da mesma e impede a ligação não específica desta ao RNA genômico

(WUNNER, 2002). Esta proteína tem um papel central como co-fator na replicação do genoma viral e atua na transcrição fazendo parte do complexo RNA-polimerase (P-L) através da estabilização da proteína L. Também participa do posicionamento do complexo de RNA-polimerase no RNA - molde (WUNNER et al., 1998).

Os estudos *in vitro* mostraram que P inibe a produção de intérferon IFN α e β através de diferentes mecanismos incluindo: abolição de fosforilação do fator de regulação de interferon (IRF-3), ação de dificultar a dimerização de IRF-3 e o transporte dele para o núcleo da célula e atividade transcricional de IRF-3 (BRZOZKA et al., 2005).

1.5.3. Proteína de matriz M

A proteína M é a menor proteína viral do RABV, composta de 202 aa (HIRAMATSU et al., 1993) que envolve o RNP durante a montagem do virion formando o esqueleto deste. É multifuncional, pois interage com proteínas tanto virais quanto da membrana celular. Sua parte central tem um domínio hidrofóbico que supostamente interage com os lipídeos da membrana (CAPONE; GHOSH, 1984; TORDO et al., 1986).

Outra função da proteína de matriz é que ela se liga intensamente ao e condensa o nucleocapsídeo nascente (NC) dentro do complexo helicoidal de ribonucleocapsídeo-proteína M. Aproximadamente 1200 a 1500 cópias das moléculas de M se conectam ao RNP do vírus da raiva. Ao mesmo tempo, M se liga à composição de RNP e intermedeia a conexão da parte central da estrutura do vírus à periferia da membrana celular onde se inicia o brotamento do vírus (MEBATION et al., 1999).

Esta proteína forma o contorno característico de bala de revólver para o RABV, independentemente da localização dela, dentro de RNP ou na superfície externa deste. O mecanismo através do qual a M intermedeia a ligação do vírus à membrana celular parece associado ao domínio rico em prolina localizado nos resíduos 35-38 dentro de uma sequência bem conservada de 14 aa no N-terminal da proteína (WUNNER, 2007).

Através de pesquisas com o RABV quimérico foi identificado que a M atua como “*trans-acting*”, fator que muda a síntese de mRNAs para síntese de RNA genômico do vírus (FINKE; CONZELMANN, 2003).

1.5.4. Glicoproteína ou G

A proteína G madura tem 505aa. Ela tem uma importância crucial na indução e ligação de anticorpos neutralizantes, bem como na estimulação de células T. A glicoproteína proporciona a adsorção do vírus à célula hospedeira (TORDO; POCH, 1988). É um elemento-chave na entrada e disseminação do vírus, também em patogenezidade e neuroinvasão (ITO et al., 2001).

Esta proteína tem formato de uma espícula e é composta de três domínios: ectodomínio (ED), transmembrana (TM) e endodomínio (ENDO). A parte externa da proteína é o ED que se estende para fora da superfície do virion. O C-terminal do ENDO estende-se desde a parte interna do envelope viral até o citoplasma da célula infectada durante a formação das partículas virais, onde interage com a M para completar a montagem do vírus. A região TM da glicoproteína é vinculada pelos 22 aa no envelope viral (WUNNER, 2007).

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

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

1.5.5. RNA-polimerase, RNA-dependente ou proteína extensa L

Esta é a maior proteína do vírus composta de 2142aa e equivale a 54% do genoma viral. A L é um componente catalítico do complexo de polimerase e junto com um cofator não catalítico P é responsável pela maioria das atividades enzimáticas envolvendo a transcrição e replicação de RNA viral (TORDO; POCH, 1988).

A proteína L tem um papel essencial no início da infecção em função da iniciação da transcrição primária do RNA genômico uma vez que o NC é isentado no

citoplasma da célula infectada. A atividade enzimática inicial de transcrição inclui a iniciação e alongação de RNA Le⁺ transcritos de mRNA assim como *capping* de RNAm, metilação e poliadenilação (WUNNER, 2007).

1.6. CICLO INTRACELULAR DO VÍRUS

Como na maioria dos vírus, o ciclo da replicação viral pode ser dividido em três fases: a fase inicial, a intermediária e a de maturação e liberação.

Os estudos recentes com o RABV proveniente dos morcegos mostram que a propagação do vírus acontece no sangue e invade o SNC através de junções neurovasculares de hipotálamos, ao contrário de outras linhagens de RABV que provavelmente entram em neurônios motores através das junções neuromusculares. Em ambos os casos, as partículas virais subsequentemente transportadas em direção retrógrada através dos axônios para o neurônio infectado (KELLY; STRIK, 2000).

1.6.1. Fase inicial

A infecção inicia com a ligação do vírus à superfície da célula alvo e a adsorção provavelmente pelos receptores ou unidade receptora celular (CRU) de tal maneira que permite a entrada de vírus nas células (WUNNER, 2002). Este passo requer a glicoproteína do vírus da raiva, uma vez que foi demonstrado que o RABV com deleção no gene codificador de glicoproteína pode infectar as células, mas não pode se propagar entre as células *in vitro* e *in vivo* (SCHNELL, et al., 2010).

Um dos potenciais receptores inicialmente investigados foi o receptor de acetilcolina (AChR) que se acha em junções neuromusculares (NMJs) (WUNNER, 2007). O AChR pode concentrar partículas virais à frente de NMJs aumentando a probabilidade das partículas virais serem recebidas pelos terminais neuronais (LENTZ et al., 1982; LEWIS; FU; LENTZ, 2000). Além disso, RABV inicialmente pode se replicar em células de músculo estriado e utilizar AChR para infectar as células musculares (WATSON, H.D.; TIGNOR, G.H.; SMITH, A.L., 1981).

Porém, nem todas as culturas celulares são susceptíveis à infecção viral *in vitro* por mais que expressem o AChR (TSIANG et al., 1986; TSIANG, 1993). Outro receptor estudado é a molécula de adesão da célula neuronal (NCAM). NCAM está

concentrada em regiões sinápticas e NMJs. Camundongos com deleção do gene que codifica a NCAM continuam sendo susceptíveis a infecção pelo RABV, mas a manifestação da doença é retardada, o que pode indicar que estes receptores não são essenciais para a infecção, mas tem um papel no processo de infecção (THOULOZE et al., 1998).

Finalmente, foi sugerido que o p75NTR (receptor neurotrópico p75) é um co-receptor para a ligação e a entrada de vírus na célula, mas ainda não se sabe se os receptores do vírus utilizados para a entrada na célula são os mesmos durante a disseminação do vírus entre as células (DIETZCHOLD, 1985).

A penetração viral ocorre via endocitose e pela fusão de envelope viral com a membrana celular (MARSH; HELENIUS, 1989; WHITT et al., 1991; GAUDIN et al., 1992). A fusão do vírus com a vesícula requer a mudança de pH dentro desta, sendo limiar de pH para ativação da fusão de partícula viral de aproximadamente 6,3, envolvendo uma série de mudanças específicas e discretas na conformação da glicoproteína viral. A liberação de RNP ocorre no citoplasma pela pressão do endossomo (WUNNER, 2007).

1.6.2. Fase intermediária

Como o local de entrada do vírus, o axônio, não fornece o meio bioquímico necessário para a síntese das proteínas virais, pois o RABV precisa alcançar o corpo da célula neuronal para replicação e transcrição (SCHNELL et al. 2010). O vírus da raiva recruta os mecanismos regulatórios que produzem os componentes virais em quantidades necessárias para a produção viral eficiente, mas baixo o suficiente para não serem detectadas pelo sistema imune do hospedeiro ou interferir nas funções vitais da célula (FABER et al. 2002).

Em seguida, quando a RNP é liberada, o nucleocapsídeo relaxa e forma uma hélice flexível, para facilitar a sequência dos eventos de replicação viral na célula (ISENI et al., 1998). O processo de transcrição desempenhada sobre o complexo de RNA com a N do genoma pelo complexo de RNA polimerase (proteína L e mais co-fator P) é independente das funções da célula-hospedeira. O complexo de RNA polimerase inicia a transcrição a partir da região 3' do RNA genômico.

Os primeiros transcritos de RNA a ser sintetizados são do RNA Le. Os transcritos de RNA Le não estão “capped” e poliadenilados em contraste com os transcritos de mRNA (COLONNO; BANERJEE, 1978; LEPPERT et al., 1979).

Os transcritos de RNA Le iniciam a síntese de mRNAs em um mecanismo de “iniciação-parada” de transcrição gênômica durante o movimento de RNA polimerase pelo genoma a partir de RNA gênômico sentido negativo (WUNNER, 2007). Cada um dos cinco mRNA monocistrônicos (Figura 5) sintetizados em ordem sequencial é traduzido em uma das cinco proteínas virais (HOLLOWAY; OBEJESKY, 1980). A sequência 3'-UUGU-5' no RNA gênômico no ponto de 3' de cada gene identifica o início da síntese de mRNA. Durante este processo o ponto 5' de mRNA nascente recebe um “cap” pela proteína L através de acréscimo de 7-metil guanosin no nucleotídeo de 5' de mRNA (TESTA et al., 1980).

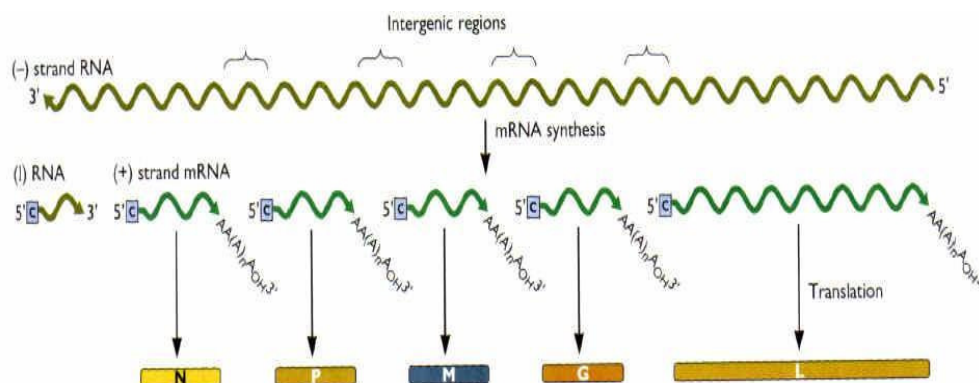


Figura 5 – Transcrição de RNAs mensageiros no ciclo viral

A replicação do genoma é iniciada pela síntese da cópia completa de RNA gênômico conhecido como *antigenoma* ou *RNA replicativo intermediário (RI)*. O RI serve como molde para a replicação de RNA gênômico de sentido negativo. Em seguida o RI e RNA progenômico são produzidos e encapsidados pela proteína N solúvel que está no citoplasma (BANERGEE; BARIK, 1992).

As proteínas virais são sintetizadas utilizando a maquinaria de síntese das proteínas da própria célula – poliribossomos. Quatro dos cinco RNAs mensageiros (RNAs) (N,-P,-M e L) são traduzidos nos ribossomos livres enquanto que o RNAm de G é traduzido nos ribossomos associados a membranas. A proteína G nascente é

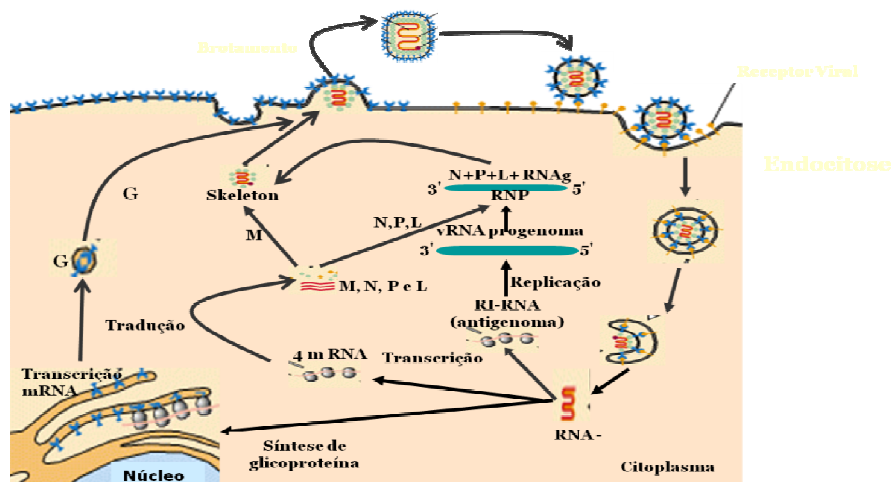
inserida no retículo endoplasmático rugoso onde ela adquire a forma de homotrímeros (GAUDIN, 1997). O processamento final da proteína G ocorre no complexo de Golgi onde acontece o acréscimo de monossacarídeos pelas glicosidases e glicosettransferases antes do aparecimento dos trímeros da proteína G na superfície da célula infectada (KOMFELD; KOMFELD, 1985).

1.6.3. Fase de maturação e liberação

A montagem do vírus começa e continua enquanto as células permanecem metabolicamente competentes. A encapsidação de RNA progenômico é o processo inicial da montagem do virion que começa com a adição de proteína N no final 5' do RNA nascente, e a formação do complexo RNA-N que protege o RNA das endonucleases celulares. Quanto a quantidade de RNA progenômico viral e das proteínas P, N, e L aglomeradas no citoplasma da célula infectada (Figura 6) atinge um limiar suficiente, o nucleocapsídeo viral é constituído. A proteína P medeia a ligação da proteína L ao complexo (WUNNER, 2007).

A próxima proteína que se associa ao complexo RNP é a M. Isto é o primeiro passo que inicia a brotamento viral. A proteína M em sua forma solúvel encontra-se no citoplasma celular onde ela pode interagir com a proteína G. Em seguida a M liga-se no complexo RNP e ambas migram à membrana celular. A proteína M está envolvida em todas as etapas que levam até o brotamento viral (MEBATSION; KONIG; CONSELMANN, 1996; ROBISON; WHITT, 2000).

O virion brota da membrana celular apenas se M se posicionar entre a bicamada lipídica e o RNP helicoidal. A interação de G com M é importante para a estabilização dos trímeros da proteína G na superfície da célula e o brotamento do vírus. A fase final de montagem do vírus ocorre por brotamento quando os virions com o RNP-M associado à membrana celular adquirem a sua bicamada lipídica (WUNNER, 2007).



Fonte: Piere (2003)

Figura 6 - Representação esquemática do ciclo intracelular do vírus da raiva

1.7. PROFILÁXIA DA RAIVA HUMANA

A profilaxia da raiva humana pode ser dividida em dois aspectos: pré-exposição (empregado para pessoas de risco antes da ocorrência do caso) e pós-exposição (destinados para a população em geral após o episódio do agravo com o animal infectado) (KOTAIT; CARRIERI; TAKAOKA, 2009).

1.7.1. Pré-exposição

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

Nas regiões onde acontece epizootia da raiva em cães e gatos, na vacinação podem ser adicionados carteiros e outros que vão à residência para entregar gás, fazer leitura de luz e água, etc. (KOTAIT; CARRIERI; TAKAOKA, 2009).

A vacina é aplicada nos dias 0, 7 e 28. Após 10 a 15 dias depois da última dose, deve ser colhida uma amostra de soro para dosagem de títulos de anticorpos. O título recomendado pelo OMS/OPAS é $>0,5$ UI/ml. Se o título for menor, deve ser

administrada uma dose de reforço e repetir-se a sorologia (KOTAIT; CARRIERI; TAKAOKA, 2009).

1.7.2. Pós-exposição

A pós-exposição é recomendada quando houve o risco da infecção pelo vírus da raiva. Podem ser utilizados vacina ou soro anti-rábico.

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

O tratamento de pós-exposição é efetivo para evitar o desenvolvimento da raiva, mas somente quando administrado antes do vírus da raiva alcançar o sistema nervoso periférico via gânglios motores em tecido muscular. Depois disso, o vírus não mais é acessível à neutralização por anticorpos (WUNNER et al., 2007).

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

1.8. CASOS CLÍNICOS DA RAIVA HUMANA E O TRATAMENTO APLICADO

O período de incubação no caso da raiva pode ser de 20 a 90 dias ou mais. Inicialmente ocorre a disseminação da infecção do sítio da inoculação. Depois o vírus se dissemina pelos nervos periféricos para o sistema nervoso central (SNC) usando o transporte axonal por meio de conexões neuro-anatômicas. Após o desenvolvimento da infecção de SNC, o vírus se dissemina centrifugamente através dos nervos sensoriais e autonômicos em múltiplos órgãos (JACKSON, 2013).

O período prodrômico não é específico. Os sintomas incluem parestesia, dor e vermelhão no local de entrada, que resulta em inflamação no gânglio sensorial local. Em 80% dos casos, os pacientes desenvolvem a encefalite que tem como características a hidrofobia, disfunções autonômicas e alternância entre os períodos de lucidez e hiperexcitação. Outros pacientes desenvolvem a raiva paralítica como a

quadriparesia e a disfunção dos esfíncteres. As duas formas da raiva eventualmente são fatais (APPOLINARIO; JACKSON, 2014).

Na literatura descrita, há dez casos documentados em que pacientes sobreviveram depois de desenvolver os sintomas. Os seis dos sete pacientes que sobreviveram receberam a vacina antes de desenvolver a doença (JACKSON, 2013a).

Em 2003, médicos e pesquisadores especializados desenvolveram um protocolo para tratamento humano que incluía vacinação antirábica, soro hiperimune, ribavirina, interferon- α e ketamina (JAKSON, 2003).

Este protocolo foi utilizado em 2004 para o tratamento de uma paciente de 15 anos de idade de Wisconsin, EUA, que foi mordida por um morcego e não recebeu a vacina. Neste caso foram administrados antivirais tais como ribavirina e amantadina, quetamina e fenobarbital para introduzir o coma terapêutico. Além disso, foi administrada a terapia intensiva para o suporte das funções vitais. A paciente sobreviveu com leves sequelas neurológicas (WILLOUGHBY et al., 2005).

Depois de ser administrado nesta paciente o protocolo foi chamado “Protocolo de Milwaukee”. Um mesmo protocolo, porém com alterações, foi utilizado no Brasil (Recife) em 2008 num caso de um paciente jovem que sobreviveu, mas teve sequelas (BRASÍLIA, 2009).

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

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

A amantadina, um agente quimioterápico lipossomotrópico, é capaz de bloquear a replicação do vírus da raiva por impedir o desenvolvimento durante a liberação da partícula viral presente nos lisossomos para o compartimento intracitoplasmático (SUPERTI et al., 1985), mas não se obtiveram dados a partir da

experimentação com camundongos que permitissem inferir a sua efetividade para uso clínico (BUSSEAU et al., 1988).

Mais um componente do protocolo, a ribavirina impede seletivamente a síntese viral de nucleotídeos de guanosina, sendo eficaz para a inibição da replicação do vírus da raiva *in vitro* (BUSSEAU et al., 1983a; BUSSEAU; ERMINE, 1983b), mas uma precedente tentativa de empregar este quimioterápico em pacientes humanos com raiva não resultou em evidências de efeitos virostáticos (WARREL et al., 1989).

Desde que foi empregado pela primeira vez em 2004, o “protocolo de Milwaukee” tem pelo menos 26 relatos de falha em casos similares da raiva humana (JACKSON, 2013b), indicando a necessidade de pesquisa continuada para aferir sua reprodutibilidade, em particular quando se consideram os diversos fatores que envolvem os episódios de infecção pelo vírus (porta de entrada, período de incubação, variante, carga viral entre outros).

UpToDate é um sítio on-line de referência clínica e não recomenda o uso do “Protocolo de Milwaukee”. Os potenciais efeitos colaterais das drogas utilizadas incluindo imunossupressão dos barbituratos, midazolam, ketamina e ribavirina podem resultar em síndrome imune inflamatória reconstituída (JACKSON, 2013a).

Recentemente uma opção aos antivirais clássicos para a raiva foi relatada, baseada na interferência por RNA (RNAi) por meio de short-interfering RNAs (siRNAs), a qual se mostrou efetiva quando utilizada em cultivo de células BHK-21 após a inoculação com a cepa PV (Pasteur Virus) do vírus da raiva (BRANDÃO et al., 2007) e em camundongos (DURYMANOVA, 2013).

1.9. INTERFERÊNCIA POR RNA

1.9.1. Definição e o mecanismo

O fenômeno de RNAi foi um achado acidental em 1990. Napoli, Lemieux e Jorgensen em um trabalho com petúnias, notaram que existia algum mecanismo que gerava o silenciamento dos genes da flor, mas não sabiam justamente qual era este mecanismo (NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990).

Em 1998, Craig Mello e Andrew Fire, os vencedores do Prêmio Nobel de Medicina em 2006, descobriram o mecanismo de RNAi nas pesquisas com um

helminto chamado *Caenorhabditis elegans*. Os estudos mostraram que os pequenos RNAs complementares ao mRNA da *C.elegans* tinham a capacidade de silenciar a expressão do gene correspondente, conseqüentemente este fenômeno foi denominado como interferência por RNA (FIRE et al., 1998).

RNAi é um mecanismo de controle de expressão gênica e também de autodefesa das células eucarióticas, pois pode prevenir especificamente infecções por vírus e pode inibir a expressão das proteínas virais (FISCHER; JAMES, 2004). Outros estudos desvendaram que plantas (Ex. *A.taliana*), insetos (Ex. a mosca da fruta – *Drosophila melanogaster*) e mamíferos possuem este mecanismo que tem um papel importante no controle da expressão gênica, modificação epigenética, regulação de heterocromatina e interação entre parasita/hospedeiro (OBBARD D.J., 2009).

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

Silenciamento gênico transcricional existe em animais e, plantas. Neste mecanismo ao siRNA se liga ao complexo RITS (Complexo de silenciamento transcricional induzido por RNA). O siRNA guia o complexo aos transcritos nascentes e promove a metilação de histona H3 na lisina 9 (H3K9) pelo histonemetiltransferase e causa a compactação de cromatina (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009).

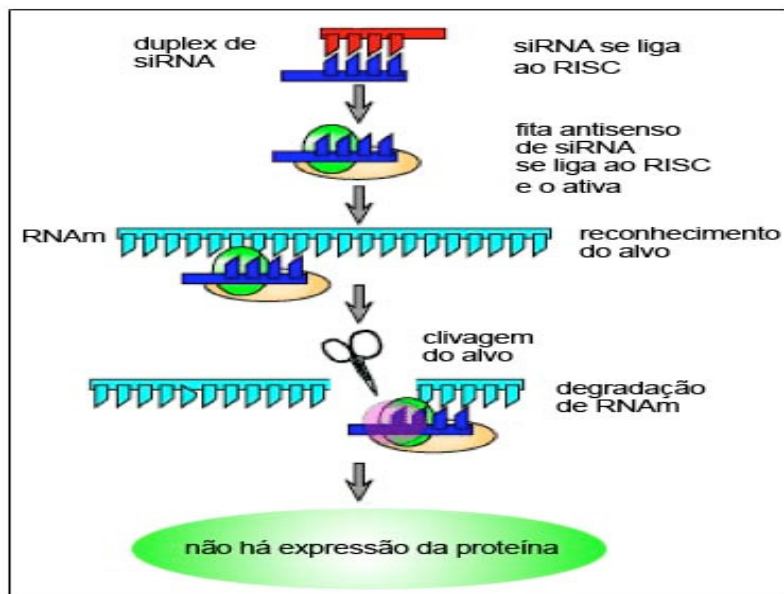
Um dos exemplos de TGS é demonstrado no trabalho de Ni et.al.(2004) com *C.elegans*, no qual os autores descreveram que siRNAs endógenos das células germinativas promovem o silenciamento dos retrotransposons no genoma deste helminto (Ni, 2014). O silenciamento gênico transcricional é conservado através de mitose e meiose por gerações (CASTANOTTO; ROSSI, 2009).

O processo de PTGS em várias espécies da natureza é composto por dois passos: inicial e efetivo. Durante o passo inicial, a Dicer (membro da família dos RNAses III) liga-se ao RNA dupla fita contendo 2 nucleotídeos sobressaindo na 3' das duas fitas e corta o RNA longo em RNAs curtos pequenos (siRNA). O siRNA é composto por duas fitas: senso (passageira) e antisenso (guia). No passo efetivo, estes pequenos RNAs dupla fita liga-se ao complexo denominado RISC (RNA induced silencing complex). (YIN; TAN, 2004). Logo em seguida a fita passageira de

siRNA desliga-se da dupla fita e é degradada pelos endonucleases da célula. A fita-guia fica no RISC e guia o complexo para o mRNA ligando-se a ele pelo princípio de pareamento do Watson-Crick. Depois que a fita-guia se liga ao RISC, o complexo é ativado.

O RISC é composto por várias proteínas, mas um dos principais componentes é uma proteína chamada Argonauta. A Argonauta tem quatro domínios: PAZ (que liga-se à fita-guia pelo seu terminal de ligação pelo 3'), PIWI (tem a função enzimática e cliva o mRNA), N e MID (contém o terminal de ligação com a fita-guia pelo fosfato de 5'). Depois que o domínio PIWI promove a clivagem da fita-alvo, os resíduos de mRNA são degradados pelas endonucleases celulares, impedindo, assim, de modo direcionado e específico, a síntese da proteína codificada (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009).

Os genes celulares podem ser silenciados não só pelos siRNAs endógenos, mas do mesmo modo pelos siRNAs sintéticos exógenos introduzidos na célula artificialmente. Estes mesmos siRNAs sintéticos são capazes de induzir o silenciamento PGTS das mRNAs virais (CASTANOTTO; ROSSI, 2009).



Fonte: <http://www.odec.ca/projects/2004/mcgo4s0/public_html/t3/RNA.html>

Acesso em 20 de Maio de 2010)

Figura 7- Representação esquemática do mecanismo de RNAi

1.9.2. Desenho de siRNA

A maior parte das aplicações terapêuticas baseadas em RNAi propõe o uso de siRNAs sintéticos. Um dos pontos importantes que influenciam no resultado de silenciamento é o desenho de siRNA. O desenho deveria obedecer a algumas “regras”, tais como:

1. 21-22 nt com 19 pares de nt (maior quantidade dos nt poderia desencadear a resposta imune celular através de IFN) (ANGART et al., 2013);
2. siRNA com deoxinucleotídeos TT na terminação 3' sobressaindo-se para imitar o produto de processamento do Dicer, como acontece naturalmente na célula (YIN et al., 2004);
3. A quantidade de G e C tem que compor 36 a 52% da sequência do siRNA e a quantidade maior de G/C aumenta a funcionalidade de siRNA (REYNOLDS et al., 2004; REN et al., 2008);
4. A sequência tem que apresentar ausência de repetições internas para prevenir a formação das estruturas secundárias que diminuem a concentração e potencial de silenciamento de siRNA (REYNOLDS et al., 2004);
5. Pelo menos 3 A/U na posição 15-19, U na posição 10 (fita senso) (o que diminui a seleção da dupla fita não funcional) (REYNOLDS et al., 2004);
6. G ou C não podem ocupar a posição 19 (fita senso) (REYNOLDS et al., 2004);
7. G não pode ocupar posição 13 (fita senso) (a não obediência da regra 4 e 7 pode diminuir a seleção do duplex mais funcional) (REYNOLDS et al., 2004);
8. Começar de 50-100nt de start códon (ATG) na sequência-alvo; (www.rnaiweb.com, www.microrna.org);
9. Regiões 5' UTR e 3' UTR devem ser evitadas como alvos (REYNOLDS et al., 2004).

1.9.3. Sistemas de entrega dos siRNAs

Devido ao seu tamanho e a carga negativa e hidrofóbica, um siRNA não pode com facilidade atravessar a membrana celular. Um siRNA “nu” é filtrado rapidamente da circulação sanguínea, degradada ou pode causar resposta imune ou inflamatória. A função dos sistemas de entrega é proteger o siRNA da degradação e facilitar o transporte dela para o citoplasma da célula, sendo que várias características destes podem aumentar a eficácia terapêutica dos siRNAs tais como: tamanho, carga, forma e química do veículo de entrega (ANGART et al., 2013).

Hoje em dia, são usados dois tipos de entrega de siRNAs: vetores não virais (lipossomos catiônicos, conjugados, complexos com os peptídeos, anticorpos ou polímeros) e vetores virais ou plasmídeos de DNA modificados geneticamente que carregam shRNA (*short-harpin RNA*) e vão originar os siRNAs pela transcrição em célula hospedeira (CASTANOTTO; ROSSI, 2009).

Vários tipos de vetores sintéticos foram investigados para a estratégia de entrega de siRNA, incluindo lipídios catiônicos, polímeros catiônicos e peptídeos catiônicos penetrantes (*CPPs- cationic cell - penetrating peptides*) (WON; SUNG, 2009). No quadro 1 são apresentados vários sistemas não virais de entrega *in vivo*.

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

Formulação de siRNA	Órgão alvo ou tecido	Via de administração	O gene alvo	Tipo de enfermidade
Modificação química	Fígado e	Intravenosa	Apo B	Redução de apoB e colesterol
Modificação química + lipídeo	Fígado	Intravenosa	HBV	Redução de quantidade de DNA de HBV no soro
Eletropulsção	Músculo	Intramuscular	GFP	Silenciamento de GFP

Complexo de histidina e lipídeo	Câncer de mama	Intratumoral	Raf - 1	Câncer de mama
PEI complex	Pulmão	Intravenosa	Genes de vírus de influenza	Influenza
Virosoma + lipídeos	Cavidade peritoneal	Intraperitoneal	GFP	Silenciamento de GFP

Fonte: Aigner.A.(2006)

O complexo siRNA/veículo pode ser formado por dois caminhos: autoligação através de eletrostática (típico) ou ligação covalente (raro). No caso de autoligação, o siRNA pode ser ancorado à superfície do veículo ou totalmente encapsulado por ele dependendo da estrutura e a flexibilidade do veículo (ANGART et al., 2013).

O tipo de sistema de entrega vai depender de cada tipo de tecido/órgão, o tipo de siRNA utilizado, o tempo desejado de silenciamento e via de entrega, a qual pode ser local ou sistêmica. Por exemplo, para bloquear a replicação de VRS (vírus respiratório sincicial) foi utilizado quitosan e a via de entrega intranasal (LI et al., 2005), e lipídeo catiônico para entrega intravaginal de siRNA em camundongos para proteger de HSV-2 (PALLISER et al., 2006).

Um dos sistemas mais utilizados para a entrega dos siRNAs são os lipídios catiônicos. A rede de carga positiva destes facilita a formação do complexo com o siRNA polianiónico e a interação com a carga negativa da membrana celular. Estas moléculas interagem com siRNA pela interação iônica e não pela adsorção simples na superfície do veículo. Esta classe das nanopartículas pode promover a estabilidade de siRNA em soro sanguíneo, aumentando o tempo da circulação dos mesmos no sangue e ajuda eventualmente a alcançar as células-alvo pelo transporte vesicular (endocitose e/ou macropinocitose). Os lipossomos catiônicos foram aplicados amplamente em vários estudos para entrega dos siRNAs *in vitro* e *in vivo*, tendo-se como exemplos comerciais RNAitect (Quagen), Oligofectamine, Lipofectamine (Invitrogen) e TransIT TKO (Mirus) (WON; SUNG, 2009).

Entre os vetores virais são usados lentivirus, adenovirus e o vírus adeno-associado (CASTANOTTO; ROSSI, 2009). A principal vantagem deste sistema de

entrega é a administração única e a expressão prolongada de efeito terapêutico, porém, alguns vetores virais, ainda que não patogênicos, são potencialmente imunogênicos. O uso deste sistema é utilizado particularmente em doenças crônicas tais como HIV e hepatites virais. Outro risco maior a ser considerado é o acúmulo de mutações no genoma do vetor viral, causando mutações insercionais ou levando a expressão gênica aberrante (CASTANOTTO; ROSSI, 2009).

1.9.4. Aplicações de RNAi

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

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

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

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

Brandão (2007) e colaboradores foram os primeiros a utilizar o fenômeno de RNAi para a inibição de replicação de RABV, administrando um “pool” dos três siRNAs dirigidos ao mRNA da nucleoproteína, em células BHK-21 infectadas com PV, diminuindo em 5 vezes o título viral nas células tratadas em comparação com os controles.

Israsena e colaboradores utilizaram o miRNA inserido no plasmídeo contra mRNA da proteína N resultando em redução de 90% do genoma viral em células N2A 72h depois da infecção. Este trabalho demonstrou que os miRNAs podem inibir

a replicação não só do vírus fixo (CVS, HEP-flury), mas também o vírus selvagem (AgV2) (ISRASENA et al., 2009).

Outro grupo de pesquisadores já usou o adenovírus expressando o siRNA contra mRNA das proteínas L e N do RABV *in vitro* e *in vivo*, conseguindo a diminuição dos focos fluorescentes em 48,2% no caso de siRNA contra mRNA da proteína L nas células infectadas com 0.001 MOI de PV. No experimento *in vivo*, animais infectados via intramuscular com 15 e 20 DL50% de CVS e tratados com os vetores (via intramuscular) expressando siRNAs contra mRNA da proteína N e L resultaram, em ambos os casos, em 50% de sobrevivência dos camundongos (SONWANE et al., 2011).

Gupta (2012) e colaboradores infectaram as células BHK-21 com PV e trataram com o vetor adenoviral expressando o siRNA contra proteína N e L. Os siRNAs diminuíram em $83,5\% \pm 2,4\%$ as unidades formadoras de placas do RABV nas placas tratadas comparadas com as placas controle. Já *in vivo*, os camundongos foram desafiados com 20DL50% de CVS-11 via intramuscular e tratados via intracerebral com vetor adenoviral expressando siRNAs contra proteína N e L do RABV. No grupo dos animais tratados com vetor expressando o siRNA N a porcentagem de sobrevivência atingiu a 66,6, contra 33,3% no grupo tratado com siRNA L.

Os trabalhos de Sonwane et.al. (2011) e Gupta et.al.(2012) demonstraram a efetividade de siRNAs em inibição de replicação de RABV *in vivo*.

Em 2012 Yang (2012) utilizou um plasmídeo que codifica o siRNA contra proteína N do RABV *in vivo* e *in vitro*. Em células foi observada a queda do nível de mRNA da proteína N em 94,2% e o efeito durou 96h. A diminuição da quantidade da proteína em questão foi comprovada pelo *western blot*. Quando os mesmos siRNAs foram administrados *in vivo* em animais infectados com CVS foi observada a redução dos sinais clínicos da doença e da morbidade.

Mais um grupo dos cientistas administrou plasmídeos codificantes dos siRNAs contra proteínas N e G e um plasmídeo que codifica os siRNAs para ambas proteínas do RABV quando células BHK-21 foram infectadas com PV e tratadas com siRNAs mencionados atingindo a diminuição do título viral em 85,9% N siRNA, 86,8% G siRNA e 87,4% G e N siRNA. Este trabalho confirmou que o efeito de RNAi pode ser potencializado utilizando o plasmídeo que expressa os siRNAs contra os mRNAs das proteínas diferentes de RABV (MESHRAM et al., 2013).

Ono et al.(2013) utilizaram um “pool” dos siRNAs contra mRNA de proteína N do RABV em camundongos infectados com 100DL50% de PV o que resultou em 30% de animais sobreviventes no grupo tratado contra 100% de mortalidade no grupo animais não tratados. Novamente, mais um estudo mostrou que os siRNAs são capazes de inibir parcialmente a replicação do vírus da raiva e diminuir a mortalidade dos animais infectados com alta dose viral.

Outro trabalho com diferente vetor viral foi publicado em 2014 onde foi empregado o lentivirus como vetor de expressão dos siRNAs contra mRNA das proteínas L e N do RABV. Neste caso foi feito um tratamento pré-exposição dos animais com o vetor lentiviral via intracerebral e depois a infecção com 20DL50% de CVS via intramuscular. Sobreviveram 62,26% dos animais tratados com o vetor expressando siRNA contra mRNA N. Estes resultados demonstram que outro tipo de vetor viral pode ser utilizado como método de entrega dos siRNAs para o tratamento da raiva (SINGH et al., 2014).

Apollinário-Harary (2014) demonstrou que o “pool” dos siRNAs dirigidos ao mRNA da proteína N diminui a severidade dos sinais clínicos nos animais infectados com AgV2 e inibe a invasão imune do RABV.

Mais recentemente, demonstrou-se que lipídeo catiônico conjugado com siRNAs contra mRNA da fosfoproteína de RABV em células BHK-21 infectadas com PV e variante de *Desmodus Rotundus* leva a queda do título viral equivalente a 1log quando se compara com as placas controle. Isso aponta que os siRNAs não são só efetivos contra as amostras fixas, mas também contra amostra do campo (AgV3) (ONO; BRANDÃO, 2014).

Pesquisas nesta área são um amplo campo a ser explorado no campo da raiva podendo contribuir com a diminuição do impacto causado por esta terrível doença.

2 . OBJETIVOS

O presente trabalho teve os seguintes objetivos:

- Avaliar *in vitro* a eficiência de três diferentes *short-interfering* RNAs (siRNAs) para silenciamento de RNA Líder do vírus da raiva.

- Avaliar *in vitro* a eficiência de três diferentes *short-interfering* RNAs (siRNAs) para silenciamento gênico pós-transcricional de mRNA de fosfoproteína do vírus da raiva.

- Testar *in vivo* um protocolo para terapia anti-rábica baseado em interferência por RNA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e métodos usados neste trabalho são descritos em seguida.

3.1. AMOSTRAS VIRAIS

Como amostra viral de referência, foi utilizado PV (Pasteur Virus). Como amostra de campo foi utilizada uma proveniente de bovino, variante antigênica 3 (AgV3, *Desmodus Rotundus*), identificada como 4005. Ambas as amostras foram fornecidas pelo Instituto Pasteur de São Paulo.

Ambas as amostras foram inicialmente isoladas e cultivadas em células da linhagem N2A (neuroblastoma murino) para os experimentos *in vitro*. A amostra PV foi cultivada durante 9 passagens e a amostra 4005 por 5 passagens, respectivamente, para atingir o volume de estoque necessário.

Além disso, foi feita uma passagem de cada amostra em camundongos (10 animais por amostra) por via intracerebral de acordo com o protocolo de Koprowsky (1996) para produção de estoque e depois utilizado em experimentos *in vivo* das amostras PV e 4005.

A suspensão de SNC (sistema nervoso central) dos camundongos infectados foi preparada pelo seguinte protocolo, a partir de um “pool” de todos os SNCs dos camundongos infectados com cada amostra em separado, como descrito a seguir.

1. Foi adicionado o meio para o cultivo celular (MEM) para uma suspensão a 20% (v/v), seguindo homogeneização em vórtex;
2. Foi feita a centrifugação de 2.500g/ 30 minutos com a refrigeração a 4 °C;
3. O sobrenadante foi aspirado e dividido em tubos de 1 ml, preservados em freezer -80 °C.

3.2. CULTIVO CELULAR

Para os experimentos *in vivo*, tanto para amostra PV quanto para a 4005, produzidas em células N2A, foi utilizada a linhagem celular BHK-21 (C-13; ATCC CCL-10, Instituto Adolfo Lutz), cultivada em frascos estacionários de plástico de 25cm² (T2) ou em placas de cultivo celular de 96 orifícios, com Meio Essencial

Mínimo de Eagle (MEM), com sais de Earle e com adição de soro fetal bovino (SFB) a 10%. Optou-se por esta linhagem ao invés da N2A em função de serem as células BHK-21 mais resistentes aos processos de lavagem subsequentes aos experimentos com siRNAs.

3.3. TITULAÇÃO DAS AMOSTRAS VIRAIS EM CULTIVO CÉLULAR

Para a titulação da amostra PV e AgV3 em cultivo de células BHK-21 foi utilizado o protocolo descrito a seguir:

1. Foram utilizadas placas de cultivo de células de 96 cavidades onde foram adicionados 50 µl da suspensão das células BHK-21 ($1,8 \times 10^5$ células/ cavidade), acrescentando-se 120 µl de MEM com 10% SFB. As placas foram mantidas na estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante 24 horas para se obter confluência da monocamada celular.

2. A seguir, foram preparadas diluições de vírus referente a cada amostra na base 10 em MEM sem SFB.

3. O MEM com SFB foi retirado da placa e a seguir foi substituído por 100µl em cada poço de vírus diluído em MEM sem SFB, correspondendo a primeira coluna a diluição 10^{-1} , a segunda a 10^{-2} e assim por diante até a sétima coluna com a diluição 10^{-6} . A oitava coluna foi mantida como controle negativo, onde foram acrescentados 100µl de MEM também sem o SFB.

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

4. Após este período, o MEM contendo vírus de todas as diluições foi descartado por inversão das placas, aspirando-se o volume restante com pipeta multicanal e substituído por MEM com 2% SFB em volume de 200µl por poço.

5. Posteriormente a placa foi mantida a 37°C com 5% de CO₂ durante 48 horas.

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

3.3.1 Imunofluorescência direta

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

2. A reação de imunofluorescência direta foi procedida com conjugado imunoglobulina total de coelho anti-nucleocapsídeo do vírus da raiva/isotiocianato de fluoresceína (produzida pelo Instituto Pasteur de São Paulo), segundo as instruções do fabricante. Foram adicionados 40µl por poço de combinação conjugado (1:70) + Azul de Evans (200ul PBS 1X + 100ul de Azul de Evans), incubando-se por 1h a 37°C.

3. A seguir, o conjugado foi descartado e as placas passaram por três lavagens em PBS (solução de salina tamponada) seguidas de três lavagens em água destilada. Em seguida foi realizada a secagem das placas.

4. Foram adicionados 50µl de glicerina a 20%.

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

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

3.4. TITULAÇÃO DAS AMOSTRAS VIRAIS EM CAMUNDONGOS

Foram utilizados camundongos albinos suíços de 21 dias de idade, com peso entre 11 e 14g. Para cada diluição do vírus de cada uma das amostras virais (PV e 4005), foram utilizados dez camundongos.

Para a titulação das amostras em sistema nervoso central de camundongos foi utilizado o protocolo descrito a seguir:

1. As amostras virais foram diluídas em base de 10 em diluente viral (17g de cloreto de sódio x 2ml de gentamicina (40mg) x 40 ml de soro fetal bovino/q.s.p. 2000ml de água destilada). Para o ensaio, foram utilizadas as diluições 10^{-2} a 10^{-6} .

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

3. Os camundongos foram observados durante 30 dias. Aqueles com sintomas de raiva como pêlos eriçados, tremores, descoordenação motora, paralisia, hiperestesia e morte a partir do quinto dia após a inoculação, bem como aqueles sem sinais até 30 dias após a inoculação foram eutanasiados.

3.4.1 Imunofluorescência direta em camundongos

Todas as amostras de sistema nervoso central foram submetidas à imunofluorescência direta para detecção de antígenos do vírus da raiva a partir de impressões dos mesmos em lâminas de vidro segundo o protocolo descrito por DEAN; ABELSETH; ATANASIU, (1996) com conjugado antirrábico policlonal anti-nucleocapsídeo/ isotiocianato de fluoresceína (Instituto Pasteur). Para a leitura das lâminas, foi utilizado o microscópio de fluorescência da marca “Leica DMLB” no aumento 40x.

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

3.5. AVALIAÇÃO DE AGENTES DE TRANSFEÇÃO EM CÉLULAS BHK-21

A escolha de agente de transfecção foi feita com a ajuda de kit comercial – Silencer® siRNA Transfection II Kit (Ambion) de acordo com as instruções do fabricante. Este kit oferece duas classes de agentes de transfecção: lipídios catiônicos e poliaminas.

Como siRNA-teste, o mesmo kit também traz um siRNA para silenciamento do mRNA do gene GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), enzima expressa por células eucarióticas e um siRNA controle negativo, sem identidade com qualquer mRNA conhecido.

A revelação da inibição de expressão foi feita com o KAlert GAPDH Assay Kit (Ambion) baseado no método fluorescente para medir a atividade enzimática de GAPDH nas células transfectadas. O kit foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante.

O cálculo da eficiência do silenciamento foi calculado com a seguinte fórmula:

% expressão residual = 100x Δ fluorescência GAPDH/ Δ fluorescência siRNA Neg

3.6 OS PEQUENOS RNAs INTERFERENTES (siRNAs)

3.6.1. siRNAs para a sequência líder do RABV

Foram desenhados três siRNAs para sequência líder do RABV, utilizando o aplicativo BLOCK-iT™ RNAi Designer (www.invitrogen.com/rnai) a partir de uma sequência consensual obtida com o programa Bioedit 7.0.9.0 (©1997-2007 Tom Hall) de sequências recuperadas do Genbank. As sequências das siRNAs foram submetidas a BLAST/n no Genbank para a verificação de identidade destas sequências com qualquer outro organismo diferente do RABV. As sequências de siRNAs contra de RNA líder estão no quadro 2.

Os siRNAs foram sintetizados no formato duplex, com dois deoxi-Ts nas posições 3'.

Quadro 2 - siRNAs (Short-interfering RNAs) que foram utilizados para a sequência líder do vírus da raiva, apresentando a sequência de ribonucleotídeos em uma apresentação de fita dupla e a respectiva posição no gene genoma da amostra PV de RABV acesso Genbank M13215.1.

siRNA	sentido 5'-3'	Posição
L1-S	ACGCUUAACAACCAGAUCAAAGAAA	1-25
L1-AS	UUUCUUUGAUCUGGUUGUUAAGCGU	
L2-S	ACAGACAGCGUCAAUUGGCAGAGCAA	28-52
L2-AS	UUGCUCUGCCAUUGACGCUGUCUGU	
L3-S	CAGACAGCGUCAAUUGGCAGAGCAA	29-53
L3-AS	UUUGCUCUGCCAUUGACGCUGUCUG	

3.6.2. siRNAs para o mRNA do gene P de RABV

Os stealth siRNAs contra os mRNA do gene P do RABV foram desenhadas utilizando o aplicativo BLOCK-iT™ RNAi Designer (www.invitrogen.com/rnai) a partir de uma sequência AB519642.1 do AgV3 recuperada do Genbank.

Optou-se, neste caso, pela síntese dos siRNAs no modo Stealth siRNAs por ser este referente a uma nova geração de siRNAs com uma modificação química (não explicitada pelo fabricante LifeTechnologies), que permite maior eficiência e estabilidade, menos efeitos indesejados e menor toxicidade celular. (<http://www.lifetechnologies.com/br/en/home/life-science/rnai/synthetic-rnai-analysis/stealth-rnai-technology.html>).

Pelo software foram desenhadas 10 stealth siRNAs para mRNA do gene P RABV.

Para seleção dos três siRNAs a ser utilizadas no experimento, foi criado, para o presente trabalho, um algoritmo que se baseia nos princípios de desenho dos siRNAs que se encontram no item 1.9.2. da introdução.

Para a avaliação das sequências pelo algoritmo acima para siRNA, foram atribuídos os escores 0, 5 e 10. O escore 0 significa que a seqüência de siRNA não obedecia este princípio, 5 que a metade do princípio foi cumprida e 10 que o dado princípio foi cumprido integralmente. Finalmente, foram selecionados os três stealth siRNAs cuja soma de escores foram as três mais elevadas, sendo estes aqueles apresentados no Quadro 3.

siRNA	Sequencia de dupla fita		Posição no gene
	Sentido 5'-3'	sentido	
stealth 360	GACCGUCGAGGAAAUCAUAUCCUAU	S	1873
stealth 360	AUAGGAUAUGAUUUCUCGACGGUC	AS	
stealth_649	UCCCGAUCAUCAGGGGAUAUUCUUGU	S	2161
stealth_649	ACAAGAAUAUCCCGAUGAUCGGGA	AS	
stealth_652	CGAUCAUCAGGGGAUAUUCUUGUACA	S	2165
stealth_652	UGUACAAGAAUAUCCCGAUGAUCG	AS	

Quadro 3 – siRNAs (Short-interfering RNAs) que foram utilizados para o silenciamento gênico pós-transcricional do mRNA da fosfoproteína do vírus da raiva, apresentando a seqüência de ribonucleotídeos em uma apresentação de fita dupla e a respectiva posição no gene P da amostra PV de RABV acesso Genbank M13215.1.

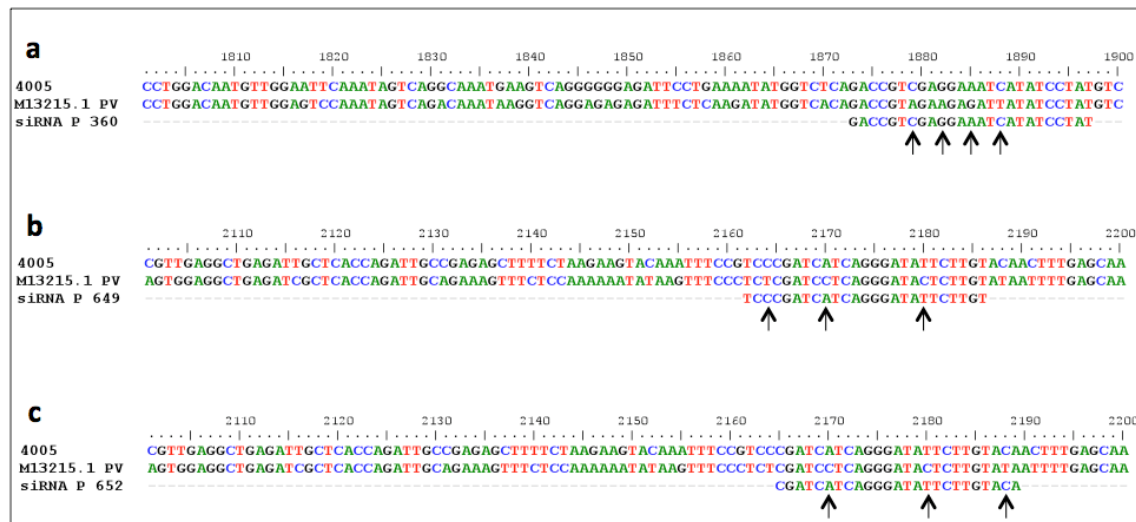


Figura 8 – Regiões de complementariedade dos siRNAs a: 360, b: 649 e c: 652 em relação as sequências do gene codificador da fosfoproteína P das amostras 4005 (AgV3) e PV (Pasteur Virus) de vírus da raiva utilizadas no presente estudo. As sequências dos siRNAs referem-se a versão em DNA do reverso-complemento da fita anti-senso dos siRNAs apresentados no Quadro 1. A posição no genoma completo pode ser vista em relação a amostra PV (número de acesso Genbank M13215.1). As setas indicam posições de ausência de identidade entre as sequências.

3.7. ENSAIO DE SILENCIAMENTO DE RNA LÍDER DO VÍRUS E DE mRNA DE FOSFOPROTEÍNA VIRAL POR siRNA *IN VITRO*

No presente estudo, cada siRNA para a sequência líder e para o mRNA da proteína P de RABV foi testado quanto à sua atividade inibitória de modo individual *in vitro* e o siRNA para mRNA da proteína P com o mais intenso efeito inibitório foi testado *in vivo*.

A eficiência de cada um dos siRNAs em silenciar o RNA líder do vírus da raiva foi realizado em duas repetições para cada um dos três siRNAs com a amostra PV. As diluições virais utilizadas foram 10^{-1} a 10^{-4} .

A eficiência de cada um dos três siRNAs contra mRNA da proteína P foi testada com as duas amostras virais: PV e AgV3. Para este fim, foram utilizadas as diluições virais de 10^{-2} a 10^{-5} para PV e 10^{-2} a 10^{-7} para AgV3 sendo oito poços para cada diluição. As diluições foram diferentes para cada amostra viral em função das diferenças de títulos obtidas para cada uma delas.

Para o ensaio de silenciamento de RNA líder foi utilizado NeoFX™ (Ambion) e para os ensaios com siRNAs contra mRNA da proteína P a Lipofectamina 2000™ (Invitrogen®) de acordo com as instruções do fabricante, ambos são os agentes de transfecção de classe dos lipídeos catiônicos.

Adianta-se aqui o fato de que, conforme demonstrado pelo protocolo apresentado no item 3.5, lipídios catiônicos foram demonstrados como mais eficientes para transfecção em células BHK-21. O fato de lipídios diferentes ter sido utilizados deve-se ao fato da descontinuação da fabricação de NeoFX™, substituindo o mesmo pela Lipofectamina 2000™.

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

Em cada poço foram adicionados 100µL ($1,5 \times 10^4$ células/poço) de suspensão de células BHK-21 em meio mínimo de Eagle com 10% de soro fetal bovino (SFB). As placas foram cultivadas a 37°C com 5% de CO₂ durante 24 horas para a obtenção da confluência da monocamada de 30 a 80%.

2. O meio de crescimento de células de todas as placas foi descartado e procedido a inoculação transferindo 100 µL de cada diluição viral no seu poço correspondente (Figura 9 e 10).

3. As placas foram incubadas a 37°C/ 5% CO₂/2 horas, tempo suficiente para a penetração viral (SHANKAR; KOPROWSKI, 1991).

4. A seguir, os inóculos com as diluições virais foram descartados e foram adicionados 20µL da combinação de agente de transfecção/siRNA 10µM na proporção 1:1 (v/v) em cada poço das diluições na placa-teste, adicionando-se 80µl/poço de MEM com 2% SFB o que daria uma concentração final do siRNA de 2µM, ou seja, 0,2nmoles em total.

5. Em uma das colunas da placa teste, foram adicionados 100µL de MEM com 2% de SFB, sem adição de vírus ou siRNA, servindo como controle negativo.

6. Simultaneamente, nas colunas livres de inoculação viral da placa-controle, foram adicionadas 100µL da combinação de agente de transfecção com MEM com 2% de SFB na proporção 1:1 (v/v), sem qualquer siRNA, para observação de possível efeito citotóxico.

7. Seguiu-se, então, incubação a 37°C/ 5% CO₂/24 horas, completando, assim, 26 horas pós-inoculação e, portanto, pelo menos 2 ciclos de replicação do vírus da raiva (SHANKAR; KOPROWSKI, 1991). Outras quatro placas foram incubadas nas mesmas condições, mas por 48h.

8. Procedeu-se a reação de imunofluorescência direta para detecção de nucleocapsídeo do RABV conforme descrito no item 3.3.1.

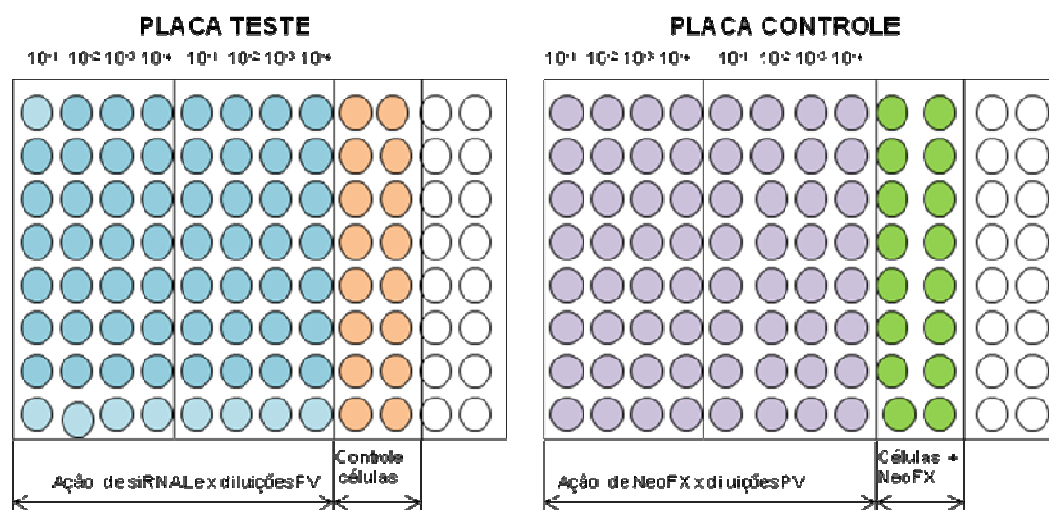


Figura 9 – Esquema de utilização de placas de cultivo celular com células BHK-21 inoculadas com diluições de 10⁻¹ a 10⁻⁴ da cepa PV do vírus da raiva e tratadas com a combinação siRNA Le/(placa teste) ou MEM/NeoFX (placa controle). Para cada um dos três siRNAs Le (Quadro 1), foi utilizado o esquema apresentado em duplicata.

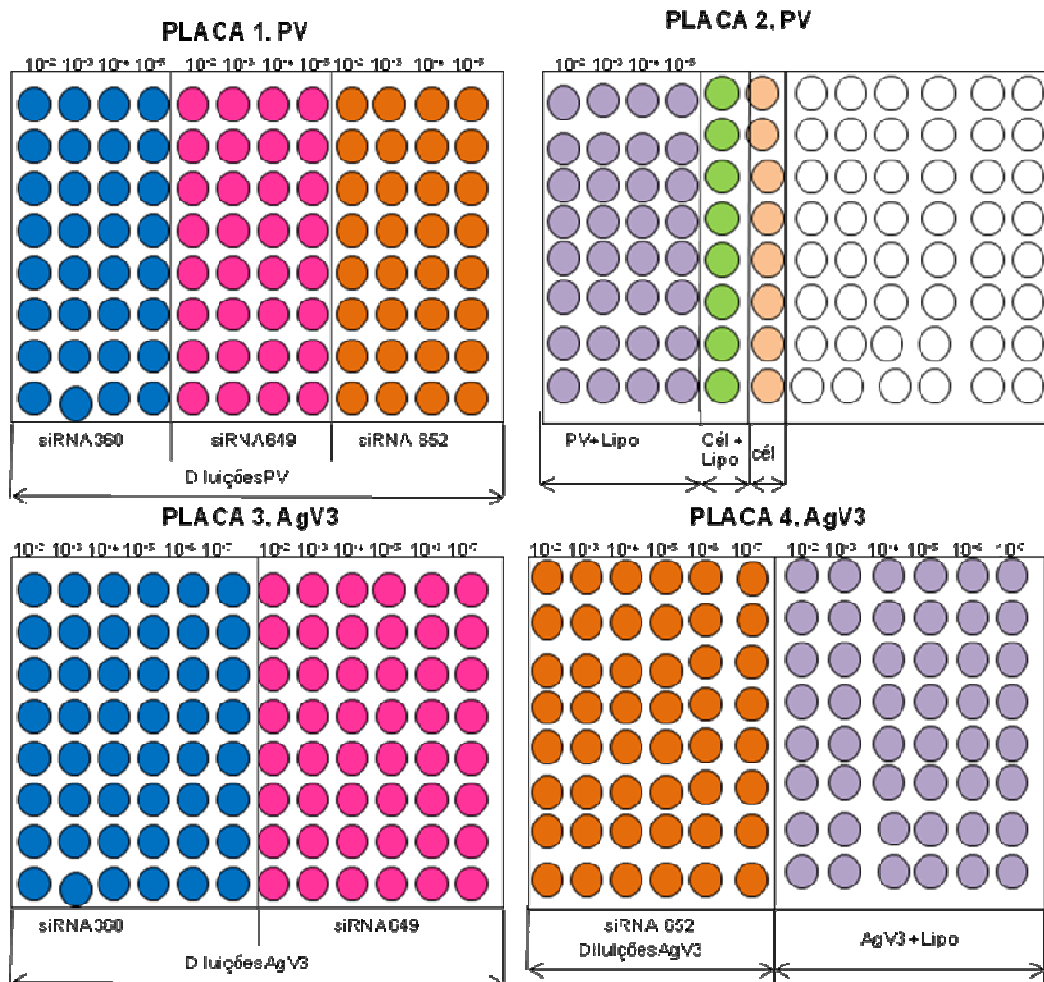


Figura 10 – Esquema de utilização de placas de cultivo celular com células BHK-21 inoculadas com diluições de 10^{-2} a 10^{-5} da amostra PV e 10^{-2} a 10^{-7} da amostra 4005 (AgV3) do vírus da raiva e tratadas com a combinação siRNAs contra mRNA de fosfoproteína do vírus (placas teste) ou MEM/Lipofectamina 2000 (placas controle). Para cada um dos três siRNAs P (Quadro 3), foi utilizado o esquema apresentado em duplicata

3.8. TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA PELA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE QUANTITATIVA (q RT-PCR) PARA O mRNA DE β -ACTINA E mRNA DA FOSFOPROTEINA DO VÍRUS DA RAIVA

3.8.1. Experimento *in vitro* para avaliação pelo método qPCR

Como nos experimentos anteriores *in vitro* foi utilizada a técnica de IFD para a avaliação dos resultados, isso impossibilitou o uso das mesmas placas para o método de qPCR. Assim sendo, para este fim foi repetido o protocolo de ensaio

descrito no item 3.7. com alguma diferença no desenho da placa que está apresentado abaixo. No caso da amostra 4005, as diluições utilizadas foram de 10^{-2} a 10^{-7} . Para cada diluição de cada amostra foram utilizados três poços no grupo tratado e dois poços no grupo controle (Figura 11).

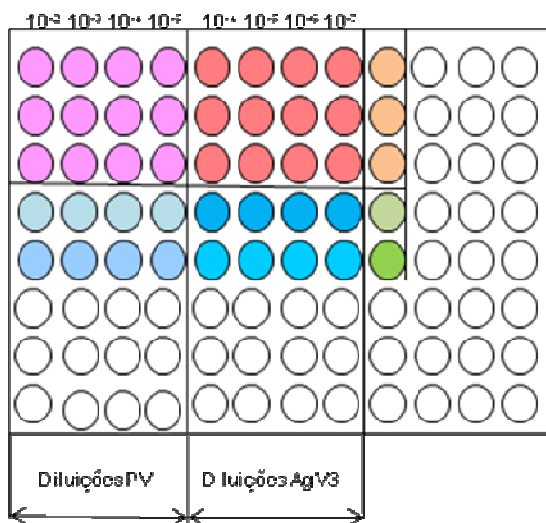


Figura 11 – Esquema do experimento em placa de cultivo celular com células BHK-21 inoculadas com as duas cepas do vírus da raiva e tratadas com a siRNA 360 contra mRNA de fosfoproteína do vírus ou siRNA controle negativo para a avaliação pelo qPCR. Onde: ● tratamento com siRNA 360 + Lipofectamina 2000/diluições do PV, ● controle PV (PV + siRNA controle negativo + Lipofectamina 2000), ● tratamento com siRNA 360 + Lipofectamina 2000/diluições de AgV3, ● controle AgV3 (AgV3 + siRNA controle negativo+Lipofectamina 2000), ● controle das células, ● célula + lipofectamina 2000, ○ poços vazios.

3.8.2. Extração de mRNA total

Para a obtenção de mRNA total das monocamadas celulares do experimento *in vitro* foi utilizado o tampão de lise do Kit Cells-to-Ct™ (Ambion). A extração das amostras foi feita de acordo com as instruções do fabricante.

3.8.3. Síntese de cDNA complementar (cDNA) e RT-PCR para mRNA de β -actina e de mRNA da fosfoproteína de RABV

Para o desenho do primer antisense para mRNA de β -actina, foram utilizadas as seqüências de hamster (*Mesocricetus auratus*, número de acesso NM001281595)

recuperadas de GenBank. A sequência do primer senso do β -actina foi gentilmente cedida e validada pelo IDT(USA).

O desenho dos oligos para o RABV foi elaborado com as sequências de Pasteur Virus (número de acesso M13215) e RABV (número de acesso AB519642.1) proveniente de *Desmodus Rotundus*. Todos os primers foram desenhados e validados com o aplicativo PrimerQuest (<http://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>). As seqüências dos primers estão representadas no Quadro 5.

Para a síntese de cDNA em cada tubo foram aliqüotados 14ul de RNA total extraído e acrescentados 1mM de DNTPs, primers específicos antisenso a 100nM (tabela 4) e água de livre de nucleases q.s.p. até 10ul o volume total. O RNA foi desnaturado a 65°C durante 5 minutos e transferido imediatamente ao banho de gelo. Em seguida foram acrescentados 8ul de tampão de 5x, 100U de MMLV, 4ul de DTT e 2ul água livre de nucleases, obtendo-se o volume de 16 uL. A reação de transcrição para ambos os alvos foi efetuada em termociclador Mastercycler™ (Eppendorf) de acordo com os ciclos de temperatura apresentados no Quadro 4.

Quadro 4 - Condições térmicas para síntese de cDNA

Temperaturas, °C	Tempo
37	50 minutos
70	15 segundos
10	∞

Quadro 5 - Primers para RT-PCR para mRNA da fosfoproteína de RABV e β -actina.

Primers	Orientação	Sequencia (5'-3')	Posição	Tm (°C)
Prtn P RABV	Anti-senso	GGAGAYTGTCACACTATGG	165-146*	53
Prtn P RABV	Senso	GAGATGGCTGAAGARACT GTWG	10272- 10292*	54,2
β act1	Senso	ATTGGCAACGAGCGGTT	794-810**	55,4
β act2	Anti-senso	ACGTCACACTTCATGATGGA	906-887**	53,8

* Referente ao genoma de RABV proveniente de *Desmodus Rotundus* o número de acesso no GenBank AB519642.1 e de genoma de Pasteur Virus (PV) o número de acesso no GenBank M13215.

** De acordo com a seqüência do gene de β -actina de camundongo o número de acesso no GenBank NM007393.

3.8.4 PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR) para a quantificação relativa de mRNA de β -actina e mRNA de fosfoproteína de RABV

Para esta reação foi utilizado o sistema TaqMan. Para RABV foi utilizada a sonda desenhada com base nas mesmas seqüências de RABV mencionadas no item 3.9.3 e sintetizada pelo Invitrogen. Para a β -actina foi utilizada uma sonda com base de seqüência de *Mus Musculus* (NM007393) que já foi validada em ensaios da IDT no kit PrimeTime qPCR Assay (IDT,USA). As seqüências de ambas as sondas estão representadas no quadro 6.

Quadro 6 - Sondas utilizadas na reação de RT-qPCR para mRNA de β -actina e mRNA de fosfoproteína de RABV

Sonda	Seqüência (5'-3')	Posição*
B-actina hamster	56- FAM/ATTCCATAC/ZEN/CCAGGAAGGAACGCTGG/31ABkFQ	786-811
Ptn P (RABV)	HEX/ CCT TGG AGA TGA GCC TGA TTG TCY TCG /BNFQ	10298- 10324

* números de acesso no GenBank AB519642.1(AgV3) e M13215 (PV), NM007393 (β - actina).

Para cada reação de qPCR, foi utilizado TaqMan Gene Express Master Mix 1x (Invitrogen, USA), 400nM de primers senso e antiseno (RABV ou β -actina), 150nM de sonda (Ptn P ou β -actina) e 2ul de cDNA, com água livre de nucleases até completar o volume total de 20ul. Nos controles negativos, no lugar da amostra foi adicionada água livre nucleases. As reações para cada alvo foram feitas separadamente e em triplicata para cada amostra analisada. Juntamente com as amostras na placa de qPCR foram aplicados os 4 pontos de curva padrão referente a cada alvo.

A reação foi feita no termociclador 7500© Real Time PCR System (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA) sob condições descritas no Quadro 7.

Quadro 7 - Termociclagem para a reação de qPCR

Termociclagem			
Etapa		Temperatura (°C)	Tempo
UDG		50	2 minutos
Ativação		95	10 minutos
40 ciclos	Desnaturação	95	15 segundos
	Hibridação/Extensão	60	1 minuto

O cálculo da expressão relativa de mRNA de fosfoproteína de RABV no experimento *in vitro* nos grupos tratados com siRNA e grupos controle infectados com ambas das cepas utilizadas no estudo foi realizado pelo método Pfaffl (PFAFFL, 2001).

3.9. ENSAIO DE INIBIÇÃO POR RNA *IN VIVO*

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

As amostras virais PV e 4005 foram utilizadas nas doses de 10 e 1LD₅₀%. Para cada dose letal foram empregados dois grupos de camundongos, sendo um grupo tratado com o siRNA de maior eficiência e outro grupo controle inoculado siRNA controle negativo (Stealth RNAi Negative Control Duplexes®, Invitrogen).

Os animais foram mantidos sob as seguintes condições: temperatura ambiente 21 a 25°C, luminosidade 12h (dia) x 12h (escuro), ração e água *ad libitum*. Os protocolos utilizados no ensaio são descritos a seguir.

1. As amostras PV e 4005 foram diluídas em MEM sem SFB em 1 e 10 doses letais 50%.

2. Foram inoculados, pela via intracerebral, de acordo com a técnica descrita por Koprowsky (KOPROWSKI, 1996), 30 μ L/camundongo de cada dose de vírus em camundongos do grupo teste, sendo 10 camundongos/dose.

3. Identicamente, foram inoculados, pela via intracerebral, 30 μ L de cada dose de vírus em camundongos do grupo controle, sendo 10 camundongos/dose.

4. Duas horas após a inoculação, foram injetados, pela via intracerebral, em todos os camundongos teste, 30 μ L da combinação do siRNA de maior eficiência/Lipofectamina 2000[®] (Invitrogen) para uma concentração final do siRNA de 10 μ M, ou seja, total de 0,3nmoles.

5. Simultaneamente, nos camundongos controle, foram injetados, pela via intracerebral, 30 μ L da combinação de siRNA controle negativo/ Lipofectamina 2000[®] (Invitrogen) (proporção 1:1 v/v), sendo a concentração final de siRNA controle negativo 2 μ M, em total de 0,06nmoles

6. Os grupos teste e controle foram observados diariamente duas vezes ao dia durante 30 dias quanto ao aparecimento dos seguintes sinais de raiva: pêlos eriçados, tremores, incoordenação motora, paralisia, hiperestesia e morte a partir do quinto dia após a inoculação. Após o período de 30 dias, os camundongos sobreviventes foram eutanasiados.

7. Para os animais mortos durante o período de observação ou eutanasiados após o mesmo, foi colhido o conjunto encéfalo/cerebelo porção craniana da medula (sistema nervoso central, SNC), realizando-se a impressão a fresco em lâminas e conservando o material restante a -20^o C até o momento da realização de imunofluorescência direta como descrito no item 3.4.1.

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

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

A significância das diferenças de sobreviventes foram calculadas com o teste de Chi-quadrado (alfa =0.05) com o software Minitab[®] 16.2.2 (© 2010 Minitab Inc.)

4 RESULTADOS

A seguir, são apresentados os resultados obtidos neste estudo.

4.1 TITULAÇÃO DAS AMOSTRA PV E 4005 EM CÉLULAS BHK-21

Em células BHK-21, os títulos das amostras PV e 4005 nas células BHK-21 foram $3,99\log\text{TCID}_{50\%}/\text{ml}$ e $5,99\log\text{TCID}_{50\%}/\text{ml}$, respectivamente. De acordo com o resultado desta titulação, foi decidido nos experimentos *in vitro* com siRNAs para a sequência líder de RBV utilizar as diluições de PV de 10^{-1} a 10^{-4} , para se obterem de 0,1 a 100 $\text{TCID}_{50\%}$. Em experimentos com siRNAs P (para mRNA da fosfoproteína do vírus) as diluições utilizadas de PV foram 10^{-2} a 10^{-5} e da amostra 4005 10^{-2} a 10^{-7} , para se obterem de 0,01 a 10 $\text{TCID}_{50\%}$ e de 0.01 a 1000 $\text{TCID}_{50\%}$. A seleção das diluições utilizadas se baseou em uma escolha de uma ampla faixa de concentração viral que deixasse uma mais apurada visualização da gradação de fluorescência de acordo com a concentração viral.

4.2 TITULAÇÃO DA AMOSTRA PV E 4005 EM CAMUNDONGOS

O título viral obtido a partir deste experimento foi $5,5\log\text{DL}_{50\%}/\text{ml}$ para PV e $6,5\log\text{DL}_{50\%}/\text{ml}$ do AgV3.

4.3 AVALIAÇÃO DE AGENTES DE TRANSFEÇÃO EM CÉLULAS BHK-21

Os resultados do teste estão apresentados na tabela 1

Tabela 1: Resultados da eficiência da transfecção de siRNAs em células BHK-21

Agente	% expressão restante	% silenciamento gênico
amina	141	-41
lipídio	9,4	90,6

O resultado do cálculo de % expressão restante de GAPDH com o uso de NeoFX foi 9,4% conclui que a expressão de GAPDH foi diminuída em 90,6% nas células BHK-21 quando foram transfectadas com agente de transfecção do grupo de lipídeos catiônicos.

Já o resultado do cálculo de % de expressão restante de Amina foi 141%, o que significa, que a expressão de GAPDH na verdade elevou-se em 41% nas células BHK-21 quando foram transfectadas com o agente de transfecção do grupo de aminas.

Os dados dos cálculos indicam que para a linhagem de células BHK-21, o mais eficiente agente de transfecção é o lipídeo catiônico.

4.4 ENSAIO DE SILENCIAMENTO de RNA LÍDER DO VÍRUS E DE mRNA DE FOSFOPROTEÍNA VIRAL POR siRNA *IN VITRO*

Os dados da eficiência das siRNAs contra RNA líder do RABV estão apresentados na tabela 2.

Tabela: 2 Títulos da amostra PV de RABV após tratamento da linhagem BHK-21 com siRNAs contra o RNA líder de RABV

AMOSTRA	Título viral em log₁₀
PV	10 ^{3,3} TCID50%/ml
siRNALe 1	10 ^{3,2} TCID50%/ml
siRNALe 2	10 ^{3,3} TCID50%/ml
siRNA Le 3	10 ^{3,2} TCID50%/ml

Como pode ser notado nos resultados da tabela 2, os siRNAs desenhados contra RNA líder do RABV não foram eficazes para inibir a replicação do vírus. O título viral na placa com siRNA Le1 foi 10^{3,2}TCID50%/ml, Le2 10^{3,3}TCID50%/ml e 10^{3,2}TCID50%/ml na placa tratada com siRNA Le3. Nestas três placas não houve a queda de título viral se comparadas com a placa controle, na qual o título foi 10^{3,3}TCID50%/ml.

A eficiência de cada um dos três siRNAs contra o mRNA da fosfoproteína do vírus da raiva (PV e AgV3) em cultivo celular encontra-se exposta na tabela 3.

Tabela: 3 – Títulos das amostras PV e 4005 de RBAV após tratamento da linhagem BHK-21 com siRNAs contra mRNA de fosfoproteína do vírus da raiva com a incubação de 24h.

Amostra	Placa	Título viral em Log₁₀/ml	Diferença com o grupo controle em log
PV	siRNA 360	3,625	0,375
	siRNA 649	3,875	0,125
	siRNA 652	4,125	-0,125
	controle	4,0	
4005	siRNA 360	5,0	1,0
	siRNA 649	5,75	0,25
	siRNA 652	5,87	0,125
	controle	6,0	

Nota-se pelos dados da tabela 3 que o siRNA 360 e siRNA649 diminuíram o título viral de PV em cultivo de células nas placas tratadas em 0,375log e 0,125log quando comparada com a placa controle. Já o siRNA 652 elevou o título de PV em 0,125log.

Por sua vez, pode-se notar que nas placas infectadas com a amostra 4005 e tratadas com siRNAs a maior queda de título viral foi na placa tratada com siRNA360, o que representa 1,0log comparando-se com a placa controle. Nas placas tratadas com siRNA649 e siRNA652 também houve a diminuição de título viral, mas em uma escala menor 0,25log e 0,125log comparando com a placa controle.

Pode-se notar (Tabela 4) que houve diferença no silenciamento de algumas siRNAs depois de 48h de incubação.

Tabela 4 – Títulos das amostras PV e 4005 de RBAV após tratamento da linhagem BHK-21 com siRNAs contra mRNA de fosfoproteína do vírus da raiva com a incubação de 48h.

Amostra	Placa	Título viral em Log₁₀/ml	Diferença com o grupo controle em log
PV	siRNA 360	5,625	0,375
	siRNA 649	4,625	1,375
	siRNA 652	4,75	1,25
	controle	6,0	
4005	siRNA 360	6,25	1,125
	siRNA 649	7,08	1,125
	siRNA 652	6,5	0,875
	Controle	7,375	

A placa infectada com PV e tratada com siRNA 360 manteve o mesmo padrão de queda do título viral, ou seja 0,375log comparando com a placa controle. Já na placa tratada com siRNA 649, houve um aumento de queda do título viral comparando com a mesma placa de 24h, o que representa a diferença de 1,375log comparando com o controle.

O mais discrepante foi o resultado da placa tratada com siRNA 652 mantida após 48 horas, pois, neste caso, houve inibição da replicação viral, pois o título viral foi de 1,25log comparando com a placa controle.

A placa com período de incubação 48h infectada com a amostra 4005 e depois tratada com siRNA 360 apresentou a maior queda de título viral entre as três siRNAs, o que resultou em 1,125log de diferença comparando com a placa controle.

Resultado semelhante foi observado nas placas com período de incubação 24h, onde o siRNA 360 proporcionou a queda de título maior entre os três siRNAs. Nas monocamadas onde foi administrado siRNAs 652 e siRNA649, observou-se também uma pequena queda de título viral igual a 0,875log e 0,295log comparando com a placa não tratada.

Assim sendo, dada capacidade maior inibitória de replicação da amostra PV e de AgV3 de RABV para o experimento *in vivo* foi decidido utilizar apenas o siRNA360.

4.5. ENSAIO DE INIBIÇÃO POR RNAi *IN VIVO*

4.5.1 Sobrevivências de camundongos tratados com siRNA 360 frente a 10DL50% das amostras PV e 4005 de RABV

A sobrevivência dos camundongos inoculados com 10DL50% virais e com as amostras de RABV PV e 4005 estão apresentados no quadro 8.

Quadro 8 - Sobrevivência (em porcentagem) dos camundongos inoculados com as amostras PV e 4005 de RABV e tratados com siRNA360

Grupo	Dose inoculada	% de sobreviventes
4005 + siRNA360		30
4005+siRNAneg	10LD _{50%}	10
PV+siRNA360		40
PV+siRNAneg	10LD _{50%}	0

No grupo de animais inoculados com 10DL_{50%} de 4005 e tratados com o siRNA360, houve sobrevivência de 30%, enquanto que no grupo controle houve 10% para esta dose (Quadro 8).

Para os grupos inoculados com 10DL_{50%} de PV, nos animais controle a mortalidade foi de 100% quanto naqueles que receberam o tratamento de siRNA360 a sobrevivência foi 40%.

Entretanto, apenas para os animais inoculados com 10DL_{50%} da amostra PV e tratados com siRNA360 houve diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo controle ($p=0,025$).

Na figura 8, apresentam-se os gráficos de sobrevivência dos camundongos e o período de incubação depois de serem inoculados com doses diferentes de PV e de 4005 e tratados com siRNA360.

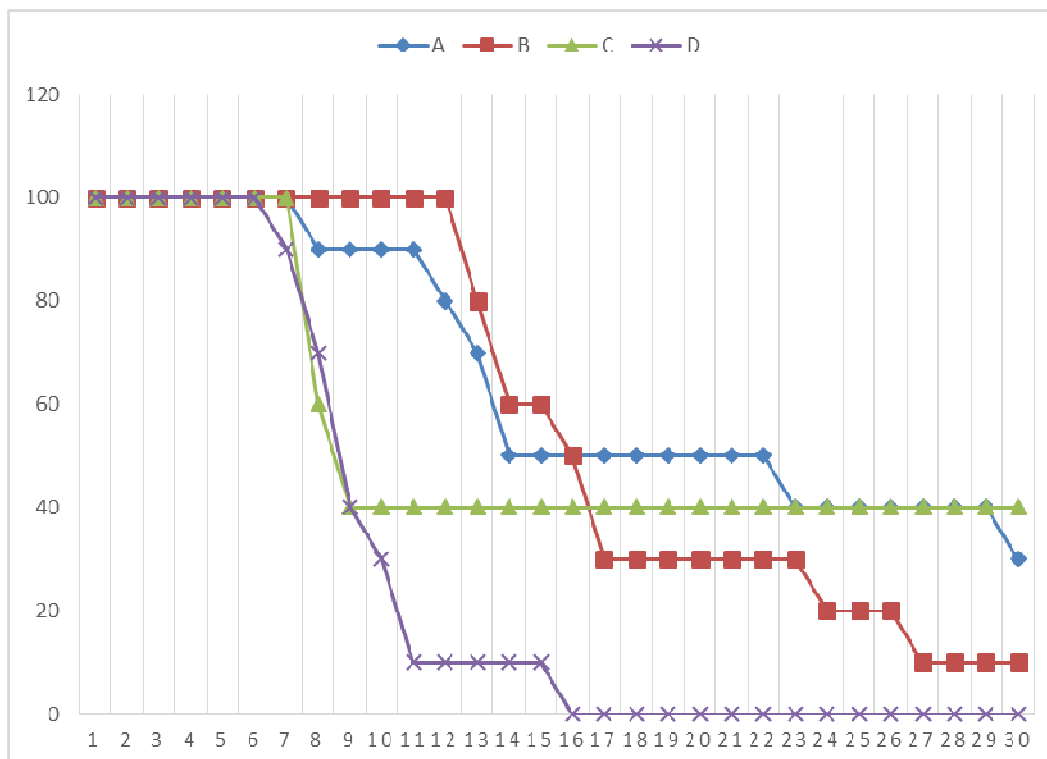


Figura 8 - Sobrevivência (em porcentagem) dos camundongos (ordenados) e o período de incubação em dias (abscissa) em grupos inoculados com as amostras PV e 4005 de RABV com 10DL_{50%} tratados com siRNA360 (para mRNA da fosfoproteína). A: 4005 10DL_{50%}+siRNA360, B: 4005 10DL_{50%} controle, C: PV 10DL_{50%}+ siRNA360, D: PV 10DL_{50%} controle.

Tabela 5 - Representação do primeiro dia de morte do primeiro animal nos grupos após a inoculação de RABV.

Grupo	O 1º dia de morte após a inoculação
4005 10DL _{50%} + siRNA 360	8
4005 10DL _{50%} + siRNA negativa	13
PV 10DL _{50%} + siRNA 360	8
PV 10DL _{50%} + siRNA negativa	7

No grupo dos animais inoculados com 10DL_{50%} da amostra 4005 a diferença é de 5 dias entre o dia de inoculação e a morte do primeiro camundongo tanto nos grupos tratados quanto nos não tratados. Já nos grupos inoculados com o PV, os

animais tanto nos grupos tratados quanto nos não tratados começaram a cair a partir do dia sete ou oito após a inoculação.

4.5.2 Imunofluorescência direta das amostras de SNC dos camundongos inoculados com o as amostras PV e 4005 de RABV tratados com siRNA360 e sem tratamento

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

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

5. QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE mRNA DE FOSFOPROTEÍNA DO RABV

Como observado na Tabela 6, nas células infectadas com a amostra PV em 10DL_{50%} e tratada com siRNA360, obteve-se a quantidade relativa de mRNA de P em 2,41 vezes maior que na placa controle.

Já na placa infectada com a amostra 4005 em 10DL_{50%} e tratada com siRNA 360, houve a diminuição da quantidade relativa de mRNA do P em 0,21 vez se comparada com a placa controle.

Tabela 6: Quantificação relativa de mRNA de fosfoproteína do RABV após tratamento com siRNA360 *in vitro*

Grupo	Quantidade relativa de mRNA de fosfoproteína de RABV comparando tratado/controle
PV 10DL _{50%}	2,41
4005 10DL _{50%}	0,21

O Cq de qPCR para β -actina dos poços com a monocamada de BHK-21 e os poços onde foi acrescentado o agente de transfecção são iguais, apontando que o

Lipofectamine 2000 na concentração utilizada não interferiu na expressão dos genes da própria célula, e, portanto, não apresentou toxicidade.

6. DISCUSSÃO

Na presente investigação, siRNAs dirigidos ao mRNA da fosfoproteína P de uma amostra fixa (PV) e de uma amostra de campo (4005, *Desmodus rotundus*) de vírus da raiva foram eficientes em inibir a replicação viral em cultivo de células BHK-21 e em diminuir a letalidade em camundongos inoculados com a amostra PV e a amostra 4005 e tratados com um destes siRNAs.

As duas amostras virais aqui utilizadas (PV e 4005) haviam sido previamente isoladas e mantidas em sistema nervoso central de camundongos e foram então adaptadas a células da linhagem neuro 2A (N₂A), sendo, para este estudo, ao contrário, utilizadas as células BHK-21 para os experimentos *in vitro* com estas amostras adaptadas a N₂A. Apesar da ausência de adaptação prévia a BHK-21, estas amostras virais atingiram títulos suficientes para os experimentos de RNAi.

A decisão pela utilização de BHK-21 em substituição a N2A deveu-se ao fato de que monocamadas de células BHK-21 são mais resistentes a toxicidade e descolamento pelos processos de transfecção, lavagens e imunofluorescência direta quando se comparam com as células N2A, o que é fundamental que se teste em procedimentos de RNAi *in vitro*. Outros grupos de pesquisadores estudando RNAi contra RABV estão utilizando as mesmas células BHK-21 para os seus experimentos, o que mostra a validação desta linhagem para estes fins (SONWANE et al, 2010; GUPTA et al., 2011; YANG et al., 2012; MESHRAM et al., 2013; ONO; BRANDÃO, 2014).

No teste para eleição do agente de transfecção para o experimento *in vitro*, a o agente lipídico catiônico foi, para as células BHK-21, mais eficiente do que outro baseado em aminas, utilizando um siRNAi para mRNA de GAPDH como indicador.

De um modo geral, reagentes de transfecção baseados em lipídios catiônicos são os mais utilizados para transfecção de siRNAs em estudos de RNAi, permitindo a transfecção por meio de ligações por diferenças de cargas elétricas entre os lipossomos transfectantes, de carga positiva, e a membrana celular, de carga negativa (KIM; KIM, 2009). Os lipossomos catiônicos podem aumentar o tempo de circulação de siRNA e simultaneamente reduzir a dose requerida para silenciamento gênico eficiente através do aumento de estabilidade siRNA em soro e melhoramento de entrega na célula (CARDOSO et al., 2008).

Yang (2012) e Meshram (2013) utilizaram para a transfecção de linhagem de BHK-21 o agente de classe lipídeo catiônico Lipofectamina 2000 para efetuar na entrega do plasmídeo que expressava o siRNA, observando queda de título viral de 85,9 a 87,9% utilizando Lipofectamina como agente de transfecção (Meshram C.D., et.al., 2013) o que demonstra a eficiência deste agente de entrega, o mesmo agente de transfecção utilizado no presente estudo.

Assim, é sempre necessário que agentes de transfecção sejam testados para cada tipo celular para que a transfecção não seja um impedimento à eficiência por RNAi.

No caso dos camundongos do experimento *in vivo* deste estudo, optou-se diretamente pelo uso de agente catiônico para a transfecção tanto pelo fato de se reduzir o número de animais de experimentação por questões bioéticas quanto pelo fato deste agente de transfecção já ter sido validado para esta espécie animal em estudos prévios (ONO, 2014).

Outros pesquisadores também utilizaram o lipídeo catiônico para entrega de siRNAs no sistema nervoso central. Yang et al. (2012) utilizaram plasmídeos que expressam os siRNAs contra a nucleoproteína de RABV conjugados com lipossomos e, em paralelo, siRNAs “nus”. Os resultados obtidos demonstraram que no grupo dos animais onde os siRNAs foram conjugados com lipídeo catiônico a taxa de sobrevivência era maior do que no grupo que foi tratado só com os siRNAs “nus” em função de mais eficiente transfecção.

Na avaliação *in vitro* dos três siRNA dirigidos a sequência líder do genoma de RABV utilizando-se a amostra PV, nota-se que não houve queda nos títulos quando comparados à placa controle.

A tentativa de utilizar siRNAs para a sequência líder tinha como base o intuito de degradar diretamente o RNA genômico por meio da ação da RISC após hibridação dos siRNAs, o que é algo diverso do clássico silenciamento gênico pós-traducional utilizado como antiviral em termos de RNAi.

Entretanto, é fato que o RNA genômico de RABV encontra-se intimamente associado às proteínas N, P e L (WUNNER, 2007), o que pode ter evitado a hibridação dos siRNAs para a sequência líder e impedindo a ação RNAi esperada.

Já para o caso dos siRNAs dirigidos ao mRNA da fosfoproteína nas placas com a incubação de 24h, utilizando-se as amostras PV e 4005, houve marcada variação na capacidade inibitória, uma vez que, no caso de PV, os siRNAs 360 e

649 levaram a queda de título, enquanto que o 652 resultou em título mais elevado e, por sua vez, para a amostra 4005, todos os três siRNAs resultaram em queda de títulos, com mais intensidade para o siRNA 360.

Inicialmente, pode-se atribuir estas diferenças em eficiência de silenciamento às diferenças entre as sequências das amostras 4005 e PV (Figura 1), uma vez que se sabe que a identidade entre um siRNA e sua sequência-alvo é um dos principais fatores ao sucesso do silenciamento (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009; ELBASHIR, 2001; ISRASENA et al., 2009).

Para o desenho dos siRNAs contra mRNA da fosfoproteína neste trabalho foi utilizada a sequência do *Desmodus Rotundus* (AgV3) como base. Foi feita uma tentativa de encontrar uma região de mRNA de fosfoproteína das amostras PV e 4005 para desenhar os siRNAs que teriam a complementaridade total das sequências alvos. Entretanto, isto não foi possível por causa da falta da quantidade razoável das sequências completas de mRNA de fosfoproteína da variante de *Desmodus Rotundus* e as regiões conservadas entre as amostras.

Em um outro estudo, Israsena e colaboradores (2009) fizeram uma busca entre 237 sequências disponíveis no banco de dados, para achar uma região do gene N de 21 nt que seja conservada entre as amostras CVS e AgV2 com o intuito de desenhar um único miRNA contra o mRNA de nucleoproteína de RABV para ambas amostras estudadas, tendo, entretanto, encontrado apenas 95% das sequências com identidade de 100% entre si, concluindo que não é possível desenhar um siRNA que sirva para todas as variantes virais de RABV.

O gene N é a parte do genoma viral mais conservada entre as espécies do *Lyssavirus* e entre as variantes de RABV em termos de sequência de aa, mas há variação entre as variantes do vírus (WUNNER, 2007) o que torna mais difícil a tarefa de desenhar um siRNA que tenha a mesma eficiência de silenciamento para as ambas amostras estudadas (PV e 4005).

Para tentar resolver esta questão de diferença entre as sequências-alvos das variantes virais de RABV, Israsena e colegas (2009) sugerem utilizar um plasmídeo expressando dois si/miRNAs desenhados para o mesmo mRNA, mas com os únicos nucleotídeos que diferenciam as sequências-alvo.

Outro fator importante a ser considerado para o sucesso de silenciamento é a complementaridade dos siRNA/miRNA com o mRNA numa região chamada “semente” que se refere a um intervalo do segundo ao oitavo nucleotídeo de 5' de

fita antisense, sendo uma região pela qual o siRNA/miRNA se liga ao mRNA. Este fator se torna principalmente crítico para os vírus com genoma composto por RNA que tenham taxa de mutação mais alta durante a replicação viral quando comparados aos vírus cujo genoma é composto por DNA. Este fato já foi relatado para os HIV-1 e HCV, cuja população não é homogênea devido a existência de várias pseudoespécies (UMBACH & CULLEN, 2009).

Assim, optou-se como alvo alternativo pelo mRNA da fosfoproteína do RABV.

Como se pode notar na Figura 1, nas sequências dos siRNAs utilizadas há uma pequena diferença entre os mesmos e a sequência de mRNA da amostra PV nas posições (sentido 5'-3'): sétimo nucleotídeo A no PV e C no siRNA 360, terceiro nucleotídeo T no PV e C no siRNA 649, o sexto nucleotídeo C no PV e A no siRNA 652, o que se refere a região-semente de si/miRNA. Isto pode ter contribuído para a diferença em funcionamento dos siRNAs usados nas placas de BHK-21 infectadas com PV e 4005.

Entretanto Israsena e colaboradores (2009) perceberam durante os experimentos que umas pequenas diferenças entre si/miRNA e a sequência alvo que não estão posicionadas nas regiões-sementes podem ser toleradas para o silenciamento gênico eficaz.

No entanto, existe outro detalhe a considerar em desenho dos siRNAs que pode interferir na clivagem de mRNA alvo pelo RISC. O RISC ativo cliva o mRNA preferencialmente entre o décimo e décimo primeiro nucleotídeo de 5' da fita antisense do siRNA. A diferença entre a sequência alvo e a fita antisense de siRNA nestas posições pode aumentar ou diminuir o efeito de silenciamento (REYNOLDS et al., 2004). Os siRNAs 649 e 652 têm complementaridade com duas sequências (PV e 4005) nestas posições e o siRNA 360 tem o nucleotídeo G na décima posição quando a sequência PV correspondente a esta região é o nucleotídeo A.

Outro ponto que poderia interferir na eficácia de inibição de replicação é o tempo de ação dos siRNAs. A reação de IFD foi feita 24h após a administração dos siRNAs e pode não ter havido tempo suficiente para a manifestação completa do silenciamento. O fornecedor dos siRNAs aqui utilizados, Invitrogen, informou que a vida útil de um stealth siRNA é de 7 dias e recomendaram fazer a leitura dos resultados depois de 24-48h após a transfecção.

Alkhalil et al (2009) em seu estudo utilizaram os siRNAs conjugados com o agente de transfecção (os autores não mencionam qual) para inibição de replicação

MPV (Monkeypox vírus). Um dos siRNAs administrados com concentração 10nM foi capaz de manter a inibição de replicação viral durante 7 dias. Este dado embasa a sugestão de que, às vezes 24h podem não ser um tempo suficiente para o efeito de siRNA ser pronunciado por completo.

Parashar et al. (2013) relatam que o efeito de siRNA na inibição de Chikungunya vírus foi maior depois de 48h de incubação. Foi medida a quantidade das cópias de RNA viral em sobrenadante das placas com cultivo através da técnica de qPCR. Depois de 24h a quantidade das cópias foi $5\log_{10}$, descendo para $2,5\log$ após 48 horas de incubação, o que indica que o efeito de silenciamento na replicação viral pode, de fato, ser mais intenso após um tempo de ação de 48h.

Na placa infectada com PV e tratada com siRNA 649 houve um aumento de queda do título viral se comparado com a placa com o mesmo siRNA incubado por 24h. Já no caso de siRNA 652 foi observado o efeito contrário que se observou na placa de 24h. Depois de 48h de incubação o siRNA 652 resultou em queda do título viral em 1,25 log.

Mesmo que os dois siRNAs, 649 e 652, tenham pequenas diferenças entre a região-semente com a sequência de mRNA, estas diferenças poderiam ser toleradas para o silenciamento eficaz. Estas siRNAs tem uma complementaridade com o mRNA na região entre o décimo e décimo primeiro nucleotídeo de 5', que se refere ao site de clivagem pelo RISC.

Portanto, o aumento do tempo de incubação não resultou em maior queda do título viral na placa infectada com PV e tratada com siRNA 360, em função não só da diferença desta com a sequência de mRNA na região-semente, mas também na região de clivagem pelo RISC.

Os mesmos siRNAs administrados nas células infectadas com a amostra 4005 resultaram em um pequeno aumento na queda do título viral a incubação de 48hs e comparadas com as placas incubadas durante 24h.

Para poder fazer uma medição mais acurada do efeito do silenciamento, foi empregada a técnica PCR em Tempo Real para a quantificação relativa de mRNA de fosfoproteína. No entanto, o resultado obtido foi discordante dos dados observados na IFD.

Inicialmente, isso pode ser devido aos primers e a sonda utilizados para qPCR. No presente trabalho, foi utilizado o sistema TaqMan, que tem uma alta sensibilidade devido ao uso da sonda e o sistema de reporter e quencher, mas pode

também haver inaccurácias na detecção do DNA-alvo por, por exemplo, diferenças entre as sequências-alvo das amostras PV e 4005, o que poderia interferir na sensibilidade de detecção de todas as cópias de mRNA de fosfoproteína nas monocamadas infectadas. Assim, para futuros estudos, pode ser sugerido sintetizar primers e sondas para cada tipo de amostra estudada.

Outra possível causa dos resultados obtidos no qPCR foi a utilização do lisado de células das placas com o período de incubação de 24h, tempo que, com já exposto, pode não ser suficiente para que os siRNAs demonstrem efeito completo de silenciamento.

O experimento com siRNAs para análise pelo método qPCR foi elaborado com 3 poços para cada dose viral nos grupos tratados com siRNAs e 2 poços no grupo controle, com intuito de economia dos siRNAs. Em futuros experimentos é aconselhável a utilização de maior quantidade dos poços para cada diluição e a amostra para diminuir o erro.

Com os resultados recebidos *in vitro*, elegeu-se o siRNA 360, dirigido ao mRNA P, para os testes *in vivo* em camundongos, nos quais resultados também aparentemente contraditórios foram encontrados, pois apenas nos camundongos inoculados com 10DL50 da amostra PV e tratados com siRNA 360 houve sobrevivência significativamente superior ($p=0,025$) quando comparados ao grupo controle. Apesar destas diferenças, o primeiro fato a ser notado é que, mesmo havendo pequenas diferenças entre as sequências de amostra PV e siRNA 360, este siRNA foi capaz de induzir algum grau de silenciamento.

No grupo de animais inoculados com 10DL50% da amostra 4005, a sobrevivência foi de 30% quando comparados com o grupo controle onde sobreviveram 10% dos camundongos. Mesmo este resultado não tendo significância estatística, fica perto do resultado do grupo inoculado com a amostra PV da mesma dose onde a sobrevivência foi de 40%. Esta diferença poderia acontecer devido à maior homogeneidade da população viral da amostra PV ou a não homogeneidade genética dos camundongos utilizados no estudo.

No entanto, vários pesquisadores já relataram que os miRNAs celulares podem diretamente ou indiretamente afetar a replicação e a patogenicidade virais (GOTTEWIN; CULLEN, 2008; ZHAO et al, 2012). Zhao e colaboradores (2012) no seu estudo relataram que o RABV, durante a infecção de SNC de camundongos, foi capaz de modular a expressão dos miRNAs celulares “a seu favor”, alterando a

expressão dos miRNAs da célula associados a resposta imune. Outro achado significativo destes mesmos autores foi que o PV e AgV2 do RABV infectando o SNC levam a um padrão de expressão dos miRNAs celulares intensamente divergente. Assim, pode-se especular que o mesmo fenômeno tenha ocorrido no presente trabalho quando SNCs foram infectados com a amostra 4005 (AgV3) e PV, associando-se diferenças de expressão de miRNAs celulares a diferenças de inibição viral por siRNAs.

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

Além de menor mortalidade, um maior período de incubação pode também ser utilizado como indicador de eficiência de terapia antiviral, uma vez que um maior tempo para a instalação dos sintomas poderia permitir mais tempo para ações terapêuticas. Entretanto, como observado na tabela 5, o siRNA 360 não foi capaz de estender significativamente o período de incubação, sendo que, no grupo infectado com 10DL50% da amostra 4005 (AgV3), houve de fato um menor período para o início de mortalidade no grupo tratado quando comparado ao grupo controle. Quanto aos grupos inoculados com 10DL50% de PV o período de incubação entre o grupo tratado e não tratado foi o mesmo.

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

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

Uma das soluções para se prolongar o tempo de ação dos siRNAs é o uso de plasmídeos ou vetores virais de expressão como sistema de entrega, levando à produção intracitoplasmática de siRNAs de modo endógeno, o que poderia prolongar o tempo de ação dos siRNAs e elevar o nível de silenciamento gênico (AIGNER, 2006).

A vida útil dos siRNAs aqui utilizados é de 7 dias, como já exposto. Isso é um outro fator que poderia influenciar no período de incubação. O período mínimo de incubação entre os grupos dos animais infectados foi de 7 dias, exatamente o período de vida de uma siRNA. O efeito de extensão do período de incubação e aumento da sobrevivência dos animais poderiam ser conseguidos pela administração de uma segunda dose de siRNA após este período.

Como exemplo deste fato, animais infectados com 10DL50% de Chandipura vírus (pertence à família de *Rhabdoviridae*) e tratados com duas doses (0 e 24h após a infecção) de plasmídeos expressando siRNAs contra gene P do vírus, obteve-se queda do título viral de 4log comparando com os animais do grupo controle (KUMAR; ARANKALLE, 2010).

Além disso, deve-se considerar a influência da concentração de siRNAs utilizados na presente investigação, que foi de 0,2 e 0,3 nmoles em células BHK-21 e camundongos, respectivamente

Comparativamente, um estudo no qual se inocularam 4LD50% de Vírus de Encefalite Japonesa por via intracraniana seguida de transfecção com siRNAs (0,5nmol) com o lipídeo catiônico iFect como agente de transfecção 6 horas após a infecção viral levou a uma queda no título viral de 2log no grupo experimental em comparação com controle (KUMAR et al., 2006).

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

Do mesmo modo, a administração por via endovenosa de 100pmol de siRNA contra RNAm do JEV conjugado ao peptídeo RVG-9R de glicoproteína de RABV resultou na sobrevivência de 80% dos camundongos tratados após inoculação de 5DL50% do vírus (KUMAR et al., 2007).

Ainda, siRNA na quantidade de 200nmol, 1000 vezes superior àquela utilizada em células BHK-21 no presente trabalho, foi empregada para inibição de replicação de Monkeypox virus e foi atingida uma eficiência de inibição próxima de 100% (ALKHALIL et al., 2009).

A realização da IFD nos SNCs de todos os animais experimentais demonstrou 100% de concordância entre a presença de sintomas de raiva e a

presença de focos fluorescentes, demonstrando que os sintomas eram de fato devidos à infecção pelo RABV, enquanto que nenhum dos animais sem sintomas, incluindo os sobreviventes após inoculação de 10DL50% do vírus PV e AgV3 tratados com siRNAs, apresentou positividade por esta prova.

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

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

CONCLUSÕES

- ✓ Os três siRNAs contra RNA líder do RABV testados na concentração de 5 μ M não são eficientes para a inibição da replicação do vírus *in vitro*.

- ✓ Os três siRNAs contra o mRNA do fosfoproteína do vírus da raiva foram eficazes para o silenciamento génico pós-transcricional *in vitro* em células infectadas com a amostra do vírus fixo e do *Desmodus Rotundus*.

- ✓ A utilização de interferência por RNA baseada em siRNA contra mRNA do fosfoproteína do vírus da raiva é capaz diminuir a mortalidade em camundongos inoculados com 10DL50% da amostra PV e variante de *Desmodus Rotundus* do vírus da raiva.

REFERÊNCIAS

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

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

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

ALKHALIL, A.; STRAND, S.; MUCKER, E.; HUGGINS, J. W.; AHRLING, P.B.; IBRAHIM, S. M. Inhibition of Monkeypox virus replication by RNA interference. **Journal of virology**, v. 6, n. 188, p. 1-4, nov.2009.

ANGART, F.; VOCELE, D.; CHAN, C.; WALTON, P. Design of siRNA therapeutics from the molecular scale. **Pharmaceuticals**, v.6, n. 4, p.3-7, 2013.

APPOLINARIO, C.M.; JACKSON, A.C., "Antiviral therapy for human rabies". **Antiviral Therapy**, DOI 10:3851/IMP2851.

APPOLINARIO - HARARY, C.M. **Eficácia terapêutica de RNAs de interferência (siRNAs) e avaliação da resposta imune em camundongos infectados com vírus da raiva de origem de cão e de morcego**. 2014. F. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2014.

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

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

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

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

BRASÍLIA. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. Brasília. 2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/saude>>. Acesso em: 20 de Dezembro de 2014.

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

BRZOZKA, K.; FINKE, S.; CONZELMANN, K.K. Identification of the rabies vírus α e β interferon antagonist: phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3. **Journal of Virology**, v.79, n. 12, p. 7673-7681, jun.2005.

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

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

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

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

CAPONE, J. A.; GHOSH, H. R. Association of the nucleocapsid protein N of vesicular stomatitis virus with phospholipid vesicles containing the matrix protein M. **Canadian Journal of Biochemistry Cell Biology**. 62, p. 153-158, nov.1984.

CARDOSO, A.L.C.; SIMÕES, S.; ALMEIDA, L.P.; PLESNILA, N., LIMA, M.C.P.; WAGNER, E.; CULMSEE, C. Tf – lipoplexes for neuronal siRNA delivery: A promising system to mediate gene silencing in the CNS. **Journal of Control Release**, v. 132, n. 2, p. 113–123, dez.2008.

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

CARTHEW R.W.; SONTHEIMER E.J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, fev. 2009.

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

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

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

COLONNO, R. J.; BANERJEE, A. K. Complete nucleotide sequence of the leader RNA synthesized *in vitro* by vesicular stomatitis virus. **Cell**, 15, p. 93-101, set.1978.

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

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

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

DIETZCHOLD, B.; WIKTOR, T.G.; TROJANOWSKI, J.Q., MACFARLAN, R.I.; WUNNER, W.H.; TORRES – ANJEL, M.J.; KOPROWSKI, H. Differences in cell-to-cell spread of pathogenic and apathogenic rabies virus *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Virology**, v.56, p. 12-18, out.1985.

DURYMANOVA ONO, E.A.; IAMAMOTO, K.; CASTILHO, J.G.; CARNIELI, P. JR.; OLIVEIRA, R. N., ASHKAR, S.M.; CARRIERI, M.L.; KOTAIT, I.; BRANDÃO, P. E. *In vitro* and *in vivo* inhibition of rabies virus replication by RNA interference. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 879, nov.2013.

ELBASHIR, S.M.; HARBORTH, J.; LENDECKEL, W.; YALEIN, A.; WEBER, K.; TUSCHI, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, v. 411, p.494-498, mai.2001.

FABER, M.; PULMANAUSAHAKUL, R.; HODAWADEKAR, S.S.; SPITSIN, S.; McGETTIGAN, J.P., SCHNELL; DIETZSCHOLD, B. Overexpression of the rabies virus glycoprotein results in enhancement of apoptosis antiviral immune response. **Journal of Virology**, v.76, p.3374-3381, abr.2002.

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

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

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

FINKE, S.; CONZELMANN, K. K. Dissociation of rabies virus matrix protein functions in regulation of viral RNA synthesis and virus assembly. **Journal of Virology**, 77, p. 12074-12082, nov.2003.

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

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

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

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

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

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

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

GOTTWEIN, E.; CULLEN, B.R. Viral and cellular microRNA as determinants of viral pathogenesis and immunity. *Cell Host Microbe*, v.3, n. 6, p. 375 – 387, jun.2008.

GUPTA, A.; BLONDEL, D.; CHOUDHARY, S.; BENERJEE, A. Phosphoproteine (P) of rabies virus is phosphorylated by a unique cellular protein kinase and specific isomers of protein kinase C. *Journal of Virology*, 74, p.91-98, jan.2000

GUPTA, P.K.; SONWANE, A.A.; SINGH, N.K.; MESHRAM, C.D.; DAHIYA, S.S.; PAWAR, S.S.; GUPTA, S.P.; CHATURVEDI, V.K.; SAINI, M. Intracerebral delivery of small interfering RNAs (siRNAs) using adenoviral vector protects mice against lethal peripheral rabies challenge. *Virus Research*, v. 163, n. 1, p. 2–7, jan.2012

GYORGY M.; SHEEHAN, M.C.; SOKOL, F. Release of envelope glycoproteine from rabies virus by non-ionic detergent. *Journal of Virology*, v. 8, p. 649–655, nov.1971.

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

HIRAMITSU, K.; MANNEN, K.; MIFUNE, K.; NISHIZONO, A.; TAKITA – SONODO. Comparative sequence analysis of the M gene among rabies virus strains and its expression by recombinant vaccinia virus. *Virus Gene*, v. 7, p.83–88, fev.1993.

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

ISENI, P.; 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, p. 2909-2919, dez.1998.

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

ITO, N.; TAKAYAMA, M.; YAMADA, K.; SUGIYAMA, M.; MINAMOTO, N. Rescue of rabies virus from cloned cDNA and identification of the pathogenicity- related gene: glycoprotein gene is associated with virulence for adult mice. **Journal of Virology**, v. 75, p. 9121-9128, out.2001

JACKSON, A.; WARREL, 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 human. **Clinical Infectious Disease**, v. 36, p.61, jan.2003.

JACKSON A., Current and future approaches to the therapy of human rabies. **Antiviral research**, 99, pp.61-62, jul.2013a.

JACKSON A. Therapy of Human Rabies. In _____ **Rabies: Scientific Basis of the disease and its Management**. Oxford, Elsevier Academic Press, 2013b p.573-587.

KANG, C.Y.; PREVEC, L. Proteins of vesiculovirus III. Intracellular synthesis and extracellular appearance of virus – specific proteins. **Virology**, v. 46, p. 678-690, dez.1971.

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

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

KELLY, R.M.; STRI, P.L. Rabies as a transneuronal tracer of circuits in the central neuro system. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 103, p. 63-71, nov.2000.

KIM, W.J.; KIM, S.W. Efficient siRNA delivery with Non – viral Polymeric Vehicles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 3, p. 657 – 665, mar.2009.

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

KOMFELD, R.; KOMFELD, S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. **Annual Review of Biochemistry**, v. 54, p. 631 – 664, 1985.

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

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

KREBS, J. W.; WILLIAMS, S. M.; SMITH, J. S.; RUPPRECHT, C. E.; CHILDS, J. E. Rabies among infrequently reported mammalian carnivores in the United States, 1960-2000. **Journal of Wildlife Disease**, v. 39, n. 2, p. 253-261, abr.2003.

KUMAR, P.; LEE, S. K.; SHANKAR, P.; MANJUNATH, N. A Single siRNA Suppresses Fatal Encephalitis Induced by Two Different Flaviviruses. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 4, p. 507, abr.2006.

KUMAR, P.; WU, H.; MCBRIDE, J. L.; JUNG, K. E.; KIM, M. H.; DAVIDSON, B. L.; LEE, S. K.; SHANKAR, P.; MANJUNATH, N. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. **Nature**, v. 448, p. 39-43, jul.2007.

KUMAR, S.; ARANKALLE, V. A. Intracranial Administration of P Gene siRNA Protects Mice from Lethal Chandipura Virus Encephalitis. **PloS One**, v. 5, n. 1, p.1-5, jan.2010.

LAHAYE, X.; VIDY, A.; POMIER, C.; OBIANG, L.; GAUDIN, Y.; BLONDEL, D. Negre bodies formed in rabies virus infected cells are sites of viral transcription and replication. In: XIV International Conference on Negative Strand Viruses, 2010, Brugge, Belgium. **Anais....2010**, p.75.

LENTZ, T. L.; BURRAGE, T. G.; SMITH, A. L.; CRICK, J.; TIGNOR, G. H. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? **Science**, v. 215, p. 182-184, jan.1982.

LEPPERT, M.; RITTENHOUSE, L.; PERRAULT, J.; SUMMERS, D. F.; KOLAKOSKY, D. Plus and minus strand leader RNAs in negative strand virus-infected cells. **Cell**, v.18, p. 735-747, nov.1979.

LEWIS, P.; FU, Y.; LENTZ, T. L. Rabies virus entry at the neuromuscular junction in nerve-muscle cocultures. **Muscle & Nerve**, v. 23, p. 720-730, mar.2000.

LI B.J.; TANG, Q.; CHENG, D.; QIN, C.; XIE, F.Y.; WEI, Q.; XU, J.; LIU, Y.; ZHENG, B.J.; WOODLE, M.C.; ZHONG, N.; LU, P.Y. Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimes against SARS coronavirus in Rhesus macaque. **Nature Medicine**, v. 11, p.944-951, set.2005.

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, ago.1992.

MARSH, M.; HELENIUS, A. Virus entry into animal cells. **Advances in Virus Research**, v. 36, p. 107-151, fev.1989.

MATTOS, C. A.; FAVI, M.; YUNG, V.; PAVLETIC, C.; MATTOS, C. C. Bat rabies in urban centers in Chile. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 36, n. 2, p. 231-240, abr.2000.

MATTOS, C. C.; MATTOS, C. A.; LOZA-RUBIO, E.; AGUILAR-SETIÉN, A.; ORCIARI, L. A.; SMITH, J. S. Molecular characterization of rabies virus isolates from México: implications for transmission dynamics and human risk. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 4, p. 587-597, out.1999.

MATTOS, C. A.; MATTOS, C. C.; SMITH, J. S.; MILLER, E. T.; PAPO, S.; UTRERA, A.; OSBURN, B. I. Genetic characterization of rabies field isolates from Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 6, p. 1553-1558, jun.1996.

MEBATION, T.; KONIG, M.; CONSELMANN, K. Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein. **The Cell**, v. 84, p. 941-951, mar.1996.

MEBATION, T., WEIAND, 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, p. 242-250, jan.1999.

MESHAM, C.D.; SINGH, N. K.; SONWANE, A.A.; PAWAR, S.S.; MISHRA, B.P.; CHATURVEDI, M.S.; SINGH, R.P.; GUPTA, P.K. Evaluation of single and dual siRNAs targeting rabies virus glycoprotein and nucleoprotein genes for inhibition of virus multiplication *in vitro*. **Archives of Virology**, v. 158, n. 11, p. 2323 – 2332, nov.2013.

MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. Geneva: World Health Organization, 1996. 445-446 p.

NADIN-DAVIS, S. A.; CASEY, G. A.; WANDELER, A. Identification of regional variants of the rabies virus within the Canadian province of Ontario. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 829-837, mai.1993.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. **The Plant Cell**, v. 2, n. 4, p. 279-289, abr.1990.

NI, J.Z.; CHEN, E.; GU, C.G. “Complex coding of endogenous siRNA, transcriptional silencing and H3K9 methylation on native targets of germline nuclear RNAi in *C. elegans*. **BMC genomics**, v. 15, p. 1157, dez.2014.

NUNAN, C. P.; TINLINE, R. R.; HONIG, J. M.; BALL, D. G. A.; HAUSCHIDT, P.; LEBERT, C. A. Post exposure treatment and animal rabies, Ontario, 1958-2000. **Emergence of Infections Disease**, v. 8, n. 2, p. 214-217, 2002.

OBBARD D.J.; GORDON, K.H.J.; BUCK, A.H.; JIGGINS, F.M. “The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements”. **Philosophical Transactions of Royal Society B: Biological Sciences**, v.362, p.100, jan.2009.

ONO, E.A.D.; BRANDÃO, P.E. Rabies virus phosphoprotein mRNA is an effective target to siRNA-mediated RNAi antiviral treatment *in vitro* and *in vivo*. In: XXV

Congresso Brasileiro de Virologia, 2014, Ribeirão Preto. **Anais....** Sociedade Brasileira de Virologia, 2014.

PÁEZ, A.; SAAD, C.; NÚÑEZ, C.; BÓSHHELL, J. Molecular epidemiology of rabies in northern Colombia 1994-2003. Evidence for human and fox rabies associated with dogs. **Epidemiology and Infection**, v. 133, n. 3, p. 529-536, jun.2005.

PÁEZ, A.; VELASCO-VILLA, A.; REY, G.; RUPPRECHT, C. E. Molecular epidemiology of rabies in Colombia 1994-2005 based on partial nucleoprotein gene sequences. **Virus Research**, v. 130, n.1-2, p. 172-181, dez.2007.

PALLISER, D.; CHOWDHURY, D.; WANG, Q. Y.; LEE, S. J.; BRONSON, R. T.; KNIPE, D. M.; LIEBERMAN, J. An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection. **Nature**, v. 439, p. 489–494, jan.2006.

PARASHAR, D.; PAINGANCAR, M.S.; KUMAR, S.; GOKHALE, M.D.; SUDEEP, A.B.; SHINDE, S.B.; ARANKALLE, V.A. Administration of E2 and NS1 siRNAs inhibit Chikungunya Virus Replication *In vitro* and protects mice infected with the virus. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 7, n. 9, p. 1–9, set.2013.

PFAFFL M.W., “A new mathematical model for relative quantification in real-time PCR. **Nucleic Acid Research**, v. 29, n. 9, p. 45, mai.2001.

REN, Y.; GONG, W.; ZHOU, H.; WANG, Y.; XIAO, F.; LI, T. siRecords: a database of mammalian RNAi experiments and efficacies. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 1-4, jan.2008.

REYNOLDS A.; LEAKE, D.; BOESE,Q.; SCARINGE, S.; MARSHALL, W.S.; KHVOROVA, A. Rational siRNA design for RNA interference. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 3, p.326, mar.2004.

ROBISON, C. S.; WHITT, M. A. The membrane-proximal stem region of vesicular stomatitis G protein confers efficient virus assembly. **Virology**, v. 74, p. 2239-2246, mar.2000.

RUPPRECHT, C. E.; HONLON, C. A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 6, p. 327-343, jun.2002.

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

SCHNELL, M.J.; McGETIGAN, J.P.; WIRBLICH, C.; PAPANERI, A. The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. **Nature**, v.8, p.51-61, jan.2010.

SEIF, I.; COULON, P.; ROLLIN, P. E.; FLAMAND, A. Rabies virus virulence: Effect on pathogenicity and sequence characterization of mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. **Journal of Virology**, v. 53, p. 926-935, mar.1985.

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

SINGH, N.K.; MESHARAM, C.D.; SONWANE, A.A.; DAHIYA, S.S.; PAWAR, S.S.; CHATURVEDI, V.K.; SAINI, M.; SINGH, R.P.; GUPTA, P.K. Protection of mice against lethal rabies virus challenge using short interfering RNAs (siRNAs) delivered through lentiviral vector. **Molecular Biotechnology**, v. 56, n. 2, p.91–101, fev.2014.

SONWANE, A.A.; DAHIYA, S.S.; SAINI, M.; CHATURVEDI, V.K.; SINGH, R.P.; GUPTA, P.K. Inhibition of rabies virus multiplication by siRNA delivered through adenoviral vector *in vitro* in BHK – 21 cells and *in vivo* in mice. **Research in Veterinary Science**, v.93, n. 1, p. 498 – 503, ago.2012.

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

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

TESTA, D.; CHANDA, P. K.; BANERJEE, A. K. Unique mode of transcription *in vitro* by vesicular stomatitis virus. **Cell**, v. 21, p. 267 - 275, ago.1980.

THOULOZE, M.I.; SHACHNER, M.; HARTMANN, U.; CREMER, H.; LAFON, M. The neuronal cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. **Journal of Virology**, v.72, p.7181-7190, set.1998.

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G.; ROUGEON, F. Walking along the rabies genome: Is the large G – L intergenic region a remnant gene? **Proceeding of the National Academy Sciences**, v. 83, p. 3914 – 3918, jun.1986.

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

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

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

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

UMBACH, J.L.; CULLEM, B.R. The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity. **Genes & Development**, v. 23, n. 10, p.1151 – 1154, mai.2009.

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

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

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

WATSON, H.D.; TIGNOR, G.H.; SMITH, A.L. Entry of rabies virus into the peripheral nerves of mice. **Journal General Virology**, v.56, p. 372-382, out.1981.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

WUNNER, W.H.; LARSON, J.K.; DIETZSCHOLD, B.; SMITH, C. The molecular Biology of rabies virus. **Infection Disease**, vol.10, 4, p.771, nov.-dez.1988.

YANG, Y.J.; ZHAO, P.S.; ZHANG, T.; WANG, H.L.; LIANG, H.R.; ZHAO, L.L.; WU, H.X.; WANG, T.C, YANG, S.T.; XIA, X.Z. Small interfering RNAs targeting the rabies virus nucleoprotein gene. **Virus Research**, v. 169, n. 1, p.169 – 174, out.2012.

YIN, J.Q.; TAN, F.L. RNAi, a new therapeutic strategy against viral infection. **Cell Research**, v. 14, n. 6, p. 460, dez.2004.

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

ZHAO, P.; ZHAO, L.; ZHANG, K.; FENG, H.; WANG, H.; WANG, T.; XU, T.; FENG, N.; WANG, C.; GAO, Y.; HUANG, G.; QIN, C.; YANG, S.; XIA, X. Infection with street strain rabies virus induces modulation of the microRNA profile of the mouse brain. **Virology Journal**, v. 9, p.1-13, ago.2012.