INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA NA IMUNOGENICIDADE DAS
RIBONUCLEOPROTEÍNAS (RNPs) DO VÍRUS DA RAIVA E PURIFICAÇÃO DE
ANTICORPOS ANTI-RNPs PARA DIAGNÓSTICO**

ANA ELENA BOAMORTE DA COSTA

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para a obtenção do
Grau de Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear – Aplicações.**

Orientador:

Prof. Dr. Patrick Jack Spencer

SÃO PAULO

2010

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA NA IMUNOGENICIDADE DAS
RIBONUCLEOPROTEÍNAS (RNPs) DO VÍRUS DA RAIVA E PURIFICAÇÃO DE
ANTICORPOS ANTI-RNPs PARA DIAGNÓSTICO**

ANA ELENA BOAMORTE DA COSTA

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para a obtenção do
Grau de Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear – Aplicações.**

Orientador:

Prof. Dr. Patrick Jack Spencer

SÃO PAULO

2010

Dedico este trabalho

À minha família: meus pais Moisés e Anael, e meus irmãos Moisés F., Lia e Patrick. Vocês são o meu porto seguro.

Ao meu amado companheiro Alexandre, por estar ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu filho Caio, razão maior da minha alegria.

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida.

Ao meu pai, grande homem, grande médico, grande pai, pelo exemplo de superação, lição que carrego em minha vida.

À minha mãe, a quem admiro muito, por saber conciliar a vida profissional com a vida familiar, me educando com dedicação e amor incondicional.

Aos meus irmãos, que mesmo distantes, estão sempre presentes em minha vida.

Ao Instituto Pasteur de São Paulo e ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), onde este trabalho foi realizado, pelo suporte e estrutura concedidos.

Ao Dr. Patrick Jack Spencer, meu orientador, pelo privilégio de ser sua aluna, por ter confiado em meu trabalho e por todo conhecimento que me proporcionou.

À Dra. Neide Takaoka, diretora do Instituto Pasteur.

À Dra. Ivanete Kotait, assistente técnica do Instituto Pasteur, e à Dra. Maria Luiza Carrieri, pesquisadora do Instituto Pasteur, pela colaboração técnica dispensada a este trabalho.

À Dra. Zélia Maria Pinheiro Peixoto, a quem admiro e respeito, por sua imensa contribuição no meu crescimento profissional, por me ensinar a “amar” a produção do conjugado, e por sempre me apoiar.

Ao Alexandre Mendes Batista, meu companheiro pessoal e de bancada, por toda a assistência na produção do vírus e por realizar a fotodocumentação utilizada neste trabalho, pela paciência (nos dias difíceis) e ajuda incondicional, principalmente quando o tempo era curto.

Às pesquisadoras do Instituto Pasteur, Andréa de Cássia Rodrigues da Silva, Luciana Botelho Chaves, Karin Côrrea Scheffer Ferreira e Samira M. Achkar, pela amizade e por estarem sempre dispostas a ajudar.

À Graciane M. M. Caporale, pesquisadora do Instituto Pasteur, pela paciência em responder todas as minhas perguntas (que não foram poucas) e pela amizade que compartilhamos.

À Keila Iamamoto, minha querida amiga, sempre disposta a ajudar (até nos fins de semana), a quem agradeço com todo meu carinho pelo apoio e por não me deixar desanimar nas horas difíceis.

À Adriana Candido Rodrigues, bióloga do Instituto Pasteur, pela amizade e colaboração nos experimentos finais.

À Maria de Fátima de Sousa Cavalcante, responsável pelo biotério do Instituto Pasteur, por ter concedido os camundongos utilizados na IFD e IFI.

À Eliana de Almeida, bióloga do Instituto Pasteur, pela amizade e pela contribuição com a manutenção das células utilizadas neste estudo.

À Karininha, Kátia, Karina e Patrícia, pela amizade.

Aos meus novos e queridos amigos do CB (IPEN), Karina C. Oliveira, Rodrigo G. Queiroz, Felipe M. Azevedo, Vicent Louis Viala, Janaína B. Alves, Rosa M. Chura-Chambi, por toda ajuda técnica e de bancada, e principalmente pela amizade que em muitos momentos me tranquilizou. Em especial a Tamara M. Fucase, minha grande amiga.

À Dra. Ruth Camargo Vassão, pesquisadora do Instituto Butantan, pela colaboração na revisão deste estudo.

À Fernanda Beatrice Nonato, do CMR (IPEN), que me ajudou a entender um pouquinho desse maravilhoso mundo da física (na inesquecível primeira disciplina obrigatória), e pela amizade que construímos nesses 2 anos.

Aos engenheiros Carlos e Elizabeth, do CTR (IPEN), por possibilitarem o tratamento com raios gama das proteínas utilizadas neste estudo.

À técnica Neide Mascarenhas, e ao funcionário Antônio Calixto, do biotério do IPEN, pelos cuidados dispensados aos animais utilizados.

A todos do Instituto Pasteur e IPEN que estiveram envolvidos direta ou indiretamente neste estudo, meu sincero muito obrigada.

“Estou entre aqueles que acham que a ciência possui grande beleza. Um cientista em seu laboratório não é apenas um técnico, ele também é uma criança posta diante de fenômenos naturais, que o impressionam como um conto de fadas. Não podemos deixar que se acredite que todos os progressos científicos possam se reduzir ao mecanicismo, [...] Tampouco acredito que o espírito de aventura corra qualquer risco de desaparecer em nosso mundo. Se vejo algo vital à minha volta, é exatamente esse espírito de aventura, que se afigura indestrutível.”

Marya Salomee Sklodowska

(Madame Curie)

EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA NA IMUNOGENICIDADE DAS RIBONUCLEOPROTEÍNAS (RNPs) DO VÍRUS DA RAIVA E PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-RNPs PARA DIAGNÓSTICO

Ana Elena Boamorte da Costa

RESUMO

A Organização Mundial da Saúde recomenda o teste de Imunofluorescência Direta (IFD) para a realização do Diagnóstico Laboratorial e Avaliação Sorológica da raiva. Como reveladores deste teste, são utilizados conjugados fluorescentes antirribonucleoproteínas (RNPs) do vírus da raiva, produzidos a partir de anticorpos anti-RNPs obtidos da purificação de soros hiperimunes de animais imunizados com RNPs purificadas. Os objetivos deste estudo foram: avaliar os efeitos da radiação gama na imunogenicidade das RNPs e comparar dois métodos cromatográficos de purificação de imunoglobulinas anti-RNPs. Os soros de animais imunizados com RNPs irradiadas e não irradiadas foram avaliados nos testes de Imunofluorescência Indireta e Ensaio Imunoenzimático. A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que os animais imunizados com RNPs irradiadas necessitam de um menor número de doses para uma resposta imunológica com alto título de anticorpos. Por meio da IFD verificou-se que o conjugado produzido com anticorpos anti-RNPs irradiadas apresentou especificidade semelhante a do conjugado produzido a partir de anticorpos anti-RNPs não irradiadas, mas com melhor definição das inclusões características do vírus. Os processos de purificação de anticorpos por cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade foram avaliados utilizando-se os testes de Bradford e eletroforese (SDS-PAGE). Pelos resultados obtidos pode-se concluir que, neste estudo, o processo de purificação que utilizou a cromatografia de afinidade foi o método que apresentou melhor rendimento, menor tempo de execução e obtenção de anticorpos com maior grau de pureza.

EFFECTS OF GAMMA RADIATION IMMUNOGENICITY OF RIBONUCLEOPROTEIN (RNPS) OF RABIES VIRUS AND PURIFICATION OF ANTI-RNPS ANTIBODIES FOR DIAGNOSIS

Ana Elena Boamorte da Costa

ABSTRACT

The World Health Organization recommends the direct immunofluorescence test for laboratory diagnosis and serological evaluation of rabies. To achieve this test, fluorescent anti-ribonucleoproteins (RNPs) conjugates, produced from purified IgGs of RNP-immunized animals are employed. The aims of the present study were: investigate the effects of gamma radiation on the immunogenicity of RNPs, as well as to compare two chromatographic methodologies for the purification of anti-RNPs immunoglobulins. Sera from animals immunized with either native or irradiated RNPs were compared by direct immunofluorescence and immunoenzymatic assays. Our results indicate that the animals immunized with irradiated antigen requested a lower number of doses to reach high antibody titers. The immunofluorescence assays indicated that the conjugates produced with the anti-irradiated RNPs IgGs showed similar specificity to its anti-native counterpart, but with a higher definition of the virus inclusions. The purification methods were compared by Bradford and electrophoresis assays. According to the results, we concluded that the affinity-based process resulted in higher yields, lower execution time, and higher purity of the antibodies.

SUMÁRIO

Página

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Raiva – Considerações Gerais	14
1.2	Principais características do vírus da raiva	15
1.3	Imunidade antivírus da raiva	17
1.4	Diagnóstico Laboratorial e Avaliação Sorológica da raiva	18
1.5	Conjugado antivírus da raiva	20
1.6	Produção de anticorpos (IgGs)	21
1.7	Radiação Ionizante	22
1.8	Purificação de anticorpos (IgGs)	24
1.8.1	Cromatografia de troca iônica	25
1.8.2	Cromatografia de afinidade	25
2	OBJETIVOS	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Obtenção e purificação das ribonucleoproteínas (RNPs)	28
3.2	Irradiação das RNPs	29
3.3	Caracterização da proteína irradiada	30
3.3.1	Eletroforese (SDS-PAGE)	30
3.3.2	Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	30
3.4	Imunização dos animais	31
3.5	Dosagem de anticorpos	31
3.5.1	Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	31
3.5.2	Imunofluorescência Indireta (IFI)	32
3.6	Produção dos conjugados anti-RNPs do vírus da raiva	33
3.6.1	Purificação das IgGs por cromatografia de troca iônica	33
3.6.2	Conjugação das IgGs com o fluorocromo	33
3.7	Titulação dos conjugados anti-RNPs do vírus da raiva	34
3.7.1	Imunofluorescência Direta (IFD)	34

3.7.2	Microteste Simplificado de Inibição de Fluorescência (SFIMT)	35
3.7.3	Isolamento viral em cultura celular	35
3.8	Purificação de anticorpos	36
3.8.1	Cromatografia de troca iônica	36
3.8.2	Cromatografia de afinidade	36
3.9	Avaliação dos processos de purificação de anticorpos	37
3.9.1	Dosagem de proteínas - Método de Bradford	37
3.9.2	Eletroforese (SDS-PAGE)	37
3.9.3	Teste de imunoreatividade das IgGs purificadas – ELISA	38
3.10	Análise Estatística	38
4	RESULTADOS	39
4.1	Obtenção e purificação das RNPs	39
4.2	Caracterização da proteína irradiada	40
4.2.1	Eletroforese (SDS-PAGE)	40
4.2.2	Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	41
4.3	Obtenção dos soros hiperimunes	41
4.4	Dosagem de anticorpos	42
4.4.1	Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	42
4.4.2	Teste de Imunofluorescência Indireta (IFI)	44
4.5	Produção dos conjugados anti-RNPs	47
4.6	Titulação dos conjugados anti-RNPs	47
4.7	Purificação das imunoglobulinas	50
4.7.1	Cromatografia de troca iônica	50
4.7.2	Cromatografia de afinidade (Proteína A)	51
4.8	Teste de imunoreatividade das IgGs purificadas - ELISA	52
4.9	Eletroforese (SDS-PAGE)	53
5	DISCUSSÃO	54
6	CONCLUSÕES	60
	ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética CEPA/IPEN-USP	61
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Representação esquemática do vírus da raiva	17
Figura 2 - Banda formada após purificação em gradiente de Cloreto de Césio.....	39
Figura 3 - Gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE).....	40
Figura 4 - Gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE).....	40
Figura 5 - Ensaio imunoenzimático para a avaliação da especificidade da reação de anticorpos com as RNPs irradiadas	41
Figura 6 - Titulação por ensaio imunoenzimático dos anticorpos dos soros de coelhos imunizados com RNPs irradiadas (coelhos grupo B) e não irradiadas (coelhos grupo A) obtidos na 1ª coleta exploratória	42
Figura 7 - Avaliação por ensaio imunoenzimático do título de anticorpos dos soros de coelhos imunizados com RNPs irradiadas (coelhos grupo B) e não irradiadas (coelhos grupo A) obtidos na 1ª coleta exploratória	43
Figura 8 - Titulação por ensaio imunoenzimático dos anticorpos dos soros de coelhos imunizados com RNPs irradiadas (coelhos grupo B) e não irradiadas (coelhos grupo A) obtidos na 2ª coleta exploratória	43
Figura 9 - Avaliação por ensaio imunoenzimático do título de anticorpos dos soros de coelhos imunizados com RNPs irradiadas (coelhos grupo B) e não irradiadas (coelhos grupo A) obtidos na 2ª coleta exploratória	44

Figura 10 - IFI do soro do coelho A ₁ (1 ^a coleta) 1:1600.....	45
Figura 11 - IFI do soro do coelho A ₁ Controle negativo.1:1600	45
Figura 12 - IFI do soro do coelho A ₂ (1 ^a coleta) 1:800	45
Figura 13 - IFI do soro do coelho A ₂ .Controle negativo 1:800	45
Figura 14 - IFI do soro do coelho B ₁ (1 ^a coleta) 1:1600.....	45
Figura 15 - IFI do soro do coelho B ₁ . Controle negativo 1:1600	45
Figura 16 - IFI do soro do coelho B ₂ (1 ^a coleta) 1:1600.....	46
Figura 17 - IFI do soro do coelho B ₂ . Controle negativo 1:1600	46
Figura 18 - IFI do soro do coelho A ₁ (2 ^a coleta) 1:2500.....	46
Figura 19 - IFI do soro do coelho A ₁ .Controle negativo 1:2500	46
Figura 20 - IFI do soro do coelho A ₂ (2 ^a coleta) 1:1000.....	46
Figura 21 - IFI do soro do coelho A ₂ Controle negativo 1:1000	46
Figura 22 - IFI do soro do coelho B ₁ (2 ^a coleta) 1:1600.....	46
Figura 23 - IFI do soro do coelho B ₁ Controle negativo 1:1600	46
Figura 24 - IFI do soro do coelho B ₂ (2 ^a coleta) 1:1600.....	47
Figura 25 - IFI do soro do coelho B ₂ Controle negativo 1:1600	47
Figura 26 - IFD conjugado anti-RNPs não irradiadas 1:40.....	48
Figura 27 - IFD conjugado anti-RNPs não irradiadas. Controle negativo 1:40	48
Figura 28 - IFD conjugado anti-RNPs não irradiadas 1:100.....	48
Figura 29 - IFD conjugado anti-RNPs não irradiadas. Controle negativo 1:100	48
Figura 30 - IFD conjugado anti-RNPs não irradiadas 1:140.....	48
Figura 31 - IFD conjugado anti-RNPs não irradiadas. Controle negativo 1:140	48
Figura 32 - IFD conjugado anti-RNPs não irradiadas. Controle negativo 1:140	49
Figura 33 - IFD conjugado anti-RNPs irradiadas. Controle Negativo 1:40.....	49
Figura 34 - IFD conjugado anti-RNPs irradiadas 1:100.....	49
Figura 35 - IFD conjugado anti-RNPs irradiadas. Controle Negativo 1:100.....	49
Figura 36 - IFD conjugado anti-RNPs irradiadas 1:140.....	49

Figura 37 - IFD conjugado anti-RNPs irradiadas. Controle Negativo 1:140	49
Figura 38 - IFD conjugado antivírus da raiva 1:200.....	49
Figura 39 - IFD conjugado antivírus da raiva 1:200.....	49
Figura 40 - Cromatograma da purificação de imunoglobulina em coluna Hi Trap rProtein A FF	51
Figura 41 - Avaliação por ensaio imunoenzimático do título de IgGs do soro de coelho, obtidas da purificação por troca iônica e por coluna de proteína A.....	52
Figura 42 - Gel de poliacrilamida 12,5% SDS-PAGE	53

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 -	Esquema de Imunização.....	31
Tabela 2 -	Volumes de soros obtidos por punção cardíaca	41
Tabela 3 -	Títulos dos soros obtidos pela técnica de Imunofluorescência Indireta	44
Tabela 4 -	Leitura a 280 nm das amostras coletadas após passagem do soro pela coluna de cromatografia de troca iônica.....	50
Tabela 5 -	Volume de amostra e resultados obtidos pelo Teste de Bradford para cada etapa do processo de purificação por cromatografia de troca iônica.....	51
Tabela 6 -	Volume de amostra e resultados obtidos pelo teste de Bradford para cada etapa do processo de purificação por cromatografia de afinidade.....	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 Raiva – Considerações gerais

A raiva é uma encefalite aguda e progressiva, com letalidade de 100%, transmitida pela inoculação do vírus da raiva, contido na saliva de animais infectados, principalmente através de mordeduras. A cada ano a raiva é responsável pela morte de aproximadamente 50.000 a 55.000 pessoas (Wunner e Briggs, 2010), principalmente nos países em desenvolvimento, representando, ainda nos dias atuais, um sério problema de saúde pública (Kotait e Carrieri, 2008).

O vírus da raiva está presente em todos os continentes, sendo alguns países e territórios considerados “livres da raiva”, como: Austrália, Japão, países do norte e sul da Europa. No entanto, a continuidade deste “status de livre” da raiva depende de métodos efetivos para prevenir a introdução ou reintrodução do vírus nas populações susceptíveis e depende da vigilância epidemiológica baseada no diagnóstico laboratorial (Rupprecht e Gibbons, 2004).

Após mais de 115 anos do desenvolvimento da vacina antivírus da raiva, por Louis Pasteur, a raiva persiste em algumas regiões sob forma epidêmica. A razão mais importante para que tal fato ocorra é a multiplicidade de reservatórios domésticos ou silvestres da raiva.

A raiva apresenta dois ciclos principais de transmissão: urbano e silvestre. No ciclo urbano, a principal fonte de transmissão é o cão. No Brasil, o morcego é o principal responsável pela manutenção da cadeia silvestre. Outros reservatórios silvestres são: macaco, sagui, cachorro do mato, gato do mato, jaritaca e guaxinim (FUNASA, 2002).

Em relação à raiva humana, na América do Sul, desde 2004 a transmissão pelos morcegos hematófagos aumentou, especialmente na região Amazônica (Brasil, Peru, Equador, Colômbia, Bolívia e Guianas) (Kotait e Carrieri, 2008).

1.2 Principais características do vírus da raiva

A raiva, doença que acomete mamíferos em geral, é causada por um vírus RNA pertencente à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus* (Carstens, 2010).

A família *Rhabdoviridae* possui três gêneros que infectam mamíferos: *Vesiculovirus* (vírus da estomatite vesicular e vírus relacionados), *Lyssavirus* (vírus da raiva e aparentados ao vírus da raiva), *Ephemerovirus* (vírus da febre efêmera dos bovinos) (ICTV, 2010).

Além desses três gêneros, há outros três: *Novirhabdovirus* (infecta peixes), *Cytorhabdovirus* e *Nucleorhabdovirus* (infectam plantas e invertebrados).

O gênero *Lyssavirus* possui atualmente 11 espécies distintas (Carstens, 2010): *Aravan virus*, *Australian bat lyssavirus*, *Duvenhage virus*, *European bat lyssavirus 1*, *European bat lyssavirus 2*, *Irkut virus*, *Khujand virus*, *Lagos bat virus*, *Mokola virus*, *Rabies virus* e *West Caucasian bat virus*.

Até o presente momento, dentre as 11 espécies do gênero *Lyssavirus*, apenas a espécie *Rabies virus* foi encontrada no continente americano.

Os diferentes genótipos do gênero *Lyssavirus* possuem RNA fita simples, polaridade negativa, linear, não segmentado, com 11.932 nucleotídeos e peso molecular (P.M.) = $4,6 \times 10^6$ daltons (Da). São formados pela combinação de cinco genes que codificam 5 proteínas estruturais (figura 1): nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz, glicoproteína (G) e a RNA polimerase – RNA dependente (L) (Tordo, 1996).

A proteína N contém 450 aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 57 kDa, sendo a proteína mais conservada geneticamente (Wunner, 2007). É a proteína de maior importância no processo de encapsidação, preenchendo o cilindro helicoidal do nucleocapsídeo (Tordo, 1986). Também tem papel importante na resposta imune celular, apresentando regiões que são importantes epítomos para o reconhecimento de linfócitos T e B (Batista et al., 2007; Wunner, 2007).

A fosfoproteína ou proteína P é constituída por 297 aminoácidos, com peso molecular de 38-41 kDa e está relacionada à replicação viral, assim como a proteína L (RNA polimerase – RNA dependente), que é constituída por 2142 aminoácidos, com peso molecular de 244 kDa e é responsável pelas atividades

enzimáticas, necessárias para a transcrição e replicação viral (Lafon e Wiktor, 1985).

A proteína M localiza-se na face interna do envelope lipídico, tendo como função a ligação entre o envelope e o complexo RNP, além de regular a replicação viral. Esta proteína constitui a matriz protéica do vírus da raiva, sendo constituída por 202 aminoácidos, com peso molecular de 25 kDa (Tordo et al., 1986). Outra função atribuída à proteína M é a regulação da polimerase viral, suprimindo completamente a atividade de transcrição da polimerase, durante o processo de brotamento do vírus da célula hospedeira (Ito et al., 1996).

A proteína responsável pela ligação do vírus à célula hospedeira é a glicoproteína G, que é uma proteína transmembranária que forma espículas glicolisadas na superfície viral, sendo constituída por 505 aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 65 kDa. É a proteína mais imunogênica e único antígeno viral capaz de induzir a formação de anticorpos neutralizantes (AcN) (Cox et. al., 1977), tendo também a função de servir como receptor na superfície dos vírus e como sítio de ligação de anticorpos.

Em relação à morfologia, o vírus da raiva apresenta a forma de um projétil, com uma das extremidades plana e a outra arredondada. Seu comprimento médio é de 180 nm e o diâmetro médio é de 75 nm. Na sua constituição química, a partícula viral completa contém de 2% a 3% de ácido ribonucléico (RNA), 67% de proteínas, 26% de lipídeos e 3% de carboidratos (Kaplan et al., 1986).

As cinco proteínas constituem duas estruturas principais, segundo suas funções biológicas: as ribonucleoproteínas (RNPs) e o envelope viral (proteína M e a glicoproteína G). As RNPs ou nucleocapsídeo apresentam-se sob forma de um complexo helicoidal constituído de RNA de fita simples associado às proteínas N, L e NS (Tordo et al., 1986). O envelope viral é constituído por uma bicamada lipídica, à qual estão associadas duas proteínas: a proteína M e a glicoproteína G.

Figura 1– Representação esquemática do vírus da raiva. Fonte: Swiss Institute of Bioinformatics.

1.3 Imunidade antivírus da raiva

O vírus da raiva, devido ao seu extremo neurotropismo, ultrapassa as defesas do sistema imune por um longo período, ao contrário de muitos vírus que causam infecção aguda (FUNASA, 2008). No sistema nervoso o vírus está isolado compartimentalmente dos anticorpos e células imunes. Antes da invasão do sistema nervoso, a resposta imune contra o vírus não existe ou não está suficientemente desenvolvida para conferir proteção. Depois de uma amplificação no músculo ou nas células epiteliais, a quantidade de vírus é suficiente para invadir as terminações nervosas, mas insuficiente para ser antigênica (King e Tuner, 1993).

Ao penetrar nos neurônios, o vírus da raiva torna-se protegido da ação dos anticorpos, das células do sistema imune e da ação dos interferons, responsáveis pela resposta imune inespecífica. Os interferons são extremamente importantes no início da infecção, pois podem atuar inibindo a replicação viral e assim sua disseminação, ou induzir as reações das células imunes. O vírus da raiva é capaz de induzir a produção de interferons antes de sua migração para o sistema nervoso central (FUNASA, 2008).

As células apresentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas, células de Langherans, etc.), ao entrar em contato com o vírus da

raiva, o fagocitam e o processam para a apresentação às células imunes. Esta apresentação é fundamental para a ativação dos linfócitos T auxiliares, que vão produzir diferentes citocinas. Estas ativam diferentes células implicadas na eliminação direta do vírus ou de células infectadas e auxiliam na produção de anticorpos pelos linfócitos B (FUNASA, 2008).

Provavelmente, o mecanismo mais importante da resposta imune ao vírus da raiva é a resposta imune celular. Os linfócitos T participam da proteção de diferentes maneiras: estimulando através dos linfócitos T auxiliares, as células B a produzirem anticorpos; como efectoras de imunidade, na forma de células T citotóxicas, lisando células infectadas; induzindo a síntese de substâncias mediadoras da estimulação de diferentes células e como células de memória imunológica (Kotait e Carrieri, 2008).

1.4 Diagnóstico laboratorial e Avaliação Sorológica da raiva

O diagnóstico da raiva baseado na observação clínica de animais encontra dificuldades em distinguir-se de outros agravos. No caso de cães, é necessário um teste diferencial das encefalites não especificadas, causadas por outros agentes patogênicos, tais como: a cinomose, a infestação por helmintos e intoxicações.

Em humanos, a raiva pode ser confundida com vários outros agravos, como: tétano; pasteureloses por mordedura de gato e de cão; infecção por vírus B (*Herpes virus simiae*) por mordedura de macaco; botulismo; febre por mordida de rato (SODÓKU); febre por arranhadura de gato (linforreticulose benigna de inoculação); encefalite pós-vacinal; quadros psiquiátricos; outras encefalites virais (Plotkin, 2000), especialmente as causadas por outros rabdovírus; e tularemia. Outras encefalites causadas por arbovírus também apresentam quadro de encefalite semelhante ao da raiva (FUNASA, 2002).

Nesse contexto, o diagnóstico laboratorial da raiva deve ser rápido e preciso, uma vez que os resultados laboratoriais influenciam não só a eleição de estratégias e definição de intervenção no paciente, como também o conhecimento do risco da doença na região de procedência do animal e a elaboração de medidas de controle para uma possível epizootia em determinada comunidade (Meslin e Kaplan, 1996).

As provas diagnósticas devem apresentar elevada sensibilidade e especificidade, portanto é recomendada na rotina laboratorial de diagnóstico a utilização de duas ou mais técnicas associadas (Kotait e Carrieri, 2008).

O primeiro método laboratorial rápido proposto para o diagnóstico de raiva foi a detecção de corpúsculos de Negri, método descrito por Adelchi Negri há mais de um século. Os corpúsculos de Negri são agregados de nucleocapsídeos que se acumulam no interior do citoplasma das células infectadas. Estas inclusões são patognomônicas para raiva, porém outras inclusões podem levar a interpretações equivocadas. A sensibilidade das provas baseadas na identificação destes corpúsculos é baixa, permitindo a detecção de aproximadamente 40 a 85% dos casos positivos (Batista et al., 2007).

Em 1958, foi adaptada a técnica de Imunofluorescência Direta (IFD) para a raiva por Goldwasser e Kissling, passando esta a ser utilizada amplamente, devido a sua rapidez, alta sensibilidade e especificidade (95 a 99%) (OIE, 2005).

O diagnóstico laboratorial da raiva no Brasil é realizado principalmente por meio da IFD (Dean et al., 1996), sendo também utilizadas técnicas histológicas e de isolamento do vírus em animais de laboratório ou cultivo celular.

A IFD é a técnica considerada “padrão ouro” no diagnóstico da raiva, sendo recomendada pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e Organização Mundial da Saúde (OMS). Esta técnica é rotineiramente empregada para a detecção do antígeno da raiva em amostras de sistema nervoso central (SNC), para a avaliação de anticorpos neutralizantes (soroneutralização) e para a identificação do antígeno viral, após o seu isolamento, estes últimos realizados em cultura celular.

Esta técnica consiste na detecção da reação antígeno-anticorpo por um sistema revelador, chamado conjugado, insumo que utiliza substância fluorescente (fluorocromo) ligada ao anticorpo específico (anticorpos antivírus da raiva). A reação é visualizada em microscópio de campo escuro e luz ultravioleta (260 nm). Os antígenos, que reagiram com o anticorpo marcado, aparecem como inclusões brilhantes de cor esverdeada, com formato ovalado ou arredondado. A qualidade e especificidade da fluorescência dependem de um microscópio adequado e da qualidade do conjugado (Kotait e Carrieri, 2008).

A sensibilidade da IFD depende do espécime (espécie animal e grau de autólise), dos reagentes utilizados e da experiência do profissional de diagnóstico (FUNASA, 2008; OIE, 2005).

A avaliação de anticorpos tem grande importância para determinar a proteção do indivíduo ao vírus da raiva após a vacinação (pré ou pós-exposição). Os testes disponíveis atualmente são: soroneutralização (Smith et al., 1973; Favoretto et al., 1993; Zalan et al., 1979; Cliquet et al., 1998), imunofluorescência indireta (Thomas et al., 1963), contra-imunoeletroforese (Diaz et al., 1986) e ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (Piza et al., 1999).

Atualmente, no Instituto Pasteur de São Paulo, realizam-se testes *in vitro* que avaliam o título de anticorpos neutralizantes utilizando células BHK-21 (Baby Hamster Kidney), chamados: Microteste Simplificado de Inibição de Fluorescência (SFIMT), desenvolvido no Instituto Pasteur de São Paulo por Favoretto et al. (1993) para sorologia humana, e o Teste Rápido para Inibição de Focos Fluorescentes (RFFIT) (Smith et al., 1973) modificado por Chaves et al. (2006) para sorologia animal.

1.5 Conjugado fluorescente antivírus da raiva

O conjugado fluorescente antivírus da raiva é utilizado praticamente em todos os testes diagnósticos recomendados pela OMS, sendo o reagente revelador destes testes. A sensibilidade e a especificidade do conjugado são fundamentais para a obtenção de resultados seguros e confiáveis.

A obtenção de conjugado antivírus da raiva ou anti-RNPs é realizada por meio da conjugação de uma substância fluorescente, como o isotiocianato de fluoresceína (ITCF) a imunoglobulinas (IgGs) específicas purificadas (Caporale et al., 2009; Lopez e Roque, 1997; Atanasiu et al., 1974).

A nucleoproteína N é a proteína mais conservada estruturalmente e antigenicamente (Wunner, 2007), e por esta razão as RNPs são as mais utilizadas para as técnicas de diagnóstico. Desta maneira os conjugados produzidos a partir de ribonucleoproteínas purificadas, são altamente específicos, pois conjugados produzidos com a utilização de partículas íntegras do vírus da raiva, além de apresentarem anticorpos antirribonucleoproteínas, apresentam anticorpos antiproteína M e antiglicoproteína.

Considerando que a maioria dos laboratórios para pesquisa e diagnóstico da raiva utiliza o teste de IFD, no qual o conjugado fluorescente antivírus da raiva é utilizado, a produção deste conjugado é de fundamental importância para o Brasil (Caporale et al., 2009).

O conjugado produzido no Brasil pelo Instituto Pasteur é utilizado no próprio Instituto, em aproximadamente 35 laboratórios credenciados pelo Ministério da Saúde e é exportado para outros países da América Latina. Segundo Caporale (2006) este conjugado apresenta alta especificidade e sensibilidade para resultados positivos e negativos.

No Brasil, o conjugado é utilizado em aproximadamente 50.000 testes de IFD e 30.000 testes de soroneutralização para amostras humanas e 2.000 testes de soroneutralização em amostras de animais de estimação que serão transportados para países pertencentes à Comunidade Européia. A realização desse número elevado de testes somente tornou-se possível após a produção deste conjugado em escala capaz de suprir as necessidades dos laboratórios que participam do Programa Nacional de Controle da Raiva, do Ministério da Saúde.

O rendimento do conjugado produzido no Brasil é de até vinte vezes superior ao conjugado adquirido comercialmente (Caporale et al., 2009), tornando os testes de diagnóstico da raiva mais acessíveis aos laboratórios devido ao melhor custo-benefício.

Além disso, é importante ressaltar que o conjugado comercial importado possui elevado custo (aproximadamente R\$ 700,00– frasco 0,5 mL), acrescidos de encargos de alfândega e importação. Considerando o número de exames realizados no Instituto Pasteur (aproximadamente 40.000/ano) a aquisição do conjugado comercial representaria um gasto anual de R\$ 500.000,00 para o Instituto e aos laboratórios credenciados dificultaria a realização destes exames.

1.6 Produção de anticorpos (IgGs)

As imunoglobulinas (IgGs) antivírus da raiva utilizadas para a produção do conjugado são obtidas do soro hiperimune de animais imunizados com partículas íntegras de vírus da raiva ou com RNPs (ribonucleoproteínas) do vírus da raiva purificadas.

Inicialmente, para a obtenção de anticorpos antivírus da raiva, eram utilizadas suspensões inativadas de cérebro de camundongos infectados com o vírus da raiva como fonte de antígeno para a imunização dos animais (Dean e Abelseth, 1973). Com o avanço de técnicas de infecção viral em cultura celular, foi possível a replicação do vírus em larga escala em células para a extração e purificação de partículas íntegras do vírus e RNPs, segundo a técnica descrita por Compans e Choppin (1967), modificada por Sokol (1973).

As RNPs são as proteínas mais utilizadas na imunização de animais para a obtenção de anticorpos usados na produção de conjugados altamente específicos, devido ao alto grau de conservação gênica da proteína N.

Estudos realizados com proteínas utilizadas na imunização de animais, submetidas à ação de radiação gama, mostram uma melhoria da antigenicidade destas, demonstrando a eficiência do método como ferramenta na produção de melhores imunógenos (Alves, 2004), somado à vantagem de não se adicionar novas moléculas à amostra durante o processo, como agentes físicos ou químicos (Nascimento et al., 1996).

1.7 Radiação Ionizante

Radiação é uma forma de energia, emitida por uma fonte, que se propaga de um ponto a outro, sob forma de partículas com ou sem carga elétrica, ou ainda sob forma de ondas eletromagnéticas. Quando a radiação possui energia suficiente para arrancar um dos elétrons orbitais de átomos neutros, transformando-os em um par de íons, diz-se que ela é ionizante. Portanto, a ionização é a eliminação direta ou indireta de um elétron de um átomo, que se transforma em um íon positivo (Okuno, 1998).

Os efeitos da radiação ionizante sobre materiais biológicos são iniciados por várias interações físicas, dependendo dos átomos presentes e da natureza química do processo (Butler et al., 1984). Seus efeitos podem ser diretos ou indiretos.

O efeito direto ocorre quando a ionização é produzida na própria molécula (Grosh e Hopwood, 1979), isto é, quando a radiação interage diretamente com componentes celulares como o DNA, proteínas e lipídeos, provocando alterações estruturais em suas moléculas, o que representa 30% do efeito biológico das radiações.

O efeito indireto ocorre quando a radiação interage com as moléculas de água presentes no meio intracelular, formando os chamados produtos da radiólise da água ($\text{OH}\cdot$, $\text{H}\cdot$, elétron aquoso e outros). Dado que as moléculas da água representam 70% da composição celular, a grande maioria dos efeitos causados pela radiação ionizante é resultado dos produtos da radiólise da água (Michaels e Hunt, 1978).

Em proteínas, a radiação provoca alterações químicas, como fragmentação, *cross-linking*, agregação e oxidação, devido aos produtos gerados pela radiólise da água (Moons e Song, 2001). Além disso, tornam-se mais sensíveis a outros fatores físico-químicos devido ao desdobramento de suas moléculas.

A irradiação de proteínas, no estado seco ou aquoso, pode induzir desde simples ionizações até alterações drásticas na estrutura primária. Podem ocorrer alterações oxidativas decorrentes da interação de radicais livres primários, produzidos após a radiólise da água, com a molécula de proteína, alterando sua estrutura e conferindo à mesma, cargas negativas (Wales e Kusel, 1992).

Deve-se considerar, ainda, que as várias funções das proteínas têm diferentes radiosensibilidades, sendo que as propriedades antigênicas e imunológicas são as mais radorresistentes do que qualquer função biológica da proteína (Spencer, 1995; Garrison, 1987).

Segundo Alves (2004), a utilização da radiação ionizante para destoxicação de venenos de serpentes leva a modificações de algumas propriedades das proteínas, mas mantém ou, até mesmo, melhora suas propriedades imunológicas.

Estudos vêm mostrando que a exposição de proteínas à radiação gama leva a alterações conformacionais (Spencer, 2000) e oxidação da cadeia protéica. Esta oxidação, por sua vez, favorece a captação da molécula irradiada por macrófagos, através de receptores *scavenger*, aumentando assim a apresentação de antígenos por estas células (Cardi et al., 1998). Assim, é possível aumentar a imunogenicidade de um antígeno submetendo o mesmo à irradiação gama.

Considerando-se que inúmeras pesquisas têm revelado o poder da radiação em modificar proteínas, melhorando seu potencial imunológico e buscando um aprimoramento de imunógenos, a realização de um estudo com a

irradiação de ribonucleoproteínas do vírus da raiva mostra-se de extrema importância na produção de anticorpos antivírus da raiva e, conseqüentemente, em todo o processo de diagnóstico laboratorial da raiva.

1.8 Purificação de Anticorpos (IgGs)

Os anticorpos ou imunoglobulinas (IgGs) são proteínas circulantes no sangue produzidas em resposta à exposição a estruturas estranhas conhecidas como antígenos. São incrivelmente diversificados e específicos em seu reconhecimento a substâncias estranhas e constituem os principais mediadores da imunidade humoral (Abbas et al., 2008).

A unidade básica de uma imunoglobulina consiste de duas cadeias polipeptídicas leves, idênticas e duas cadeias polipeptídicas pesadas idênticas, unidas por pontes dissulfeto. As cadeias leves e pesadas contêm regiões denominadas domínios variáveis e constantes. Os domínios variáveis das cadeias leves e pesadas possuem regiões de ligação para interação com o antígeno.

Um aumento no número de técnicas modernas de diagnóstico e de terapêutica, baseadas na interação entre anticorpos com alta afinidade e seus antígenos específicos vêm tornando necessário o desenvolvimento das técnicas de purificação de imunoglobulinas (Huse et al., 2002).

A purificação de anticorpos apresenta vários problemas: primeiro, o sistema imune humoral é extremamente diversificado e capaz de produzir um número ilimitado de diferentes imunoglobulinas e isso pode causar uma falha em um processo de purificação já estabelecido para um determinado anticorpo; segundo, as moléculas de anticorpos são multifuncionais e um determinado processo de purificação pode preservar a ligação antígeno-anticorpo, mas pode prejudicar a interação anticorpo-receptores celulares; terceiro, na maioria das vezes os anticorpos têm que ser purificados a partir de soluções muito complexas, como sangue, frações do sangue, leite, sobrenadantes de cultura celular com componentes variados e extratos de células de diferentes origens (mamíferos, bactérias, fungos, vegetais, etc.) (Huse et al., 2002). Por isso torna-se necessário o desenvolvimento e aprimoramento das técnicas de purificação, uma vez que a utilização de anticorpos é extremamente necessária.

Para a purificação de proteínas, especialmente proteínas pertencentes à mesma classe e, portanto, apresentando estreitas relações estruturais e

funcionais, é necessária a utilização de metodologias diferenciadas. As imunoglobulinas são um exemplo dessas proteínas.

Muitos métodos para a purificação de anticorpos são utilizados, mas os mais comuns são: precipitação com sais, cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade (Huse et al., 2002).

1.8.1 Cromatografia de troca iônica

A cromatografia de troca iônica é um processo baseado na interação reversível entre a carga da proteína a ser purificada e a carga contrária do meio cromatográfico (Amersham Pharmacia Biotech, 1999). Nesse processo, a matriz sólida possui grupos carregados. Na fase móvel, as proteínas com cargas com cargas líquidas opostas àquela da matriz são adsorvidas, ao passo que proteínas com carga neutra ou igual eluem na fração não retida (Lehninger et al., 2006).

Para a purificação dos soros obtidos da imunização de animais com as partículas íntegras de vírus da raiva ou com RNPs (ribonucleoproteínas) do vírus da raiva purificadas, utilizavam-se inicialmente métodos como: precipitação com sulfato de amônio, etanol ou outras estratégias previamente desenvolvidas de fracionamento de soros (Atanasiu et. al., 1974). Com a utilização da técnica de cromatografia de troca iônica em coluna de QAE-Sephadex A50 (Joustra e Lundgren, 1969) foi possível obter produtos mais puros em um menor tempo de execução.

1.8.2 Cromatografia por afinidade

Outra forma bastante empregada para a purificação de IgGs é a cromatografia de afinidade, onde as proteínas são separadas pela sua habilidade de se ligar a grupos químicos particulares. As esferas na coluna cromatográfica possuem um grupo químico ligado de forma covalente. Uma proteína com afinidade para este grupo químico particular se ligará às esferas na coluna, e sua migração será retardada (Lehninger et al., 2006).

Nesse processo podem ser utilizadas colunas preenchidas com proteína A isolada de *Staphylococcus aureus* (Reis et al., 1997), comercialmente preparadas. Provavelmente a cromatografia de afinidade com proteína A é a mais utilizada, isto porque a proteína A tem características importantes para sua aplicação como ligante: é bem caracterizada estruturalmente, pode ser obtida em

grandes quantidades a partir de proteínas recombinantes e tem alta afinidade com a região Fc das imunoglobulinas (Huse et al., 2002).

Além disso, a cromatografia de afinidade oferece uma alta seletividade, portanto uma alta resolução, e normalmente alta capacidade para as proteínas de interesse (Amersham Pharmacia Biotech, 1999).

Com o objetivo de assegurar o desenvolvimento rápido e de menor custo do método, estratégias de purificação têm sido adotadas por indústrias farmacêuticas e laboratórios de pesquisa. Uma delas, que pode ser aplicada após testes de detecção, preparação da amostra e extração, é dividida em três fases: captura, purificação intermediária e polimento. Na fase da captura o objetivo é isolar, concentrar e estabilizar o produto alvo. Durante a fase da purificação intermediária, o objetivo é remover a maioria das impurezas, e a última fase de polimento tem o objetivo de remover qualquer traço restante de impureza (Amersham Pharmacia Biotech, 1999).

Essas estratégias têm um grande significado, uma vez que são aspectos importantes na purificação de anticorpos em larga escala: grau de pureza da proteína desejada, alta recuperação e custo do processo (Ferreira e Bueno, 2002).

Dessa maneira, empresas especializadas em purificação de anticorpos e outras proteínas têm adquirido as colunas de proteína A, com o objetivo de aperfeiçoar o processo de purificação.

A importância da comparação e avaliação dos processos de purificação por cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade está na possibilidade de redução de custos, tempo de execução e número de etapas, e maior grau de pureza, permitindo melhor aproveitamento e recuperação do produto ao final do processo.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Buscar alternativas para aprimorar a produção e purificação das Imunoglobulinas (IgGs) antivírus da raiva.

Objetivos Específicos:

- Avaliar a imunogenicidade das ribonucleoproteínas do vírus da raiva nativas (não irradiadas) e irradiadas com ^{60}Co .
- Comparar metodologias de purificação de anticorpos antivírus da raiva utilizando cromatografia por afinidade e troca iônica, para avaliação da eficiência dos dois processos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e purificação das ribonucleoproteínas (RNPs)

As RNPs foram obtidas por meio da técnica descrita por Compans e Choppin (1967), modificada por Sokol (1973), e adaptada por Caporale et al. (2009).

Foi utilizada uma suspensão viral da cepa CVS (*Challenge Virus Standard*) IP 1/05 (diluição 1:100), adaptada à cultura de células BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*), cultivadas em monocamadas com Meio Essencial Mínimo de Eagle (MEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) para a obtenção das ribonucleoproteínas do vírus da raiva.

Para a propagação das partículas virais foram utilizados 12 frascos (Corning) para cultura celular com capacidade de 225 cm², oito frascos (Corning) *roller* com superfície expandida com capacidade de 1700 cm² e dois frascos (Corning) *roller* com capacidade de 850 cm².

Em cada frasco com capacidade de 225 cm² foram adicionados 18 mL de suspensão célula/vírus 1:1 e 72 mL de MEM (contendo 10% de soro fetal bovino). Em cada frasco *roller* com capacidade de 1700 cm² foram adicionados 68 mL de suspensão viral, 68 mL de suspensão de células e 544 mL de MEM. Nos frascos *roller* com capacidade de 850 cm² foram adicionados 34 mL de suspensão viral, 34 mL de suspensão de células e 278 mL de MEM (por frasco). A suspensão viral utilizada foi diluída previamente (onde a diluição infecte de 80 a 100% das células), e a concentração de células utilizada foi de 5x10⁵ células/mL.

Os frascos foram mantidos a 34°C por 48 horas e, após este período, o sobrenadante de cada frasco foi desprezado e o tapete celular foi lavado com 50 mL de tampão PBS (*Phosphate-buffered saline*) 0,01mol/L⁻¹ pH 7,4 estéril. O tapete celular de cada frasco foi retirado com raspadores (*cell scraper* 32 cm) para a individualização das células, sendo estas ressuspensas com 50 mL de tampão NT (Trometamol-HCl) 0,05 mol/L⁻¹ pH 7,6 estéril e gelado. As células ressuspensas foram distribuídas em tubos com capacidade de 50 mL e centrifugadas a 1000g em temperatura de 4°C por 10 minutos. O

sobrenadante foi desprezado e os tubos foram completados com 10 mL de tampão NT. O procedimento foi repetido por mais duas vezes e o sobrenadante foi desprezado.

A lise das células foi realizada adicionando-se 10 mL de água (Milli-Q) estéril, gelada, contendo 130 µL de Aprotinina (1000 unidades inibidoras de “Kalikreina”- KIU/ Sigma) em um dos frascos, sendo então transferidas de frasco para frasco.

O tubo final permaneceu a 4°C por uma hora, sendo a lise intensificada com agitação manual esporádica do tubo. Em seguida o tubo foi centrifugado a 1000g, a 4°C, por 10 minutos.

Ao final, o volume total do sobrenadante foi coletado e centrifugado a 12000g, a 4°C, por 10 minutos.

A purificação das RNPs foi realizada pelo método de ultracentrifugação em gradiente de Cloreto de Césio (CsCl), conforme descrito por Dietzschold (1996).

Em tubos de policarbonato com capacidade de 5 mL foram distribuídos 4,0 mL de sobrenadante e adicionados 2,0 g de CsCl. Foi realizada a ultracentrifugação a 150000g, a 4°C, por 18 horas (Hitachi, rotor P55ST2).

As bandas formadas, aproximadamente 0,7 mL de cada tubo, foram coletadas com seringa e agulha estéreis. O volume total foi dialisado em membrana de celulose (Sigma) com tampão NT pH 7,6, a 4°C, por 24 horas, com trocas sucessivas de tampão (Perrin et al., 1985). A amostra contendo as proteínas virais foi coletada e mantida a 4°C.

A presença das proteínas virais foi confirmada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) a 12,5%, com empilhamento a 5%.

3.2 Irradiação das RNPs

Amostras contendo 2,0 mg/mL de proteínas virais foram submetidas à irradiação em uma fonte de ⁶⁰Co (Gamma Cell, Atomic Agency of Canada Ltd) com uma dose de 2000 Gy (taxa de dose de 2,7 kGy/hora) (Murata et al., 1990), em temperatura ambiente e na presença de oxigênio atmosférico. Uma amostra utilizada como controle foi mantida nas mesmas condições, exceto no que diz respeito à irradiação.

3.3 Caracterização da proteína irradiada

3.3.1 Eletroforese (SDS-PAGE)

Amostras de RNPs purificadas irradiadas e não irradiadas foram submetidas à separação em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de Dodecil Sulfato de Sódio, seguindo protocolo descrito por Laemmli (1970). Foram aplicadas amostras contendo 40 µg de proteínas (por poço), diluídas em tampão de amostra contendo β-mercaptoetanol, e padrões de massa molecular conhecidos. Procedeu-se a corrida fixando-se a corrente em 25 mA. Em seguida, o gel foi corado com “*Coomassie Brilliant Blue*” R-250.

3.3.2 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

As proteínas irradiadas foram submetidas ao ensaio imunoenzimático, conforme metodologia descrita por Engvall e Perlmann (1971), utilizando-se soro de coelho imunizado com proteínas não irradiadas com o objetivo de verificar a especificidade da reação antígeno-irradiado com os anticorpos.

Uma microplaca de 96 orifícios (Corning) foi sensibilizada com RNPs purificadas (10 µg/mL em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6) irradiadas e não irradiadas (uma triplicata para cada antígeno), por 24 horas, a 4°C. Após a sensibilização, eventuais sítios de ligação foram bloqueados com solução de bloqueio (leite desnatado em pó - Molico a 3% em PBS pH 7,4) por uma hora, a temperatura ambiente. Após sucessivas lavagens com PBS pH 7,4 foi adicionado à placa soro de coelho com título conhecido com diluições seriadas com razão 1:2 partindo de uma diluição inicial 1:1000. Todas as diluições foram feitas em triplicata. A placa foi mantida a 37°C por uma hora. Seguindo a fase da lavagem acima descrita, foram adicionados 100 µL/orifício do anticorpo anti-IgG de coelho marcado com peroxidase 1:10000 (Sigma), incubando a placa a 37°C por 45 minutos. Após lavagens sucessivas com PBS pH 7,4, foram adicionados 100µL/orifício de solução de substrato/cromógeno contendo 0,5 µL H₂O₂ a 30% e orto-fenildiamina (OPD) 0,5 mg por mL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico 60 mM, pH 5,0. Após 20 minutos em câmara escura, a reação foi finalizada pela adição de 50 µL/orifício de solução de ácido cítrico 200 mM. A densidade óptica

das amostras foi determinada em leitor de microplacas Molecular Devices modelo Spectra 190 a 450 nm.

3.4 Imunização dos animais

Quatro coelhos *New Zealand* com três meses de idade, provenientes da Granja RG Comércio de Produtos Agropecuários Ltda – São Paulo/SP, recebendo comida e água *ad libitum*, foram imunizados com o antígeno (dois coelhos com antígeno irradiado – grupo B, e dois com antígeno não irradiado – grupo A), por meio de cinco doses com intervalo de sete dias entre as três primeiras doses e 15 dias entre a quarta e a quinta dose (tabela 1). A primeira e segunda doses eram compostas de 200 µg de RNPs purificadas diluídas em 500 µL de PBS pH 7,4 e 400 µL de hidróxido de alumínio. A terceira, quarta e quinta dose foram administradas com o antígeno (200 µg) diluído em PBS pH 7,4. Todas as doses foram administradas por via subcutânea.

Sangrias exploratórias (1ª e 2ª coletas) foram realizadas sete dias após a quarta e a quinta dose por meio da veia auricular. Sete dias após a segunda coleta exploratória foi colhido o sangue dos animais por punção cardíaca sob anestesia (25 mg/kg de quetamina associada à 2 mg/kg de xilazina por via intramuscular) e realizada a eutanásia (utilizando os mesmos anestésicos citados anteriormente, seguido do uso de cloreto de potássio por via intravenosa).

Tabela 1 – Esquema de imunização

Doses/ Coletas	Dias
1ª dose	0
2ª dose	7
3ª dose	14
4ª dose	21
1ª coleta exploratória	28
5ª dose	36
2ª coleta exploratória	43
Coleta sangue total	50

A manipulação dos animais antes e durante as imunizações esteve de acordo com as regras de cuidados de animais de laboratório (NIH publ. Nº 86-23, revisado em 1985) e com os princípios de ética de experimentação animal (SBCAL - Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório). O experimento foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA-IPEN/USP), protocolo nº58/10 (em anexo).

3.5 Dosagem de anticorpos

3.5.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Foi realizado o procedimento descrito anteriormente, utilizando RNPs do vírus da raiva para a sensibilização da placa. As amostras utilizadas para a avaliação do título de anticorpos foram obtidas dos soros de coelhos imunizados com RNPs irradiadas e coelhos imunizados com RNPs não irradiadas. Foram feitas diluições seriadas na razão 1:2 partindo de uma diluição inicial 1:1000. Todas as diluições foram feitas em triplicata.

3.5.2 Imunofluorescência Indireta (IFI)

Foram realizadas diluições seriadas dos soros dos coelhos (grupo A e grupo B) na razão 1:2 e na razão 1:3, sendo a diluição 1:100 utilizada como inicial e a diluição 1:3000 como final. As diluições 1:400 a 1:3000 foram distribuídas em lâminas com decalques de sistema nervoso central (SNC) de bovinos positivos para a raiva e em lâminas com decalques de SNC de camundongos negativos para raiva. O procedimento foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Weller e Coons (1954). As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Após incubação, foram feitas lavagens sucessivas com PBS pH 7,4 e com água de osmose reversa. Após secas, as lâminas receberam 30 µL de anticorpo anti-IgG de coelho marcado com ITCF (Sigma) e foram incubadas nas mesmas condições descritas acima. Foram realizadas as lavagens sucessivas com PBS pH 7,4 e com água de osmose reversa. Após secas, adicionou-se glicerina sob os decalques. A leitura foi feita em microscópio de fluorescência (Leica), com filtro ultravioleta, lâmpada HBO-50, aumento de 400x, onde foi considerado o título final a maior diluição que apresentou máxima fluorescência

específica, indicando a presença dos anticorpos anti RNPs. No controle negativo não se observaram quaisquer traços de fluorescência (fundo escuro).

3.6 Produção dos Conjugados anti-RNPs do vírus da raiva

3.6.1 Purificação das IgGs por cromatografia de troca iônica

A partir dos soros de coelhos imunizados com RNPs não irradiadas (coelho grupo A) e irradiadas (coelho do grupo B) (30 mL de cada soro), IgGs foram purificadas pelo processo de cromatografia de troca iônica.

Os soros foram diluídos em tampão Etilenodiamina (TED) pH 7,0 na proporção 1:2, sendo então dialisados contra o mesmo tampão por 24 horas.

A purificação das IgGs antivírus da raiva foi realizada em coluna de vidro graduada com 1,8 cm de diâmetro e 1,20 m de altura (Vidrolabor). Foi utilizada 8,1g resina Sephadex QAE A-50, sendo esta hidratada com tampão TED pH 7,0 e resultando em 80 mL de gel (Joustra e Lundgren, 1969).

Os soros dialisados foram adicionados sobre o gel e foram coletadas frações de aproximadamente 5,0 mL. As frações foram lidas em espectrofotômetro (BioMate 5 – Thermo Electron Corporation) a 280 nm e somente aquelas com densidade ótica (DO) $\geq 1,0$ foram utilizadas para a etapa de concentração por precipitação com sulfato de amônio.

Ao volume total das frações escolhidas adicionou-se o mesmo volume de solução saturada de sulfato de amônio, sob agitação branda e banho de gelo, por 30 minutos. As soluções foram distribuídas em tubos com capacidade de 50 mL e centrifugadas 1500g, a 4°C, por 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado de IgGs, de cada tubo, foi dissolvido em 1mL de tampão PBS 0,01mol/L⁻¹ pH 7,4.

O volume total obtido da purificação de cada soro, foi dialisado por 24 horas contra PBS pH 7,4, com trocas sucessivas de tampão. Utilizou-se reagente de Nessler para verificar a ausência do sulfato de amônio na solução de IgGs. As soluções foram coletas e estas foram mantidas a -20°C.

3.6.2 Conjugação das IgGs ao fluorocromo

Para realizar a conjugação das IgGs ao isotiocianato de fluoresceína (ITCF) foram adicionados 10% do volume total de cada solução contendo IgGs,

de tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,5 mol/L⁻¹, pH 9.0 e em seguida 1 mg de ITCF para cada 100 mg de proteínas, após ter sido ajustada a concentração de IgGs na solução para 20 mg/mL com tampão carbonato/bicarbonato 0,05 mol/L⁻¹, pH 9.0. As soluções foram mantidas sob agitação magnética branda a 4°C, por 24 horas. A concentração protéica foi determinada anteriormente à adição do ITCF por meio de espectrofotômetro (BioMate 5 – Thermo Electron Corporation), pelo método de absorvância a 280 nm (Bollog e Edelstein, 1991).

Para a eliminação do excesso de ITCF não conjugado, as soluções foram filtradas em colunas de cromatografia utilizando resina de exclusão molecular (Sephadex G50 - Sigma). Para aproximadamente 20 mL de solução de IgG, foram hidratadas 8 g de resina e o gel foi equilibrado com tampão PBS 0,01mol/L⁻¹ pH 7,4, em colunas de vidro graduadas com 0,8 cm diâmetro e 35 cm de altura (Vidrolabor).

Os conjugados anti-RNPs irradiadas e não irradiadas foram coletados após a passagem pela coluna, em seguida foram filtrados em membrana de 0,22 µm (Millipore), e diluídos 1:2 em glicerina (50%), pH 7,4, para conservação a 4°C.

3.7 Titulação dos conjugados anti-RNPs do vírus da raiva

A titulação dos conjugados anti-RNPs irradiadas e não irradiadas, foi realizada nas seguintes técnicas: Imunofluorescência Direta, Microteste Simplificado de Inibição de Fluorescência e Isolamento Viral em Cultura Celular.

3.7.1 Imunofluorescência Direta (IFD)

Foram feitas diluições seriadas (razão 2) de 1:10 a 1:640 dos conjugados em lâminas com decalques de sistema nervoso central (SNC) de camundongos positivos para raiva e realizado o teste descrito por Dean et al., 1996. Como controle negativo, foram utilizadas lâminas com decalques de sistema nervoso central (SNC) de camundongos negativos para raiva.

A leitura foi feita em microscópio de fluorescência (Leica), filtro ultravioleta, lâmpada HBO-50, com aumento de 400x, onde foi considerado o título final a maior diluição que apresentou máxima fluorescência específica. No controle negativo não se observaram quaisquer traços de fluorescência (fundo escuro).

3.7.2 Microteste Simplificado de Inibição de Fluorescência (SFIMT)

Em uma microplacas de 96 orifícios (Corning) foram adicionados 100 μL de Meio Essencial Mínimo de Eagle (MEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 50 μL de suspensão de células BHK-21 (5×10^5 células/mL) e 50 μL de suspensão de vírus da raiva, cepa PV (*Pasteur Virus*) diluída previamente 1:60. Como controle negativo, foram utilizadas células BHK-21 não infectadas. Após 24 horas de incubação a 37°C e 5% de CO_2 , o sobrenadante das placas foi aspirado. As placas foram colocadas em banho de gelo e as células foram fixadas com acetona a 80%, gelada, por 15 minutos.

Os conjugados foram diluídos (razão 2) de 1:5 a 1:640 em tampão PBS 0,01mol/L⁻¹, pH 7,4, com corante azul de Evans, e transferidos 40 μL /orifício de cada diluição em 8 orifícios das microplacas com células infectadas com a cepa PV e em 8 orifícios com células não infectadas (controle negativo).

Os títulos dos conjugados foram determinados pela leitura em microscópio invertido de fluorescência (Leica) filtro ultravioleta, lâmpada HBO-50, com aumento de 100x. Foi considerado o título a maior diluição que apresentou máxima fluorescência específica. No controle negativo não se observaram quaisquer traços de fluorescência.

3.7.3 Isolamento viral em cultura celular

O procedimento descrito seguiu a padronização da técnica por Castilho et al. (2007). Foi preparada uma suspensão a 20% de tecido cerebral das amostras a serem utilizadas pesando 0,5 a 1 g dos diferentes fragmentos do SNC. O material foi macerado em gral estéril e foi adicionado de 2 a 4 mL de diluente de vírus. O material macerado foi centrifugado a 1000g, por 30 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi retirado. Foi preparado então o meio de cultura a ser utilizado, onde para cada 10 mL de Meio Essencial Mínimo de Eagle (MEM) foram adicionados 30 μL de gentamicina (50 mg/mL) e 30 μL de aminoácidos não essenciais 10 mM (100x).

As suspensões das amostras a serem utilizadas como controles positivo (CVS e amostra de bovino positivo para a raiva) e como controle negativo (células N2A e cérebro de camundongo negativo para a raiva) foram inoculadas em 8 orifícios (40 μL /orifício) de uma microplaca de 96 orifícios (Corning). Durante o processo a placa foi mantida sob gelo.

Foram adicionados 160 μL /orifício do MEM previamente preparado. O material adicionado na placa foi homogeneizado. Adicionaram-se 100 μL /orifício da suspensão celular (N2A) (5×10^5 células/mL), para este procedimento a placa foi retirada do gelo.

Após 96 horas de incubação a 37°C em estufa de CO_2 a 5%, o sobrenadante das placas foi aspirado. As placas foram colocadas em banho de gelo e as células foram fixadas com acetona a 80%, gelada (200 μL /orifício), por 15 minutos.

Os conjugados foram diluídos (razão 2) de 1:5 a 1:640 em tampão PBS $0,01\text{mol/L}^{-1}$, pH 7,4, com corante azul de Evans, e transferidos 40 μL /orifício de cada diluição em 8 orifícios das microplacas com controle positivo (CVS e amostra de bovino positivo para a raiva) e em 8 orifícios com controle negativo (células N2A e SNC de camundongos negativos para a raiva).

Os títulos dos conjugados foram determinados pela leitura em microscópio invertido de fluorescência (Leica) filtro ultravioleta, lâmpada HBO-50, com aumento de 100x. A escolha da diluição para a determinação do título é baseada na cor avermelhada para as células não infectadas e esverdeada fluorescente para as células infectadas.

3.8 Purificação de anticorpos

3.8.1 Cromatografia de troca iônica

Para a obtenção das IgGs foi utilizado o soro hiperimune de um coelho imunizado com RNPs purificadas. O procedimento foi o mesmo descrito no item 3.6.1 deste estudo.

3.8.2 Cromatografia de Afinidade

Primeiramente, o soro hiperimune do coelho imunizado com RNPs purificadas foi submetido a um processo de deslipidização para a remoção dos lipídeos presentes no soro.

Para cada 1,0 mL de soro foram adicionados 40 μL de Sulfato de Dextran 10% e 1,0 mL de Cloreto de Cálcio (CaCl_2) 1 mol/L^{-1} . O soro foi então

centrifugado a 10000g por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e dialisado contra PBS, pH 7,4 por 24 horas.

Após diálise o soro foi coletado e distribuído em tubos tipo *ependorf* com capacidade de 1,5 mL e centrifugados por 10 minutos a 10000g. O sobrenadante foi coletado e submetido à cromatografia de afinidade em um sistema ÄKTA equipado com uma coluna Hi Trap rProtein A FF (5 x 1,0 cm) (GE Healthcare), previamente equilibrada com tampão PBS pH 7,4. A fração não adsorvida foi eluída com o mesmo tampão e as imunoglobulinas foram eluídas por meio de um pulso de glicina 100 mM pH 3,0. A absorvância do eluato foi determinada a 280 nm e o fluxo foi de 1,0 mL/min.

Foram coletadas frações de 1,0 mL em tubos contendo 100 µL de tampão TRIS (tris-hidroximetilaminometano) 1 mol/L⁻¹ pH 8,0. As frações correspondentes ao pico de IgG foram agrupadas e submetidas à diálise contra PBS pH 7,4 por 24 horas, com trocas sucessivas do tampão.

3.9 Avaliação dos processos de purificação de anticorpos

3.9.1 Dosagem de proteínas - Método de Bradford

A concentração protéica das amostras foi avaliada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Para cada dosagem foi construída uma curva padrão com albumina bovina, sendo todos os pontos duplicatas, e a partir destes pontos calculou-se a equação da reta Concentração x Absorvância por regressão linear.

3.9.2 Eletroforese (SDS-PAGE)

Amostras coletadas em três etapas dos processos de purificação contendo IgGs foram submetidas à separação em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de Dodecil Sulfato de Sódio, seguindo protocolo descrito por Laemmli (1970). Foram aplicadas amostras contendo 50 µg de proteínas (por poço), diluídas em tampão de amostra redutor, e padrões de massa molecular conhecidos. Procedeu-se a corrida fixando-se a corrente em 25 mA. Em seguida, o gel foi corado com “*Coomassie Brilliant Blue*” R-250.

3.9.3 Teste de imunoreatividade das IgGs purificadas - ELISA

Foi realizado o procedimento descrito anteriormente, com exceção dos soros utilizados para a avaliação dos anticorpos. As amostras utilizadas foram obtidas do soro hiperimune de coelho imunizado com RNPs do vírus da raiva, submetido aos processos de purificação por cromatografia de troca iônica e de afinidade (proteína A). Foram feitas diluições seriadas na razão 1:2 partindo de uma diluição inicial 1:1000. Todas as diluições foram feitas em triplicata.

3.10 Análise Estatística

Os dados obtidos do Ensaio imunoenzimático (ELISA) foram analisados utilizando o teste T (dados não paramétricos) no programa GraphPad Prism 5, onde foi considerado intervalo de confiança de 95% e diferença não significativa quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção e purificação das RNPs

Na etapa de concentração das RNPs, foi obtido um volume final de 15 mL e após a purificação por gradiente de Cloreto de Césio o volume obtido foi 6,0 mL (bandas coletadas). A concentração de proteínas dosada pelo teste de Bradford foi 2,0 mg/mL. Na figura 2 pode ser observada a banda correspondente às RNPs formada após o processo de purificação por gradiente de Cloreto de Césio.

Figura 2 - Banda formada após purificação em gradiente de CsCl . Fonte: Instituto Pasteur.

A presença das RNPs, após a purificação foi confirmada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE) (figura 3), podendo ser observada a banda correspondente à nucleoproteína (57 kDa).

Figura 3 - Gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE). (PM) padrão de massa molecular; (RNP) nucleoproteína. Corante “Coomassie Brilliant Blue” R-250.

4.2 Caracterização da proteína irradiada

4.2.1 Eletroforese

Após a irradiação as RNPs foram analisadas em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE) comparando-as com RNPs não irradiadas, de acordo com sua massa molecular. Foi observado que não houve alteração no perfil eletroforético correspondente à banda específica da nucleoproteína (N), principal proteína que constitui as RNPs (figura 4).

Figura 4 - Gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE). (PM) Padrão de massa molecular em kDa; (A) RNP não irradiada; (B) RNP irradiada com 2 kGy; (C) RNP 08/07; (D) RNP irradiada. Corante “Coomassie Brilliant Blue” R-250.

4.2.2 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Na figura 5 pode ser observado que os anticorpos obtidos da imunização de coelhos com RNPs não irradiadas foram capazes de reconhecer as RNPs irradiadas de maneira igual ou discretamente superior com que reconheceram o antígeno não irradiado, apesar da estatística não indicar diferença significativa.

Figura 5 - Ensaio imunoenzimático para a avaliação da especificidade da reação de anticorpos com as RNPs irradiadas. Sensibilizantes da placa: RNPs irradiadas com 2 kGy e RNPs não irradiadas. Diluições do soro 1:1000, 1:2000 e 1:4000.

4.3 Obtenção dos soros hiperimunes

Os coelhos foram divididos em dois grupos: A – coelhos imunizados com RNPs não irradiadas e B – coelhos imunizados com RNPs irradiadas. O volume total do soro obtido para cada grupo está descrito na tabela 2.

Tabela 2 – Volumes de soros obtidos por punção cardíaca

Coelhos	Volume do soro obtido (mL)
A ₁ (imunizados com RNPs não irradiadas)	35
A ₂ (imunizados com RNPs não irradiadas)	45
B ₁ (imunizados com RNPs irradiadas – 2 kGy)	50
B ₂ (imunizados com RNPs irradiadas – 2 kGy)	15

4.4 Dosagem de Anticorpos

4.4.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Foi realizada a titulação das imunoglobulinas (IgGs) antivírus da raiva, obtidas através da imunização dos coelhos, por meio do Ensaio Imunoenzimático (ELISA).

O título de anticorpos do soro dos coelhos imunizados com RNPs irradiadas (coelhos grupo B) foi superior ao título de anticorpos do soro dos coelhos imunizados com RNPs não irradiadas (coelhos grupo A), na 1ª coleta exploratória, conforme é observado nas figuras 6 e 7. Os dados obtidos apresentaram diferença significativa.

Figura 6 - Titulação por ensaio imunoenzimático dos anticorpos dos soros de coelhos imunizados com RNPs irradiadas com 2 kGy (coelhos grupo B) e não irradiadas (coelhos grupo A) obtidos na 1ª coleta exploratória (28 dias após a 1ª dose). Diluições do soro: 1:1000 a 1:1.024.000.000.

Figura 7 - Avaliação por ensaio imunoenzimático do título de anticorpos dos soros de coelhos imunizados com RNPs irradiadas com 2 kGy (coelhos grupo B) e não irradiadas (coelhos grupo A) obtidos na 1ª coleta exploratória (28 dias após a 1ª dose). Diluições do soro: 1:6000 e 1:32000.

Nas figuras 8 e 9 pode ser observado que na 2ª coleta exploratória os anticorpos obtidos da imunização dos coelhos com RNPs irradiadas (coelhos grupo B) e não irradiadas (coelhos grupo A) apresentaram títulos semelhantes. Os dados obtidos não apresentaram diferença significativa.

Figura 8 - Titulação por ensaio imunoenzimático dos anticorpos dos soros de coelhos imunizados com RNPs irradiadas com 2 kGy (coelhos grupo B) e não irradiadas (coelhos grupo A) obtidos na 2ª coleta exploratória (43 dias após a 1ª dose). Diluições do soro: 1:1000 a 1:1.024.000.000.

Figura 9 - Avaliação por ensaio imunoenzimático do título de anticorpos dos soros de coelhos imunizados com RNPs irradiadas (coelhos grupo B) e não irradiadas (coelhos grupo A) obtidos na 2ª coleta exploratória (43 dias após a 1ª dose). Diluições do soro: 1:6000 e 1:32000.

4.4.2 Teste de Imunofluorescência Indireta (IFI)

Através do teste de Imunofluorescência Indireta foi determinado o título de cada soro (1ª e 2ª coletas). Foi considerado o título final a maior diluição que apresentou máxima fluorescência. Na 1ª coleta (cinco dias após a quarta dose) e na 2ª coleta (cinco dias após a quinta dose) foi possível observar que os soros obtidos dos coelhos A₁, B₁ e B₂ apresentaram os maiores títulos (tabela 3).

Tabela 3– Títulos dos soros obtidos pela técnica de Imunofluorescência Indireta

Coelhos	1ª Coleta (28 dias após a 1ª dose)	2ª Coleta (43 dias após a 1ª dose)
A ₁ (imunizado com RNP não irradiada)	1: 1600	1: 2500
A ₂ (imunizado com RNP não irradiada)	1: 800	1: 1000
B ₁ (imunizado com RNP irradiada)	1: 1600	1: 1600
B ₂ (imunizado com RNP irradiada)	1: 1600	1:1600

Nas figuras 10 a 25 pode ser observada a fotodocumentação das lâminas com decalques do sistema nervoso central de bovinos positivos para raiva e controles negativos (sistema nervoso central de camundongos negativos para a

raiva), submetidas à IFI com os soros hiperimunes obtidos dos coelhos (1ª e 2ª coletas).

Foi possível observar que na 1ª coleta exploratória (28 dias após a 1ª dose) os títulos dos coelhos A₁, B₁ e B₂ foram 1:1600, enquanto que o título do soro do coelho A₂ foi 1:800.

Nos soros obtidos da 2ª coleta exploratória (43 dias após a 1ª dose) os títulos de anticorpos foram 1:2500 para o coelho A₁, 1:1000 para o coelho A₂, e 1:1600 para os coelhos B₁ e B₂.

Figura 10 - IFI do soro do coelho A₁ (1ª coleta). Título 1:1600. 400x.

Figura 11 - IFI do soro do coelho A₁ Controle negativo 1:1600. 400x.

Figura 12 - IFI do soro do coelho A₂ (1ª coleta). Título 1:800. 400x.

Figura 13 - IFI do soro do coelho A₂ Controle negativo 1:800. 400x.

Figura 14 - IFI do soro do coelho B₁ (1ª coleta). Título 1:1600. 400x.

Figura 15 - IFI do soro do coelho B₁ Controle negativo 1:1600. 400x.

Figura 16 - IFI do soro do coelho B₂ (1ª coleta). Título 1:1600. 400x.

Figura 17 - IFI do soro do coelho B₂ Controle negativo 1:1600.

Figura 18 - IFI do soro do coelho A₁ (2ª coleta). Título 1:2500. 400x.

Figura 19 - IFI do soro do coelho A₁ Controle negativo 1:2500.

Figura 20 - IFI do soro do coelho A₂ (2ª coleta). Título 1:1000. 400x.

Figura 21 - IFI do soro do coelho A₂ Controle negativo 1:1000.400x.

Figura 22 - IFI do soro do coelho B₁ (2ª coleta). Título 1:1600. 400x.

Figura 23 - IFI do soro do coelho B₁ Controle negativo 1:1600. 400x.

Figura 24 - IFI do soro do coelho B₂ (2ª coleta). Título 1:1600. 400x.

Figura 25 - IFI do soro do coelho B₂ Controle negativo 1:1600. 400x.

4.5 Produção dos conjugados anti-RNPs

Os soros hiperimunes submetidos ao processo de cromatografia de troca iônica e utilizados para a produção dos conjugados apresentaram as seguintes concentrações protéicas (determinadas pelo método de absorvância a 280 nm - espectrofotômetro BioMate 5 Thermo Electron Corporation): coelho imunizado com RNPs irradiadas (coelho B₁) - 24,55 mg/mL e coelho imunizado com RNPs não irradiadas (coelho A₂) - 29,74 mg/mL.

Após a conjugação das IgGs com o ITCF e passagem dos conjugados anti-RNPs irradiadas e não irradiadas pela coluna de cromatografia por exclusão molecular, os volumes obtidos foram 7,5 mL e 6,5 mL, respectivamente.

4.6 Titulação dos conjugados anti-RNPs por IFD, SFIMT e Isolamento viral

O título obtido na técnica de IFD foi 1:140 para os conjugados anti-RNPs irradiadas e anti-RNPs não irradiadas. Na técnica do SFIMT, os títulos obtidos foram 1:80 para o conjugado anti-RNPs não irradiadas e 1:60 para o conjugado anti-RNPs irradiadas. Na técnica de Isolamento Viral em Cultura Celular o título obtido foi 1:320 para ambos os conjugados.

Nas figuras 26 a 39 pode ser observada a fotodocumentação das lâminas com decalques do sistema nervoso central de camundongos positivos para raiva e controles negativos (sistema nervoso central de camundongos negativos para a raiva), submetidas à IFD com os conjugados anti-RNPs irradiadas e não irradiadas e conjugado antívirus da raiva Lote IP-CAR TOT 1/10, utilizado na rotina do laboratório. Por meio da fotodocumentação pode-se

visualizar que os títulos de ambos os conjugados foram semelhantes em todas as técnicas, sendo estes considerados adequados para sua utilização na rotina laboratorial.

Figura 26 – IFD conjugado anti-RNPs não irradiadas. Diluição 1:40 400x..

Figura 27 – IFD conjugado anti-RNPs Não irradiadas. Controle negativo. Diluição 1:40. 400x.

Figura 28 – IFD conjugado anti-RNPs não irradiadas. Diluição 1:100. 400x.

Figura 29 – IFD conjugado anti-RNPs não irradiadas. Controle negativo. Diluição 1:100. 400x.

Figura 30 – IFD conjugado anti-RNPs não irradiadas. Diluição 1:140. 400x.

Figura 31 – IFD conjugado anti-RNPs não irradiadas. Controle negativo. Diluição 1:140. 400x.

Figura 32 – IFD conjugado anti-RNPs irradiadas. Diluição 1:40. 400x.

Figura 33 – IFD conjugado anti-RNPs irradiadas. Controle Negativo. Diluição 1:40. 400x.

Figura 34 – IFD conjugado anti-RNPs irradiadas. Diluição 1:100. 400x.

Figura 35 – IFD conjugado anti-RNPs irradiadas. Controle Negativo. Diluição 1:100. 400x.

Figura 36 – IFD conjugado anti-RNPs irradiadas. Diluição 1:140. 400x.

Figura 37 – IFD conjugado anti-RNPs irradiadas. Controle Negativo. Diluição 1:140. 400x.

Figura 38 – IFD conjugado antívirus da raiva (CAR TOT 1/10). Diluição 1:200. 400x.

Figura 39 – IFD conjugado antívirus da Raiva (CARTOT1/10). Controle Negativo. Diluição 1:200. 400x.

4.7 Purificação das Imunoglobulinas

O soro hiperimune de um coelho, obtido a partir da imunização com ribonucleoproteínas do vírus da raiva (dose de 200 µg), foi submetido ao processo de purificação de imunoglobulinas por cromatografia de troca iônica ou cromatografia de afinidade (proteína A). Este soro apresentou título 1:1600 na técnica de Imunofluorescência Indireta.

4.7.1 Cromatografia de Troca Iônica

Após a passagem do soro pela coluna, foi feita a leitura da densidade óptica (D.O) das amostras coletadas em espectrofotômetro (BioMate 5 - Thermo Electron Corporation) a 280 nm (tabela 4), as amostras com leitura $\geq 1,0$ foram selecionadas para a concentração com sulfato de amônio.

Tabela 4 – Leitura a 280 nm das amostras coletadas após passagem do soro pela coluna de cromatografia de troca iônica

Tubos	D.O.	Tubos	D.O.
1	0,289	13	1,428
2	0,814	14	1,395
3	1,252	15	1,343
4	1,491	16	1,315
5	1,642	17	1,254
6	1,683	18	1,201
7	1,707	19	1,177
8	1,691	20	1,148
9	1,682	21	1,121
10	1,624	22	1,03
11	1,553	23	0,928
12	1,496	24	0,862

O volume final de amostra obtida após o processo de purificação foi 6,0 mL, contendo 3,55 mg/mL de concentração protéica e o rendimento total do processo foi 2,05% (tabela 5). O tempo total para a realização de todo o processo foi 120 horas.

Tabela 5 – Volume de amostra obtido e resultados obtidos pelo Teste de Bradford para cada etapa do processo de purificação por cromatografia de troca iônica.

Etapas	D.O	[] proteínas (mg/mL)	Volume (mL)	Massa de proteína (mg)	Rendimento (%)
Soro “bruto”	0,3831	34,5317	30,0	1035,9	100,0
Após passagem pela coluna de troca iônica	0,209	0,424975	153,0	65,0	6,27
Após concentração por sulfato de amônio	0,3229	3,558661	6,0	21,3	2,05

4.7.2 Cromatografia de Afinidade (Proteína A)

Na figura 40 é observado o perfil cromatográfico obtido da passagem do soro pela coluna Hi Trap rProtein A FF- GE Healthcare (5 x 1,0 cm). O pico 1 refere-se à fração não retida e o pico 2 corresponde às imunoglobulinas (IgGs). O pico da fração de interesse corresponde a 30% de toda a área do cromatograma.

Figura 40 - Cromatograma da purificação de imunoglobulina em coluna Hi Trap rProtein A FF. O tampão utilizado para a eluição do pico 2 foi glicina 100 mM pH 3,0. O pico 1 corresponde à fração não retida e o pico 2 se refere à fração de imunoglobulina.

Após o processo de purificação por coluna de proteína A, o volume final de amostra foi 30,0 mL, contendo 0,33 mg/mL de concentração protéica e o rendimento total do processo foi 4,64% (tabela 6). O tempo total para a realização de todo o processo foi 72 horas.

Tabela 6 – Volume de amostra obtido e resultados obtidos pelo teste de Bradford para cada etapa do processo de purificação por cromatografia de afinidade

Etapas	D.O	[] proteínas (mg/mL)	Volume (mL)	Massa de proteína (mg)	Rendimento (%)
Soro “bruto”	0,44	35,5357	6,0	213,2142	100,0
Após processo de deslipidização	0,3604	14,0272	12,0	168,3270	78,94
Após passagem pela coluna rProtein A FF	0,1322	0,3303	30,0	9,9107	4,6482

4.8 Teste de imunoreatividade das IgGs purificadas – ELISA

Na figura 41 é observado o título de anticorpos dos soros purificados pelos dois processos de purificação, indicando o reconhecimento das RNPs do vírus da raiva pelas IgGs antivírus da raiva. Não houve diferença significativa entre os títulos

Figura 41 - Avaliação por ensaio imunoenzimático do título de IgGs do soro de coelho, obtidas da purificação por troca iônica e por coluna de proteína A. Diluição do soro: 1:8000.

4.9 Eletroforese (SDS-PAGE)

Foi feita a eletroforese, em gel de poliacrilamida a 12,5% (SDS-PAGE), do soro proveniente dos dois processos de purificação. Observa-se que o soro obtido da purificação por afinidade apresenta uma quantidade menor de bandas inespecíficas (figura 42 e 43), portanto, um maior teor de pureza. No perfil eletroforético do soro, após passagem pela coluna de proteína A, podem ser observadas duas bandas com 25 e 55 kDa, equivalente ao padrão de migração observado para cadeias leves (L) e pesadas (H) de IgGs.

Figura 42 - Gel de poliacrilamida 12,5% SDS-PAGE. (PM) Padrão de massa molecular em kDa; (A) soro "bruto"; (B) soro após passagem pela coluna de troca iônica; (C) soro após concentração com sulfato de amônio; (D) soro "bruto"; (E) soro após processo de deslipidização; (F) soro após passagem na coluna de proteína A. Corante "Coomassie Brilliant Blue" R-250.

5 DISCUSSÃO

A Imunofluorescência Direta (IFD) é a técnica considerada “padrão ouro” para a realização do Diagnóstico Laboratorial e Avaliação Sorológica da raiva (Caporale et al., 2009), sendo recomendada pela Organização Mundial da Saúde e Organização Pan-americana de Saúde. Como reveladores deste teste, são utilizados conjugados fluorescentes antirribonucleoproteínas (RNPs) do vírus da raiva, produzidos a partir de anticorpos específicos anti-RNPs. Os anticorpos anti-RNPs do vírus da raiva são obtidos da purificação de soros hiperimunes de animais imunizados com RNPs purificadas.

No Instituto Pasteur - São Paulo, para a purificação de anticorpos antivírus da raiva, é utilizada a técnica de cromatografia de troca iônica em coluna de QAE-Sephadex A50, padronizada por Joustra e Lundgren (1969).

No presente estudo, buscou-se avaliar a imunogenicidade de RNPs irradiadas empregadas na imunização de animais para a obtenção de anticorpos antivírus da raiva utilizados na produção de conjugados fluorescentes antirribonucleoproteínas do vírus da raiva, e comparar dois métodos cromatográficos de purificação de anticorpos.

O processo de purificação de ribonucleoproteínas (RNPs) do vírus da raiva por gradiente de cloreto de cério (Dietzschold 1996), posteriormente utilizadas na imunização dos animais, mostrou resultado similar ao descrito na literatura (Caporale et al., 2009), sendo evidenciado pela visualização da banda formada após ultracentrifugação e pelo alto título de anticorpos específicos presente nos soros dos coelhos imunizados (grupos A e B).

A eletroforese em gel de poliacrilamida, a 12,5% (SDS-PAGE), permitiu a observação da banda correspondente à nucleoproteína, principal proteína que compõe as RNPs (massa molecular de aproximadamente 57 kDa), nas amostras de RNPs não irradiadas e irradiadas.

A ausência de alteração no perfil eletroforético das RNPs irradiadas sugere que não houve agregação ou ruptura nas cadeias polipeptídicas

produzindo fragmentos, fato também observado por Boni-Mitake et al. (2001) em seu estudo sobre os efeitos da radiação gama em crotamina, polipeptídeo presente no veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Dados contrários em relação aos estudos de Boni-Mitake foram obtidos por Nascimento (1991), que estudando a crotoxina (neurotoxina do mesmo veneno) irradiada, detectou a produção de agregados, observando um “arraste” na região de proteínas de massa molecular mais elevada, o que não foi observado na eletroforese da crotoxina nativa.

A realização do ensaio imunoenzimático (ELISA) mostrou que anticorpos produzidos por meio da imunização de coelhos com RNPs não irradiadas, reconheceram as RNPs irradiadas de forma eficaz, indicando que não houve mudanças estruturais significativas capazes de impedir a interação antígeno - anticorpo.

O processo de avaliação do título de anticorpos, realizado pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) e imunofluorescência indireta (IFI), presentes nos soros dos coelhos imunizados com RNPs não irradiadas e irradiadas mostrou que não houve diminuição da imunogenicidade das proteínas do vírus da raiva irradiadas.

Dados semelhantes foram obtidos por Spencer (2000) e Caproni et al. (2009), que observaram que a irradiação da bothropstoxina-1 (Bthx-1) promoveu modificações na estrutura da proteína mas foram mantidas as propriedades antigênicas e imunológicas.

Elliott et al. (1982) em seu estudo mostram que vírus inativados por radiação do tipo gama não apresentaram alterações na sua atividade imunológica. Baptista et al. (2006) e Souza et al. (2001) mostraram que proteínas do veneno de *Bothrops jararacussu* quando irradiadas, apresentaram modificações estruturais, mas preservaram suas propriedades imunogênicas.

Wiktor et al. (1972) estudaram a irradiação do vírus da raiva com objetivo de diminuir sua infectividade para a produção de vacinas, e observaram que houve uma diminuição no coeficiente de infectividade e um aumento nos valores antigênicos do vírus irradiado. No estudo acima descrito, os autores sugerem que provavelmente ocorreu oxidação de grupos funcionais específicos de sulfidril para grupos disulfidril. Diferentemente dos resultados obtidos por Kume e Matsuda (1995), que observaram uma diminuição da antigenicidade da proteína ovalbumina quando irradiada.

Os resultados obtidos pelo ELISA corroboram os dados do estudo de Wiktor et al. (1972), que mostram que na 1ª coleta exploratória, os coelhos imunizados com RNPs irradiadas (grupo B) tiveram uma resposta imunológica superior aos coelhos imunizados com RNPs não irradiadas (grupo A). Em relação à 2ª coleta exploratória os soros obtidos dos dois grupos de coelhos apresentaram títulos de anticorpos semelhantes.

Estes resultados sugerem que coelhos imunizados com RNPs irradiadas podem precisar de um menor número de doses ou uma menor quantidade de antígeno por dose para produzirem quantidades de anticorpos semelhantes a dos coelhos imunizados com RNPs não irradiadas, diminuindo assim a quantidade de antígeno utilizado no processo de imunização.

Os dados da IFI concordam com os resultados do ELISA, mas mostram diferenças entre os títulos dos dois coelhos do grupo A, onde o soro do coelho A₂ apresentou título menor. Este fato pode ser resultado das respostas imunológicas individuais de cada animal, como observado no estudo de Caporale (2006).

Os títulos superiores de anticorpos observados nos soros dos coelhos do grupo B (1ª coleta exploratória), que sugerem alterações de especificidade, poderiam ser resultado das mudanças conformacionais na ribonucleoproteína do vírus da raiva decorrentes da irradiação (Paula, 1995), como exposição de grupos aromáticos, antes escondidos em regiões hidrofóbicas, ou, o desdobramento de cadeias polipeptídicas (Murata, 1988; Nascimento, 1991; Guarnieri, 1992). Estas alterações podem expor sítios antigênicos e enzimáticos, ou diferentes determinantes antigênicos, que nas moléculas em estado natural encontravam-se protegidos (Mandal et al., 1991).

Esses resultados obtidos a partir da imunização dos animais com RNPs irradiadas (coelhos do grupo B), também poderiam ser resultado da oxidação das RNPs, devido à propriedade da radiação em oxidar moléculas facilitando a apresentação destas pelas células apresentadoras de antígenos do sistema imune, como os macrófagos.

Cardi et al.(1998) estudaram a captação de crotoxina nativa e irradiada por macrófagos peritoneais de camundongos, e observaram que a crotoxina irradiada era mais facilmente fagocitada pelas células do que a crotoxina nativa, isto porque receptores presentes na superfície dos macrófagos, chamados *scavengers*, apresentam maior afinidade por macromoléculas oxidadas. Neste

estudo eles concluem que provavelmente a irradiação da toxina com ⁶⁰Co provocou mudanças oxidativas na toxina, induzindo uma melhor resposta imune.

Os resultados obtidos pelo ELISA e pela IFI mostram também os anticorpos produzidos a partir da imunização dos coelhos com RNPs irradiadas foram capazes de reconhecer o antígeno não irradiado. Paula (1995), em seu estudo, também observou que anticorpos produzidos por imunizações com venenos irradiados de diferentes gêneros e espécies de serpentes foram capazes de reconhecer os venenos nativos. O mesmo resultado foi obtido por Baptista et al.(2004) onde foi observado que, anticorpos produzidos em camundongos imunizados com ovalbumina irradiada foram capazes de reconhecer a proteína nativa.

Em relação à produção de conjugados anti-RNPs do vírus da raiva, foi observado que ambos conjugados produzidos a partir da purificação de soros hiperimunes obtidos de imunizações em animais com proteínas irradiadas e não irradiadas do vírus da raiva apresentaram títulos adequados para sua utilização nos testes de diagnóstico para a raiva, e superiores quando comparados ao conjugado comercial.

A titulação dos conjugados na técnica de Imunofluorescência Direta mostra que o conjugado anti-RNPs irradiadas, apesar de apresentar título semelhante ao conjugado anti-RNPs não irradiadas, resultou em uma melhor definição na marcação das inclusões características do vírus. Esse resultado sugere que pode ter ocorrido uma modificação na resposta imunológica dos animais frente ao antígeno irradiado.

Por meio do teste de Bradford e eletroforese (SDS-PAGE), foi possível observar que os dois processos de purificação de IgGs avaliados (cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade), resultaram em amostras contendo IgGs purificadas.

A partir do teste de Bradford foi possível obter o rendimento de cada processo, mostrando que a cromatografia de afinidade apresentou rendimento superior (4,64%) à cromatografia de troca iônica (2,05%). Dados semelhantes foram obtidos por Kamogae et al. (1998) em seu estudo sobre purificação de enterotoxina.

A purificação pela cromatografia de afinidade permitiu a conclusão do processo em 72 horas, um valor bastante inferior à cromatografia de troca iônica

(120 horas). Essa diferença de tempo de execução também foi observada por Kamogae et al. (1998), onde a cromatografia de afinidade obteve um melhor desempenho.

Outro aspecto significativo foi a diferença na execução dos dois processos, onde a cromatografia de troca iônica, da forma como é feita no Instituto Pasteur de São Paulo, requer execução manual (preparo e empacotamento da resina, passagem dos soros pela coluna e coleta dos mesmos) (Perrin, 1996; Atanasiu et al., 1974; Caporale, 2006) e a cromatografia de afinidade utiliza colunas comercialmente adquiridas, podendo serem elas utilizadas inúmeras vezes (Amersham Pharmacia Biotech, 1999).

O ensaio imunoenzimático permitiu validar a purificação de ambos os processos, pois mostra o reconhecimento do antígeno específico (RNP do vírus da raiva) pelos anticorpos purificados.

O perfil eletroforético obtido, por meio do gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE), mostra que o teor de pureza da purificação de IgGs resultantes da cromatografia de afinidade foi superior à pureza obtida da cromatografia de troca iônica, onde foi possível observar as bandas correspondentes às cadeias leves e pesadas das IgGs (25 e 55 kDa, respectivamente).

Esse resultado concorda com dados obtidos por Monteiro et al. (2003) que isolou proteínas do veneno de *Crotalus durissus terrificus* por cromatografia de afinidade com alto grau de pureza. Hong et al. (1994), comparando a purificação de imunoglobulinas de equinos, observaram que a purificação por cromatografia de afinidade apresentou um grau de pureza superior ao obtido pela cromatografia de troca iônica.

Os dados obtidos mostram que neste estudo a cromatografia de afinidade com proteína A foi o método de purificação que apresentou melhor rendimento, menor tempo de execução e obtenção de anticorpos com maior grau de pureza.

6 CONCLUSÕES

- As diferenças observadas, nos títulos de anticorpos, entre os soros dos animais imunizados com RNPs do vírus da raiva irradiadas e não irradiadas, na 1ª coleta exploratória, sugerem que as proteínas irradiadas podem ter sofrido alterações estruturais, expondo novos epítomos e exarcebando assim a resposta imunológica.
- As RNPs irradiadas foram capazes de induzir resposta do sistema imune nos animais utilizados, o que sugere que não houve perda da imunogenicidade com o processo de irradiação.
- A partir dos resultados obtidos pelo ELISA e IFI, pode-se concluir que os animais imunizados com RNPs irradiadas necessitam de uma quantidade menor de antígeno ou menor número de doses para uma resposta imunológica com alto título de anticorpos, o que poderia diminuir a quantidade de antígeno utilizado no processo de imunização.
- Os anticorpos produzidos pela imunização com RNPs irradiadas foram capazes de reconhecer o antígeno não irradiado.
- O conjugado produzido a partir dos anticorpos anti-RNPs irradiadas apresentou a mesma especificidade e melhor definição das inclusões intracitoplasmáticas, características do vírus da raiva, quando comparado ao conjugado produzido a partir de anticorpos anti-RNPs não irradiadas.
- O processo de purificação que utilizou a cromatografia por afinidade com proteína A foi o método que apresentou melhor rendimento, menor tempo de execução e obtenção de anticorpos com maior grau de pureza.
- O produto final, de ambos os processos de purificação, apresentou título, especificidade e reatividade adequadas, mostrando potencial para uma produção em uma maior escala, visando seu uso na rotina laboratorial.

ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética CEPA/IPEN-USP **Parecer - Projeto N° 58/10 - CEPA-IPEN/SP**

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa **“EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA NA IMUNOGENICIDADE DAS RIBONUCLEOPROTEÍNAS (RNP) DO VÍRUS DA RAIVA E PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-RNP PARA DIAGNÓSTICO”** de responsabilidade do pesquisador **PATRICK JACK SPENCER** foi considerado **APROVADO**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados, a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais, dependendo da duração do projeto) referentes ao andamento da pesquisa. Após o término da pesquisa, uma cópia do trabalho deve ser encaminhada a este CEPA.

São Paulo, 17 de maio de 2010

Profa. Dra. Nanci do Nascimento
Coordenadora do CEPA-IPEN

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. ***Imunologia celular e molecular***. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ALVES, J.B. ***Aspectos da resposta imune frente a antígenos protéicos irradiados com ⁶⁰Co***. 2004. Dissertação (mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH. ***Protein Purification (Handbook)***. 1999.

ATANASIU, P.; TSIANG, H.; VIRAT, J. Obtention D'IgG anti-nucléocapsides rabiques, purification et conjugaison a la peroxydase ou a l'isothiocyanate de fluorescéine. ***Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)***, v. 125 B, p. 85-98, 1974.

BAPTISTA, J.A.; SPENCER, P.J.; OLIVEIRA, J.E.; CASARE, M.S.; NASCIMENTO, N. Immune response against antigens irradiated with ⁶⁰Co gamma-rays. ***J. Radioanal. Nuclear Chem.***, v. 269, n. 3, p. 565-569, 2006.

BAPTISTA, J.A.; SPENCER, P.J.; AROEIRA, L.G.S.; CASARE, M.S.; NASCIMENTO, N. Effects of gamma rays on the immunogenicity (IgG types) of ovalbumin). ***Radiat. Phys. Chem.***, v. 71, p. 481-483, 2004.

BATISTA, H.B.C.R.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Raiva: uma breve revisão. ***Acta scientiae veterinariae***, v. 35, n. 2, p. 125-144, 2007.

BOLLOG, D.M.; EDELSTEIN, S.J. ***Protein Methods***. 1 ed. New York, N.Y.; Wily-Liss, 1991.

BONI-MITAKE, M.; COSTA, H.; SPENCER, P.J.; VASSILIEFF, V.S.; ROGERO, J.R. Effects of ⁶⁰Co gamma radiation on crotamine. ***Braz. J. Med. Biol. Res.***, v. 34, p. 1531-1538, 2001.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. ***Anal. Biochem.***, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUTLER, J.; LAND, E.J.; SWALLOW, A.J. Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems. ***Radiat. Phys. Chem.***, v. 24, p. 273-282. 1984.

CAPORALE, G.M.M. **Purificação do vírus da raiva e ribonucleoproteínas para a produção de conjugados fluorescentes**. 2006. Dissertação (mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

CAPORALE, G.M.M.; SILVA, A.C.R.; PEIXOTO, Z.M.P.; CHAVES, L.B.; CARRIERI, M.L.; VASSÃO, R.C. First production of fluorescent anti-ribonucleoproteins conjugate for diagnostic of rabies in Brazil. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 23, p. 7-13, 2009.

CAPRONI, P.; BAPTISTA, J.A.; ALMEIDA, T.L.; PASSOS, L.A.C.; NASCIMENTO, N. Study of irradiated toxins with ^{60}Co gamma rays: immune system behavior. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v.15, n. 2, p. 216-225. 2009.

CARDI, B.A.; NASCIMENTO, N.; ANDRADE J.R., H.F. Irradiation of *Crotalus durissus terrificus* crotoxin with ^{60}Co gamma-rays induces its uptake by macrophages through scavenger receptors. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 73, n. 5, p. 557-564, 1998.

CARSTENS, E. B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). **Arch. Virol.**, v. 155, p.133–146, 2010.

CASTILHO, J. G.; Yamamoto, K. ; LIMA, J.Y.O. ; SCHEFFER, K. C.; CARNIELI JUNIOR, P.; OLIVEIRA, R. N.; MACEDO, C. I. ; ACHKAR, S. M.; CARRIERI, M. L.; KOTAIT, I. Padronização e Aplicação da Técnica de Isolamento do Vírus da Raiva em Células de Neuroblastoma de Camundongo (N2A). **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, p. 12-18, 2007.

CHAVES, L.B.; MAZUTTI, A. L. C.; CAPORALE, G.M.M.; SCHEFFER, A. C. R.; SILVA, A. C. R. Comparison of RFFIT in LAB-TEK and in 96-well microtitre plates. In: RAIVA NAS AMÉRICAS, 17., 15-20 outubro, 2006, Brasília. **Resumos...**Brasília.

CLIQUE, F.; AUBERT, M.; SAGNE, L. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. **J. Immunol. Methods.**, v. 212, v. 79–87.1998.

COMPANS, R.; CHOPPIN, P. The length of the helical nucleocapsid of Newcastle disease virus. **J.Virol.**, v. 33, p. 344-346, 1967.

COX, J.H.I.; DIETZSCHOLD, B.; SCHNEIDER, L.G. Rabies virus glycoprotein II. Biological and serological characterization. **Infect. Immun.**, v. 16, p. 754-759, 1977.

DEAN, D.J.; ABELSETH, M,K. The fluorescent antibody test. In: KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. Geneva: World Health Organization,1973. p. 73-84.

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

DIAZ, A.M.; ARISPE, E.; BRUNEL, C.; CAVANDOLI, C.; DELLEPIANE, N.; MIRANDA, A. La tecnica de contraimunoelctroforesis para la determinación de anticuerpos antirrabicos. **Bol. Ofic. Sanit. Panamer.**, v. 101, p. 255-261, 1986.

DIETZSCHOLD, B. Techniques for the purification of rabies virus, its subunits and recombinant products. In: MESLIN F.-X., KAPLAN M.M., KOPROWSKI H. **Laboratory techniques in rabies**. Geneva.; World Health Organization, 1996. p.175-180.

ELLIOTT, L.H.; McCORMICK, J.B.; JOHNSON, K.M. Inactivation of Lassa, Marburg, and Ebola viruses by gamma irradiation. **J. Clin. Microbiol.**, v. 16, p. 704-708, 1982.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**. v. 8, n. 9, p. 871-874, 1971.

FAVORETTO, S.R.; CARRIERI, M.L.; TINO, M.S.; ZANETTI, C.R.; PEREIRA O.A.C. Simplified fluorescence inhibition microtest for titration of rabies neutralizing antibodies. **Rev. Inst. Med. trop.**, v. 35, p. 171-175, 1993.

FERREIRA, N.R.; BUENO, S.M.A. Separação de Imunoglobulina G humana por cromatografia de interação hidrofóbica. In: CONGRESSO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNICAMP, 10., 2002, Campinas. **Anais eletrônicos...** Campinas: UNICAMP, 2002. Disponível em: <http://www.prp.unicamp.br/pibic/congressos/xcongresso/pdfN/96.pdf><>. Acesso em 27 jul. 2003.

FUNASA. Fundação Nacional da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília (DF). 2002. p. 673-704.

FUNASA. Fundação Nacional da Saúde. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva. Brasília (DF). 2008. p. 52.

GARRISON, W.M. Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. **Chem. Rev.**, v. 87, p. 381-398, 1987.

GROSH, D.S.; HOPWOOD, L.E. Biological effects of radiation – Ch.2 direct and indirect action on living matter. **Biological Effects of Radiations**., v. 2, p. 17-28, 1979.

GUARNIERI, M.C. **Estudo dos efeitos da radiação gama de ^{60}Co nas propriedades bioquímicas, biológicas e imunológicas do veneno de *Bothrops jararaca***. 1992. Tese (doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

GOLDWASSER RA, KISSLING RE. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 98, p. 219-23, 1958.

HONG, H.A.; ROOIJAKKERS, E. J. M.; KE, N. T.; GROEN, J.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Methods for the purification of equine rabies immunoglobulin: Effects on yield and biological activity. **Biologicals.**, v. 22, n. 1, p. 1-6, 1994.

HUSE, K.; BÖHME, HJ.; SCHOLZ, G.H. Purification of antibodies by affinity chromatography. **J. Biochem. Biophys. Methods.**, v. 51, p. 217-231, 2002.

ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?bhcp=1>. Acesso em 20 fev. 2010.

ITO, Y.; NISHIZONO, A.; MANNEN, K.; HIRAMATSU, K.; MIFUNE, K. Rabies virus M protein expressed in *Escherichia coli* and its regulatory role in virion-associated transcriptase activity. **Arch. Virol.**, v. 141, p. 671-683, 1996.

JOUSTRA, M.; LUNDGREN, H. Preparation of freeze-dried, monomeric and immunochemical pure IgG by a rapid and reproducible chromatographic technique. In: PEETERS, H. **Protides of the biological fluids**. (Proceedings of the 17th colloquium). Bruges.1969. p.511-515.

KAMOGAE, M.; MIYA, N.; PEREIRA, J.L.; HIROOKA, E. Y. Cromatografia de afinidade com corante red A *versus* troca iônica-permeabilidade em gel: comparação da praticidade na purificação de enterotoxina estafilocócica A. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 18, n. 2, não paginado. 1998.

KAPLAN, G.; TURNER, G.S.; WARREL, D. **Rabies: The facts**. 2. ed. Oxford Medical Publications, 1986.

KING, A.A.; TUNER, G.S. Rabies: a review. **J. Comp. Pathol.**, v.108, p. 1-39, 1993.

KOTAIT, I.; CARRIERI, M.L. Raiva. In: TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 689-698.

KUME, T.; MATSUDA, T. Changes in structural and antigenic properties of proteins by radiation. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 46, n. 2, p. 225-231, 1995.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAFON, M.; WIKTOR, T.J. Antigenic sites on the ERA rabies virus nucleoprotein and nonstructural protein. **J. Gen. Virol.**, v. 66, p. 2125-2133, 1985.

LEHNINGER, A. L.; COX, M.M.; NELSON, D. L. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Sarvier, 2006.

LOPES, R.; ROQUE, F.V. Producción del primer lote de conjugado antirrábico de origen caprino en el Perú. **Rev. Med. Exp.**, v. 14, n. 1, p. 43-44, 1997.

MANDAL, M.; HATI, R. N.; BARDHAN, D. K.; HATI, A. K. Effect of gamma-irradiation on cobra (*Naja naja*) venom as a toxoid. **The snake**, v. 23, p. 8-14. 1991.

MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M. An overview of laboratory techniques in the diagnosis and prevention of rabies and in rabies research. In: MESLIN F-X; KAPLAN M.M.; KOPROWSKI H. **Laboratory techniques in rabies**. Geneva.: World Health Organization, 1996. p. 9-27.

MICHAELS, H.B.; HUNT, J.W. A model for radiation damage in cells by direct effect and by indirect effect : a radiation chemistry approach. **Radiat. Res.**, v. 74, p. 23-34. 1978.

MONTEIRO, L.F.; SILVA, L.A.; COPPEDE, J.; GONÇALVES, C.A.G.; SANTOS, F.; SANTANA, E.I.F.; NASCIMENTO, M.M.; MATRANGULO, P.V.F.; BOM, C.A.M.; ARROYO, A.G.; OLIVEIRA, A.H.; FEITOZA, J.A.; PIRES, M.A.; PIZZO, V.; MARCUSSI, S.; SOARES, A.M. Novas estratégias de purificação de toxinas de venenos de serpentes. Trabalho apresentado no Curso Sequencial de Bio-Tecnologia, Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP. 2003.

MOONS, S.; SONG, K.B. Effect of γ -irradiation on the molecular properties of ovalbumin and ovomucoid and protection by ascorbic acid. **Food chem.**, v. 74, p. 479-483. 2001.

MURATA, Y. **Efeitos da radiação gama no veneno de *Crotalus durissus terrificus***. 1988. Dissertação (mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

MURATA, Y.; NISHIKAWA, A.K.; NASCIMENTO, N.; HIGASHI, H.G.; DIAS, W.S.; ROGERO, J.R. Gamma irradiation reduces the toxic actives of *Crotalus durissus terrificus* venom but does not affect their immunogenic activities. **Toxicon**, v. 28, p. 617, 1990.

NASCIMENTO, N. **Estudo comparativo entre crotoxina nativa e irradiada, aspectos bioquímicos e farmacológicos**. 1991. Dissertação (mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

NASCIMENTO, N.; SEEBART, C.S.; FRANCIS, B.; ROGERO, J.R.; KAISER, I.I. Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. **Toxicon**, v. 34, n. 1, p. 123-131, 1996.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ ANIMALE (OIE). Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres. França. 2005. p. 369-389.

OKUNO, EMICO. **Radiação: Efeitos, Riscos e Benefícios**. 1. ed. São Paulo: Harbra, 1998.

PAULA, R. A. **Obtenção e avaliação de anticorpos induzidos por veneno crotálico ou crotoxina irradiados em fonte de ⁶⁰Co**. 1995. Dissertação (mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

PERRIN, P. Techniques for the preparation of rabies conjugates. . In: MESLIN F-X; KAPLAN M.M.; KOPROWSKI H. **Laboratory techniques in rabies**. Geneva.: World Health Organization, 1996. p. 433-444.

PERRIN, P.; LAFON, M.; VERSMISSE, P. Application d'une méthode immunoenzymatique au titrage des anticorps rabiques neutralisants en culture cellulaire. **J. Biol. Standard.**, v.13, p. 35-42, 1985.

PIZA, A.S.; SANTOS, J.L.; CHAVES, L.B.; ZANETTI, C.R. An ELISA suitable for detection of rabies virus antibodies in serum samples from human vaccinated with either cell culture vaccine or suckling mouse brain vaccine. **Rev. Inst. Med. trop.**, v. 41, n. 1, p. 39–43, 1999.

PLOTKIN, S.A. Rabies. **Clin. Infect. Dis.** v. 30, p. 4–12, 2000.

REIS, V.M.; CRUZ, G.B.; FERREIRA, A.; FERNANDES, M.F.; FERREIRA, A.C.; REIS, F.B.; RIBEIRO, J.R.A.; SALLES, J.F.; WEBER, O.B. Produção caracterização de soros policlonais para a detecção de bactérias diazotróficas. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1997; 11p.

RUPPRECHT, C.E., GIBBONS, R.V. Prophylaxis against rabies. **N. Engl. J. Med.**, v. 351, p. 2626-2635, 2004.

SMITH, J.S; YAGER, P.A; BAER, G.M. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. **Bull. Wild. Hlth. Org.**, v. 48, p. 535-541, 1973.

SOKOL, F. Purification of rabies virus and isolation of its componentes. In: KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. Geneva.: World Health Organization, 1973. p. 165-178.

SOUZA, F.A.D.; SPENCER, P.J.; ROGERO, J.R.; NASCIMENTO, N.; DAL PAI-SILVA, M.; GALLACCI, M. ⁶⁰Co gamma irradiation prevents *Bothrops jararacussu* venom neurotoxicity and myotoxicity in isolated mouse neuromuscular junction. **Toxicon**, v. 40, p. 1101-1106. 2001.

SPENCER, P.J. **Efeitos da radiação gama de ⁶⁰Co nas propriedades bioquímicas e imunológicas do veneno de *Bothrops jararacussu***. 1995. Dissertação (mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

SPENCER, P.J. **Efeitos da radiação gama de ⁶⁰Co na estrutura molecular da bothropstoxina-1**. 2000. Tese (doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

THOMAS, J.B; SIKES, R.K; RICKE, A.S. Evaluation of indirect fluorescent antibody technique for detection of rabies antibody in human sera. **J. Immunol.**, v. 91, p. 721-723, 1963.

TORDO, N. Characteristics and molecular biology of the virus. In: MESLIN F-X; KAPLAN M.M.; KOPROWSKI H. **Laboratory techniques in rabies**. Geneva.: World Health Organization, 1996. p.28-51.

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G. Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome: Segmented homology with VSV. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 14, p. 2671-2683, 1986.

WALES, A.; KUSEL, J.R. Biochemistry of irradiated parasite vaccines: Suggested models for their mode of action. **Parasit. Today**. v. 8, n. 11, p. 358-363. 1992.

WELLER, T.H.; COONS, A.H. Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. **Proc. Soc. Exp. Biol.**, v. 86, p. 789-794, 1954.

WIKTOR, T.J.; AASLESTAD, H. J.; KAPLAN, M. M. Immunogenicity of rabies virus inactivated by β -propiolactone, acetyleneimine, and ionizing irradiation. **Appl. Microbiol.**, v.23, p.914-918, 1972.

WUNNER, H.W. Rabies virus. In: JACKSON C.A.; WUNNER H.W. **Rabies**. San Diego.: Academic Press, 2007. p.23-68.

WUNNER, H.W.; BRIGGS, J.D. Rabies in the 21st Century. ***PLoS Negl. Trop. Dis.***, v. 4, n. 3, p. 1-3, 2010.

ZALAN, E.; WILSON, C.; PUKITIS, D. A microtest for quantitation of rabies virus neutralizing antibodies. ***J. Biol. Stand.***, v.7, p. 213-20, 1979.