



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” FACULDADE DE MEDICINA

Mayra Pereira Rocca

Desenvolvimento de uma nova vacina veterinária de subunidade contra raiva

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Tit. Helio Langoni
Co orientador: Renato Mancini Astray

Botucatu

2020

Mayra Pereira Rocca

Desenvolvimento de uma nova vacina veterinária de
subunidade contra raiva

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutor em Doenças
Tropicais.

Orientador: Prof. Tit. Helio Langoni
Co orientador: Dr. Renato Mancini Astray

Botucatu
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Rocca, Mayra.

Desenvolvimento de uma nova vacina veterinária de subunidade contra raiva / Mayra Rocca. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Helio Langoni

Coorientador: Renato Mancini Astray

Capes: 40101096

1. Vacina veterinária. 2. Hidrofobia - Vacinação.
3. Glicoproteínas. 4. Adjuvantes imunológicos.

Palavras-chave: Adjuvante; Glicoproteína; Raiva ; Vacina.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Helio Langoni, que abriu as portas do seu laboratório e confiou no meu trabalho, me orientou e me acolheu como aluna.

Ao Dr. Renato Astray, pela orientação, ajuda, paciência, ensinamentos, apoio durante tanto tempo e pelos muitos momentos de calma e tranquilidade que foram tão importantes para mim.

A Dr. Soraia Jorge, por todas as conversas, dicas, opiniões e objetividade durante os seminários do LIV e também fora do laboratório.

A todos os companheiros de laboratório, tanto os da FMVZ como os do LIV, que me proporcionaram tantos momentos de descontração e alegria, amizade, ajuda de trabalho, colaborações e ótimo convívio por tanto tempo.

A todos os companheiros da Artemis One Health Research Foundation, em especial o Dr. Byron Martina que me recebeu em seu laboratório e me proporcionou uma experiência única, contribuindo muito com meu trabalho. Obrigada por sempre responder todas minhas muitas perguntas, por fazer todos falarem inglês porque eu não aprendi holandês e por me fazer aprender e crescer ainda mais.

Agradeço especialmente ao Dr. Benedito Menozzi por tantos momentos de ajuda, e pela disposição, sempre que dúvidas, conflitos e aflições vieram. Obrigada também por tantos momentos de risadas e discussões sem pé nem cabeça. Seu companheirismo, bom humor e simpatia foram essenciais. Sempre muito solícito, disposto a me ajudar em qualquer experimento com um trabalho muito bem feito. Toda minha gratidão.

A minha família, formada por publicitários talentosos que nunca entenderam absolutamente nada do que eu faço e falo, mas sempre me apoiaram em todas as decisões e todos os momentos difíceis e os alegres também. Eu nunca teria chegado onde cheguei sem a ajuda de vocês.

Ao Gabriel, que me conheceu no início do doutorado, virou amigo, namorado e agora meu marido. Obrigada por estar do meu lado durante todas minhas empreitadas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento (FAPESP), pelo apoio financeiro e bolsa (2016/07820-1) e bolsa BEPE (2018/10119-9).

Aos meus amigos de infância e amigas de faculdade, que me ajudaram tanto a crescer como pessoa e como profissional. Durante o doutorado, tive as maiores alegrias e realizações, mas também a tristeza mais intensa que já conheci. Com a ajuda e apoio de todos vocês, cada um com sua parcela e maneira de ajuda, me mantiveram em pé e seguindo em frente! Muito obrigada!

RESUMO

A vacinação contra a raiva canina e felina é a medida profilática mais eficaz para a prevenção de casos de raiva humana. No Brasil a campanha de vacinação de animais domésticos é realizada anualmente, a partir das primeiras 4 semanas de vida do animal. As vacinas utilizadas são constituídas de vírus inativado e adjuvante. A proteção é conferida por um nível de anticorpos elevados, pois uma resposta imune efetiva ao vírus da raiva depende de sua neutralização. Embora as vacinas estejam disponíveis há muitos anos, há uma evidente falha de cobertura devido à necessidade de reforços periódicos e eventuais problemas com as vacinas contra raiva administradas em campanhas, o que leva muitos proprietários a não vacinarem seus animais. Dessa forma, o desenvolvimento de novas vacinas contra a raiva deve visar o aumento da segurança dessas vacinas e facilitar o processo de administração das doses de reforço. A proposta deste estudo foi o desenvolvimento de um protótipo vacinal baseado na utilização de uma glicoproteína recombinante do envelope do vírus da raiva (RVGP). Essa glicoproteína, utilizando um sistema de vetor viral (SFV-RVGP) e sendo expressa em sistema de células S2 amplamente caracterizado, demonstrou ter propriedades imunogênicas em ensaios preliminares. Diferentes preparações, combinadas ou não com adjuvantes, e diferentes vias foram testadas em modelo animal estabelecido e avaliadas frente ao desafio intracerebral, verificando por meio de testes sorológicos (ELISA e soroneutralização) se os níveis necessários para proteção foram atingidos. Resultados mostraram que tanto a imunização com RVGP de células S2 como com SFV-RVGP são capazes de proteger camundongos contra o desafio viral. A utilização de adjuvantes juntamente com a proteína recombinante se mostrou necessária, tendo sido testados MPLA, sílica (SBA-15) e ISCOM (complexos imunoestimulantes), sendo este último o mais eficiente.

Palavras-chave: Raiva; Vacina; RVGP; Adjuvante; RFFIT; FAVN; Reforço vacinal.

ABSTRACT

Vaccination against canine and feline rabies is the most effective prophylactic measure for preventing cases of human rabies. In Brazil, the domestic animal vaccination campaign is carried out annually, from the first 4 weeks of the animal's life. Available veterinary Rabies vaccines are composed of inactivated viruses with adjuvant. High level of neutralizing antibodies directly correlates with protection. Although Rabies vaccines have been available for many years, there is a clear lack of coverage due to the need for periodic boosters and potential problems with campaign-administered rabies vaccines, which makes many owners fail to meet their pet vaccination schedule. Thus, the development of new rabies vaccines should aim at increasing the safety of these vaccines and facilitating the booster administration process. The purpose of this study was to develop a vaccine prototype based on the use of a recombinant rabies virus glycoprotein (RVGP). Recombinant RVGP expressed *in vivo* by using a viral vector system (SFV-RVGP) or being expressed in a widely characterized S2 cell system, have shown immunogenic properties in preliminary experiments. Different preparations, combined or not with adjuvants, and different routes were tested in an established animal model. Immunogenicity evaluated by survival against intracerebral challenge and by serological tests (ELISA and seroneutralization). Results showed that both the RVGP produced in insect cells and the SFV-RVGP system were able to protect mice against viral challenge (CVS). The combination of adjuvants was important for the glycoprotein immunogenicity. Adjuvants as MPLA, silica (SBA-15) and ISCOM (immunostimulant complexes) were tested, with ISCOM showing more efficiency.

Key words: Rabies; Vaccine; RVGP; Adjuvant; RFFIT; FAVN; booster vaccination.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática do vírus da raiva (A) e da estrutura de sua glicoproteína (B).	17
Figura 2 - Cronograma de imunização via intraperitoneal	54
Figura 3 – Curva sobrevivência frente ao desafio viral em animais imunizados pela via intraperitoneal com SFV - RVGP	55
Figura 4 – Cronograma de imunização SFV – RVGP via subcutânea.....	56
Figura 5 – Curva sobrevivência frente ao desafio viral em animais imunizados pela via intraperitoneal com SFV-RVGP	57
Figura 6 – Cronograma de imunização SFV – RVGP via oral	58
Figura 7 – <i>Dot blot</i> da preparação de RVGP de células S2	60
Figura 8 – Cronograma de imunização com preparação de membranas de S2 contendo RVGP pela via intraperitoneal.....	61
Figura 9 – Curva sobrevivência frente ao desafio viral em animais imunizados pela via intraperitoneal com preparação de membrana de S2 contendo RVGP	63
Figura 10 – Cronograma de imunização com preparação de membranas de S2 contendo RVGP pela via subcutânea	64
Figura 11 – Curva sobrevivência de Log-Rank frente ao desafio viral em animais imunizados pela via subcutânea com preparação de membrana de S2 contendo RVGP	65
Figura 12 – cronograma de imunização de RVGP de células S2 via oral	65
Figura 13 – Cronograma de imunização com preparação de membranas de S2 contendo RVGP + sílica, pela via oral.....	66
Figura 14 – Cronograma de imunização com RVGP purificada pela via intramuscular.....	68
Figura 15 – Curva sobrevivência de Log-Rank frente ao desafio viral em animais imunizados com preparação de RVGP purificada.....	70
Figura 16 – Cronograma de imunização com RVGP purificada combinando vias (IM+oral)	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos utilizados na caracterização da conformação da RVGP recombinante.....	46
Tabela 2 – Resultados da imunização com SFV – RVGP via intraperitoneal	54
Tabela 3 – Análise estatística dos títulos de anticorpos com SFV via intraperitoneal	56
Tabela 4 – Resultados da imunização com SFV – RVGP via subcutânea	57
Tabela 5 – Análise estatística dos títulos de anticorpos com SFV via subcutânea (D30).....	58
Tabela 6 – Resultados da imunização com SFV – RVGP via oral.....	59
Tabela 7 – Resultados da imunização pela via intraperitoneal com preparação de membranas de S2 contendo RVGP	61
Tabela 8 – Análise estatística dos títulos de anticorpos com preparação de membrana de S2 contendo RVGP pela via intraperitoneal	62
Tabela 9 – Resultados da imunização pela via subcutânea com preparação de membranas de S2 contendo RVGP	64
Tabela 10 – Resultados da imunização de RVGP de células S2 via oral.....	66
Tabela 11 – Resultados da imunização com preparação de membranas de S2 contendo RVGP + SBA15.....	67
Tabela 12 – Análise estatística dos títulos de anticorpos da preparação de membrana de S2 contendo RVGP com sílica	67
Tabela 13 – Reforço vacinal via oral com membrana de S2 contendo RVGP	67
Tabela 14 – Resultados da imunização com RVGP purificada pela via intramuscular ..	69
Tabela 15 – Curva sobrevivência de Log-Rank frente ao desafio viral em animais imunizados pela via intramuscular com RVGP purificada.....	70
Tabela 16 – Relação de grupos e preparações com combinação de vias	71
Tabela 17 – Resultados da imunização com RVGP purificada combinando vias	72
Tabela 18 – Resultados do ensaio de proliferação celular (BrdU)	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgV	Variantes do vírus da raiva
AcN	Anticorpos Neutralizantes
BHK	<i>Baby Hamster Kidney</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i>
CuSO ₄	Sulfato de cobre
CVS	<i>Challenge virus strain</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbant Assay</i>
EU/mL	Unidades Equivalentes por mililitro
FAVN	<i>Fluorescent Antibody Virus Neutralization</i>
G	Glicoproteína do Lyssavírus da Raiva
IgG	Imunoglobulina G
ISCOM	<i>Immunostimulating complex</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Proteína de matriz
MLV	Vacinas de vírus modificado
MPLA	Monofosforil lipídeo A de <i>Bordetella pertusis</i>
N	Nucleoproteína
OIE	Organização mundial da saúde animal
ORV	<i>Oral rabies vaccine</i>
P	Fosfoproteína
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PEP	<i>Post-exposure prophylaxis</i>
RABV	<i>Rabies Virus strain Pasteur vaccines / PV</i>
RFFIT	<i>Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RVGP	<i>Rabies Virus Glycoprotein</i>
S2	<i>Drosophila melanogaster</i> Schneider 2
S2mtRVGP-H	Células que expressam a RVGP sob domínio do promotor da metalotioneína e selecionadas com higromicina
SBA-15	Sílica Nanoestruturada - Instituto Butantan
SFV	<i>Semliki Forest Virus</i>
SFV-RVGP	Partícula SFV que contém RNA para codificar a RVGP
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
UI/mL	Unidades Internacionais por mililitro
VR	Vírus da raiva

Sumário

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 RAIVA, UMA DOENÇA ANCESTRAL	14
1.2 O AGENTE ETIOLÓGICO E SUAS CARACTERÍSTICAS IMUNOLÓGICAS	16
1.4 SITUAÇÃO DA RAIVA NO MUNDO E SUA EPIDEMIOLOGIA.....	19
1.5 SITUAÇÃO DA RAIVA NO BRASIL	21
1.6 SOROLOGIA DE RAIVA	24
1.7 SAÚDE ÚNICA	26
1.8 A VACINA CONTRA RAIVA.....	28
1.8.1 Vacinas contra a raiva para humanos	31
1.8.2 Vacinas de raiva para animais domésticos.....	31
1.8.3 Vacinas de raiva para animais silvestres.....	33
1.8.4 Adjuvantes.....	35
1.8.4.1 Monofosforil Lipídeo A (MPLA).....	36
1.8.4.2 Sílica Nanoestruturada (SBA-15).....	36
2 JUSTIFICATIVA	38
3 OBJETIVO GERAL	42
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1 OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS	43
4.1.1 RVGP recombinante de células de <i>Drosophila melanogaster</i> Schneider 2 (células S2).....	43
4.1.2 Purificação da RVGP recombinante a partir de células S2	44
4.1.3 Dosagem de RVGP por ELISA	44
4.1.4 Dot blotting.....	45
4.1.5 Obtenção das partículas de <i>Semliki Forest Virus</i> (SFV-RVGP)	46

4.2 FORMULAÇÕES	47
4.3 ANIMAIS	48
4.4 MÉTODOS SOROLÓGICOS	48
4.4.1 RIFFT (<i>Rapid Fluorescent Foci Inhibition Test</i>).....	49
4.4.2 FAVN (<i>Fluorescent Antibody Virus Neutralization</i>).....	49
4.4.3 Titulação de anticorpos anti-RVGP por ELISA - Platelia®	50
4.5 DESAFIO INTRACEREBRAL	51
4.6 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	52
 4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	 53
 5 RESULTADOS	 53
5.1 IMUNIZAÇÃO COM SFV-RVGP	53
5.1.1 Imunização via intraperitoneal:	53
 5.3.2 Imunização pela via subcutânea.....	 56
5.3.3 Imunização pela via oral:.....	58
5.4 IMUNIZAÇÃO COM RVGP PRODUZIDA EM CÉLULAS S2	59
 5.4.2 Imunização com preparação membranária de S2 contendo RVGP	 60
5.4.2.1 Via intraperitoneal	61
5.4.2.2 Via subcutânea.....	63
5.4.2.3 Via oral:	65
5.4.3 Imunização com RVGP purificada de células S2	68
5.4.3.1 Via intramuscular	68
5.4.3.2 Reforço pela via oral	70
5.6 ENSAIO <i>EX VIVO</i> DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	72

6 DISCUSSÃO	74
7 CONCLUSÕES.....	83
9 REFERÊNCIAS	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 RAIVA, UMA DOENÇA ANCESTRAL

A raiva é uma doença viral infecciosa negligenciada, caracterizada por encefalomielite aguda e que causa importantes prejuízos à pecuária e à saúde pública. A doença afeta o sistema nervoso central dos mamíferos, inclusive humanos, sendo quase invariavelmente fatal (FOOKS et al., 2014).

É a infecção mais severa quando comparada a qualquer outra doença, seja ela humana ou animal. Essa zoonose (antropozoonose) é transmitida pela penetração do vírus contido na saliva do animal infectado, principalmente pela mordedura e, mais raramente pela arranhadura ou lambedura de mucosas ou feridas abertas (WHO 2018). A quantidade de vírus presentes na saliva, a gravidade da infecção e localização da ferida podem agravar o caso (WARRELL E WARRELL 2004; HEMACHUDHA et al., 2013). Do latim *rabere*, a raiva é uma doença progressiva causada por um vírus neurotrópico do gênero *Lyssavirus* - do grego *lyssa* (frenesi ou loucura). A doença, que é antiga e temida entre os seres humanos e animais, teve seu primeiro registro escrito no Código pré-mosaico de Eshnunna (século XXIII a.C), em que são listadas as leis e penalidades para donos de cães que ficam agressivos e mordem, e devem tomar medidas preventivas contra suas mordidas. Na antiguidade a raiva humana foi bem descrita por Demócrito (460-370 a.C) e Aristóteles (322 a.C). Segundo este último, os animais sofriam com a loucura, fazendo com que ficassem irritáveis e todos os animais por eles mordidos também adoecessem (BAER, 2007; FEDER et al., 2012). Hipócrates descreveu a doença humana relatando que “as pessoas bebem muito pouco, são perturbadas e amedrontadas, tremem ao mínimo ruído ou são convulsionadas”. A humanidade antiga, mesmo que sem mais detalhes da doença, já sabia que se tratava de uma enfermidade que afetava tanto os cães como os humanos, se tratando do que chamamos hoje de zoonose (ROSEN, 1958).

Muito tempo depois, a raiva foi descrita na Europa por volta de 1271, onde reportaram a relação entre cães, lobos e humanos. Contudo, só em 1804 Zinke, demonstrou a infecciosidade da saliva, inoculando-a em cães saudáveis (FERREIRA, 1968).

Os primeiros casos de raiva em cães nas Américas foram em 1753 na Virgínia. Na América do Sul, a raiva foi relatada pela primeira vez no Peru em 1803 e na Argentina em 1806. Os primeiros estudos científicos foram feitos em 1879 pelo médico veterinário Galtier, que

efetuiu a primeira inoculação de amostras contendo o vírus em cérebro de coelhos, demonstrando sua posterior eliminação pela saliva. Ele demonstrou que coelhos eram sensíveis ao vírus e realizou os primeiros testes de profilaxia em ovelhas juntamente com Pasteur e seus parceiros Roux, Chamberlan e Thuiller, todos pioneiros na vacinação em humanos.

As descobertas começaram a acelerar no século XIX, quando esta equipe conseguiu isolar o vírus (KOTAIT et al., 2009) e concluiu que o órgão alvo do agente no organismo era o sistema nervoso central, e que a inoculação intracerebral era a forma mais eficaz da raiva ser transmitida (FERREIRA, 1968). Até 1885, nenhum tratamento e nenhuma prevenção existiam até a descoberta de Pasteur: uma vacina contra a raiva. Pela primeira vez, a patogenicidade do vírus foi modificada por meio de passagens intracraniais do vírus em animais de laboratório. Neste mesmo ano, Pasteur administrou com sucesso a vacina em Joseph Meister que tinha sido gravemente atacado por um cachorro raivoso.

Em termos de diagnóstico, Remlinger (1903) identificou o vírus da raiva demonstrou que poderia ser separado por um processo de filtração (SINGH et al., 2017). Na Itália, um médico chamado Negri descobriu, por microscópio, inclusões celulares citoplasmáticas em determinadas células do sistema nervoso central, que ficaram conhecidas por corpúsculos de Negri, e que são de extrema importância para o diagnóstico (FERREIRA, 1968). Este método avançou quando se começou a usar um teste de anticorpos fluorescentes mais sensíveis para o diagnóstico da raiva em 1959. Este e outros notáveis avanços da medicina e tecnologia, como o desenvolvimento de técnicas de cultura celular para a manutenção de células infectadas com o VR, permitiram o aprofundamento e conhecimento científico sobre a transmissão, patogenia, epidemiologia e profilaxia da doença, permitindo sua erradicação em alguns países (BAER, 1991).

Muito mais tarde, pesquisadores do Instituto Pasteur na França mapearam parte do material genético do VR coletado de animais carnívoros e morcegos, a fim de entender melhor a procedência destes vírus. Com essa estratégia, foi possível estimar a sequência dos primeiros vírus da raiva que surgiram, assim como de seus “parentes” mais próximos (HUGHES et al., 2005). Os pesquisadores concluíram que como outros vírus da mesma família, os vírus eram encontrados em insetos há milênios. Há uma grande chance de os morcegos terem sido infectados por vírus ancestrais vindos destes animais. Nos morcegos, os VR foram transmitidos entre espécies e evoluíram. Em algum momento da história, o VR foi transmitido dos quirópteros para os carnívoros, em um processo conhecido como *spillover*, o que pode ter

ocorrido entre 900 e 1500 anos atrás (BADRANE & TORDO, 2001). Atualmente sabe-se que o vírus da raiva que acomete os guaxinins nos EUA procede de morcegos americanos e que, os morcegos da América do Norte, por sua vez, provavelmente foram infectados a partir do contato com morcegos da América Latina no século XVII. Nessa época, o homem alterava massivamente o meio ambiente da América Central com suas colônias e plantações. Dessa forma, os desmatamentos nessa época podem ter ocasionado migrações de morcegos e do VR (BADRANE & TORDO, 2001).

1.2 O AGENTE ETIOLÓGICO E SUAS CARACTERÍSTICAS IMUNOLÓGICAS

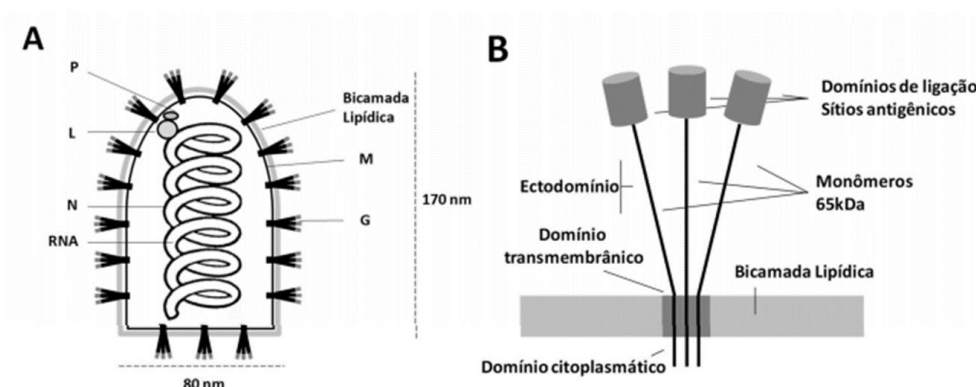
Pertencente à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, o gênero *Lyssavirus* forma um grupo monofilético distinto, baseando-se em árvores de máxima verossimilhança, a partir de sequências completas da proteína L (RUPPRECHT et al., 2002; ICTV, 2018). Possuem em geral forma de projétil, com cerca de 170 nm de comprimento por 70 nm de largura e envelope e uma matriz proteica que isolam o nucleocapsídeo (MURPHY et al. 1999).

O genoma do VR está contido em uma molécula de RNA não segmentado de cadeia simples e polaridade negativa. Contém cinco genes na ordem 3'-N-P-M-G-L-5', que codificam para cinco proteínas diferentes, com funções distintas. O gene N codifica uma nucleoproteína que encapsula o RNA viral; o gene P produz uma fosfoproteína, que é importante não só na transcrição e replicação, mas também para interações com componentes proteicos celulares durante o transporte axoplásmico; o gene M codifica para uma proteína de matriz; o gene G para a glicoproteína, que possui uma porção ligada à membrana e é responsável pela recepção e fusão viral às superfícies celulares; o gene L que codifica uma polimerase para a síntese de RNA (RUPPRECHT et al., 2002; MASATANI et al., 2013; ICTV, 2018). O envelope do vírus é composto de uma única glicoproteína, a RVGP (*rabies virus glycoprotein*) que fica exposta na superfície da partícula viral e tem papel fundamental na patogenia do vírus (WHITT et al. 1991; ASTRAY et al. 2017). Esta é uma proteína trimérica, de aproximadamente 195 kDa, cuja antigenicidade depende da modificação pós-traducional (GAUDIN et al., 1992) é formada por três monômeros que possuem um domínio citoplasmático (44 aminoácidos), um domínio transmembrânico (22 aminoácidos) e um ectodomínio (439 aminoácidos) (GAUDIN et al., 1999; WOJCZYK et al., 2005). O ectodomínio apresenta um domínio de fusão, que interage com proteínas receptoras das células hospedeiras e três sítios imunogênicos: o sítio I é um sítio

linear; o sítio II é um sítio conformacional formado através de uma ponte de dissulfeto pela interação dos sítios IIa e IIb presentes em partes diferentes do monômero; e o sítio III que é um sítio conformacional formado por regiões adjacentes do monômero (Figura 1) (ASTRAY; JORGE; PEREIRA, 2017).

A associação de três monômeros da glicoproteína resulta na homotrimerização da molécula (GAUDIN et al., 1992). A proteína G é o principal antígeno para o desenvolvimento de anticorpos e vacinas contra o vírus da raiva (WAGNER, 1991; MURPHY et al. 1999), as vacinas contendo esse antígeno podem fornecer proteção completa contra o desafio viral (PASTORET e BRONCHIER, 1992; XIANG et al., 1994).

Figura 1 – Representação esquemática do vírus da raiva (A) e da estrutura de sua glicoproteína (B).



Nota: P, fosfoproteína; L, Polimerase; N, ribonucleoproteína; M, proteína de matriz; G, glicoproteína (adaptado de ASTRAY; JORGE; PEREIRA, 2017).

O vírus (RABV) foi classificado e dividido em 16 genótipos/espécies distintos e uma subdivisão em dois filogrupos (ICTV, 2018). O RABV é o mais amplamente distribuído mundialmente, por isso, o mais conhecido e estudado (MARSTON et al., 2007). Dentre esses genótipos/espécies, 14 têm morcegos como seus potenciais reservatórios ou espécies mais frequentemente infectadas (ICTV, 2018).

Acredita-se que a replicação do vírus da raiva seja semelhante à de outros vírus de RNA de cadeia negativa. O vírus se liga às membranas das células hospedeiras através da proteína G, penetra no citoplasma por fusão ou pinocitose. O núcleo inicia a transcrição primária dos cinco RNAs mensageiros monocistrônicos complementares, usando a RNA polimerase dependente de RNA presente no virion. Cada RNA é então traduzido em uma proteína viral individual. Após a síntese das proteínas virais, a replicação do RNA genômico continua com a

síntese do RNA de cadeia positiva de comprimento total, que atua como um modelo para a produção de RNA de cadeia negativa da progênie (RUPPERECHT, 1996).

Grupos de pesquisa do Instituto Pasteur (Paris) e universidades e institutos dos Estados Unidos, desvendaram, no final do século XX, a importância da proteína G para a imunidade à raiva. Foi demonstrado que a proteína G está envolvida na indução de imunidade celular, e que esta contribui de forma determinante para a proteção antiviral (CELIS et al., 1988). Já foi demonstrado que a proteína G é reconhecida tanto por linfócitos T CD4 quanto por linfócitos T CD8. Após o processamento, as células apresentadoras expõem os antígenos virais aos linfócitos, ativando os mecanismos adaptativos, que incluem tanto a imunidade humoral como a mediada por células. A natureza da célula que inicialmente apresenta o antígeno pode determinar a ocorrência de resposta imune ou de tolerância aos epítomos. (MACFARLAN et al., 1984; CELIS et al., 1990; XIANG et al., 1995)

Assim, a apresentação do antígeno por células dendríticas ou macrófagos, com altos níveis de moléculas co-estimuladoras e de receptores de classe II do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), resulta em ativação eficiente dos linfócitos da linhagem T. Ao reconhecer os epítomos, os linfócitos T e B iniciam um processo de diferenciação e multiplicação, produzindo clones T efetores citotóxicos, células T auxiliares (Th) e clones de plasmócitos produtores de anticorpos antivirais, instalando a memória imunológica. Após a apresentação dos antígenos da raiva a linfócitos T CD4 ou CD8, é induzida a produção de citocinas. Os linfócitos com perfil Th1 secretam IL-2, IFN- γ , TNF α e TNF β e estão envolvidas com a imunidade mediada por células e com a mudança de classe de imunoglobulinas para IgG2a em camundongos (WIKTOR et al., 1984; CELIS et al., 1988; CELIS et al., 1990). Já os linfócitos com perfil Th2 secretam as interleucinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 e condicionam a mudança de isótipos para IgG1, IgA e IgE (MAWAS et al., 2001).

O padrão de resposta preferencial de linfócitos T auxiliares, após a imunização com vírus da raiva inativado é predominantemente do tipo Th1 (CELIS et al., 1988; PERRIN et al., 1988; ERTL et al., 1996). Portanto, para uma abordagem utilizada a fim de acessar o padrão da resposta imunológica anti-G é a determinação da razão entre IgG1/IgG2a produzidos após a imunização. Uma quantidade maior de anticorpos do subtipo IgG1 indica a predominância da resposta imune do tipo Th2, enquanto uma maior quantidade de anticorpos IgG2a indica a predominância da resposta imune do tipo Th1 (KAUR et al., 2009). A importância da resposta Th foi confirmada utilizando animais deficientes em CD4, que apresentaram uma diminuição

da produção de anticorpos neutralizantes e da proteção (PERRY e LODMELL, 1991; XIANG et al., 1995).

Embora a resposta mediada por células seja reconhecidamente importante para a proteção, ela atua juntamente com a resposta humoral e a maior parte das vacinas licenciadas hoje se baseia na indução da produção de anticorpos séricos para comprovar sua eficácia (PLOTKIN, 2001).

1.4 SITUAÇÃO DA RAIVA NO MUNDO E SUA EPIDEMIOLOGIA

A raiva é uma doença negligenciada, que apresenta ampla distribuição mundial (KOTAIT et al., 2009). É mantida e transmitida por várias espécies de mamíferos, mas principalmente carnívoros e morcegos (VELASCO-VILLA et al., 2008). Mesmo países que conseguem manter seu *status* livre de raiva, requerem constante monitoramento, quarentena de animais importados e regulamentação para evitar a entrada do vírus ou a introdução de animais infectados (SINGH et al., 2017).

No mundo, a forma mais comum de transmissão da raiva a seres humanos é pela mordida de animais infectados e, de longe, o cão doméstico ainda é a fonte mais importante de infecções para os seres humanos (BAER 1991; BLANTON et al., 2009).

Atualmente morrem cerca de 60 mil pessoas no mundo todo devido à raiva. Por ser uma doença negligenciada, a coleta de dados epidemiológicos é ruim em locais onde não há controle ou vigilância organizados. Dessa forma, o número de mortes é provavelmente subestimado, pois a subnotificação também é uma característica de quase todas as doenças infecciosas nos países em desenvolvimento, que não conseguem registrar 100% das ocorrências (WHO, 2018). Particularmente na Ásia e na África, as mordidas de cães são responsáveis por quase 99% dos casos de raiva em seres humanos (HAMPSON et al., 2015; WHO, 2013). A infecção pode ocorrer por lambidas do cão na superfície da mucosa ou fissuras na pele, porém está mais comumente associada a mordidas severas e profundas, principalmente em crianças. Em contrapartida, morcegos conseguem transmitir o vírus eficientemente por mordidas mais superficiais, que muitas vezes passam despercebidas pelas vítimas (JOHNSON et al., 2010).

De uma forma abrangente podemos separar ciclo da doença em ciclo aéreo e ciclo terrestre. O ciclo terrestre compreende também os animais selvagens, tornando os animais domésticos infectados se houver contato. A propagação da doença envolve a proporção da

densidade populacional do vetor principal, que varia de acordo com cada região, e também depende de características geográficas (KOTAIT et al., 2009).. O tipo de reservatório e transmissão, que pode ocorrer entre diferentes espécies animais e por distintas variantes, têm grande importância na manutenção do vírus na natureza (WHO, 2018).

Na América do Sul, o principal reservatório é o morcego hematófago, *Desmodus rotundus*, devido à sua densidade populacional. Esses animais têm se adaptado e feito uso de abrigos em construções urbanas, aumentando a possibilidade de contato desses animais com pessoas e animais domésticos e, conseqüentemente, aumentando o potencial risco de transmissão de raiva (ALMEIDA et al., 2011). Essa espécie de morcego tem elevada importância também pelo fato de transmitir mais frequentemente a raiva para os herbívoros (KOTAIT et al., 2009). A raiva silvestre terrestre ocorre principalmente no cachorro do mato (*Cerdocyon thous*), o mão pelada (*Procyon lotor*), o sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) e raposas cinzentas (*Urocyon cinereoargenteus*) (FAVORETTO et al., 2006; ANTUNES et al., 2018).

A raiva na pecuária atingiu níveis agravantes nos últimos anos, com estimativas oficiais excedendo 50.000 mortes de bovinos no Brasil (FERNANDES et al., 2017). Assim, a circulação maciça do vírus em áreas selvagens/rurais levou à preocupação de sua transmissão a cães e gatos urbanos. Portanto, a importância da vacinação contínua é clara em populações urbanas de cães e gatos para minimizar o risco de introdução e transmissão para os seres humanos.

Em regiões onde a raiva transmitida por variante de cão foi controlada, há a ocorrência de casos de raiva em cães e gatos com variantes de morcegos, e esses animais, uma vez infectados, podem transmitir a doença principalmente para humanos e para outros animais. O contato dos animais silvestres (várias espécies, variando de acordo com cada região) com os animais domésticos é uma situação alarmante no mundo todo (KOTAIT et al., 2009). Nos Estados Unidos, por exemplo, onde o diagnóstico é mais eficaz, o número de casos em animais de companhia é alto, na grande maioria animais que não foram vacinados e foram infectados por animais silvestres como coiotes (*Canis latrans*), raposas cinzentas (*Urocyon cinereoargenteus*), guaxinins (*Procyon lotor*), gambás (*Mephitis mephitis*) e raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*), além dos quirópteros (de diversos gêneros) que também já foram diagnosticados com a doença (MONROE et al., 2016). Mesmo com a vacina veterinária disponível, os animais silvestres estão em constante contato com os animais domésticos, fazendo com que o ciclo da raiva se mantenha. A interação de seres humanos com animais

suspeitos resulta na necessidade de se observar ou de serem testados centenas de milhares de animais e administração da profilaxia pós-exposição à raiva. Os EUA são um exemplo do mapeamento e vigilância, em uma média anual, entre 60 a 70 cães e mais de 250 gatos são relatados com a doença nos EUA, gerando custos altos com profilaxia pós exposição. Anualmente, os custos variam de 245 a 510 milhões de dólares (CDC, 2017).

1.5 SITUAÇÃO DA RAIVA NO BRASIL

Em 1921 foi relatado e demonstrado no Brasil que as mordidas de morcegos hematófagos transmitiam a raiva aos rebanhos de gado (BERAN, 2000). Além de apresentar forte impacto econômico à agropecuária, este ciclo representa um risco à saúde pública por causa da possibilidade de transmissão aos humanos, pela manipulação de animais raivosos, principalmente por médicos veterinários e tratadores (KOTAIT et al., 2009).

A partir da década de 90, com a utilização da tipificação antigênica e molecular para a denominação das variantes, o ciclo de transmissão da raiva no Brasil ficou mais claro (DIAZ, 1994). No país, circulam quatro variantes (AgV) do *Lyssavirus* da raiva: AgV2-cão, AgV3-morcego *D. rotundus*, AgV4-morcego *Tadarida brasiliensis* e AgV6-morcego *Lasiurus cinereus*; além de linhagens específicas do vírus adaptadas em espécies de morcegos, como a Linhagem Myotis Brazil (OLIVEIRA et al., 2010; ALBAS et al., 2011; MENOZZI et al., 2017).

Como em todo o mundo, o Brasil apresenta uma heterogeneidade em relação aos reservatórios e a ocorrência de casos de raiva que varia de acordo com a região do país. Existem outros reservatórios importantes no Brasil além dos morcegos. No Nordeste, por exemplo, os canídeos silvestres (*Cerdocyon thous*) e saguis (*Callithrix jachus*) (ITO, 2008), assumem papel importante e estão atuando como reservatório do vírus e mantendo uma variante antigênica e genética bastante distinta das que já foram isoladas no país (KOTAIT et al., 2018).

A raiva em morcegos possibilita a circulação do vírus nas áreas urbanas e rurais e o diagnóstico adquire grande importância por possibilitar medidas de controle para impedir novos casos da doença (QUEIROZ et al., 2009). O controle e a importância do quiróptero (hematófago ou não) em muitas áreas das Américas se relacionam não apenas com o controle da infecção em herbívoros, mas também de animais domésticos (SOUZA et al., 2005). Há bastante discussão sobre a infecção no morcego hematófago, alguns autores afirmam que a infecção é

subclínica e que permanece com as secreções respiratórias e saliva contaminada por meses a anos, além de apresentarem alteração de comportamento evoluindo para morte, como em qualquer mamífero (BERAN, 2000). O papel desempenhado pelos morcegos (hematófagos ou não) tem muita importância na epidemiologia da raiva, além de serem muitas vezes responsáveis pela manutenção de outros vírus emergentes (SOUZA et al., 2005). No Brasil, há cerca de 178 espécies de quirópteros (NOGUEIRA et al., 2014), sendo que a lista de espécies positivas para raiva já inclui 41 delas (SODRÉ et al., 2010).

A frequência do diagnóstico da raiva em morcegos vem crescendo a cada ano no Brasil. Em 2016, 11 cães, 8 gatos e 104 morcegos foram diagnosticados, os não hematófagos foram 85 positivos. Em 2017, foram 14 cães, 4 gatos e 288 morcegos positivos, sendo os não hematófagos a grande maioria (265). Já em 2018, foram diagnosticados casos de raiva em 71 morcegos não hematófagos e 6 hematófagos (a grande maioria na região sudeste do país). No mesmo ano, foram constatados 83 casos de raiva canina, 8 casos de raiva felina e um caso de raiva humana (BRASIL, 2018).

O primeiro registro mundial do ciclo denominado secundário (morcego/felino/homem) ocorreu em área urbana do município de Dracena, interior do Estado de São Paulo em 2001 (KOTAIT, 2003). Em 2009, novamente um caso de raiva humana do ciclo secundário foi relatado: uma mulher foi a óbito por raiva após ser agredida por sua gata raivosa, que havia anteriormente capturado um morcego infectado com o vírus e que, presumivelmente, não era hematófago. Na região de Ribeirão Preto, Campinas, Botucatu e Piracicaba o ciclo de transmissão da raiva é geralmente verificado em morcegos e em 2016, seis morcegos foram diagnosticados com a doença. Na região de Caminas, em 2017, foram verificados 12 casos de raiva em morcegos (DEVISA, 2017). Um gato de cinco meses teve sua morte confirmada por raiva pelo Instituto Pasteur após entrar em contato com um morcego e a região sudeste já teve um caso felino em 2014. Em 2015, os dois casos de raiva humana no Brasil ocorreram na Paraíba transmitido por gato, sendo identificado com a variante de morcego. Em 2016 foram notificados dois casos de raiva humana, um em Boa Vista/RR, transmitido por felino infectado com a variante 3 (transmissão secundária) e um caso em Iracema/CE por morcego (*Desmodus rotundus*), também pela variante 3. Nos casos de infecção nos felinos domésticos as variantes encontradas foram AgV3, AgV2 - *C. thous* e Linhagem Myotis), (BRASIL, 2018).

Em 2017, em Pernambuco, houve um caso de raiva humana após agressão de um gato de rua infectado com a variante 3, demonstrado a importância dos animais doméstico como

transmissores secundários da raiva (*spillover*) e a importância da vacinação também nesta espécie (BRASIL, 2018).

Em maio de 2019, vimos o ciclo se repetir, quando uma mulher (Gravatal – SC) foi mordida por um gato e vinte dias depois apresentou sintomas e faleceu. Foi o primeiro caso confirmado em Santa Catarina de raiva humana desde 1981, segundo a Diretoria de Vigilância Epidemiológica (Dive-SC).

Esses casos tendem a se tornar cada vez mais frequentes e são um problema de saúde pública, visto que com o aumento da frequência do número de casos em animais, principalmente os felinos domésticos não vacinados, o número de casos de raiva humana voltou a crescer. O que reforça ainda a importância da relação entre felinos e morcegos.

Os felinos domésticos têm baixas taxas de cobertura vacinal e por apresentarem maior instinto predatório, são mais vulneráveis que os cães a se infectar pelo vírus a partir do contato com morcegos (WOODS et al., 2003). Além disso, um levantamento feito pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (Abinpet) em 2016, mostrou que o Brasil tem a segunda maior população de pets do mundo, com 22,1 milhões de felinos e 52,2 milhões de cachorros. O ponto mais interessante é que a população de gatos se multiplica em maior proporção e deve predominar em menos de dez anos.

No ciclo silvestre da raiva no Brasil, o aumento da densidade populacional de morcegos é extremamente importante e está atrelado ao meio ambiente. Fatores que devem ser esclarecidos são: o motivo da invasão de morcegos em diversas áreas e o aumento do número destes animais (e consequentemente dos ataques) em relação aos anos anteriores. A densidade populacional de morcegos hematófagos costuma ser mais alta em áreas com animais domésticos, especialmente bovinos que são animais com comportamento gregário, que vivem em grupos. O homem modificou ecossistemas naturais para que houvesse cada vez mais espaço para o gado, que serviu de alimento para os morcegos que estavam na área. No entanto, nas últimas décadas o Sudeste do Brasil trocou a pastagem pelos campos de cana-de-açúcar, e juntamente com o grave desmatamento da Mata Atlântica, os morcegos tiveram que encontrar outra fonte de alimento. Na região do Pantanal e da Mata Atlântica, com a proliferação de javalis e javaporcos (animais resultantes do cruzamento entre javalis e suínos) na região, fez com que os morcegos tivessem ainda outra fonte de alimento (GALETTI et al., 2016).

1.6 SOROLOGIA DE RAIVA

A sorologia permite avaliar o nível de anticorpos de indivíduos vacinados contra a raiva, que é também utilizado para animais. Em seres humanos, segundo recomendação da Organização Mundial da Saúde, indivíduos expostos a situações de risco devem receber tratamento profilático pré-exposição contra raiva e coletar sangue para titulação de anticorpos circulantes e, se necessário, receber reforço vacinal. A avaliação sorológica deve ser repetida semestralmente ou anualmente, de acordo com a intensidade e/ou gravidade de risco ao qual está exposto o profissional. Pessoas com exposição continuada, como pesquisadores, profissionais de laboratório que manipulam o vírus e veterinários que atuam em áreas de epizootia, devem ser avaliadas semestralmente. Ninguém deve ser exposto conscientemente a riscos, sem a confirmação sorológica de títulos iguais ou superiores a 0,5 UI/mL.

Dentre os testes sorológicos, a soroneutralização em camundongos ou soroneutralização em células (inibição de focos fluorescentes) e o teste de ELISA (ensaio imunoenzimático) são os mais amplamente utilizados. A soroneutralização em camundongos é o teste mais antigo para a dosagem de anticorpos, porém vem sendo substituída pela soroneutralização em células. Neste teste uma quantidade fixa de vírus (50 DL50% de CVS) é misturada às diluições seriadas de soro teste e após um período de incubação para permitir a neutralização viral, alíquotas de cada diluição são inoculadas em camundongos, via intacerebral. Quando a diluição dos soros contiver anticorpos suficientes, o animal sobreviverá (quantidade suficiente de anticorpos neutralizantes) e poderá ser feita a quantificação dos anticorpos presentes no soro. Caso contrário, os animais apresentarão sintomas e morrerão entre 7 e 21 dias (KOTAIT et al., 2009).

A soroneutralização em células, ainda é o teste mais aceito em substituição à tradicional soroneutralização em camundongos. Consiste na adição de células BHK à mistura previamente incubada de diluições de soro teste e dose fixa de vírus. Em algumas horas as monocamadas são formadas e após um período de incubação será verificada a replicação viral, fixando as monocamadas e corando com fluoresceína conjugada à imunoglobulina anti-rábica. Na ausência de replicação a fluorescência específica não é observada, sinalizando que anticorpos específicos existentes no soro teste inibiram a ação do vírus, neutralizando-o e protegendo as monocamadas celulares da infecção (KOTAIT et al., 2009). A presença de fatores inespecíficos que interferem com as células ou com o vírus pode resultar em reações falso-positivas, como por exemplo, a hemólise do soro (QUINN et al., 2005).

Embora o RFFIT tenha sido extensivamente avaliado e aceito para titulação de soros pós-vacinais humanos, o manual da OIE substituiu o uso do RFFIT pelo teste de Neutralização de Vírus de Anticorpos Fluorescentes (FAVN) para testar soros animais (CLIQUET et al., 1996). No entanto, em certos grupos de animais vacinados imunossuprimidos e de fraca reação, ambos os métodos podem fornecer respostas de anticorpos “falso positivo” e “falso negativo” nos casos em que apenas um deles é utilizado (BRIGGS et al., 1998).

A imunidade do animal contra o vírus raiva varia conforme a espécie, portanto a interpretação dos resultados dos testes pode ser difícil, uma vez que a resposta imune do hospedeiro pode variar ainda entre os indivíduos de uma mesma espécie. Outros fatores como qualidade da vacina, dose, idade da vacinação primária, estado nutricional, presença de infecções concomitantes e capacidade imunológica individual também podem interferir na imunidade do indivíduo (SEGHAIER et al., 1999; ALMEIDA et al., 1997; MORTERS et al., 2014).

Mesmo o RFFIT ainda sendo considerado padrão ouro, ele requer mão de obra treinada, cultura de células e instalações de microscopia fluorescente, além de medidas de biossegurança adequadas para trabalhar com vírus vivo. O RFFIT é sensível à citotoxicidade em soros de baixa qualidade e, inibidores inespecíficos do vírus em soros podem produzir resultados falso-positivos. A dosagem de anticorpos neutralizantes fornece uma medida laboratorial da habilidade da amostra de soro do indivíduo/animal em neutralizar o vírus da raiva. Embora o valor de 0,5 UI/mL seja tradicionalmente considerado protetor, títulos de anticorpos neutralizantes menores já foram encontrados em animais que sobreviveram ao desafio. Títulos inferiores a 0,5 UI em ensaio de RIFFT são considerados insuficientes para a proteção. (MANI et al., 2013).

Inúmeros testes sorológicos foram desenvolvidos em vários países, já existindo muitos “kits” comerciais para a realização do teste de ELISA, que determina a existência de anticorpos anti-rábicos em soros. Para isso utiliza-se como antígeno o vírus rábico semi-purificado produzido em células BHK, realizando a prova em placas de poliestireno. Como conjugado, utiliza-se anticorpos anti-IgG humana, conjugados com peroxidase. Esse teste apresenta a rapidez requerida nos testes de avaliação de anticorpos (KOTAIT et al., 2009).

Não há como comparar testes que utilizam o vírus da raiva inteiro e testes que utilizam somente a glicoproteína do vírus da raiva como o antígeno (como é o caso do ELISA), pois na maioria das amostras, a maioria dos anticorpos contra o VR que estão sendo analisados será

direcionada contra a RVGP, mas os anticorpos para os antígenos nucleoproteína (N) e fosfoproteína (P) do vírus não são incomuns e serão detectados em um ELISA indireto quando este for baseado no vírus inteiro (GRASSI et al., 1989). Na medição da potência de anticorpos monoclonais (e neutralizantes), é importante considerar que a especificidade de um anticorpo para um único epítipo de uma cepa de vírus de desafio (CVS) pode não ser suficiente para neutralizá-lo por inteiro (MARISSEM et al., 2005; POLONIS et al., 2008).

Os testes sorológicos são muito importantes também em animais que estejam saindo ou chegando a um novo país. Ele nos dá uma ideia se devemos ou não manter os animais em quarentena ou quanto ela deve durar. Esses pequenos desvios nos testes podem ter um impacto econômico considerável para países onde a raiva não ocorre ou foi erradicada (BRIGGS et al., 1998; ONDREJKOVÁ et al., 2002). Além disso, deve ser levado em consideração que os níveis de proteção podem diferir entre espécies e pelo teste usado para titulação desses anticorpos neutralizantes, por esse motivo é indicada a utilização de mais de um teste (MOORE et al., 2017).

1.7 SAÚDE ÚNICA

Alterações climáticas, poluição, degradação ou fragmentação de ecossistemas e aumento da densidade humana invadindo ambientes selvagens podem alterar as relações entre predadores, presas, competidores e recicladores e, conseqüentemente, a epidemiologia de enfermidades infecciosas (BOSSART, 2011; WALTZEK et al., 2012). Animais silvestres são o principal reservatório de novas infecções que infectam seres humanos diretamente ou através de espécies domésticas ou peri-domésticas (animais sinantrópicos), ameaçando a saúde das pessoas ou de rebanhos. De maneira inversa, também a vida selvagem é ameaçada pelas doenças de outras espécies, incluindo os seres humanos (LLOYD-SMITH, 2017).

Por isso é de extrema importância que a saúde pública seja encarada de forma ampla, já que 60% das doenças humanas emergentes são de origem animal e podem ser prevenidas e combatidas por meio da atuação integrada dos profissionais da área da saúde. Além do consumo de produtos de origem animal, o vínculo entre tutores e seus pets cresce a cada dia, ampliando as possibilidades de disseminação de doenças transmissíveis entre animais e seres humanos. Estudos tem enfatizado a importância de espécies selvagens, tanto no surgimento de novas

infecções e reemergência de patógenos já conhecidos, quanto na manutenção desses patógenos (WALTZEK et al., 2012). O número de doenças cuja proliferação se dá por problemas ambientais e animais sinantrópicos é crescente.

Das 1.461 doenças reconhecidas em humanos, aproximadamente 60% são devidas a patógenos de “multi-hospedeiros” caracterizados por seu movimento através das espécies (TORREY & YOLKEN, 2005). Nossa crescente interdependência com os animais e seus produtos pode ser o fator de risco mais crítico para a saúde e bem-estar humano em relação às doenças infecciosas. Nas últimas três décadas aproximadamente 75% das novas doenças infecciosas humanas emergentes tiveram origem zoonótica (TAYLOR et al., 2001). Nesse sentido, houve crescimento e preocupação por parte de diversos países e órgãos internacionais de saúde e conservação animais, quanto à necessidade de monitoramento de ocorrência e da distribuição de enfermidades infecciosas em populações de animais silvestres.

Em 2017, Olival et al. acumularam um banco de dados de mais de 2.800 associações de animais/vírus que abrangem todos os vírus conhecidos de mamíferos e todas as principais ordens de mamíferos terrestres. Usando modelos estatísticos para tentar avaliar todas as hipóteses de uma vez, conseguiram demonstrar quantos vírus são transportados por hospedeiros mamíferos. Morcegos, primatas e roedores carregam as maiores proporções de vírus zoonóticos, mas apenas os morcegos carregam significativamente mais do que outras espécies. Essa análise também solidificou a ideia intuitiva de que aqueles vírus que são capazes de infectar uma ampla gama de animais são mais propensos a infectar seres humanos. Essa abordagem rendeu previsões atraentes das espécies e regiões que mais provavelmente abrigam zoonoses ausentes, como morcegos no norte da América do Sul e carnívoros na África Oriental. Embora existam algumas ressalvas e vieses para algumas regiões, essas descobertas podem orientar futuros investimentos em pesquisas virológicas globais.

A saúde humana está intimamente relacionada à saúde ambiental e animal. A manutenção da saúde nas várias esferas requer essa abordagem interdisciplinar, conceito conhecido como “Uma saúde, Uma medicina” (*One Health, One Medicine*). Isso faz com que o contexto fique mais amplo visando o equilíbrio que há entre essas esferas, pois essa é uma estratégia que visa justamente melhor compreender e abordar as questões contemporâneas de saúde criadas pela convergência dos domínios humano, animal e ambiental (KING, 2008; BOSSART, 2011).

1.8 A VACINA CONTRA RAIVA

A vacina contra a raiva visa induzir a produção de anticorpos e células de memória, evitando que a doença se instale (HAGIWARA & MEGID, 2004). O desenvolvimento de vacinas que previnem a raiva tem uma longa e distinta história, com a mais antiga compreensão científica dos vírus e os mecanismos de proteção imune contra a doença (HICKS et al., 2012).

Louis Pasteur desenvolveu a primeira vacina eficaz contra a raiva. O experimento começou pela inoculação da saliva de um menino doente em coelho, sem muito sucesso. No entanto, o estudo científico da raiva só se iniciaria com a colaboração de outros pesquisadores como Thuillier, Roux e Chamberland que apresentaram em 1881, o isolamento de um microorganismo. Em 1884, Pasteur declarou que o VR se encontra disseminado nas glândulas maxilares, parótidas e sublinguais e em todo o sistema nervoso (central e periférico) (KOPROWISKI, 1996).

Também inoculou coelhos com material proveniente do cérebro de vacas infectadas com raiva e usou suspensões da medula destes coelhos para infectar outros coelhos. Depois de sucessivas experiências iguais, os resultados foram coelhos imunizados contra a raiva. Em 1885, Pasteur experimentou esse método de atenuação do vírus que lhe permitiu tentar o tratamento preventivo da raiva. A vacina foi usada pela primeira vez para tratar um menino, Joseph Meister, vítima de ferimentos graves na coxa quando atacado um cão, em 6 de julho de 1885 (BARDENAVE, 2003). Essa primeira vacina foi derivada de medula espinhal de um coelho inoculado que morreu de raiva 15 dias antes (DEBRÉ, 1994). Nos 10 dias que se seguiram, o garoto recebeu 12 doses adicionais de vírus atenuado e progressivamente mais virulento, a fim de gerar rapidamente uma resposta imune, na tentativa de criar anticorpos antes que a infecção se instalasse (MURPHY, 2013).

A abordagem de Pasteur mostrou-se altamente eficaz e a metodologia se espalhou amplamente. Dois problemas foram associados à abordagem. A primeira foi a consistência da inativação, que em alguns casos levou os pacientes que receberam a vacina a desenvolver a raiva vacinal e, em segundo lugar, a capacidade de produzir uma vacina suficiente em coelhos para atender à demanda de tratamento, isto é, era necessário o desenvolvimento de melhores métodos para produzir uma maior quantidade desta vacina (FLINT, et al. 2004; HICKS et al., 2012).

Esses problemas foram resolvidos pela inativação do vírus extraído do cérebro de ovelhas ou cabras infectadas, com agentes químicos como o fenol (SEMPLE, 1911). Essas vacinas foram bem-sucedidas, mas, assim como a vacina original de Pasteur, continham altos níveis de mielina que causavam sensibilização em alguns pacientes e, em casos extremos, encefalite fatal (HICKS et al., 2012). Para isso, buscaram-se alternativas como a inativação de vírus produzidos em embriões de galinha infectados (KOPROWSKI & COX, 1948) ou produzidos em cérebro de camundongos neonatos infectados que apresentam um nível menor de mielina quando comparado ao cérebro do animal adulto (FUENZALIDA et al., 1964). No entanto, mesmo essas abordagens não foram totalmente livres de reações auto-imunes, e a Organização Mundial da Saúde (OMS) não recomenda o uso de vacinas contendo tecido nervoso, embora elas ainda sejam usadas em vários países (HICKS et al., 2012). Nos poucos lugares em que as vacinas do tecido nervoso permanecem em uso, elas contribuem para a falha vacinal e causam efeitos colaterais graves que podem durar de 4 a 7 meses. Até hoje há a produção de vacinas de tecido nervoso tanto para uso humano (Argentina e Bolívia) quanto para uso animal (na Bolívia, El Salvador e Honduras) (WHO, 2018).

Na vacinação contra raiva, houveram basicamente três gerações de vacinas: a primeira geração é a que utiliza cérebros de coelhos, ovelhas, vacas, cavalos e outros animais como substrato para o cultivo de vírus. A segunda geração usa culturas de células para a produção de vacina contra a raiva. Em 1960, Fenje anunciou a primeira vacina a ser produzida no tecido renal do hamster, em células BHK (FENJE, 1960).

A segunda geração de produção de vacinas contra a raiva surgiu do desenvolvimento de cultura celular para propagação de vírus. A primeira vacina de cultura de tecidos foi derivada do vírus cultivado em células de rim de hamster (células BHK- *Baby Hamster Kidney*) (KISSLING, 1958). Isto foi seguido pela multiplicação de vírus da raiva fixo numa linhagem celular diplóide humana (WIKTOR et al., 1964). A linhagem celular derivada de pulmão WI-38 foi usada inicialmente, mas foi posteriormente substituída para a linhagem celular MRC-5, que resultou no desenvolvimento e licenciamento de uma vacina produzida em células diplóides humanas (HDCV - *human diploid cell vaccine*) em meados da década de 1970. Uma alternativa ao HDCV foi o uso de células embrionárias de galinha purificadas (PCEC - *Purified chick embryo cell*) (KONDO, 1965).

Já a terceira geração de vacinas engloba a biotecnologia na produção de vacinas recombinantes derivadas da RVGP, amplamente utilizada no controle da doença em animais

silvestres. A RVGP tem sido expressa em células de *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (células S2), um sistema amplamente estudado pelo grupo de imunologia viral do Instituto Butantan. O sistema foi considerado adequado para a expressão da RVGP imunogênica (ASTRAY et al., 2008; LEMOS et al., 2009) e se mostrou capaz de proteger animais contra a infecção experimental com o VR, sendo que a imunização foi efetuada com a proteína não purificada (YOKOMIZO et al., 2007).

As vacinas contra raiva, tanto de uso humano como uso em animais, são todas de vírus inativado. A vacina utilizada nos programas de saúde pública no Brasil é a vacina produzida em cultura de células Vero (*Purified Vero Cell Vaccine*) e, em casos de reação de hipersensibilidade, utiliza-se a vacina produzida em cultura de células diploides humanas (*human Diploid Cell Vaccine* – HDCV). Ambas são bem toleradas e apresentam resposta semelhantes (COSTA et al., 2000).

Cada lote de vacina contra raiva liberada para uso deve possuir uma potência adequada. O teste de potência recomendado pela Organização Mundial de Saúde para a vacina de raiva é o *National Institutes of Health* (NIH), baseado na vacinação de grupos de camundongos com múltiplas diluições da vacina, com posterior desafio viral com a amostra padrão CVS (WILBUR; AUBERT, 1999). Apesar dos inúmeros ajustes ao longo de anos de existência, o teste NIH permanece sendo alvo de muitas críticas, por apresentar desvantagens intrínsecas à sua metodologia, como a via de administração da dose do vírus desafio em camundongos, que não mimetiza a infecção natural pelo VR, a amostra do vírus da raiva padrão CVS apresenta patogenicidade e neurotropismo diferentes da maioria das amostras isoladas a campo, a via intraperitoneal para a vacinação, com intervalo de sete dias, pode levar a uma resposta imune diferente daquela induzida pela vacinação intramuscular realizada e ainda baixa reprodutibilidade do método (BARTH et al., 1988; WUNDERLI et al., 2006).

No Brasil, até 2002 era utilizada a vacina tipo Fuenzalida & Palacios modificada. Segundo o Ministério da Saúde, a partir de janeiro de 2003 passou-se a utilizar somente vacinas em culturas de células em todo o país. Como esse imunobiológico não é produzido no Brasil, o mesmo vem sendo adquirido de laboratórios estrangeiros e embalado no Instituto Butantan, para então ser distribuído pelo ministério da Saúde a todos os Estados.

1.8.1 Vacinas contra a raiva para humanos

Ao contrário de todas as outras vacinas, a vacina da raiva pode ser administrada tanto antes quanto após a exposição ao vírus. A vacinação pré-exposição é apropriada para viajantes a regiões endêmicas de raiva, veterinários e pesquisadores que trabalham com o vírus.

A vacinação pós-exposição é possível porque o evento de exposição, geralmente uma mordida, é facilmente identificável e o período de incubação da doença tem duração suficiente para que a vacinação possa construir uma resposta imune protetora mais rápida. Isto se dá principalmente por meio da produção de anticorpos neutralizantes. A vacinação pós-exposição pode ser acompanhada pela injeção de imunoglobulina contra raiva de origem humana (HRIG) ou equina (ERIG), e é referida coletivamente como profilaxia pós-exposição (PEP - *post-exposure prophylaxis*). A profilaxia pode ser feita ou não, a ser decidido pelo nível de exposição da pessoa (HICKS et al., 2012).

O esquema PEP varia de acordo com a gravidade do ferimento e do animal que fez a agressão. Em casos graves, o esquema profilático com soro e 4 (quatro) doses de vacina nos dias 0, 3, 7 e 14, pela via intramuscular. O esquema utilizado varia de acordo com o protocolo médico e com análise de cada situação. Em geral, o esquema de vacinação pré-exposição tem esquema de 3 (três) doses, aplicadas nos dias: 0, 7, 28 administrada pela via intradérmica. Após o décimo quarto dia da última dose, deve ser feito o controle sorológico, que deve atingir um título de anticorpos referente a $> 0,5$ UI/ml para ser considerado satisfatório. Em caso de título insatisfatório, deverá ser aplicada uma dose reforço e a sorologia avaliada novamente depois de 14 dias (Ministério da Saúde, 2017).

1.8.2 Vacinas de raiva para animais domésticos

Em 1921 a vacina utilizada por Pasteur foi adaptada para o uso em cães domésticos, porém ainda com alto número de reações adversas nos animais (BAER, 1991). Segundo Friedberger, Hogyes e Protopopoff, estudos seguintes foram realizados para melhorar a segurança e eficácia da vacina contra a raiva em cães. Em 1927, na 1ª Conferência Internacional de Raiva, ficou definido que o vírus para a vacina canina deveria ser inativado para que não houvesse reversão da patogenicidade (SCHOEING, 1930).

As vacinas originadas de tecido nervoso, inativadas com fenol, foram usadas nas décadas seguintes, sendo que frequentemente causavam reações neurológicas pós-vacinais, inclusive levando à morte o animal vacinado, o que levou a estudos para o desenvolvimento de melhores vacinas (BRIGGS et al. 2002). Assim, foram desenvolvidas as vacinas *low-egg-passage* (LEP), que eram constituídas por vírus de baixa passagem (136 passagens) em ovos embrionados de galinhas ou “chick-embryo-origin” (CEO), utilizando em passagens seriadas a cepa Flury (VR humano) até a década de 1950 (KOPROWSKI & COX, 1948). As vacinas LEP ocasionalmente causavam raiva em filhotes de cães e gatos, o que levou ao desenvolvimento das vacinas *high-egg-passage* (HEP) ou de muitas passagens (205 passagens) em ovos embrionados, sendo esta segura para uso em filhotes de cães com 3 meses de idade, bovinos e gatos (BRIGGS et al. 2002).

Vários tipos de vacinas podem ser distinguidos entre as vacinas veterinárias de segunda geração, dependendo se são vivas ou inativadas, de acordo com a cepa do VR utilizada e as características do substrato celular escolhido para a replicação viral. As vacinas foram com o decorrer do tempo sendo aperfeiçoadas, visando segurança e eficácia (ANTUNES et al., 2012). Muito progresso tem sido feito na produção de vacinas para uso animal durante as últimas duas décadas, com o uso crescente de linhagens celulares contínuas como substrato e a adoção da tecnologia de biorreação para a produção de antígeno. Estas vacinas são produzidas para administração a animais domésticos por via parenteral e também são usadas em animais de produção (HICKS et al., 2012).

As vacinas de vírus vivo modificado (MLV) originadas de “*Tissue Cells*” (TC) produzem poucas reações alérgicas se comparadas com as de embriões de galinha, mas a Organização Mundial da Saúde - *World Health Organization* (WHO) não recomenda o uso destas MLV em animais por via parenteral (WHO, 2004). Mesmo que as MLV tenham provado o seu valor, o uso de vacinas inativadas está substituindo progressivamente as MLV, muito pela questão da segurança (BRIGGS et al. 2002; ANTUNES et al., 2012).

Vacinas de cultura celular, altamente imunogênicas, inativadas para imunização de cães por via parenteral, estão agora amplamente disponíveis no mercado internacional a um custo acessível, mesmo em países em desenvolvimento. Além disso, a tendência para a transferência ou aquisição de tecnologia moderna de cultura celular, para a produção de vacinas parenterais veterinárias, está aumentando nos países em desenvolvimento, particularmente na Ásia. Por serem inativadas, precisam de altas concentrações virais, que são obtidas pelo crescimento do

vírus em tecido cerebral de coelhos, células BHK, embriões de galinha ou células VERO (isoladas de células epiteliais de rim de macaco verde da África). As vacinas produzidas em tecido cerebral, embora inativadas, são responsáveis por encefalomielite em animais e embora autorizadas a serem utilizadas em animais de companhia com mínimo de 3 meses de idade (RECLARD, 1996), não são recomendadas hoje em dia (ANTUNES et al., 2012).

O aumento do uso de vacinas inativadas para a imunização animal pode ser esperado como resultado de melhorias recentes nas técnicas de produção de vacinas (HICKS et al., 2012). O método mais apropriado para inativação do vírus é o que se baseia no uso da β -propiolactona. Após a inativação é adicionado o adjuvante altamente purificado (geralmente hidróxido de alumínio), o que permite maior estabilidade e segurança (PRECAUSTA & SOULEBOT, 1991).

Para campanhas de vacinação canina em massa, o uso da vacina inativada é altamente recomendável. O manejo da vacina inativada a campo é mais fácil do que o da vacina viva, uma vez que é menos sensível a mudanças na temperatura. Além disso, acidentes de auto-inoculação não representam risco para o vacinador. A vacinação parenteral com vacina derivada de tecido de cultivo celular foi extensivamente utilizada desde 1970 em todos os continentes do mundo (HICKS et al., 2012).

Mais recentemente, uma terceira geração de vacinas utilizando um vetor viral contra raiva foi desenvolvida usando tecnologia recombinante, para a vacinação de animais silvestres e domésticos. Dependendo do sistema de expressão, estas vacinas são usadas via parenteral ou oral. A Purevax Rabies, que utiliza como vetor o vírus canarypox recombinante é utilizada para vacinação em felinos domésticos a partir de 12 semanas de idade com reforço um ano após a primeira vacinação e depois em intervalos de até 3 anos (AMANN et al., 2013). A vantagem dos vetores virais reside em sua capacidade de entrar nas células alvo, se ligando aos receptores da célula e estimulando a resposta imune inata. A desvantagem das vacinas com vetores virais é que são mais custosas, e via de regra, elas só podem ser usadas uma vez em um indivíduo, pois os anticorpos neutralizantes induzidos contra o vetor reduzirão a eficácia das doses de reforço (FITZGERALD et al., 2003; TATSIS et al., 2009).

1.8.3 Vacinas de raiva para animais silvestres

Para animais silvestres estão disponíveis vacinas orais contra raiva (ORV). Esse tipo de vacina começou a ser utilizado na Suíça, com o uso de iscas para raposas contendo vírus

atenuado derivado da cepa *Street Alabama Duferin* (SAD) (WANDELER et al., 1988). As vacinas orais contra a raiva são amplamente utilizadas em raposas na Europa e em guaxinins nos EUA (HICKS et al., 2012). A imunização oral de animais selvagens foi primeiramente considerada como uma abordagem potencial para o controle da raiva na década de 1970, após a manipulação genética do VR em condições de laboratório produzir formas menos virulentas. Avanços posteriores da biotecnologia produziram um vetor de *Vaccinia* recombinante expressando o gene da glicoproteína do vírus da raiva (ESPOSITO et al., 1987).

Na década de 90, a cepa ERA (*Evelyn Rokitnicki Abelseth* – vírus vivo modificado derivado da SAD) era utilizada, porém foi substituída por poder causar a raiva clínica em gatos (ESH et al., 1982). Derivada de ERA, a SAD Bern foi adaptada em cultivo celular e utilizada como vacina oral. Desta última ainda derivaram outras como a SAD B 19 e SAD 5/88, que ainda apresentava problemas por ser patogênica para alguns roedores. Ainda derivada da cepa SAD Bern vieram as cepas SAG-1 e SAG-2 (*SAD Avirulent Gif*). A SAG 2, que é a cepa de escolha, é uma cepa de vírus vivo modificado selecionado da cepa SAD Bern após seleção de anticorpos monoclonais. Embora tenha sido de grande ajuda para controlar a raiva no ciclo silvestre, ORV são sempre baseadas em replicação de vírus competentes, ou seja, a replicação viral primária é necessária, o vírus precisa ser processado e absorvido na cavidade oral para desenvolver uma resposta imune, uma vez que no trato gastrointestinal provavelmente seria destruído. Além disso, também podem ser limitadas devido à termoestabilidade dos vírus RNA (FEHLNER-GARDINER et al., 2008; MAKI et al., 2017) e eficácia variável da imunização oral em algumas espécies-alvo, principalmente reservatórios na América do Norte como o gambá (*Didelphis marsupialis*) (RUPPRECHT et al., 1990; TOLSON et al., 1990; VOS et al., 2017).

A natureza da resposta imune intestinal depende de como o antígeno é apresentado para as células T CD4⁺ pelas células dendríticas (MOWAT, 2004). Ao contrário das vacinas convencionais injetadas, aquelas administradas por via mucosa podem desencadear as respostas imunes das mucosas como primeira linha de defesa no portal de entrada de patógenos e respostas imunes sistêmicas que neutralizam os patógenos que penetraram nessa barreira (BOYAKA & FUJIIHASHI, 2019).

Estudos recentes em animais e em humanos mostraram que o sistema imune de mucosa, que é caracterizado por anticorpos IgA como o principal fator de defesa humoral, contém tecidos linfóides especializados onde antígenos são absorvidos e induzem respostas de células

B e T. A proteção efetiva contra patógenos virulentos na mucosa requer respostas imunológicas profiláticas que podem ser alcançadas por meio de vacinas nas mucosas. Este conhecimento conduziu a abordagens práticas para a construção e entrega de vacinas em locais indutivos das mucosas, a fim de induzir a proteção do hospedeiro nas superfícies das mucosas onde a infecção realmente ocorre (MCGHEE et al., 1992; BOYAKA & FUJIHASHI, 2019).

A via oral já é utilizada em países desenvolvidos; como é o caso da RABORAL V-RG® onde sua aplicação a campo contribuiu para o controle da raiva silvestre de três países europeus (Bélgica, França e Luxemburgo) e da variante cão/coiote dos Estados Unidos da América (EUA). Um programa de barreira de vacinação oral contra raiva (ORV) de longo prazo nos EUA está impedindo a expansão geográfica substancial da variante do VR de guaxinim. A RABORAL V-RG também tem sido usada para controlar a raiva na vida selvagem em Israel por mais de uma década (MAKI et al., 2017). A dificuldade de se estabelecer uma vacina oral contra a raiva, que se adeque não só aos animais selvagens, está na resposta a antígenos administrados oralmente que geralmente é baixa. A propensão do sistema imune intestinal de gerar tolerância a antígenos não invasivos apresenta um desafio enorme ao desenvolvimento de novas vacinas oralmente ativas, compreendendo antígenos purificados ou recombinantes. Muitos estudos consideram o uso de substâncias que possam funcionar como adjuvantes orais, para melhorar (por diversos mecanismos) tanto a imunidade secretora quanto a sistêmica (MCGHEE et al., 1992; MOWAT, 2005).

1.8.4 Adjuvantes

A vacinação com antígenos purificados, subunidades ou vacinas virais sintéticas geralmente resulta na indução modesta de anticorpo e resposta de células T e requer múltiplas doses para induzir respostas de anticorpos suficientes (RIESE et al., 2013). Para melhorar a resposta imunológica recorre-se frequentemente à adição de adjuvantes à formulação vacinal. A adição de um adjuvante a um antígeno vacinal leva a várias vantagens, incluindo a preservação da dose e a indução de uma resposta imune mais rápida, ampla e forte (PELLEGRINO et al., 2015; REED et al., 2013). O uso de adjuvantes também pode reduzir a quantidade de antígeno purificado necessário para uma imunização bem-sucedida, tornando a produção de vacinas mais econômica e viável.

A combinação de um imunoregulador sintético de baixo peso molecular com antígenos pode modular os compartimentos do sistema imunológico. Até o momento, a questão da segurança do adjuvante representa o maior obstáculo para o desenvolvimento de novas formulações (EDELMAN, 1980).

O objetivo daqueles que trabalham no campo das vacinas contra raiva é desenvolver uma vacina satisfatória que seja capaz de fornecer uma resposta sorológica mais rápida, mais forte e duradoura. Há evidências crescentes nos últimos anos de que as vacinas virais e recombinantes podem ser significativamente potencializadas pela adição de adjuvantes. Portanto, os adjuvantes devem ser explorados para aumentar a potência das preparações para uso veterinário.

1.8.4.1 Monofosforil Lipídeo A (MPLA)

O monofosforil lipídeo A de *Bordetella pertussis* (MPLA) foi produzido pelo Instituto Butantan pela hidrólise ácida de LPS que é o componente majoritário nas membranas de superfície das bactérias Gram negativas. Uma das regiões dessa molécula, é a porção lipídeo A, ancorada na membrana externa, que foi estudada como molécula imunoestimulatória combinada com o $Al(OH)_3$ (hidróxido de alumínio) em uma vacina de influenza (QUINTILIO et al., 2009).

O MPLA é 99 % menos tóxico que o lipídeo A, o que torna interessante seu uso como adjuvante (ROMERO et al., 2011). Esta molécula também interage com proteínas adaptadoras e com o receptor TLR4, sem provocar a expressão de citocinas pró-inflamatórias, mas mantendo ou aumentando fatores e atividades relacionadas com resposta imune o tipo celular (COATS et al., 2011; ROMERO et al., 2011). Diferenças estruturais do lipídeo A, como o número e posição dos grupos fosfatos ou cadeias lipídicas, determinam diferentes propriedades imunológicas (COATS et al., 2011).

1.8.4.2 Sílica Nanoestruturada (SBA-15)

A sílica nanoestruturada foi produzida pelo Instituto Butantan. As partículas de SBA-15 têm uma estrutura altamente organizada e, devido a suas propriedades físico-químicas,

apresentam um grande potencial para aplicação em diferentes áreas. Esses materiais são capazes de interagir com átomos, íons e moléculas, não apenas na superfície, mas também dentro dos nanoporos. Essa sílica é sintetizada em meio ácido e tem uma estrutura com boa estabilidade térmica, hidrotérmica e mecânica. Seu potencial já foi testado como adjuvante e há vários estudos promissores com a vacina da hepatite, em curso no Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan, inclusive pela via oral (SCARAMUZZI et al., 2011).

1.8.4.3 Complexos Imunoestimulantes (ISCOMs)

Os complexos imunoestimulantes (ISCOMs) são a nova alternativa que mostra estimulação moderada de Th1 e Th2 para as vias de administração mucosa e parenteral e, portanto, são uma consideração importante na formulação de uma vacina animal. São estruturas “*cage-like*” compostas por colesterol, fosfolipídios e saponinas (DUEWELL et al., 2011; SUN et al., 2009) com um tamanho típico de 40 nm (SJOLANDER et al., 1998). Os adjuvantes à base de saponina atuam em parte estimulando a entrada de células apresentadoras de antígenos no local da injeção e melhorando a apresentação de antígenos nos linfonodos locais. Assim, teoricamente induz uma resposta imune mediada por células e por anticorpo, o que é importante no desenvolvimento de futuras vacinas. São caracterizadas por um agregado de micelas em forma de anel formadas por saponinas e colesterol que são mantidas juntas por interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (KERSTEN et al., 1991).

2 JUSTIFICATIVA

A raiva é uma zoonose viral fatal negligenciada. Globalmente, a raiva transmitida por cães mata mais pessoas do que a febre amarela, dengue e encefalite japonesa, sendo que mais de 7 milhões de pessoas são expostas ao contato com o vírus a cada ano (COLEMAN et al., 2004; KNOBEL et al., 2005; WHO, 2018).

Somente a redução da população de cães não se mostra efetiva no controle da doença (WHO, 2004; CLEAVELAND et al., 2006). A eliminação da raiva em países como Malásia, Japão e o sucesso no controle de raiva canina ao longo da Europa e América do Norte, foi alcançado graças à vacinação em massa de cães, juntamente com a movimentação restrita desses animais e a remoção de cães não vacinados (CLEAVELAND et al., 2006). A raiva ainda é um problema crescente em regiões onde há rápido crescimento populacional de cães e vacinação ineficiente, em menos de 70% da população canina, como ocorre na África Subsaariana e Ásia (CLEAVELAND, 1998; WHO, 2002).

Anticorpos são cruciais para a proteção contra a infecção do vírus da raiva (HOOPER et al., 1998) e títulos protetores são alcançados com a vacina. A maioria das vacinas no mercado atualmente é inativada. As vacinas vivas atenuadas induzem longa e duradoura imunidade mediada por células e por anticorpos, porém tem grandes desvantagens, com potencial de reverter a virulência, não sendo uma opção segura para a imunização de animais domésticos. Já as vacinas inativadas são seguras por não reverterem a patogenicidade, contudo não induzem uma imunidade duradoura (TIZARD, 2002).

Mesmo com o sucesso da vacina comercial utilizada hoje em dia contra raiva, há inúmeras tentativas de se desenvolver alternativas aproveitando as vantagens da revolução da manipulação genética, visto que as vacinas recombinantes, que representam a terceira geração, evitam o uso de partículas que contém o material genético, estrutura responsável pela replicação viral, priorizando a segurança do manipulador (HICKS et al., 2012).

As falhas em manter a cobertura vacinal juntamente com a falta de controle da doença no ciclo silvestre, levam ao ressurgimento de casos de raiva no país. A necessidade de retorno anual para doses de reforço em animais de companhia tem sido apontada como limitante para muitas pessoas que possuem animais domésticos. Por outro lado, devido ao encontro mais

frequente entre a fauna selvagem (morcegos e raposas) e a doméstica (cães e bovinos) a possibilidade de transmissão do vírus da raiva tende a aumentar (HILDEGUND, 2009).

Além disso, lotes de vacinas produzidos no Brasil já apresentaram problemas, o que, entre outras causas, faz com que a taxa de cobertura vacinal fique instável em várias regiões. Um problema registrado com lotes da vacina em 2010 culminou na morte de dezenas de animais em todo o Brasil, o que fez com que a aderência à vacinação de cães e gatos sofresse uma queda, que resultou em casos de raiva animal e humana (BRASIL, 2015). Nesses casos e em áreas onde a acessibilidade à vacinação parenteral não é suficiente, a vacinação oral pode resultar em aumento da cobertura vacinal, sem as dificuldades de logística, demora e programas caros que envolvem visitas casa-a-casa. A vacinação oral sozinha ou combinada com a vacinação via parenteral pode prover uma metodologia eficaz e segura a fim de alcançar a meta de 70% de cobertura em países em que a cobertura vacinal sofre oscilações. Embora esteja claro que a raiva em cães pode facilmente ser controlada por campanhas de vacinação em massa, se a cobertura vacinal não for mantida, a doença pode se reestabelecer rapidamente (CLEAVELAND et al., 2006).

Há uma grande preocupação em manter a cobertura vacinal de raiva no Brasil por dois motivos: o número de ocorrências de animais mortos por conta da vacina, e animais que foram previamente imunizados com a vacina existente no mercado veterinário, e não apresentaram títulos de anticorpos adequados contra a raiva. Diversos estudos mostram que uma parcela significativa de cães previamente vacinados por pelo menos dois anos, não atingiram títulos de anticorpos anti-RABV compatíveis com proteção, ou seja, ≥ 0.5 UI/mL como recomendado pela OIE. São dados preocupantes considerando o estado de vacinação dos animais e que indicam falha na estratégia de vacinação e/ou na qualidade da vacina (FERNANDES et al., 2017). RAMANNA et al. (2007) verificaram que apenas 56% dos cães que receberam uma única dose de vacina desenvolveram níveis adequados de anticorpos. PÁEZ et al. (2011) observaram que 48% dos animais que não receberam uma vacinação de reforço anual não desenvolveram resposta sorológica adequada à RABV. Num estudo com 432 amostras de cães jovens e adultos que receberam uma dose única da vacina, 21,76% não apresentaram níveis adequados de anticorpos, sendo 67,02% filhotes (SILVA et al., 2014).

Segundo o Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunização, o Brasil desde 1999 vem mantendo a cobertura vacinal acima de 70%, porém em 2010 houve uma queda, e ficou em torno de 44% por conta da interrupção da campanha de vacinação devido à morte de

muitos animais após receberem a dose da vacina. Com esse problema, as pessoas deixaram de aderir às campanhas de vacinação. Em 2014 a cobertura foi de apenas 55,85%. Como é sabido, se a cobertura vacinal não for mantida, a doença pode se reestabelecer extremamente rápido.

Essa realidade faz com que seja interessante, tanto do ponto de vista de saúde pública quanto econômico, o desenvolvimento de vacinas contra a raiva que sejam imunogênicas, eficazes e mais seguras, especialmente para o uso veterinário, para que a taxa de cobertura vacinal se mantenha sempre alta. A principal característica dessa preparação deve ser a capacidade de promover altos títulos de anticorpos neutralizantes, capazes de neutralizar o vírus no meio extracelular antes da sua ligação com os receptores das células musculares, limitando sua propagação no local da infecção e sua progressão para o sistema nervoso central (LUBROTH et al. 2007).

As vacinas constituídas de antígenos purificados, subunidades ou vacinas virais sintéticas são mais seguras, porém geralmente resultam na indução moderada de anticorpo e resposta de células T e requerem múltiplas doses vacinais para induzir respostas de anticorpos suficientes (RIESE et al., 2013). Nesse ponto, a adição de um adjuvante traz vantagens, incluindo a preservação da dose e a indução de uma resposta imunológica mais rápida, ampla e forte (REED et al., 2013). Há evidências crescentes nos últimos anos de que as vacinas virais e recombinantes podem ser significativamente potencializadas pela adição de adjuvantes. Vacinas recombinantes contra influenza, para-influenza, poliomielite e hepatite, com a adição de adjuvantes induzem uma resposta sorológica maior do que aquela induzida por vacinas preparadas sem adjuvantes. Koraka et al. (2014) investigaram a imunogenicidade e eficácia de vacinação com a configuração trimérica nativa da proteína G do vírus da raiva (tG). Com uma pequena dose da proteína trimérica em combinação com adjuvante (ISCOM), conseguiu-se obter a indução de níveis elevados de anticorpos neutralizantes com boa avidéz, que protegeram todos os camundongos contra o desafio intracerebral com o VR.

Para a obtenção de uma nova preparação vacinal veterinária recombinante contra o VR, foram padronizados antígenos para imunização, utilizando dois sistemas de expressão recombinante da glicoproteína do vírus (RVGP).

Para a avaliação dos antígenos, foram realizados testes de imunizações em camundongos combinando vias e adjuvantes frente ao desafio por inoculação intracerebral com CVS (*Challenge Virus Standard*), e análise de títulos de anticorpos pelos testes de RFFIT

(*Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test*), FAVN (*Fluorescent Antibody Virus Neutralization*)
e Platelia Rabies Kit®.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a utilização da glicoproteína recombinante do vírus da raiva a fim de propor uma nova abordagem vacinal em animais de companhia.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção e caracterização dos antígenos recombinantes expressos em células S2, pela análise de epítomos;
- Imunização de animais e análise da resposta imunológica, variando vias de administração, número de doses e quantidade de antígeno;
- Teste de adjuvantes em associação com os antígenos recombinantes (Hidróxido de Alumínio, MPLA, ISCOM e Sílica nanoestruturada);
- Verificação do efeito de reforço vacinal utilizando esquemas de dose-reforço com preparações idênticas ou com diferentes composições (vacina + proteína; proteína + proteína, etc...).
- Análise da resposta imunológica da preparação mais promissora, incluindo anticorpos neutralizantes e subclasses, teste de proteção ao desafio e análise de resposta imune celular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS

4.1.1 RVGP recombinante de células de *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (células S2)

Para a obtenção das linhagens de células recombinantes, foram utilizadas células de inseto provenientes do organismo *Drosophila melanogaster*, cuja linhagem S2 foi estabelecida por Schneider (Schneider, 1972).

Células S2 de *Drosophila melanogaster* foram anteriormente obtidas por transfecção de plasmídeo contendo gene de seleção e cDNA da RVGP sob controle do promotor da metalotioneína de *Drosophila* (LEMOS et al., 2009). Posteriormente as células originalmente obtidas passaram por um processo de enriquecimento das células recombinantes com maior expressão da RVGP, resultando no estabelecimento das células S2MtRVGP-H-M3 (SANTOS et al., 2016) que foram utilizadas neste trabalho. As células recombinantes foram mantidas em meio de cultura SF900II (Invitrogen®) livre de soro fetal bovino, à temperatura de 28°C ($\pm$ 2°C), sendo subcultivadas em intervalos de 5 a 6 dias. As culturas estáticas foram realizadas em frascos T 25 cm², com volume de trabalho de 5 mL. As culturas sob agitação foram realizadas em frascos Schott de 100 ml com volume de trabalho de 20 mL e agitação orbital a 100 rpm em incubadora (New Brunswick®).

Frascos Schott foram inoculados com 1×10^6 células/mL, em um volume de 20 mL. Os frascos foram mantidos em *shaker* à temperatura de 28°C durante 48 h para a adaptação das células ao cultivo sob agitação. Após 24h, as células foram induzidas com CuSO₄ 700µM, para a indução da expressão da RVGP nas células de inseto e coletadas após 48h. O meio foi retirado, as células foram ressuspensas em tampão de congelamento (tris 25 mM, NaCl 25 mM, MgCl 5 mM, 20% glicerol) e mantidas a – 80°C.

As preparações de membrana foram obtidas após ressuspender as células em PBS com inibidores de proteases (Sigma fast), homogeneização em triturador de células à velocidade máxima por 5 minutos, ultracentrifugação a 50.000 g por 30 minutos, e suspensão do pellet contendo a preparação de membrana em PBS estéril.

4.1.2 Purificação da RVGP recombinante a partir de células S2

Foi utilizada a coluna HiTrap NHS-activated HP de 1mL (GE) contendo anticorpo C75 - monoclonal clone RV1C5 contra a glicoproteína do vírus da raiva (LS-C75309-1000 da LSBio, Seattle, WA, USA™) imobilizado na matriz. A coluna foi preparada de acordo com as instruções do fabricante. A amostra foi preparada conforme o item anterior, utilizando $1,2 \times 10^8$ células expressando a RVGP recombinante, porém a solubilização foi realizada com 40 mL de tampão de solubilização (25mM Tris, 25mM NaCl, 5mM MgCl₂, 0.2% NP40, pH 7.4) por 1 hora a 4°C, com agitação a cada 15 minutos. A amostra foi centrifugada a 15.000 g, por 10 minutos, e o sobrenadante foi utilizado para a purificação (PILATTI, 2019).

4.1.3 Dosagem de RVGP por ELISA

Foi utilizado o kit “*Rabies Glycoprotein Enzyme Immunoassay*” (Instituto Pasteur, Paris) para a dosagem de RVGP trimérica em amostras de células S2, conforme descrito por Astray e colaboradores (2008). Nesse método são utilizados anticorpos que reconhecem especificamente a glicoproteína trimérica (ASTRAY et al., 2008). O anticorpo utilizado nesta análise é um anticorpo monoclonal (IgG-D1 – Instituto Pasteur, Paris, França), específico para o sítio III da RVGP, um sítio antigênico que depende da correta conformação da proteína. Este anticorpo é utilizado como anticorpo primário e secundário, de maneira que apenas a glicoproteína na forma trimérica seja detectada, uma vez que o sítio de ligação é o mesmo (MORGEAUX et al., 2017).

Para a realização do teste, a placa é previamente sensibilizada com anticorpo IgG-D1 na proporção 1:2.000 em tampão carbonato pH 9,6 e incubada a 4 °C por 16 h. A placa foi então bloqueada com tampão de bloqueio, por 30 min a 37 °C. Em seguida foi lavada cinco vezes com tampão de lavagem. Após a lavagem, a placa foi incubada com 200 µL das amostras e da curva padrão (1 h a 37°C), preparada a partir do *Lyssavirus* da raiva cepa Pasteur (presente no kit na forma inativada, purificada e liofilizada, contendo 10 µg do antígeno referência por ampola), nas concentrações 7,8 ng/mL, 14,6 ng/mL, 31,2 ng/mL, 62,5 ng/mL, 125 ng/mL, 250

ng/mL e 500 ng/mL. Em seguida, a placa foi lavada 5 vezes com tampão de lavagem e o anticorpo monoclonal anti-RVGP conjugado com peroxidase foi adicionado, e a reação foi incubada por 1 h a 37 °C. Em seguida a placa foi lavada 6 vezes com tampão de lavagem e foi adicionado tampão citrato (pH 5,6) contendo substrato peróxido de hidrogênio e composto cromógeno orthophenilenediamine (OPD). A reação foi então incubada no escuro (30 min a 22°C), desenvolvendo coloração alaranjada após a adição da solução de parada (H₂SO₄, 1 N). A absorbância foi lida no comprimento de onda de 492 nm em leitor de microplacas (Multiskan MJ-Labsystems). Os cálculos para a obtenção da concentração de RVGP presente em cada amostra foram realizados através da comparação da absorbância das amostras com a curva padrão.

4.1.4 Dot blotting

Amostras da lise de membrana de células contendo RVGP foram utilizadas para a análise do estado conformacional da RVGP produzida em células de inseto (Tabela 1).

A membrana de nitrocelulose (GE HealthCare Life Science) foi disposta num aparelho de dot blotting (Bio-Dot™ Apparatus, BioRad) de 96 poços. Foram utilizados 20 µL de cada amostra. Como controle positivo foi utilizada a vacina comercial sem adjuvante produzida para uso comercial em esquema pré-exposição (Rijks Institute – Bilthoven). A membrana foi hidratada com tampão TBS (*Tris buffered saline*) que foi posteriormente removido por vácuo antes da aplicação da amostra. Após a aplicação da amostra, a membrana foi secada por sucção com auxílio da bomba de vácuo, retirada do aparelho e bloqueada com solução TBS contendo 5% de leite desnatado por uma hora a 200 rpm à temperatura ambiente. Em seguida o tampão de bloqueio foi removido e a membrana foi incubada com o anticorpo primário (Tabela 1) por uma hora à temperatura ambiente. A solução foi retirada e a membrana foi lavada três vezes com TBS contendo 0,1% tween por 5 min. O anticorpo secundário conjugado com peroxidase foi adicionado (1:3000 em TBS com 5 % de leite desnatado) e a membrana incubada novamente sob agitação. Em seguida, as membranas foram lavadas novamente duas vezes com TBS por 5 min e a revelação foi realizada com TMB (para membranas – Sigma-Aldrich®) seguindo instruções do fabricante.

As amostras do cultivo de células foram preparadas de duas maneiras: (1) lise mecânica das células por homogeneizador em velocidade máxima por 5 minutos, seguida de ultracentrifugação por 30 minutos a 120.000 g, suspensão em PBS; (2) lise com tampão T4 contendo detergente (25 mM Tris, 25 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,05 % NP40 (v/v), pH 7,4).

Tabela 1 – Anticorpos utilizados na caracterização da conformação da RVGP recombinante

Anticorpo	Concentração	Diluição	Forma da RVGP reconhecida	Referência
C2-22-C5	6 mg/mL	1:3125.	Epítipo Linear	BUNSCHOTEN et al., 1989
C1-11-D6	1,3 mg/mL	1:658.	Epítipo Conformacional	LAFON et al., 1983
C52418	5 mg/mL	1:2500.	Estado Trimérico	KORAKA et al., 2014

Nota: Anticorpos cedidos gentilmente pelo Prof. Dr. Byron E. E. Martina, CEO Artemis One Health Research Foundation – Delft, Holanda.

4.1.5 Obtenção das partículas de *Semliki Forest Virus* (SFV-RVGP)

As partículas de SFV recombinantes, carregando a informação genética da RVGP (SFV-RVGP), foram obtidas a partir da clonagem do cDNA da RVGP extraído do plasmídeo RVGP/PV (Institut Pasteur, Paris), no plasmídeo de pSFV-2genC (HASSAINE et al. 2006), na Escola Superior de Biotecnologia da Universidade de Strasbourg (BENMAAR et al., 2009). A tecnologia baseia-se na divisão do cDNA correspondente ao genoma do SFV em dois plasmídeos: um auxiliar contendo somente os genes que codificam as proteínas estruturais do vírus (*helper*) e outro contendo os genes das proteínas não estruturais. Neste segundo plasmídeo, sob a regulação de um promotor forte subgenômico, foi clonado o gene da RVGP, substituindo as proteínas estruturais originais do vírus.

As amostras SFV-RVGP foram obtidas pela eletroporação de RNA de SFV-RVGP e de SFV-*helper* em células BHK-21, seguida de incubação por 24 horas e coleta das partículas virais no sobrenadante. As partículas virais foram aliquotadas e mantidas a – 80 °C até o momento de sua utilização. Uma alíquota de cada produção foi utilizada para a quantificação das partículas virais por RT-qPCR, utilizando um par de *primers* que amplifica uma região de 145 pares de bases da região da proteína não estrutural 1 (NS-1) utilizando metodologia anteriormente descrita (PUGLIA et al., 2013). Imediatamente antes da imunização, as partículas

foram ativadas com α -quimiotripsina (0.5 mg/mL) por 25 minutos à temperatura ambiente, seguido da inativação da protease com aprotinina (1 mg/mL) por 5 minutos. A quantidade de SFV-RVGP utilizada foi baseada em estudos prévios *in vitro*, em que foi determinada a quantidade de vírus suficiente para produzir 1,0 μ g de RVGP após a infecção de células de mamífero (BHK-21) em 24 h (PUGLIA et al., 2013). Portanto, as doses de partículas de SFV foram de $8,7 \times 10^6$ (dose 1) ou $17,4 \times 10^6$ (dose 2) a cada 50 μ L.

4.2 FORMULAÇÕES

Diversas formulações foram testadas ao longo do trabalho. Na maior parte das imunizações foram utilizados adjuvantes para auxiliar a resposta ao antígeno. O Monofosforil Lipídeo A de *Bordetella pertussis* (MPLA, Instituto Butantan) foi utilizado em combinação ou não com hidróxido de alumínio, nas quantidades de 0,25mg/dose para hidróxido de alumínio e 5 ng/dose de MPLA. No caso da utilização sem hidróxido de alumínio, o MPLA foi administrado na mesma quantidade. Quando administrada com o adjuvante MPLA foi utilizada a quantidade de 1 μ g de RVGP por dose.

A sílica nanoestruturada (SBA-15, Instituto Butantan) foi utilizada em uma concentração final de 20 mg/mL. A formulação foi realizada em uma proporção de 40 μ g de proteína total (contendo 1 μ g de RVGP medida por ELISA) para 400 μ g de SBA-15. A dose de RVGP foi estabelecida em 1 μ g/dose. A adsorção de preparação de membrana à sílica foi realizada em homogeneizador de tubos durante 24 horas na geladeira.

O complexo imunoestimulante (ISCOM) foi preparado no laboratório pelo método de injeção por etanol como descrito por Landemans et al. (2005), formulado com colesterol, fosfatidilcolina e Quil-A® - InvivoGen (derivado da planta *Quillaja saponaria* Molina). Para produzir ISCOMs de maneira rápida, simples e eficiente, colesterol e fosfatidilcolina foram dissolvidos em etanol e a solução resultante foi rapidamente injetada em uma solução aquosa de Quil-A® (InvivoGen) sob agitação. A agitação foi mantida por 48h à temperatura ambiente. O adjuvante ISCOM foi utilizado na quantidade de 10 μ g/dose.

O ISCOM comercial Matrix-M™ é um adjuvante à base de saponina (Novavax), que fornece um efeito adjuvante potente e é bem tolerado. Saponinas são glicosídeos esteróides que

ocorrem em muitas espécies de plantas. Na Matrix-M, as frações de saponina purificadas são misturadas com colesterol sintético e um fosfolipídio para formar partículas estáveis que podem ser prontamente formuladas com uma variedade de antígenos de vacina. Matrix-M TM já é utilizado em vacinas veterinárias disponíveis comercialmente.

4.3 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, de 8 semanas, e C57BL6/6J também fêmeas de 8 semanas procedentes do biotério CEMIB (Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório – UNICAMP) ou do biotério central da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP – Botucatu. O projeto de pesquisa foi realizado após análise e aprovação pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP - Botucatu, com número de protocolo 0147/2017.

Todos os ensaios envolvendo animais foram realizados no Infectório de Raiva da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu. A coleta de sangue foi sempre realizada da mesma forma, fazendo uso de colírio anestésico e coleta pela via retro orbital dos camundongos.

Todos os animais sobreviventes ao final das provas foram submetidos à eutanásia por sedação anestésica para coleta de sangue (xilasina + cetamina) seguida de deslocamento cervical.

4.4 MÉTODOS SOROLÓGICOS

Para as provas sorológicas, as amostras de sangue coletadas foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm e os soros coletados foram mantidos a -20°C até a realização das análises.

4.4.1 RIFFT (*Rapid Fluorescent Foci Inhibition Test*)

Os títulos de anticorpos neutralizantes foram determinados pela metodologia de RIFFT (*Rapid Fluorescent Foci Inhibition Test*), teste de rápida inibição de focos fluorescentes (SMITH; YAGER; BAER, 1996) modificado por De Moura et al. (2008). Essa técnica foi realizada em cooperação com o Instituto Pasteur de São Paulo.

Como soro padrão, foi utilizado o soro internacional (WHO) contendo 30 UI/mL, diluído para uso a 0,5 UI/mL. As amostras de soro teste e soro padrão internacional foram diluídas em seis diluições quintuplas seriadas iniciando-se em 1:2,5 em microplacas de 96 orifícios num volume final de 50µL usando meio mínimo essencial de Eagle com sais de Earle contendo 10% de soro fetal bovino (MEM-SFB). O volume de 50µL da suspensão de vírus padrão (*Challenge Virus Standard* – CVS- 132-11A), contendo 100 FFD₅₀ foi acrescentado ao soro diluído e as microplacas incubadas durante 90 minutos a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, foram adicionados 100µL de suspensão de células BHK-21 (2,5 x 10⁵ células/mL) e incubadas novamente por mais 20 horas, a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. As células das placas foram fixadas com acetona 80% a 4°C por 15 minutos em banho de gelo. Em seguida incubadas por uma hora a 37°C com anticorpos CAR-IP (Instituto Pasteur de São Paulo, CAPORALE, 2009) contra o vírus da raiva conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), diluídos em tampão Fosfato de Sódio 0,01M pH 7,3 (PBS) contendo 0,001% de azul de Evans. A leitura foi realizada em microscópio invertido de fluorescência em aumento de 200 vezes e em cada orifício da placa foram examinados 18 campos para verificar a presença de focos fluorescentes. O cálculo dos títulos foi feito utilizando o método de análise Spearman-Kärber (AUBERT, 1996) por comparação ao soro padrão.

4.4.2 FAVN (*Fluorescent Antibody Virus Neutralization*)

No teste FAVN da raiva, foram feitas seis diluições em série do soro de teste que são incubadas com 100 TCID₅₀ da cepa CVS do vírus da raiva em quadruplicatas, de acordo com a técnica oficial descrita pelo órgão competente, OIE.

Após a incubação inicial do vírus com o soro, células BHK-21 foram adicionadas e a placa de teste incubada por 48 horas a 37°C. Como a cepa de vírus usada no teste causa pouco ou nenhum efeito citopático, o teste é lido por imunofluorescência.

A leitura é calculada para cada diluição do soro de teste e os soros de controle pelo método Spearman Karber. Por convenção internacional, esse título é convertido para um valor em UI / mL em comparação com um soro padrão de título conhecido (OIE, 2008).

Este teste foi realizado pela instituição Artemis Research Foundation, Delft - Holanda.

4.4.3 Titulação de anticorpos anti-RVGP por ELISA - Platelia®

A detecção e titulação dos anticorpos IgG anti-glicoproteína do vírus da raiva foram realizados com o Kit de ELISA Platelia Rabies Kit® (Bio-Rad, Hercules, Califórnia EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Esse método possui a glicoproteína viral (extraída de membrana do vírus inativado) aderida à placa, que é reconhecida por anticorpos presentes nos soros imunes. A imunodetecção se dá pela reação da proteína A de *S. aureus* conjugada com peroxidase. Os controles positivos calibrados contra padrões da Organização Mundial da Saúde (OMS), permitem uma determinação qualitativa ou quantitativa do título de anticorpos anti-vírus da raiva em soros ou plasma de animais. Os resultados foram expressos em EU/mL (unidades equivalentes) que correlacionam com unidades internacionais (UI/mL). Por definição do fabricante, uma UI do soro de referência incluído no teste, corresponde a uma EU.

Os reagentes padrões para validação do teste inclusos no kit são diluídos e os soros testes também em uma diluição de 1/100. Essa diluição é então distribuída na placa, com 100 µL por poço. A placa é coberta com adesivo plástico e incubada a 37°C por 1 hora. Após essa incubação a placa é lavada 3 vezes e é adicionado o conjugado (100 µL/poço) e após a vedação com o adesivo plástico é incubada por mais 1 hora a 37°C. A solução enzimática reveladora é preparada e mantida no escuro, e ao final de mais um ciclo de lavagem (5 vezes), é adicionado rapidamente 100 µL da solução para nova incubação, protegida de luz, durante 30 minutos sem o adesivo plástico. A solução de parada é adicionada (100 µL/poço) e a placa é lida a 450 - 620 nm, em um período de até 30 minutos.

4.5 DESAFIO INTRACEREBRAL

Foi utilizada a amostra padrão CVS-31, cedida pelo Instituto Pasteur, mantida por passagens em camundongos e utilizada na rotina da prova biológica do Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, campus Botucatu em sua 1166ª passagem. Todos os ensaios que envolviam o desafio intracerebral foram realizados no Infectório de Raiva da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu.

O desafio intracerebral com dose letal 10^5 DL₅₀ /0,03mL que resulta em aproximadamente 10^6 vírus/0,03mL da cepa CVS-31.

A prova de inoculação intracerebral em camundongos foi realizada segundo protocolo descrito por Koprowski (1996), que consiste na inoculação via intracerebral em camundongos com suspensão de material encefálico colhido de outro animal previamente infectado. Para o preparo da suspensão de inóculo, foi colhido o material total do SNC camundongos, macerado em gral esteril, adicionando-se 1:5 (peso: volume) de solução diluente esteril preparada com água filtrada, obtida em aparelho de osmose reversa (Merck®, EUA), além de soro equino (Laborclin®, Brasil) e antibiótico (Frademicina, 600mg/ml, Pfizer®, USA). A suspensão foi centrifugada a 1000 x rpm por 10 minutos, e o sobrenadante separado e inoculado nos camundongos por via intracerebral.

Nos ensaios mais longos, o desafio viral por inoculação intracerebral é arriscado pelo fato de animais mais velhos possuírem o osso do crânio mais rígido, dificultando sua perfuração sem atingir o cérebro dos animais. Para não comprometer as análises estatísticas para a comparação de grupos, o desafio intracerebral foi realizado apenas nos experimentos com menores intervalos de doses (semanais).

Os camundongos foram alojados em caixas de polipropileno identificadas, mantidas em estante ventilada (Alesco®, Brasil), com água e ração *ad libitum*. Foram utilizadas fichas de avaliação individual para o registro de alterações clínicas, com observação diária dos camundongos por 30 dias. Ao apresentarem os sinais clínicos da doença, os camundongos

foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂, procedendo-se a retirada do encéfalo e submetendo-o ao teste de imunofluorescência direta, para a confirmação diagnóstica.

4.6 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para a análise da resposta imune do tipo celular foi realizada a proliferação de células de baço após extração dos animais. Para isso, após a etapa de imunização e coleta de sangue, os camundongos foram anestesiados e os baços foram removidos para serem tratados e os esplenócitos cultivados. Neste experimento não houve o desafio intracerebral com o vírus da raiva.

Os baços dos animais de um mesmo grupo foram macerados conjuntamente em placa de Petri com meio RPMI 1640 (Merck®) e macerados no *cell strainer* (100µm Nylon – BD Falcon™). As células recuperadas e tratadas com ACK (NH₄Cl, KHCO₃, EDTA) para a lise das hemácias. As células restantes foram contadas e plaqueadas em 3x10⁵ células por poço, em uma placa de cultura em triplicatas, com exceção do controle negativo que foi feito em duplicata (RPMI). Para estímulos das células foram utilizados os seguintes reagentes:

- Vacina contra raiva: Vacina inativada, liofilizada, sem adjuvante, produzida na Holanda – Artemis. Foi ressuspensa em meio RPMI sem soro (50µL por poço).
- Concanavalina A (Sigma - Aldrich®): 5 mg/mL. Liofilizada; ressuspensa em 1 mL de meio RPMI sem soro, concentração final de 15 µg/mL.
- Meio RPMI: meio RPMI 1640 (Merck®) foi suplementado para atender as necessidades do cultivo de células de baço. Portanto foi adicionado 2-Mercaptoetanol 5x10⁻⁵ M (Sigma), piruvato de sódio 1mM (Gibco), L-glutamina 2mM (Gibco), solução de aminoácidos não essenciais (1% vol/vol) (Gibco), 10% vol/vol de Soro Fetal Bovino e os antibióticos Gentamicina (40µg/mL) e Peftacin (20µg/mL).

O restante de células foi congelado (60% meio RPMI suplementado + 20% Soro fetal bovino + 20% DMSO).

Uma vez que as células foram contadas, plaqueadas e estimuladas, foi usado um kit de medida da proliferação celular: *BrdU Cell Proliferation Assay Kit #6813*, gentilmente cedido

pelo Dr. Byron Martina. O método consiste em dosar a incorporação da 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), um análogo da pirimidina, que é incorporado no lugar da timidina no DNA recém-sintetizado das células em proliferação. A detecção da BrdU incorporada ao DNA celular durante a proliferação celular é realizada com um anticorpo anti-BrdU.

Dessa forma, as células foram colocadas em cultivo por 48 horas na presença ou não do reagente para estímulo e então foi adicionado o BrdU (concentração final 1X) e incubado *overnight*. Após a incubação com o BrdU, as células foram centrifugadas (300g por dez minutos) e foi feita a remoção do meio, fixação e desnaturação do DNA com a solução de fixação/desnaturação. Em seguida, foi adicionado o anticorpo anti-BrdU e anticorpo secundário, ligado à HRP. A reação foi concluída pela adição do substrato TMB e leitura da placa a 450nm.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas e gráficos de sobrevivência foram realizados com auxílio do aplicativo GraphPad Prism 8.3.0. Para análise da diferença estatística no tempo de sobrevivência ao desafio viral, foi utilizado o teste de Log-rank (Mantel Cox) para três amostras ou para duas amostras pareadas para confirmar ou não a diferença estatística. Para a análise dos títulos de anticorpos foi utilizado o teste de ANOVA moncaudal seguido do teste de Tukey para as comparações múltiplas.

5 RESULTADOS

5.1 IMUNIZAÇÃO COM SFV-RVGP

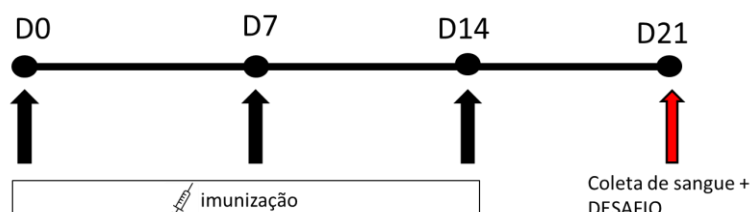
As preparações de SFV-RVGP foram utilizadas para a imunização de camundongos por diferentes vias e esquemas de administração para a padronização da preparação. A quantidade de SFV-RVGP utilizada como base para a definição das doses utilizadas nos experimentos ($8,7 \times 10^6$ partículas) foi aquela necessária para produzir 1µg de RVGP em 24 h após a infecção de células BHK-21 em cultura.

5.1.1 Imunização via intraperitoneal:

Camundongos Balb/c SPF fêmeas de 8 semanas foram imunizados com três doses, em intervalos de 07 dias, pela via intraperitoneal, seguidos por desafio viral no 21º dia (Figura 2).

A via intraperitoneal foi escolhida para a padronização da dose por ser uma via clássica de avaliação de vacinas contra a raiva.

Figura 2 - Cronograma de imunização via intraperitoneal



Esquema de imunização semanal pela via intraperitoneal. Depois de sete dias da última dose (D21) foi feita a coleta de sangue e o desafio intracerebral. Os animais foram observados 21 dias após o desafio para verificação do aparecimento de sintomatologia.

Foram testadas duas dosagens de SFV-RVGP: $8,7 \times 10^6$ partículas (dose 1); e $17,4 \times 10^6$ partículas (dose 2). Um grupo foi imunizado nas duas primeiras doses com proteína RVGP (1 µg) e recebeu o segundo reforço com SFV-RVGP (dose 1). Os animais foram observados durante 21 dias após o desafio viral, sendo eutanasiados ao apresentar sinais típicos da infecção pelo vírus. Os títulos de anticorpos anti-RVGP foram determinados por ELISA (*Platelia Rabies Kit®*, Bio-rad) e os títulos de anticorpos neutralizantes do VR foram determinados por RFFIT (*Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test*), no Instituto Pasteur SSP/SP (Tabela 2).

Tabela 2 – Resultados da imunização com SFV – RVGP via intraperitoneal

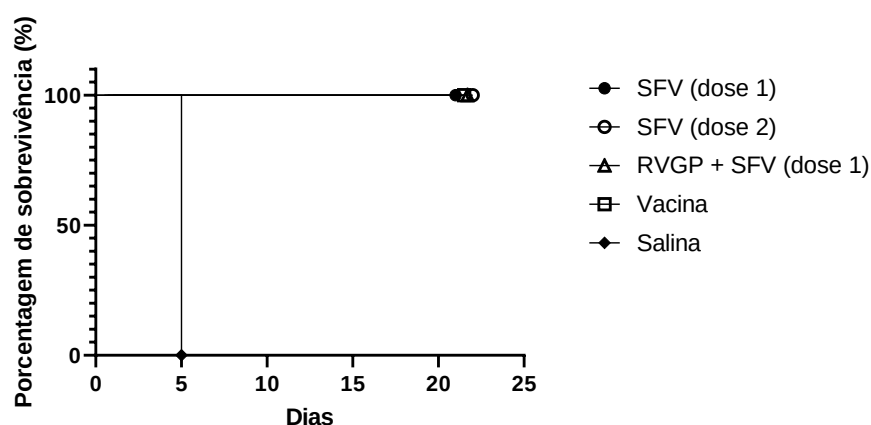
GRUPO	PREPARAÇÃO	RFFIT (UI/mL)	Platelia® (EU/mL)
G1	SFV-RVGP (dose 1)	123,01	$2,1 \pm 0,76$
G2	SFV-RVGP (dose 2)	86,6	$2,47 \pm 1,20$
G3	RVGP de células S2 (2 doses) + reforço com SVF-RVGP dose 1	187,7	$1,64 \pm 1,27$
G4	Vacina contra raiva	239	$5,15 \pm 0,59$
G5	Salina	2,1	0,02

Número de animais por grupo = 5. As doses de partículas de SFV foram de $8,7 \times 10^6$ (dose 1) ou $17,4 \times 10^6$ (dose 2). Títulos de anticorpos dos testes Platelia® e RFFIT coletados no D21 e porcentagem de sobreviventes após 21 dias do desafio (%). Os títulos de anticorpos são expressos em (EU/mL) e (UI/mL) para as medidas por ELISA (Platelia®) e soroneutralização (RFFIT). Os valores representam a média dos títulos verificados em cada grupo. Controle negativo: salina. Controle positivo: vacina comercial veterinária de raiva Defensor® – Pfizer. Os valores representam a média dos títulos verificados em cada grupo.

Os resultados desse experimento apresentaram grande discordância entre os valores dosados pelos métodos de ELISA e RFFIT. De fato, o valor de 2,1 UI/mL encontrado no soro

dos animais imunizados com salina, sendo 0,5 UI/mL o limite inferior de proteção contra a raiva, indica que o teste de RFFIT apresentou algum problema. Isso é confirmado pelo resultado do desafio viral, em que nenhum animal desse grupo sobreviveu (Figura 3). Os resultados de sorologia por ELISA (Platelia®) apresentaram uma coerência maior. De maneira geral, os dados mostraram que os grupos 1, 2 e 3 foram eficazmente protegidos contra o desafio viral, sobrevivendo aos 21 dias e estatisticamente diferentes do controle não vacinado (Figura 2). Os títulos de anticorpos anti-RVGP encontrados foram superiores ao limite considerado protetor pelo ensaio de ELISA (0,5 EU/mL), nos três grupos em teste, sendo estatisticamente iguais entre si, porém diferentes do título encontrado para o grupo imunizado com vacina, que foi superior (Tabela 3).

Figura 3 – Curva sobrevivência frente ao desafio viral em animais imunizados pela via intraperitoneal com SFV - RVGP



Nota: curva de sobrevivência de Log-Rank (Mantel-Cox). Todas as preparações foram estatisticamente (***) capazes de aumentar o tempo de vida dos animais imunizados em relação ao controle.

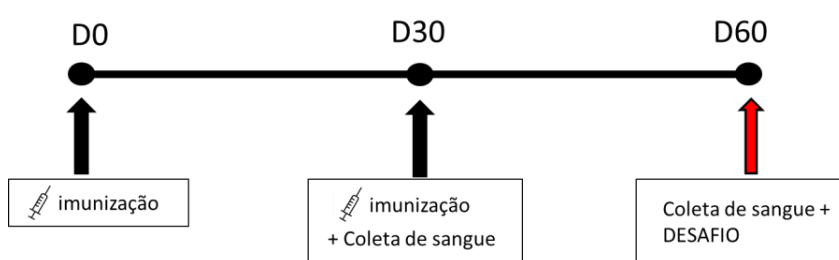
Tabela 3 – Análise estatística dos títulos de anticorpos com SFV via intraperitoneal

Teste de Tukey múltiplas comparações	Significativo?	Valor ajustado de P
Vacina vs. SFV (dose 1)	Sim	0,0002
Vacina vs. SFV (dose 2)	Sim	0,001
Vacina vs. Salina	Sim	<0.0001
Vacina vs. RVGP + SFV	Sim	<0.0001
SFV (dose 1) vs. SFV (dose 2)	Não	0,9655
SFV (dose 1) vs. Salina	Sim	0,0114
SFV (dose 1) vs. RVGP + SFV	Não	0,9192
SFV (dose 2) vs. Salina	Sim	0,0027
SFV (dose 2) vs. RVGP + SFV	Não	0,591
Salina vs. RVGP + SFV	Sim	0,0136

5.3.2 Imunização pela via subcutânea

Foi avaliada a eficácia da imunização pela via subcutânea, bem como a capacidade da proteção por tempos mais prolongados após a imunização. Para isso, camundongos Balb/c SPF fêmeas de 8 semanas foram imunizados pela via subcutânea em esquema dose-reforço, em intervalos de 30 dias. Um mês após o reforço vacinal os animais foram desafiados e observados por 21 dias (Figura 4).

Figura 4 – Cronograma de imunização SFV – RVGP via subcutânea



Esquema de imunização semanal pela via subcutânea. Depois de trinta dias da dose de reforço (D60) foi feita a coleta de sangue e o desafio intracerebral. Os animais foram observados 21 dias após o desafio para verificação do aparecimento de sintomatologia.

Seguindo os dados do experimento anterior, foi utilizada a dose 2 ($17,4 \times 10^6$ partículas de SFV) em que se observou o maior valor de anticorpos anti-RVGP. Neste experimento, os títulos de anticorpos anti-RVGP foram determinados apenas por ELISA (Tabela 4).

Tabela 4 – Resultados da imunização com SFV – RVGP via subcutânea

GRUPO	PREPARAÇÃO	Platelia® (EU/mL)	
		D30	D60
G1	SFV-RVGP (dose 2)	17,59 ± 14,34	99,06 ± 31,10
G2	Salina + ISCOM + MPLA	0,26 ± 0,006	0,3 ± 0,041
G3	Vacina contra raiva	0,26 ± 0,002	32,8 ± 31,81

Número de animais por grupo = 5. No controle negativo foi usado salina e no controle positivo foi administrada a vacina comercial veterinária de raiva Defensor® – Pfizer. Os valores representam a média dos títulos verificados em cada grupo. O controle negativo consistiu de salina com adjuvantes pois o ensaio foi realizado em paralelo com outros antígenos, no caso demonstra-se que o ensaio de desafio viral foi letal para todos os animais do grupo controle.

Os resultados mostram uma clara superioridade da preparação de SFV-RVGP frente à vacina de raiva na imunização pela via subcutânea. Utilizando a preparação recombinante, 100 % dos animais foram protegidos contra o desafio viral, contra 55,5 % daqueles que receberam a vacina (Figura 5). Além disso, os títulos de anticorpos foram muito mais elevados para o grupo SFV-RVGP, com marcante diferença na primeira coleta, 30 dias após a primeira dose (Tabela 4). Alguns animais imunizados neste experimento apresentaram altos títulos de anticorpos, contribuindo para os resultados médios com altos valores. No entanto, a variabilidade dos títulos de anticorpos foi muito grande dentro dos grupos fazendo que no D60 não seja possível avaliar estatisticamente as diferenças entre os grupos.

Figura 5 – Curva sobrevivência frente ao desafio viral em animais imunizados pela via intraperitoneal com SFV-RVGP

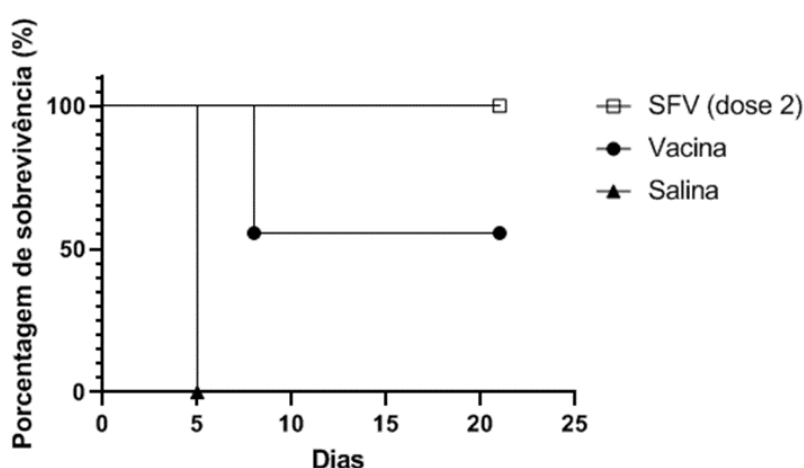


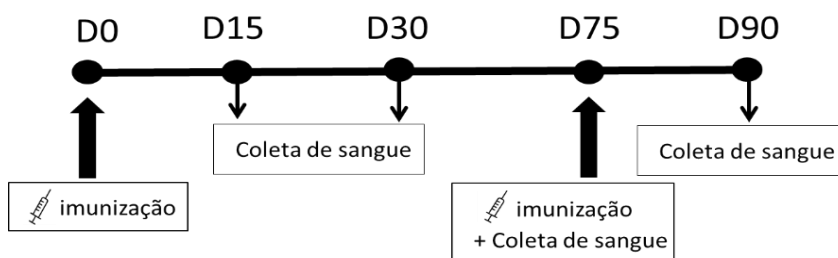
Tabela 5 – Análise estatística dos títulos de anticorpos com SFV via subcutânea (D30)

Teste de Tukey múltiplas comparações	Significativo?	Valor ajustado de P
SFV (dose 2) vs. Salina + Adjs	Sim	0,0301
SFV (dose 2) vs. Vacina	Não	0,125
Salina + Adjs vs. Vacina	Não	0,6255

5.3.3 Imunização pela via oral:

Uma vez que existem no mercado pelo menos duas opções de vacinação via oral contra a raiva utilizando vetores virais (Vaccinia e Adenovírus), foi testado o poder imunizante do SFV-RVGP pela via oral, na estratégia de utilização desse vetor como reforço vacinal. Dessa maneira, camundongos Balb/c fêmeas de 8 semanas foram imunizados com três doses combinando vias, sendo a primeira dose de vacina de raiva via intraperitoneal (que demonstrou ser a melhor via para essa preparação) e as duas doses de reforço com SFV-RVGP dose 2 pela via oral. Neste experimento as doses de reforço foram realizadas em 60 e 75 dias após a primeira imunização (Figura 6), pois para verificar o efeito de reforço era necessário que o título de anticorpos estivesse em queda após a primeira.

Figura 6 – Cronograma de imunização SFV – RVGP via oral



Esquema de imunização (D0 e D75) pela via oral combinada com a intraperitoneal. Amostras de sangue coletadas ao longo do experimento (D15, D30, D75 e D90).

Os títulos de anticorpos anti-RVGP foram determinados por ELISA em quatro pontos de coleta, para acompanhar a queda do título e o possível efeito de reforço vacinal pela via oral (Tabela 6).

Tabela 6 – Resultados da imunização com SFV – RVGP via oral

GRUPOS	PREPARAÇÃO	Platelia® (EU/mL)			
		D15	D30	D75	D90
G1	Vacina contra raiva + salina	1,84 ± 0,09	1,85 ± ,038	0,57 ± 0,49	0,43 ± 0,51
G2	Vacina contra raiva + SFV RVGP	1,48 ± 0,19	1,13 ± 0,32	0,36 ± 0,41	0,13 ± 0,1

Número de animais por grupo = 5. Os valores representam a média dos títulos verificados em cada grupo. Nos dois grupos foi utilizada a vacina comercial veterinária contra raiva Defensor® – Pfizer.

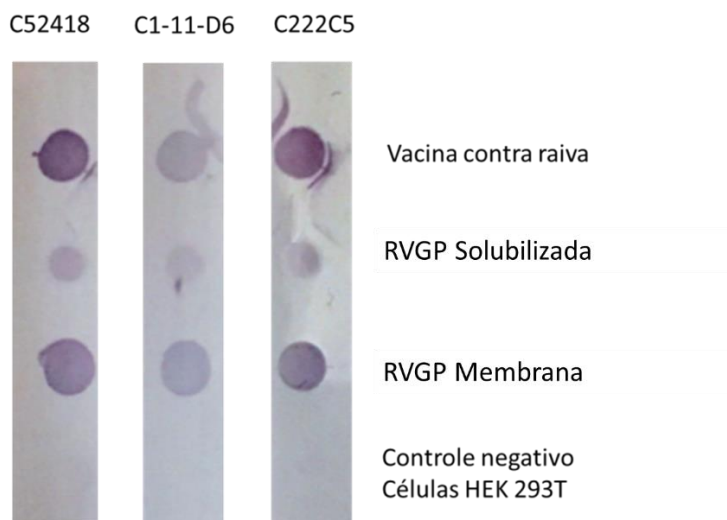
Os dados mostraram que o reforço via oral com SFV-RVGP não resultou em aumento do título de anticorpos anti-RVGP após 15 dias da administração, dessa forma não foi aplicada análise estatística aos dados. A queda do título de anticorpos para ambos os grupos demonstrou que os animais permaneceram pouco tempo com níveis adequados de imunidade (acima de 0,5 EU/mL), o que pode estar associado a uma debilidade imunológica, uma vez que não é um quadro esperado para esse modelo, o que poderia ter influenciado o experimento. No entanto, como não há descrição do uso desse vetor viral pela via oral e não há evidência científica associada a essa via de infecção para *Alphavirus*, essa estratégia não foi retomada.

5.4 IMUNIZAÇÃO COM RVGP PRODUZIDA EM CÉLULAS S2

5.4.1 Caracterização e quantificação do antígeno

Levando em consideração que a RVGP pode apresentar diferentes conformações pós-traducionais e existem amplas evidências de que, para fins de vacinação, as características da RVGP nativa (trímero) devem ser mantidas (ASTRAY et al., 2017), foi realizado o ensaio de *dot blot* com anticorpos específicos para confirmação da presença da forma trimérica. As amostras de RVGP foram preparadas a partir de células S2 tanto por lise mecânica como por solubilização com detergente e se mostraram reagentes para a conformação trimérica, bem como apresentaram epítomos linear e conformacional, assim como apresentado pelo vírus presente na amostra de vacina (Figura 7). Para este experimento não havia células S2 não recombinantes disponíveis no momento, uma vez que foi realizado durante estágio no Instituto Artemis (Delft, Holanda), dessa forma, apenas para ter um controle negativo baseado em lisado celular, foi aplicado à membrana um lisado de células HEK 293T.

Figura 7 – Dot blot da preparação de RVGP de células S2



Nota: **C52418**: Anticorpo que reconhece trímeros de RVGP; **C1-11-D6**: Anticorpo que reconhece a forma conformacional da RVGP; **C222C5**: Anticorpo que reconhece a forma linear da RVGP.

Para os primeiros ensaios de imunização com a RVGP produzida pelas células S2, foram utilizadas preparações de membrana das células S2, devido à indisponibilidade no momento de um protocolo adequado para a purificação da RVGP produzida. Dessa forma, foram utilizadas amostras de preparação de membrana de células S2, provenientes de 1×10^8 células recombinantes, preparadas por lise mecânica das células, seguida de centrifugação para a remoção dos debris celulares e ultracentrifugação para a coleta da fração membranária. As preparações de membrana foram ajustadas para uma concentração de RVGP de $0,5 \mu\text{g/mL}$ (dosada por ELISA). As amostras de RVGP purificada de células S2 apresentaram concentração de $5,432 \mu\text{g/mL}$.

As preparações foram formuladas com base na quantidade de antígeno determinado pelo teste de ELISA quantitativo para dosagem de RVGP trimérica. Assim, foi preparada uma quantidade de $1,0 \mu\text{g}$ de RVGP (em sua forma trimérica) para ser administrada em cada dose, na forma de preparação membranária.

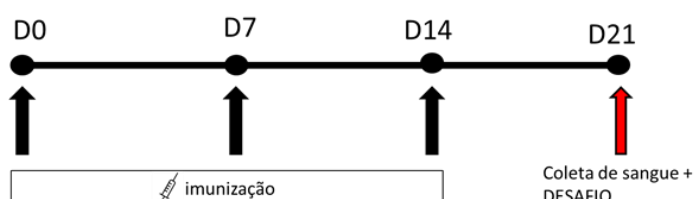
5.4.2 Imunização com preparação membranária de S2 contendo RVGP

Diversas estratégias vacinais e vias de imunização foram testadas para avaliar o potencial uso da RVGP produzida em S2 para fins de vacinação.

5.4.2.1 Via intraperitoneal

Camundongos Balb/c SPF fêmeas de 8 semanas foram imunizados com três doses, em intervalos de 07 dias, pela via intraperitoneal (Figura 8). Para a avaliação da imunogenicidade do antígeno foi testada como adjuvante a associação de MPLA e hidróxido de alumínio. Essa associação foi sugerida pelo Laboratório de Vacinas Aeróbicas do Instituto Butantan.

Figura 8 – Cronograma de imunização com preparação de membranas de S2 contendo RVGP pela via intraperitoneal



Esquema de imunização semanal pela via intraperitoneal. Depois de sete dias da última dose (D21) foi feita a coleta de sangue e o desafio intracerebral. Os animais foram observados 21 dias após o desafio viral para verificação do aparecimento de sintomatologia.

Após o período de observação dos animais, os que apresentaram sinais típicos da infecção pelo vírus foram eutanasiados.

Neste experimento, os títulos de anticorpos anti-RVGP foram determinados por ELISA (*Platelia Rabies Kit*®, Bio-rad) e os títulos de anticorpos neutralizantes do *Lyssavirus* da raiva foram determinados por RFFIT (*Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test*), no Instituto Pasteur SSP/SP.

Tabela 7 – Resultados da imunização pela via intraperitoneal com preparação de membranas de S2 contendo RVGP

GRUPO	PREPARAÇÃO	RFFIT (UI/mL)	Platelia® (EU/mL)
G1	RVGP de células S2 + MPLA + Al	49,7	1,09 ± 0,92
G2	RVGP de células S2	79,8	2,94 ± 0,47
G3	Vacina contra raiva	239	5,15 ± 0,59
G4	Salina com MPLA+ Al	2,1	0,02 ± 0,0
G5	Células S2 selvagens	-	0,04 ± 0,0

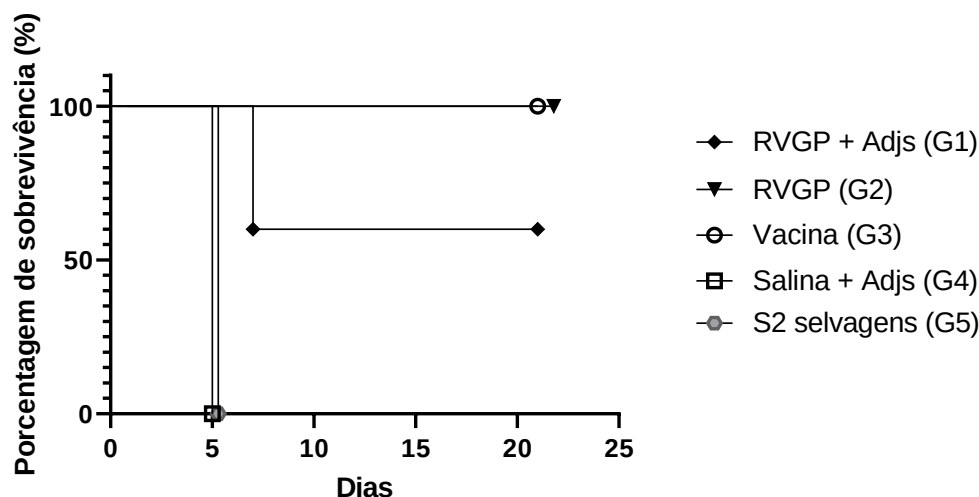
Número de animais por grupo = 5. Nota: no controle negativo foi usada salina e no controle positivo foi administrada a vacina comercial veterinária de raiva Defensor® – Pfizer. Os valores representam a média dos títulos verificados em cada grupo. G5 controle negativo adicional, as células S2 selvagens não possuem em sua membrana a glicoproteína recombinante do vírus da raiva (RVGP).

Os resultados mostram que a preparação de membrana de células S2 contendo RVGP foi capaz de gerar anticorpos em níveis adequados e suficientes para a proteção contra o desafio letal com o vírus da raiva. Há diferenças evidentes de título de anticorpos entre a preparação e a vacina comercial (Tabela 7). Isso potencialmente se deve à presença do adjuvante na vacina comercial e justifica a tentativa de utilizar adjuvantes associados à preparação contendo RVGP. No entanto, a associação de MPLA e hidróxido de alumínio à RVGP demonstrou ser prejudicial à resposta imunológica, gerando menor quantidade de anticorpos específicos anti-RVGP e protegendo apenas parte dos animais imunizados. Apesar de haver apenas proteção parcial na amostra contendo adjuvantes, tanto esta quanto a RVGP sem adjuvantes foram capazes de aumentar o tempo de sobrevivência dos animais imunizados (Figura 9).

Tabela 8 – Análise estatística dos títulos de anticorpos com preparação de membrana de S2 contendo RVGP pela via intraperitoneal

Teste de Tukey múltiplas comparações	Significativo?	Valor Ajustado de P
Vacina vs. Salina	Sim	<0.0001
Vacina vs. RVGP+Adj	Sim	<0.0001
Vacina vs. RVGP	Sim	0,0006
Vacina vs. S2 selvagens (G5)	Sim	<0.0001
Salina vs. RVGP+Adj	Não	0,1498
Salina vs. RVGP	Sim	<0.0001
Salina vs. S2 selvagens (G5)	Não	0,9203
RVGP+Adj vs. RVGP	Sim	0,0035
RVGP+Adj vs. S2 selvagens (G5)	Não	0,5142
RVGP vs. S2 selvagens (G5)	Sim	<0.0001

Figura 9 – Curva sobrevivência frente ao desafio viral em animais imunizados pela via intraperitoneal com preparação de membrana de S2 contendo RVGP



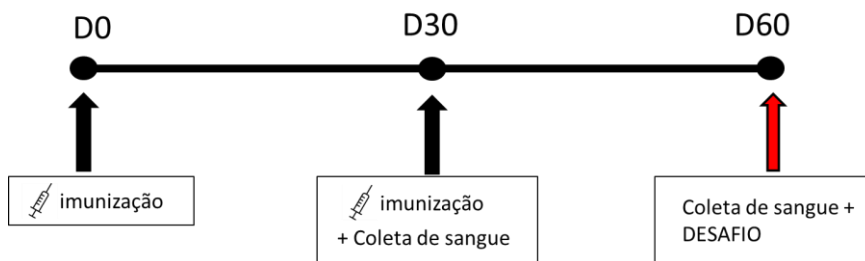
Curva de sobrevivência de Log-Rank (Mantel-Cox). Preparações de RVGP foram estatisticamente (***) $P < 0,001$ capazes de aumentar o tempo de vida dos animais imunizados.

5.4.2.2 Via subcutânea

Como o uso do adjuvante ISCOM não é recomendado pela via intraperitoneal segundo o fabricante de Quil-A® (um dos produtos que compõem o ISCOM), foram utilizadas as vias subcutânea e oral para a avaliação da imunogenicidade da RVGP utilizando esse adjuvante. Neste experimento também foi testado o adjuvante MPLA, porém sem a associação com o hidróxido de alumínio, uma vez que resultados prévios do grupo mostraram que a utilização desse adjuvante com a RVGP em geral resultava em resultados inferiores de títulos de anticorpos, provavelmente devido a alguma incompatibilidade físico-química.

Para a realização do experimento, camundongos Balb/c SPF fêmeas de 8 semanas foram imunizados com duas doses, em intervalos de 30 dias, pela via subcutânea (Figura 10).

Figura 10 – Cronograma de imunização com preparação de membranas de S2 contendo RVGP pela via subcutânea



Esquema de imunização semanal pela via subcutânea. Depois de trinta dias da última dose (D60) foi feita a coleta de sangue e o desafio intracerebral em todos os grupos. Os animais que foram desafiados foram observados 21 dias após o desafio para verificação do aparecimento de sintomatologia.

Os animais foram observados durante 21 dias após o desafio viral, sendo que os que apresentaram sinais típicos da infecção pelo vírus foram eutanasiados. Neste experimento, os títulos de anticorpos anti-RVGP foram determinados apenas por ELISA (*Platelia Rabies Kit*®, Bio-rad).

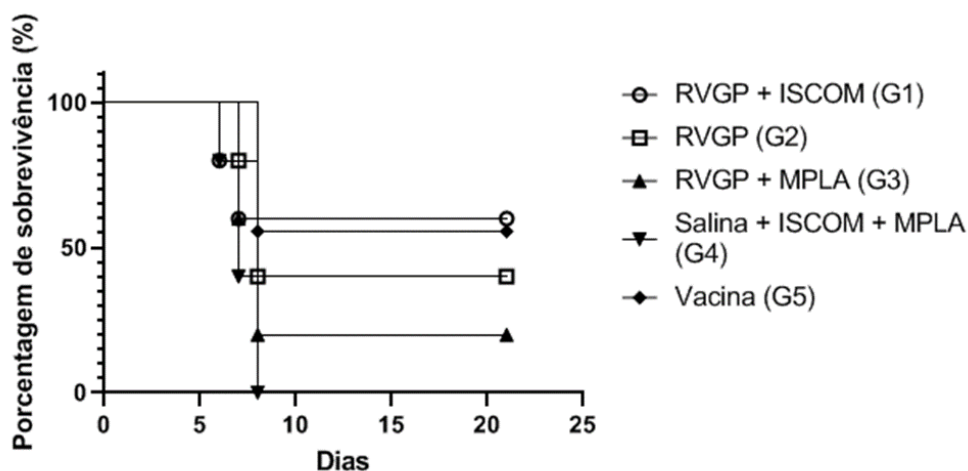
Tabela 9 – Resultados da imunização pela via subcutânea com preparação de membranas de S2 contendo RVGP

GRUPO	PREPARAÇÃO	% de sobrevivência	Platelia® (EU/mL)	
			D30	D60
G1	RVGP de células S2 + ISCOM	60	0,28 ± 0,03	0,78 ± 0,38
G2	RVGP de células S2	25	0,25 ± 0,0	0,68 ± 0,63
G3	RVGP de células S2 + MPLA	20	0,253 ± 0,0	0,51 ± 0,37
G4	Salina + ISCOM + MPLA	0	0,26 ± 0,0	0,3 ± 0,05
G5	Vacina contra raiva	55	0,26 ± 0,0	32,8 ± 44,99

O número de animais por grupo (N) no controle positivo e negativo é n = 9. Em todos os outros grupos n=5. Exclusivamente no G2, n = 4 devido a morte de um animal antes da imunização. No controle negativo foi usado salina e no controle positivo foi administrada a vacina comercial veterinária de raiva Defensor® – Pfizer. Os valores representam a média dos títulos verificados em cada grupo.

A análise estatística dos títulos de anticorpos anti-RVGP retornaram ausência de diferença estatística entre todos os grupos (Anova monocaudal, seguida de teste de comparação múltipla de Tukey, com $p > 0.05$). Isso se deve ao grande desvio padrão observado em todos os grupos. As taxas de sobrevivência, no entanto mostram uma clara diferença entre as preparações, sendo que os animais que atingiram níveis de anticorpos anti-RVGP superiores ou iguais a 1,06 EU/mL sobreviveram ao desafio. Os animais que não sobreviveram apresentavam em sua maioria títulos inferiores a 0,5 EU/mL. Esses dados mostram uma grande variabilidade na sorologia dos animais quando imunizados pela via subcutânea com essas preparações.

Figura 11 – Curva sobrevivência de Log-Rank frente ao desafio viral em animais imunizados pela via subcutânea com preparação de membrana de S2 contendo RVGP

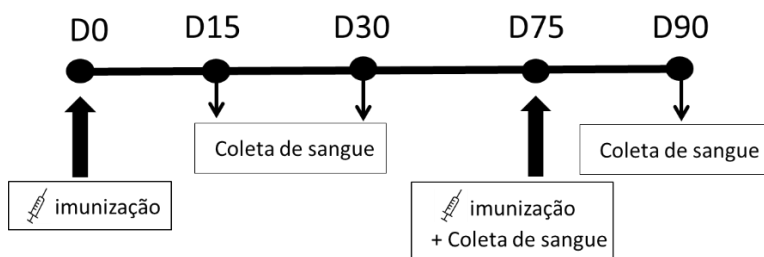


Nota: apenas G5 sobreviveu mais tempo que o controle negativo (G4) ($P = 0,0045$).

5.4.2.3 Via oral:

Camundongos Balb/c SPF fêmeas de 8 semanas foram divididos em grupos contendo 5 animais ($n=5$) e imunizados com duas doses combinando vias, sendo a primeira dose de vacina de raiva via intraperitoneal e segunda dose pela via oral.

Figura 12 – cronograma de imunização de RVGP de células S2 via oral



Esquema de imunização (D0 e D75) pela via oral (reforço) combinada com a intraperitoneal (1ª dose). Amostras de sangue coletadas ao longo do experimento (D15, D30, D75 e D90).

Neste experimento, os títulos de anticorpos anti-RVGP foram determinados apenas por ELISA (*Platelia Rabies Kit®*, Bio-rad).

Tabela 10 – Resultados da imunização de RVGP de células S2 via oral

GRUPOS	PREPARAÇÃO	Platelia® (EU/mL)			
		D15	D30	D75	D90
G1	Vacina contra raiva + RVGP de células S2	0,81 ± 0,24	0,93 ± 0,23	1,17 ± 0,55	0,98 ± 0,28
G2	Vacina contra raiva + salina	1,84 ± 0,09	1,85 ± 0,38	0,57 ± 0,57	0,43 ± 0,51

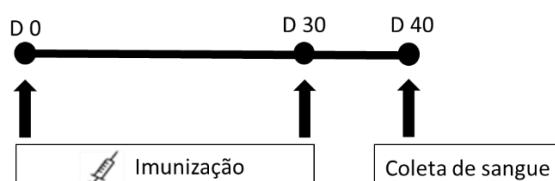
O número de animais por grupo (N) é n = 5. Os valores representam a média dos títulos verificados em cada grupo. Nos dois grupos foi utilizada a vacina comercial veterinária contra raiva Defensor® – Pfizer.

Os dados mostram que o G2 apresentou o efeito esperado de queda do título de anticorpos após 75 dias da imunização ($P < 0.01$). Nesse ponto a aplicação do reforço seria ideal para verificar se haveria um aumento no título de anticorpos. No entanto o grupo em estudo (G1) apresentou comportamento distinto, permanecendo com níveis de anticorpos semelhantes durante todo o experimento. Curiosamente e contrariamente ao que ocorreu no G2, todos os animais do G1 apresentaram manutenção do nível de anticorpos, como pode ser visto pelos baixos valores de desvio padrão ($\pm 0,55$ e $\pm 0,28$ para D75 e D90 de G1, respectivamente). Como não houve aumento no título de anticorpos do grupo G1 no tempo 90 dias, pode-se concluir que o reforço via oral não foi eficaz.

Na tentativa de oferecer alguma proteção ao antígeno e de associar algum efeito adjuvante para a imunização, foi testada a sílica nanoestruturada (SBA-15), combinando a via subcutânea com a via oral. Esse experimento, exclusivamente, foi realizado no Instituto Butantan em colaboração com o Prof. Osvaldo Sant'Anna, em seu laboratório.

Camundongos Balb/c SPF fêmeas de 8 semanas foram divididas em grupos contendo 3 animais por grupo. O esquema de imunização foi de uma dose inicial pela via subcutânea e *booster* pela via oral.

Figura 13 – Cronograma de imunização com preparação de membranas de S2 contendo RVGP + sílica, pela via oral



Esquema de imunização com duas doses pela via subcutânea (D0 e D30). A primeira e a segunda dose foram iguais para cada grupo.

Os títulos de anticorpos anti-RVGP foram determinados por ELISA (*Platelia Rabies Kit®*, Bio-rad).

Tabela 11 – Resultados da imunização com preparação de membranas de S2 contendo RVGP + SBA15

GRUPOS	PREPARAÇÃO	VIA	N	Platelia® (EU/mL)
G1	Sílica	Oral	3	0,0025
G2	RVGP de células S2 + sílica	Oral	3	0,1
G3	RVGP de células S2	Oral	3	0,004

Nota: Os valores representam a média dos títulos verificados em cada grupo.

As análises estatísticas revelaram que apesar dos valores serem muito abaixo do esperado, com o maior título no grupo RVGP + SBA15 de apenas 0,1 EU/mL, esse grupo teve resultados estatisticamente diferentes ($P < 0,0001$) dos seus controles (salina e RVGP).

Tabela 12 – Análise estatística dos títulos de anticorpos da preparação de membrana de S2 contendo RVGP com sílica

Teste de Tukey múltiplas comparações	Significativo?	Valor Ajustado de P
RVGP+SBA 15 vs. SBA 15	Sim	<0.0001
RVGP+SBA 15 vs. RVGP oral	Sim	<0.0001
SBA 15 vs. RVGP oral	Não	0,9753

Finalmente, foi realizado um ensaio de reforço com preparação de membrana contendo RVGP associada a ISCOM pela via oral. Nesse experimento a primeira dose foi realizada com vacina ou RVGP via intraperitoneal e o reforço com RVGP + ISCOM pela via oral.

Tabela 13 – Reforço vacinal via oral com membrana de S2 contendo RVGP

GRUPO	PREPARAÇÃO	Platelia® (EU/mL)			Valor de P
		D14	D21	D28	
G1	Vacina contra raiva (ip)+ RVGP de células S2 + ISCOM (oral)	15,64 ± 4,89	14,85 ± 5,90	17,42 ± 5,16	0,85
G2	RVGP de células S2 (ip)+ RVGP de células S2 + ISCOM (oral)	3,08 ± 1,26	4,5 ± 2,24	9,37 ± 3,39	0,04

Nota: ip: via intraperitoneal. Os valores representam a média dos títulos verificados em cada grupo. O número de animais por grupo (N) é 5. A vacina contra administrada foi a vacina comercial veterinária de raiva Defensor® – Pfizer.

No reforço via oral com trímico + ISCOM, em camundongos que receberam apenas trímico (sem adjuvantes) na primeira dose, houve aumento significativo (Anova monocaudal, $P = 0,04$) na quantidade de anticorpos. Esse dado apresenta a possibilidade de reforço via oral. Ficou claro pelo experimento que o estudo de reforço vacinal via oral deve ser conduzido em condições de nível basal de anticorpos, uma vez que a presença de títulos elevados prejudica a visualização do aumento da quantidade de anticorpos.

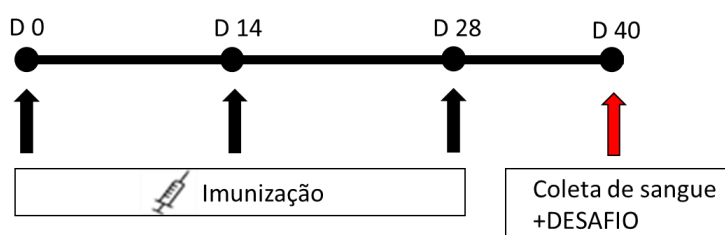
5.4.3 Imunização com RVGP purificada de células S2

Depois de purificadas conforme protocolo estabelecido, as preparações foram formuladas com base na quantidade de antígeno determinado pelo teste de ELISA quantitativo para dosagem de RVGP. A fim de testar as doses da proteína pura que seriam necessárias, o primeiro experimento foi feito com três doses de 5µg/animal. O adjuvante ISCOM (Matrix-M™) foi, dessa vez, gentilmente cedido pelo Dr. Byron Martina e utilizado em Delft – Holanda, durante estágio (FAPESP/BEPE).

5.4.3.1 Via intramuscular

A disponibilidade de uma preparação purificada possibilitou a utilização da via intramuscular para a imunização pela disponibilidade de uma preparação mais concentrada, possibilitando o uso de menores volumes de inoculação e também por ser uma preparação mais pura, com menor probabilidade de ocorrência de reações de toxicidade ou inflamação decorrentes de contaminantes. Para esse experimento, camundongos C57BL/6 de 4 semanas de idade, fêmeas, foram divididos em 5 grupos (n = 6) e imunizados pela via intramuscular nos dias D0, D14 e D28. O soro dos animais foi coletado no dia 40. Foram utilizadas as preparações de RVGP purificada, com e sem adjuvante (Matrix-M™), controle negativo PBS e controle positivo vacina de vírus inativado para uso humano (Artemis), com ou sem adjuvante ISCOM.

Figura 14 – Cronograma de imunização com RVGP purificada pela via intramuscular



Esquema de imunização (D0, D14 e D28) pela via oral combinada com a intraperitoneal. Amostras de sangue coletadas (D40) antes do desafio.

Após a coleta do soro (D40), os camundongos foram desafiados com 100 TCID₅₀ de CVS pela via intracerebral e observados durante 21 dias. A seleção da linhagem de camundongos e o esquema vacinal e de desafio proposto seguiram os protocolos já utilizados na instituição e que possuíam aprovação do conselho de ética em pesquisa animal. Também

seguindo os protocolos da instituição, os soros dos animais foram analisados, desta vez, pelo FAVN e os títulos de anticorpos anti-RVGP foram determinados por ELISA (*Platelia Rabies Kit®*, Bio-rad).

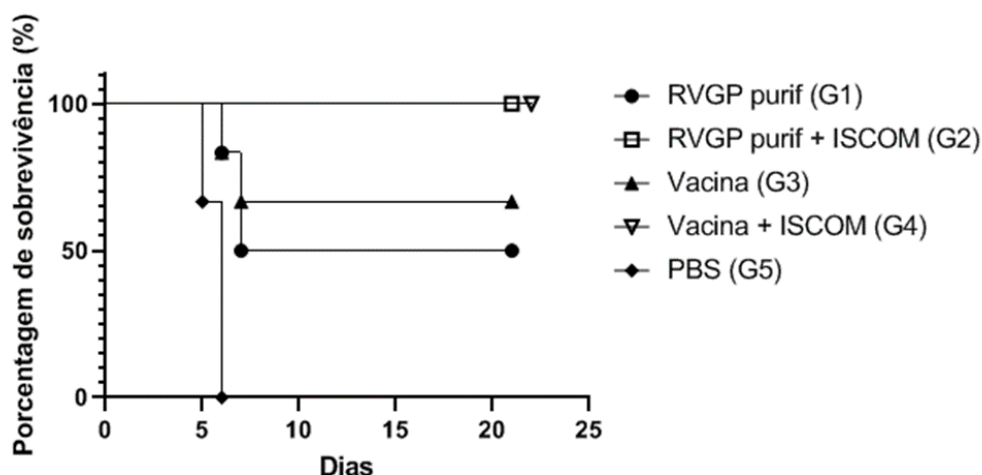
Tabela 14 – Resultados da imunização com RVGP purificada pela via intramuscular

GRUPOS	PREPARAÇÃO	% de sobreviventes	SOROLOGIA	
			FAVN (UI/mL)	Platelia (EU/mL)
G1	RVGP purificada	50	45,9 ± 61,36	3,23 ± 2,4
G2	RVGP purificada + ISCOM	100	442,6 ± 148,23	5,4 ± 1,4
G3	Vacina contra raiva	66,6	118,2 ± 13,43	2,6 ± 1,7
G4	Vacina contra raiva + ISCOM	100	203,1 ± 37,85	3,75 ± 2,5
G5	PBS	0	<0,5	0,12 ± 0,0
G6	ISCOM	-	-	0,12 ± 0,0

Nota: A vacina utilizada foi a vacina contra raiva liofilizada, sem adjuvante, de vírus inativado produzida na Holanda e utilizada no laboratório (Artemis). ISCOM utilizado foi o Matrix – MTM disponível no laboratório. A proteína pura, assim como a vacina foram testadas com e sem o adjuvante. Os valores representam a média dos títulos verificados em cada grupo.

Este experimento mostra claramente o potencial protetor da preparação de RVGP produzida em células S2. A RVGP purificada associada com ISCOM foi capaz de proteger os animais contra o desafio viral de maneira semelhante à vacina inativada com o mesmo adjuvante. Na ausência do adjuvante, ambas as preparações tiveram performances semelhantes. Os dados de sorologia por ELISA (*Platelia®*) mostram diferença entre as preparações com e sem adjuvante, porém sem relevância estatística (Tabela 15). Vale informar que a presença de ISCOM na preparação de RVGP fez com que todos os animais tivessem títulos superiores a 3,46 EU/mL, enquanto entre os imunizados com RVGP apenas, alguns animais apresentaram títulos menores.

Figura 15 – Curva sobrevivência de Log-Rank frente ao desafio viral em animais imunizados com preparação de RVGP purificada



Nota: todos grupos têm tempo de sobrevivência estatisticamente maior que os grupos controle negativo ($P < 0,001$), porém não são estatisticamente diferentes entre si.

Tabela 15 – Curva sobrevivência de Log-Rank frente ao desafio viral em animais imunizados pela via intramuscular com RVGP purificada

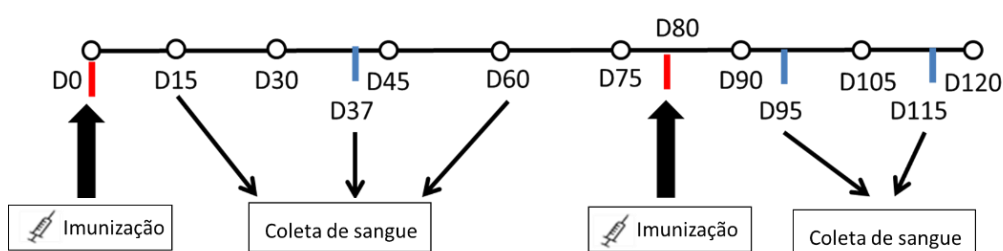
Teste de Tukey múltiplas comparações	Significativo?	Valor Ajustado de P
RVGP purif vs. RVGP purif + ISCOM	Não	0,4785
RVGP purif vs. Vacina	Não	0,9949
RVGP purif vs. Vacina + ISCOM	Não	0,9977
RVGP purif vs. PBS	Não	0,1396
RVGP purif vs. ISCOM	Não	0,1396
RVGP purif + ISCOM vs. Vacina	Não	0,222
RVGP purif + ISCOM vs. Vacina + ISCOM	Não	0,7436
RVGP purif + ISCOM vs. PBS	Sim	0,0024
RVGP purif + ISCOM vs. ISCOM	Sim	0,0024
Vacina vs. Vacina + ISCOM	Não	0,9268
Vacina vs. PBS	Não	0,3363
Vacina vs. ISCOM	Não	0,3363
Vacina + ISCOM vs. PBS	Sim	0,0079
Vacina + ISCOM vs. ISCOM	Sim	0,0079
PBS vs. ISCOM	Não	>0.9999

5.4.3.2 Reforço pela via oral

Com o antígeno bem definido e resultados promissores pela via intramuscular, foi feito um teste combinando esta via com a via oral para o reforço vacinal.

Neste experimento, a via oral foi combinada com a intramuscular em um protocolo experimental mais longo, a fim de aguardar a queda do nível de anticorpos dos animais vacinados, possibilitando a observação do efeito de reforço da preparação. Esse novo experimento foi desenhado variando doses de RVGP combinando as duas vias. Grupos de camundongos Balb/c de 6 semanas ($n = 5$ / grupo) foram imunizados em um esquema vacinal de 2 doses, conforme o cronograma a seguir.

Figura 16 – Cronograma de imunização com RVGP purificada combinando vias (IM+oral)



Doses foram administradas na primeira dose (D0) pela via intramuscular e a segunda dose (D80) variou entre os grupos (via oral ou intramuscular).

Os animais foram imunizados primeiramente pela via intramuscular com amostras de vacina veterinária adjuvantada, salina ou RVGP purificada em duas doses diferentes. A dose de reforço foi administrada pela via intramuscular ou oral, segundo o grupo experimental, utilizando as mesmas preparações descritas (Tabela 16).

Tabela 16 – Relação de grupos e preparações com combinação de vias

GRUPOS	PREPARAÇÃO 1a DOSE	VIA	PREPARAÇÃO 2a DOSE	VIA
G1	Vacina contra raiva	intramuscular	Vacina contra raiva	Intramuscular
G2	Salina	intramuscular	Salina	Intramuscular
G3	Vacina contra raiva	intramuscular	RVGP purificada 3µg/dose + ISCOM	oral
G4	Vacina contra raiva	intramuscular	RVGP purificada 3µg/dose	oral
G5	RVGP purificada 1µg/dose ISCOM	intramuscular	RVGP purificada 3µg/dose + ISCOM	oral
G6	RVGP purificada 3µg/dose + ISCOM	intramuscular	RVGP purificada 3µg/dose + ISCOM	Intramuscular

Nota: No controle negativo foi usado salina e no controle positivo foi administrada a vacina comercial veterinária de raiva Defensor® – Pfizer. Os valores representam a média dos títulos verificados em cada grupo. Os animais foram mantidos durante um período de 115 dias; doses D0 e D80; coletas de sangue nos D15, D37, D60, D95 e D115.

Os títulos de anticorpos anti-RVGP foram determinados por ELISA (*Platelia Rabies Kit®*, Bio-rad).

Tabela 17 – Resultados da imunização com RVGP purificada combinando vias

GRUPOS	SOROLOGIA - Platelina® (EU/mL)				
	D15	D37	D60	D95	D115
G1	2,09 ± 1,19	3,24 ± 1,81	5,01 ± 2,43	4,9 ± 2,90	4,49 ± 2,06
G2	0,12 ± 0,0	0,12 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,00
G3	0,21 ± 0,4	1,29 ± 01,05	1,33 ± 1,46	1,81 ± 1,77	1,58 ± 1,51
G4	0,15±0,04	0,76±0,52	1,05±0,87	1,03± 0,86	1,12± 1,63
G5	0,12 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,00
G6	0,14 ± 0,04	0,31 ± 0,29	0,36 ± 0,33	0,31 ± 0,29	0,75 ±0,08

Nota: No controle negativo foi usado salina e no controle positivo foi administrada a vacina comercial veterinária de raiva Defensor® – Pfizer. As coletas de sangue foram feitas nos D15, D37, D60, D95 e D115.

Este experimento apresentou uma variabilidade inesperada na imunização com vacina de raiva. Enquanto o G1 apresentou altos níveis de anticorpos após 15 dias da primeira dose de vacina ($P < 0.001$), os demais grupos que receberam vacina (G3 e G4) passaram a apresentar níveis de anticorpos mais altos apenas mais tardiamente, a partir da segunda e terceira coleta. Todos os animais utilizados tiveram a mesma origem e foram separados no momento da primeira dose, sendo assim, cada grupo respondeu com bastante homogeneidade internamente. Como os animais geralmente respondem rapidamente à vacina de raiva, com níveis de anticorpos elevados em 07 dias após uma dose, os resultados de títulos baixos levantam a questão sobre a correção dos resultados encontrados também para as preparações com ISCOM, uma vez que os títulos de anticorpos também foram abaixo do esperado. O efeito de reforço também apresentou resultado inesperado, sendo visto apenas um pequeno aumento no título de anticorpos no grupo imunizado com 3 µg de RVGP+ISCOM via intramuscular.

Em suma, o experimento não foi capaz de demonstrar o efeito de reforço via oral da preparação RVGP+ISCOM. Como obtivemos apenas um resultado anterior em que essa possibilidade se mostrava promissora, optamos por não prosseguir com essa abordagem.

5.6 ENSAIO *EX VIVO* DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

O ensaio foi realizado mais de uma vez, variando técnicas, protocolos e concentrações tanto de concanavalina (ConA) como celular. Em todos os experimentos foram utilizadas as mesmas células que foram previamente congeladas a partir de uma réplica do ensaio de imunização com RVGP purificada pela via intramuscular (5.4.3.1). Após o descongelamento as células apresentaram viabilidade superior a 50 %, tendo sido brevemente expandidas antes

da preparação das placas para a análise da proliferação. Os resultados iniciais não permitiram ver diferenças entre os grupos. Foram então introduzidas diversas modificações no protocolo em busca de melhorar a aderência das células às placas de cultura no momento da fixação. As modificações foram testadas com os grupos controle para a verificação da melhoria potencial. No entanto os valores de absorbância encontrados não permitem uma clara distinção das células com e sem proliferação induzida por estímulo específico (RVGP) ou inespecífico (ConA) (Tabela 18), não sendo possível chegar a uma conclusão.

Tabela 18 – Resultados do ensaio de proliferação celular (BrdU)

ESTÍMULO	GRUPOS					
	G1	G2	G3	G4	G5	G6
VACINA	0,45	0,246	0,32	0,31	0,268	0,322
	0,74	0,323	0,309	0,383	0,238	0,29
	0,3	0,327	0,295	0,386	0,257	0,269
ConA	0,316	0,208	0,236	0,241	0,186	0,244
	0,226	0,202	0,315	0,248	0,184	0,247
	0,331	0,202	0,237	0,261	0,161	0,208
MEIO RPMI	0,274	0,197	0,318	0,273	0,177	0,301
	0,257	0,206	0,338	0,283	0,221	0,27

Resultados obtidos no ensaio de proliferação celular com o kit BrdU. Leitura de 450nm. Vacina: vírus inativado, liofilizado produzida na Holanda – Atremis. Con A: concanavalina A é uma proteína que contém apenas folhas β em sua estrutura e pertence à família das lectinas de leguminosas, usada em ensaio de proliferação celular *in vitro*, na proliferação linfocitária e na cultura de esplenócitos. RPMI: meio de cultivo (RPMI 1640) suplementado utilizado no cultivo das células de baço.

6 DISCUSSÃO

Embora as vacinas clássicas contra a raiva sejam eficientes e com metodologia de produção bem estabelecida, ainda existe o interesse em desenvolver novas tecnologias para obtenção de vacinas mais seguras e imunogênicas, visando o desenvolvimento tecnológico com justificativa em fatores como biossegurança e eficiência vacinal (SAKAMOTO et al., 1999; ZHU et al., 2015).

As vacinas recombinantes, que representam a terceira geração, evitam o uso de partículas que contém o material genético, estrutura responsável pela replicação viral, priorizando a segurança do manipulador durante a sua produção. Essas vacinas se baseiam essencialmente na utilização da glicoproteína do vírus da raiva, que é o antígeno responsável pela indução da produção de anticorpos neutralizantes pelo sistema imune do hospedeiro, protegendo-o contra a infecção viral.

Com base nisso, neste trabalho algumas formas de apresentação da RVGP foram avaliadas para a imunização de animais de laboratório. As estratégias utilizadas visaram avaliar as preparações recombinantes para a imunização dos animais, com e sem o uso de adjuvantes. Também foi abordada uma estratégia de utilização das vacinas recombinantes para o reforço vacinal após a imunização com vacina veterinária comercial. Essas estratégias foram estabelecidas tendo em consideração que o problema associado à queda da vacinação de animais domésticos, se deve também à necessidade de vacinação anual e, portanto, uma vacina mais potente poderia trazer benefícios e, por outro lado os casos de reação à vacinação contra raiva em animais domésticos pela via parenteral, o que poderia ser contornado pelo uso da via oral, já utilizada em animais silvestres.

Em relação às preparações utilizadas, o sistema SFV-RVGP se mostrou imunogênico, conferindo proteção ao desafio viral, com bons níveis de anticorpos anti-RVGP e neutralizantes. Também apresentou versatilidade de vias: resultou em 100% de proteção quando administrado pela via subcutânea, sendo superior à proteção conferida pela vacina comercial (55.5%) nesta mesma via. Por outro lado, quando administrado pela via oral não mostrou bons títulos de anticorpos, diferentemente do que ocorre com outros vetores virais

como Vaccinia e Adenovirus utilizados na imunização de animais silvestres (WIKTOR et al., 1986; MAKI et al., 2017). Além disso, possui uma manipulação mais difícil (vetor viral) para a rotina de vacinação em animais de companhia. Mesmo assim, testes com esse sistema de expressão juntamente com um adjuvante devem ser levados em consideração, principalmente pela via oral.

Para a avaliação da imunogenicidade da RVGP foram utilizadas preparações de membrana ou RVGP purificada, diferentes vias de administração e utilização ou não de adjuvantes.

A RVGP de células S2 foi primeiramente utilizada apenas com a lise mecânica das células, permitindo que a glicoproteína viral fosse administrada ancorada em fragmentos de membrana celular, ainda na forma trimérica. Essa preparação se mostrou imunogênica quando administrada pela via intraperitoneal, protegendo os animais frente ao desafio intracerebral (100%). Os animais imunizados com essa preparação apresentaram bons títulos de anticorpos dosados tanto por RFFIT ($\geq 0,5$ UI/mL) como por Platelia® ($\geq 0,5$ EU/mL). O fato de os animais que receberam membrana de células S2 selvagens (não recombinantes) terem morrido igualmente aos que receberam salina, demonstra que a administração da preparação de membrana em si não resultou em qualquer grau de proteção. Igualmente, esses animais não apresentaram títulos de anticorpos específicos no teste sorológico (Platelia®).

Quando a preparação de membrana contendo RVGP foi combinada com o adjuvante MPLA (tanto associado ao alumínio como sem associação) os resultados de proteção e título de anticorpos foram inferiores aos obtidos com a RVGP sem adjuvantes, além de ter causado alopecia em alguns animais no local de aplicação.

O melhor adjuvante testado com a RVGP foi o ISCOM. Esse adjuvante foi utilizado pela via subcutânea, já que a via intraperitoneal não era recomendada pelo fabricante de Quil-A® (um dos componentes do ISCOM). A utilização de RVGP com ISCOM foi claramente superior em termos de proteção e título de anticorpos em relação à preparação sem adjuvante. Os níveis de anticorpos e a proteção foram semelhantes à vacina comercial utilizada pela mesma via.

Como o ISCOM já vem sendo utilizado com êxito pela via oral (SANDERS et al., 2005; CHAUHAN et al., 2017), ele foi avaliado em combinação com a RVGP de células S2, na tentativa de se ter uma boa resposta quando utilizado como *booster*. Porém dado os resultados apresentados, ele não atendeu à essas expectativas como esperado.

Quando a RVGP de células S2 foi obtida purificada, esta foi utilizada combinada ou não com o ISCOM (Matrix-M™, Novavax) para avaliar seu potencial imunogênico. Como não havia ensaios prévios realizados com a proteína pura, utilizou-se a dose máxima possível (5µg/dose) em relação à concentração da proteína e o volume de aplicação adequado à via intramuscular. Dessa forma, a RVGP pura sem adjuvantes apresentou títulos altos na sorologia (45,9 UI/mL no FAVN e 3.23 EU/mL no Platelia®) e apenas 50% de sobrevivência ao desafio, enquanto que a RVGP associada ao ISCOM apresentou melhores resultados tanto no FAVN (442,6 UI/mL) como no Platelia® (5.4 EU/mL), com 100% de sobrevivência no desafio intracerebral. Mesmo a vacina de vírus inativado quando em combinação com o Matrix-M™ apresentou melhor resultado (100% de sobreviventes) que a vacina sem adjuvante (66,6% de sobreviventes).

A avaliação do reforço vacinal pela via oral utilizando RVGP pura associada ao ISCOM foi realizada após 80 dias de imunização pela via intramuscular, seja com vacina comercial ou a própria RVGP em duas doses (item 5.4.3.2). Ao contrário do que ocorreu em experimentos anteriores, os grupos imunizados não apresentaram queda no título de anticorpos conforme o esperado, sendo assim, o reforço vacinal realizado em D80 não apresentou resultados válidos, pois não houve variação para cima dos títulos de anticorpos anti-RVGP nos animais após a dose de reforço. O grupo que recebeu reforço intramuscular ainda experimentou um ligeiro aumento na quantidade de anticorpos, porém ainda em títulos inferiores aos atingidos em outros ensaios deste trabalho. Por outro lado, fica claro em D37 (G5 x G6) que a quantidade de 1 µg/dose foi inferior que 3 µg/dose para a primeira imunização, sugerindo que a quantidade ideal para imunização está em torno ou acima de 3 µg/dose.

A escolha das vias de administração com cada preparação se fundamentou tanto nos conhecimentos teóricos quanto práticos: a via subcutânea é a via de eleição para a maioria das vacinas comerciais veterinárias disponíveis. Já a via intraperitoneal é sabidamente mais

imunogênica quando se trata da glicoproteína recombinante como já mostrado em testes prévios *in vivo* (ASTRAY et al., 2014).

No desenvolvimento de uma vacina, é importante estabelecer o tipo de resposta imune desejada e então selecionar o adjuvante, sem efeitos adversos. Os adjuvantes são predominantemente usados para permitir que uma vacina induza uma forte resposta imune, incluindo uma maior produção de anticorpos e proteção mais duradoura contra infecções virais e bacterianas. As diferentes propriedades dos vários adjuvantes existentes indicam a necessidade de estratégias de formulações individuais para cada vacina específica com base no uso pretendido, tipo de resposta imune desejada, via de administração e população alvo (SHARMA & HINDS, 2012).

Os adjuvantes utilizados neste trabalho são considerados adjuvantes novos com efeitos imuno-estimulantes moderados e menores efeitos colaterais. O adjuvante de Freund, que é uma solução de antígeno emulsionado em óleo mineral e usado como um imunopotenciador, é muito conhecido na veterinária e muito utilizado, porém frequentemente induz efeitos adversos quando administrados em animais. Qualquer vacina que apresente efeitos adversos tem pouca probabilidade de ser aceita não só pelas agências reguladoras, mas também pelos próprios tutores de animais de companhia (SHAH et al., 2001).

A utilização inicial de MPLA e hidróxido de alumínio foi sugerida pelo laboratório desenvolvedor do adjuvante no Instituto Butantan, baseando-se em dados preliminares de ensaios utilizando a hemaglutinina do vírus Influenza (QUINTILIO et al., 2017). Os experimentos iniciais demonstraram que o MPLA associado à RVGP não apresentou bons resultados nos ensaios *in vivo*. No primeiro experimento, a utilização da preparação de membrana contendo RVGP juntamente com o composto de adjuvantes MPLA + Al resultou em 60% de sobreviventes, enquanto que a administração da mesma preparação sem a presença do MPLA e Al resultou em 100% de sobreviventes. Mesmo quando foi avaliado sem a associação com o alumínio, os resultados não foram positivos, uma vez que no experimento de administração pela via subcutânea apresentou apenas 20% de sobreviventes enquanto a mesma preparação quando combinada com o ISCOM pela mesma via apresentou 60% de sobreviventes (item 5.4.2.2).

Também quando avaliamos a sílica (SBA-15), não foram obtidos títulos de anticorpos suficientes independentemente da via de administração ou preparação. A adsorção com a SBA-15, foi feita utilizando a preparação de lisado celular de S2. Como a proteína não estava inteiramente pura (restos de lise celular) pode ter havido prejuízo da sua adsorção à sílica. Com a disponibilidade da RVGP pura, outros testes utilizando a SBA-15 para a imunização oral ou por outras vias poderão ser realizados pelo grupo.

Diferentemente dos adjuvantes anteriormente comentados, o ISCOM apresentou bons resultados, tanto no aumento da sobrevivência dos animais como no aumento dos títulos de anticorpos neutralizantes (seja pelo RFFIT, FAVN ou Platelia®). O ISCOM que possui apresentação eficiente de antígeno e propriedades imunoestimulantes, levou a níveis maiores de proteção em relação ao antígeno sem adjuvante. Este adjuvante já é bem descrito na literatura (SUN et al., 2009) e além de ser comercializado já é usado na medicina veterinária em vacinas para equinos e bovinos (MOREIN et al., 2004). Sempre que utilizado nos experimentos conferiu bons níveis de proteção.

Os resultados sorológicos foram avaliados de acordo com o que é recomendado pela OIE. O RFFIT, FAVN e Platelia® são testes reconhecidos que neste trabalho apresentaram resultados que devem ser discutidos.

O teste de RFFIT significa Teste Rápido de Inibição de Focos Fluorescentes. É um teste de neutralização (inibição) sérico, que mede a capacidade de anticorpos específicos da raiva em neutralizar o vírus da raiva e impedir que o vírus infecte as células. Esses anticorpos são chamados anticorpos neutralizantes do vírus da raiva.

Nos experimentos realizados, os resultados do RFFIT são incompatíveis com o que foi visto no ensaio *in vivo* de proteção ao desafio viral. Foi apresentado um número superior a 0,5 UI/mL no grupo de controle negativo, o que não condiz com o que foi visto no ensaio *in vivo* onde todos animais desse grupo apresentaram sintomas clínicos da doença e foram eutanasiados. Por esse motivo essa ferramenta não foi mais utilizada nos experimentos posteriores. Já os resultados obtidos pelo Platelia®, foram mais coerentes com o que foi observado no ensaio de desafio. Na dosagem pelo Platelia®, esse mesmo grupo controle apresentou níveis inferiores a 0,5 EU/mL, que segundo o fabricante não é nível suficiente para proteção. As unidades expressas no Platelia® em unidades equivalentes por ml (UE/ml)

equivalem às unidades internacionais definidas por soro neutralização, também segundo o fabricante.

A comparação de testes para detecção e quantificação de anticorpos anti-RABV demonstrou não haver diferenças significativas entre RFFIT e FAVN, ambos recomendados pela OIE para exame de soros. O FAVN é realizado no Brasil por laboratórios particulares, para a emissão de laudo para o proprietário que deseja viajar com o animal (seja cão ou gato). Diversos estudos mostram que não há diferença significativa entre os dois testes, apesar de o FAVN ser utilizado para amostras animais e o RFFIT para amostras humanas (BRIGGS et al., 1998; ONDREJKOVÁ et al., 2002).

A mensuração de títulos de anticorpos frente a diversos tipos de testes tem que ser feita cautelosamente. Ao comparar os métodos sorológicos utilizados no diagnóstico de qualquer doença infecciosa, é importante avaliar particularmente sua sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. Para evitar erros nos resultados obtidos por vários procedimentos analíticos, é inevitável a utilização de padrões de referência totalmente caracterizados, reagentes, etc.

O controle mais importante para resultados de testes sorológicos reprodutíveis entre laboratórios é o vírus de desafio bem definido, obtido a partir de uma única fonte. O vírus da raiva CVS é um produto de múltiplas passagens em animais e células e a variação clonal dentro dos estoques de CVS é bem documentada. As diferenças entre os vírus de desafio podem facilmente afetar os testes comparativos entre laboratórios. Embora não frequentes, mutações já foram encontradas em vírus obtidos de laboratórios, independentemente da passagem do vírus obtido do CDC (BRIGGS et al., 1998). Portanto, se as medidas de controle de qualidade forem mantidas para todos os reagentes usados nos testes sorológicos para a raiva, vários métodos diferentes podem fazer a mensuração de anticorpos em resposta à vacinação contra a raiva (MOORE et al., 2017).

Por sua vez, o teste de ELISA Platelia® é indicado para a detecção e titulação de IgG contra a glicoproteína do vírus da raiva em soros de cães, gatos e raposas. Por não utilizar anticorpo secundário específico e sim streptavidina conjugada, ele foi utilizado no trabalho para a quantificação de IgG anti-RVGP em amostras de soro de camundongos. Pode-se questionar até que ponto os anticorpos de ligação testados por Platelia® se correlacionam com anticorpos neutralizantes, avaliados nos testes RFFIT e FAVN. No entanto, a técnica do Platelia® que é

baseada em ELISA foi adotada pela OIE para titulação de anticorpos contra raiva há mais de uma década (CLIQUET et al., 2003; BAHLOUL et al., 2005). Nesse sentido, como foi observado que os títulos de anticorpos mensurados pelo ensaio de Platelia® tiveram maior correspondência com o perfil de proteção encontrado no ensaio de desafio, optou-se por usar os resultados do Platelia® como método de dosagem de anticorpos anti-RVGP.

O desenvolvimento de uma vacina contra raiva veterinária bem-sucedida não é somente influenciada por fatores imunológicos, mas também pelo tipo de antígeno, formulação e aspectos de entrega. Esta última inclui a necessidade de um vetor ou um sistema específico de entrega, a escolha da via de administração e a natureza da espécie – alvo (população e seu habitat). Uma vacina, seja ela destinada para os humanos ou animais, induz uma resposta imune efetiva, apresenta mínimos efeitos colaterais e deve ser produzida com um bom custo benefício em larga escala. Além desses requisitos, muitos dos problemas em relação a uma entrega efetiva dos antígenos das vacinas, estão na situação em que o animal se encontra. A vacinação de animais silvestres, de produção ou de companhia tem cenários totalmente diferentes e requerem estratégias específicas para controle de doenças infecciosas.

A raiva é uma doença de epidemiologia variável quando se compara os diferentes nichos. Animais selvagens são problemáticos quando se trata de vacinação justamente por não se ter fácil acesso a esses animais. Se a vacina for administrada pela via parenteral, fica praticamente impossível manter a cobertura vacinal, ainda mais com vacinas que exijam reforço.

Teoricamente, animais de companhia podem ser facilmente acompanhados e podem ser individualmente manipulados, mas especificamente para a raiva, ainda temos grandes falhas na cobertura vacinal devido à grande população de animais criados soltos, animais errantes e a necessidade de revacinação anual. Em ambos os casos (de animais selvagens e domésticos) a vacinação oral seria ideal, porém exige o desenvolvimento de sistemas de entrega específicos para cada espécie. Vos et al. (2017), verificaram grandes diferenças nos títulos vacinais necessários para se induzir resposta imune protetora contra raiva após vacinação oral em diferentes espécies reservatórias. Há espécies que são suscetíveis a vacinação oral e outras que são refratárias a esse tipo de imunização, como o gambá listrado. Esses desafios, juntamente com os obstáculos comerciais e de regulamentação no desenvolvimento de vacinas veterinárias,

acabaram restringindo o número de produtos desenvolvidos para animais, especialmente os animais selvagens (SHARMA & HINDS, 2012).

Os problemas relacionados à formulação de vacinas veterinárias não só variam com a espécie – alvo, mas também são significativamente influenciados pelas características dos antígenos selecionados a serem formulados. No presente estudo apresentou-se dois tipos de preparações vacinais: um vivo e um não vivo. As vacinas vivas, de um modo geral, são capazes de induzir tanto uma resposta imune celular como humoral pelo fato de o organismo conseguir infectar a célula hospedeira. Porém, há alguns fatos ligados à segurança de vacinas vivas que devem ser considerados, como a virulência residual, reversão da patogenicidade, entre outras (TIZARD, 2002). O sistema SFV – RVGP utiliza um vetor viral e apresenta a vantagem de não ser replicativo, mesmo sendo considerado um sistema vivo onde suas partículas são infecciosas (RIEZEBOS-BRILMAN et al., 2006).

Já as vacinas não-vivas são mais seguras que as vacinas vivas, mas a incapacidade delas de infectar células usualmente resulta na indução de uma resposta imune humoral com pequena indução da resposta mediada por células, tornando-as menos efetivas quando comparadas às vacinas vivas ou atenuadas (ROTH & HENDERSON, 2001). Consequentemente, as vacinas não-vivas geralmente demandam a adição de adjuvantes e múltiplas doses para alcançar e sustentar o nível desejado de proteção (SHARMA & HINDS, 2012).

Por serem mais seguras, a vacinologia junto à biotecnologia abriram caminho para o desenvolvimento de vacinas com antígenos não vivos, esses avanços na biotecnologia e biologia molecular promoveram a capacidade de utilização de subunidades, tal proteínas imunogênicas, peptídeos ou ainda as vacinas de DNA ou RNA.

No caso da raiva, a segurança na manipulação do vírus é parte fundamental da produção vacinal, uma vez que se trata de uma zoonose quase 100% fatal. O sistema de expressão da RVGP em células S2, é um sistema seguro que expressa eficientemente a RVGP que é a responsável por induzir a produção de anticorpos pelo hospedeiro. Dessa maneira, tem-se um antígeno de fácil manipulação no laboratório, e cultivo celular bem descrito. Nos experimentos *in vivo*, não apresentou nenhum tipo de reação adversa e apresentou bons títulos de anticorpos para a raiva, melhorados quando adicionou-se o adjuvante ISCOM.

Idealmente, uma vacina de sucesso requer uma consideração cautelosa na sua formulação e um mecanismo de entrega a diferentes animais, que vivem em diferentes ambientes. A vacinação oral é a opção que atende tanto os animais silvestres como os animais domésticos. Hoje, todas as vacinas contra raiva pela via oral são baseadas em replicação de vírus competentes capazes de se replicar inicialmente na cavidade oral para gerar algum tipo de resposta imune pois devido à instabilidade do vírus da raiva, o trato gastro intestinal causa rápida degradação o antígeno. A via oral parece estar sendo o problema da falta de eficácia dessas vacinas, que quando recebem o mesmo antígeno pela via intramuscular, apresentam altos níveis de anticorpos neutralizantes (VOS et al., 2017). Esse mesmo resultado foi visto no presente estudo onde preparações administradas pela via oral produziram um título menor de anticorpos do que as administradas pela via parenteral, seja ela intramuscular ou subcutânea. A via oral ainda levanta questões se as espécies suscetíveis responderiam uniformemente, uma vez que a dieta de cada espécie é diferente: não é possível dizer se um gato que se alimenta exclusivamente de carne responderá da mesma maneira que um cão que tenha uma outra dieta e um pH diferente (mais ácido, por exemplo).

A utilização do antígeno recombinante pode ser feita tanto para a imunização primária, como para o reforço vacinal, que também apresentou potencial em ensaios preliminares para ser administrado pela via oral. Mesmo assim, os ensaios pela via oral ainda devem ser explorados para conclusões mais precisas.

Com o presente estudo, foram apresentados fortes candidatos à uma nova abordagem vacinal, que é mais segura e se mostrou eficiente frente ao desafio intracerebral, protegendo os camundongos no teste de desafio. Ainda é necessário finalizar os estudos celulares *ex vivo*, pois a avaliação da eficácia da vacinação depende também de qual tipo de resposta imune foi produzida, se as células foram devidamente estimuladas e quais citocinas foram produzidas.

Os desafios de se obter uma nova vacina veterinária de subunidade são muitos. Esse estudo mostra de uma forma preliminar que há candidatos com potencial para serem utilizados como vacinas no futuro. Porém muitos estudos referentes à dose e via de administração ainda devem ser feitos em laboratório para permitir testes finais em espécies específicas.

7 CONCLUSÕES

Com esse trabalho foi possível concluir que:

- 1- O sistema SFV-RVGP foi capaz de imunizar camundongos pela via intraperitoneal e subcutânea gerando altos títulos de anticorpos anti-RVGP e protegendo os animais contra o desafio letal com o vírus da raiva.
- 2- A RVGP de células S2 foi capaz de proteger camundongos contra o desafio viral (CVS), tanto na sua forma ancorada à membrana das células, como na sua forma purificada. Os títulos de anticorpos e proteção ao desafio foram melhores quando a RVGP foi associada ao adjuvante ISCOM.
- 3- O estudo das diferentes vias de imunização demonstrou superioridade para as vias intraperitoneal e intramuscular, frente às vias subcutânea e oral. A via subcutânea apresentou grande variabilidade e a via oral não apresentou resultados satisfatórios em esquema de vacinação e reforço ou apenas de reforço.

9 REFERÊNCIAS

- Albas A, Campos ACA, Araujo DB, Rodrigues CA. et al., Molecular characterization of rabies virus isolated from non haematophagous bats in Brazil, *Rev Soc Bras Med Trop.* 44(6): 678-683. 2011.
- Almeida, M.F. et al. Humoral immune response of dogs to the inactivated suckling mouse brain vaccine utilized in antirabies campaigns in Brazil. *Revista Saúde Pública*, v.31, n.5, p.502-507, 1997.
- Almeida, M.F., Favoretto, S.R., Martorelli, L.F.A. et al. (2011). Characterization of rabies virus isolated from a colony of *Eptesicus Furinalis* bats in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. SãoPaulo.* 53(1): 31-7.
- Astray, R. M.; Augusto E.; Yokomizo, A. Y.; Pereira, C. A. Analytical approach for the extraction of recombinant membrane viral glycoprotein from stably transfected *Drosophila melanogaster* cells. *Biotechnol J*, 3:98–103. 2008.
- Astray, R. M.; Jorge, S.A.C.; Pereira, C. A. Rabies vaccine development by expression of recombinant viral glycoprotein. *Arch Virol.* 162(17):323–332, 2007.
- Aubert, M.F.A: Practical significance of rabies antibody in cats and dogs. *Rev Sci Techn Off Int Epiz*, 11(3):735–760. 1992.
- Badrane H, Bahloul C, Perrin P, Tordo N, (2001). Evidence of Two *Lyssavirus* Phylogroups with Distinct Pathogenicity and Immunogenicity. *J Virol.* 75(7): 3268-3276.
- Badrane H. & Tordo N. Host switching in *lyssavirus* history from the chiroptera to the carnivora orders. *J. Virol.* 75:8096-8104. 2001.
- Baer, G. M. Evaluation of an animal rabies vaccine by use of two types of potency tests. *Am. J. Vet. Res*, v.58, p.837-840, 1997.
- Baer, G.M. *Historia natural de la rabia*. Mexico: La Prensa Médica Mexicana, 1975.
- Baer, G.M. The history of rabies. In: *Rabies*. Jackson AC, Wunner HW (Eds), 2nd edn., Academic Press, San Diego, USA, pp 1-22. (2007).
- Bahloul C, Jacob Y, Tordo N, Perrin P, (1998). DNA based immunization for exploring the enlargement of immunological cross reactivity against the *lyssavirus*. *Vaccine*, 16(4): 417-425.

Bahloul, C. et al. Comparative evaluation of specific ELISA and RFFIT antibody assays in the assessment of dog immunity against rabies. *Epidemiol. Infect.* 133, 749–757. Cambridge University Press. 2005.

Bardenave G. Louis Pasteur (1822–1895). *Microbes Infect* 2003; 5:553–60.

Benmaamar, R., Astray, R.M, Wagner, R., Pereira, C.A. High-level expression of rabies virus glycoprotein with the RNA-based Semliki Forest Virus expression vector *J Biotechnol*, 139 (2009), pp. 283-290.

Beran, George W. Handbook of zoonoses, second edition, section B: viral. Rabies and infections by rabies-related viruses, p-308-350. United States, CRC Press, INC., 1994.

Blanton, J.D., Palmer, D., Rupprecht, C.E.. Rabies surveillance in the United States during 2009 *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 237 (6) (2010), pp. 646-657.

Bossart G.D. Marine mammals as Sentinel Species for Oceans and Human Health. *Wildlife and Marine Mammals, Veterinary Pathology*, 2011.

Boyaka & Fujihashi. Host Defenses at Mucosal Surfaces. Chapter 20. *Clinical Immunology (Fifth Edition). Principles and Practice.* p. 285-298, 2019.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Normas técnicas de profilaxia da raiva humana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014.

Brasil. Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da raiva no Brasil, (2015) (acesso em 19/09/2018). <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/raiva/situacao-epidemiologica>

Brasil. Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da raiva no Brasil, (2018). Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/raiva/situacao-epidemiologica> (Acesso 05/03/2019).

Brasil. Ministério da Saúde. SUS. Esquema para profilaxia da raiva humana pós-exposição com vacina de cultivo celular. Disponível em http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/folder/esquema_profilaxia_raiva_humana.pdf (Acesso em 28/04/2019).

Briggs, D.J. et al. A Comparison of Two Serological Methods for Detecting the Immune Response after Rabies Vaccination in Dogs and Cats being Exported to Rabies-free Areas. *Biologicals*. Volume 26, Issue 4. p. 347-355, 1998.

- Briggs, D.J.; Dreesen, D. W.; Wunner, W. H. Vaccines. In: Jackson, A.C.; Wunner, W.H. Rabies. USA: Elsevier Science, p.371-400. 2002.
- Bunn, T. O. Canine and feline rabies vaccines, past and present. In: Baer, G.M. The Natural History of Rabies. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.415-425.
- Bunschoten, H.; Gore, M.; Claassen, I.J.; Uytdehaag, F.G.; Dietzschold, B.; Wunner, W.H.; Osterhaus, A.D. Characterization of a new virus-neutralizing epitope that denotes a sequential determinant on the rabies virus glycoprotein. *J Gen Virol.* 70 (Pt 2) :291-8. 1989.
- CDC. Centers for Diseases Control and Preventions, (2017). Rabies.
https://www.cdc.gov/rabies/location/usa/surveillance/human_rabies.html (acesso em 05/03/2019).
- Celis, E. et al. Identification of a rabies virus T cell epitope on the basis of its similarity with a hepatitis B surface antigen peptide presented to T cells by the same MHC molecule (HLA-DPw4). *J Immunol.* V. 145, p.305-10, 1990.
- Celis, E. et al. Recognition of rabies and rabies-related viruses by T cells derived from human vaccine recipients. *J Virol.* V. 62, n. 9, p.3128-134, 1988.
- Chabaud-Riou, M. Moreno, N. et al. G-protein based ELISA as a potency test for rabies vaccines. *Biologicals.* V.46. p. 124-129. 2017.
- Cleaveland, S. Kaare, M.; Knobel, D.; Laurenson, K. Canine vaccination – providing broaden benefits for disease control. *Veterinary microbiology* 177, pp. 43-50. 2006.
- Cleaveland, S.. Epidemiology and control of rabies. The growing problem of rabies in Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92, 131-134, 1998.
- Cliquet F, Sagne L, Barrat Jet al. A new protocol for the quantitation of rabies neutralizing antibodies in serum of cats and dogs. Abstract. VII Annual International Meeting Advances Towards Rabies Control in the Americas, 9-13 December, Atlanta, GA, USA, 1996.
- Cliquet, F. et al. Standardization and establishment of a rabies ELISA test in European laboratories for assessing the efficacy of oral fox vaccination campaigns. *Vaccine* 21:2986-2993, 2003.
- Coleman, P.; Ferve, E.; Cleaveland, S. Estimating the public health burden of rabies. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 140-142, 2004.
- DEVISA, Departamento de Vigilância em Saúde de Campinas. 2017.

- Diaz AM, Papo S, Rodriguez A, Smith JS, (1994). Antigenic Analysis of Rabies virus Isolates from Latin America and the Caribbean. *Zoonoses Public Hlth*, 41: 153-160.
- Duewell, P.; Kisser, U.; Heckelsmiller, K.; Hoves, S.; Stoitzner, P.; Koernig, S.; Morelli A.B.; et al., ISCOMATRIX Adjuvant Combines Immune Activation with Antigen Delivery to Dendritic Cells In Vivo Leading to Effective Cross-Priming of CD8+ T Cells. *The Journal of Immunology*. 187 (1) 55-63, 2011.
- Edelman, Robert. Vaccine Adjuvants, *Reviews of Infectious Diseases*, Volume 2, Issue 3. Pages 370–383. 1980.
- Ertl, H.C.J. & Xiang, Z.Q. Genetic Immunization. *Vir Immunol*, V. 9, p.1-9, 1996.
- Esh, J.B.; Cunningham, J.G.; Wiktor, T.J. Vaccine-induced rabies in four cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 180 (1982), pp. 1336-1339
- Esposito J, Brechling K, Baer G, Moss B (1987) Vaccinia virus recombinants expressing rabies virus glycoprotein protect against rabies. *Virus Genes* 1:7–21
- Fehlner-Gardiner C, Nadin-Davis S, Armstrong J, Muldoon F, Bachmann P, Wandeler A (2008) Era vaccine-derived cases of rabies in wildlife and domestic animals in Ontario, Canada, 1989–2004. *J Wildl Dis* 44:71–85
- Feder, H.M., Petersen, B.W., Robertson, K.L. et al. Rabies: Still a Uniformly Fatal Disease? Historical Occurrence, Epidemiological Trends, and Paradigm Shifts. *Curr Infect Dis Rep* 14, 408–422 (2012).
- Fekadu M, Shaddock JH, Sanderlin DW, Smith JS, (1988). Efficacy of rabies vaccines against Duvenhage virus isolated from European house bats (*Eptesicus serotinus*), classic rabies and rabies-related viruses. *Vaccine*, 6(6): 533-539.
- Fernandes et al., Antibodies against rabies virus in dogs with and without history of vaccination in Santa Maria – RS – Brazil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 47:11, 201 e20170125, 2017. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20170125>. Microbiology. Accessed: May, 15, 2019.
- Ferreira, A.J.; Doenças infecto-contagiosas dos animais domésticos. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 1968.
- Fitzgerald, J.C.; Gao, G.-P.; Reyes-Sandoval, A. et al. A simian replication-defective adenoviral recombinant vaccine to HIV-1 gag. *J. Immunol*. 2003, 170, 1416-1422.

- Fitzpatrick, M.C.; Hampson, K.; Cleaveland, S. et al. Potential for Rabies control through dog vaccination in Wildlife-Abundant communities of Tanzania. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. V. 6, Issue 8, e1796. 2012.
- Flint, S.J.; Enquist, L.W.; Rancaniello, V.R.; Skalka, A.M. Principles of virology, molecular biology, pathogenesis and control animal viruses. USA: AMS, 2004.
- Fooks AR, (2004). The challenge of new and emerging lyssavirus *Lyssaviruses*, *Expert Review of Vaccines*, 3:(4), 333-336.
- Friedberger, E.; Frohner, E. *Veterinary Pathology*. London: Hurst and Blackett, 1904.1v.p. 353.
- Fuenzalida E, Palacios R, Borgono JM. Anti-rabies antibody responses in man to vaccine made from infected suckling-mouse brains. *Bull World Health Organ*; 30:431–6. 1964.
- Galetti, M.; Pedrosa, F.; Keuroghlian, A.; Sazima, I. Liquid lunch – vampire bats feed on invasive feral pigs and other ungulates. *Natural History Notes*. 2016. Disponível em <https://doi.org/10.1002/fee.1431> acesso em 23/04/2019.
- Gaudin Y, Ruigrok RW, Tuffereau C, Knossow M, Flamand A. Rabies virus glycoprotein is a trimer. *Virology* 187(2):627–632. 1992.
- Gaudin, Y. et al. A Reversible conformational changes and fusion activity of rabies virus glycoprotein. *J. Virol.* V. 65, p. 4853–59, 1991.
- Grassi, M.; Wandeler, A.I.; Peterhans, E. Enzyme-linked immunosorbent assay for determination of antibodies to the envelope glycoprotein of rabies virus. *J Clin Microbiol.*;27:899–902. 1989.
- Hagiwara, M.K.; Megid, J. Imunização e vacinas. IN: Andrade, S.F. *Manual de Terapêutica Veterinária*. São Paulo: Roca, 2004. Cap.24.p.591-628.
- Haider, S. Rabies: old disease, new challenges. *Public health. CMAJ*, 2008. 178(5). 562–563.
- Hanlon C.A., Kuzmin I.V., Blanton J.D., Weldon W.C., Manangan J.S., Rupprecht C.E. Efficacy of rabies biologics against new lyssavirus *Lyssaviruses* from Eurasia *Virus Res.*, 111 (1) (2005), pp. 44-54.
- Hampson K, Coudeville L, Lembo T, Sambo M, Kieffer A, et al. (2015). Estimating the Global Burden of Endemic Canine Rabies. *PLOS Neglected Tropical Diseases*: 9(5).

Hemachudha, T.; Ugolini, G.; Wacharapluesadee, S.; Sungkarat, W.; Shuangshoti, S.; Laothamatas, J. Human rabies: neuropathogenesis, diagnosis, and management. *Lancet Neurol.* 2013 May;12(5):498-513.

Hicks, D.J.; Fooks, A.R.; Johnson, N. Developments in rabies vaccine. *Clinical and experimental Immunology* 169: 199-204, 2012.

Hildegund, C.G. Novel Vaccines to Human Rabies. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, Volume 3, Issue 9, e515. September, 2009.

Hooper, D.C. Morimoto, K. et al. Collaboration of antibody and inflammation in the clearance of rabies virus from the central nervous system. *J Virol*; 72: 3711-9, 1988.

Horton DL, Banyard AC, Marston DA, Wise E, et al. (2014). Antigenic and genetic characterization of a divergent African virus, Ikoma lyssavirus *Lyssavirus*. *J Gen Virol.* 95(5): 1025-1032.

Hughes GJ, Orciari LA, Rupprecht CE. Evolutionary timescale of rabies virus adaptation to North American bats inferred from the substitution rate of the nucleoprotein gene. *J Gen Virol.*; 86:1467–1474. 2005.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses, (2018). Mononegavirales, Rhabdoviridae, *Lyssavirus* *Lyssavirus*. https://talk.ictvonline.org/ictvreports/ictv_online_report/negative_sense_rnaviruses/mononegavirales/w/rhabdoviridae/795/genus_lyssavirus_Lyssavirus (acesso em 21/03/2019).

Ito FH, “Raiva Urbana: aspectos clínicos e programa de controle”, XXXV Semana Capixaba do Médico Veterinário e III encontro regional de Saúde Pública em Medicina Veterinária. Setembro de 2008, Guarapari, ES.

Jackson, A.C. Rabies (Third Edition), Scientific Basis of the Disease and Its Management. Chapter 1 - History of Rabies Research, Pages 1-15. 2013.

Johnson, N.; Cunningham, A.F.; Fooks, A. R. The immune response to rabies virus infection and vaccination. *Vaccine* 28: 3896-3901, 2010.

Kaur M., et al. Rabies DNA vaccine: no impact of MHC class I and class II targeting sequences on immune response and protection against lethal challenge. *Vaccine*, V. 27, p. 2128-37, 2009.

King, L.J. et al. Executive summary of the AVMA One Health Initiative Task force Report. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 233(2): 259-61. 2008.

- Kissling, R.E. Growth of rabies virus in non-nervous tissue. *Proc Soc Exp Biol Med*; 98:223–5. 1958.
- Knobel, D.; Cleaveland, S.; Coleman, P.G.; Ferve, E.; Meltzer, M.I. et al. Re-evaluating the burden of rabies in Asia and Africa. *Bull. World health Orgn.* 83, 360-368, 2005.
- Kondo A. Growth characteristics of rabies virus in primary chicken embryo cells. *Virology*; 27:199–204, 1965.
- Koprowski H (1986) Oral immunization and protection of raccoons (*Procyon lotor*) with a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:7947–7950.
- Koprowski H, Cox HR. Studies on chick embryo adapted rabies virus: I. Culture characteristics and pathogenicity. *J Immunol*; 60:533–54. 1948.
- Koraka, P.; Bosch, B.J.; Cox, M.; Chubet, R.; Amerongen, G.; Lövgren-Bengtsson, K.; Martina, B.E.E.; Roose, J.; Rottier, P.J.M.; Osterhaus, A.D.M.E. A recombinant rabies vaccine expressing the trimeric form of the glycoprotein confers enhanced immunogenicity and protection in outbred mice. *Vaccine*, 4644-4650, 2014.
- Kotait I. Past In: Raiva humana causada pela variante 3 *Desmodus rotundus*. Instituto Pasteur, São Paulo 7:3, 2003.
- Kotait, I. Raiva: Aspectos gerais e clínica. In: Manual Técnico do Instituto Pasteur, 8ª edn. Kotait I, Carrieri ML, Takaoka NY (Eds). Instituto Pasteur, São Paulo, Brasil, 49 p. (2009).
- Krebs, J. W., Rupprecht, C. E. and Childs, J. E.. 2000. Rabies surveillance in the United States during 1999. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 217: 1799–1811.
- Lafon, M.; Wiktor, T.J.; Macfarlan, R.J. Antigenic Sites on the CVS Rabies Virus Glycoprotein: Analysis with Monoclonal Antibodies. *J. gen. Virol.* 64, 843-851. Printed in Great Britain. 1983.
- Lemos, M.A.N.; Santos, A.S.; Astray, R.M.; Pereira, C.A.; Jorge, S.A.C. Rabies virus glycoprotein expression in *Drosophila* S2 cells. I. Design of expression/selection vectors, subpopulations selection and influence of sodium butyrate and culture medium on protein expression. *J Biotechnol*; 143:103-110. 2009.
- Lubroth, J.; Rweyemamu, M.M.; Viljoen, G., et al. Veterinary vaccines and their use in developing countries. *Rev Sci Tech.* 26(1):179-201. 2007.

- Lütticken, D.; Segers, R.P.A.M.; Visser, N. Veterinary vaccines for public health and prevention of viral and bacterial zoonotic diseases. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, v.26, n.1, p.165-177, 2007.
- Macfarlan, R. et al. T cell responses to cleaved rabies virus glycoprotein and to synthetic peptides. *J Immunol.*, V. 133, p. 2748-52, 1984.
- Maki, J., Guiot, A.-L., Aubert M., et al. Oral vaccination of wildlife using a vaccinia–rabies-glycoprotein recombinant virus vaccine (RABORAL V-RG®): a global review. *Vet. Res.*, p. 48:57 (2017).
- Mani, R.S.; Madhusudana, S.N. Laboratory Diagnosis of Human Rabies: Recent Advances. *The Scientific World Journal*. 2013:569712. 2013.
- Marissen, W.E.; Kramer, R.A.; Rice, A.; Weldon, W.C.; Niezgoda, M.; Faber, M.; Slootstra, J.W.; Meloen, R.H.; Clijsters-Van der H.M.; Visser, T.J.; Jongeneelen, M.; Thijsse, S.; Throsby, M., de K.J.; Rupprecht, C.E., Dietzschold, B.; Goudsmit, J.; Bakker, A.B. Novel rabies virus-neutralizing epitope recognized by human monoclonal antibody: fine mapping and escape mutant analysis. *J Virol*. 79: 4672–4678. 2005.
- Marston DA, Ellis RJ, Wise EL, Aréchiga Ceballos N, Freuling CM, Banyard AC, et al. (2017). Complete Genome Sequence of Lleida Bat Lyssavirus *Lyssavirus* . *Genome* 5(2): e01427 16.
- Marston, D. A.; McElhinney, L.M.; Johnson, N.; Müller, T. et al.(2007). Comparative Analysis of the Full Genome Sequence of European Bat Lyssavirus *Lyssavirus* Type 1 and Type 2 with Other *Lyssavirus* *Lyssaviruses* and Evidence for a Conserved Transcription Termination and Polyadenylation Motif in the G L 3' Non Translated Region. *Journal of General Virology*, 88: 1302 14.
- Masatani, T.; Ito, N.; Ito, Y.; Nakagawa, K.; Abe, M.; Yamaoka, S.; Okadera, K.; Sugiyama, M. (2013). Importance of rabies virus nucleoprotein in viral evasion of interferon response in the brain. *Microbiol Immunol*. 57: 511 517.
- Mawas F, Feavers IM, Corbel MJ. Serotype of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide can modify the Th1/Th2 cytokine profile and IgG subclass response to pneumococcal–CRM197 conjugate vaccines in a murine model. *Vaccine* 2001; 19: 1159-66.
- McCallum, H.; Hocking, B.A. Reflecting on ethical and legal issues in wildlife disease. *Bioethics*, v.19, n.4, p.336-347, 2005.

- McGhee, J.R.; Mestecky, J. et al. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine*. Volume 10, Issue 2, p. 75-88. 1992.
- Menozi BD, Oliveira RN, Paiz LM, Richini Pereira VB, Langoni H, (2017). Antigenic and genotypic characterization of rabies virus isolated from bats (Mammalia: Chiroptera) from municipalities in São Paulo State, Southeastern Brazil. *162*(5): 1201-1209.
- Monroe B.P., Yager P., Blanton J., Birhane M.G., Wadhwa A., Orciari L., Petersen B., Wallace R. (2016). Rabies surveillance in the United States during 2014. *J Am Vet Med A*. 248(7): 777-788.
- Morein, B.; Hu, K.; Abusugra, I. Current status and potential application of ISCOMs in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56 (2004) 1367–138.
- Morters, M.K. et al. Achieving population level immunity to rabies in free-roaming dogs in Africa and Asia. *PLoS Neglected Tropical Disease*, v.8, n.11, e3169, 2014.
- Morton, D.B. Vaccines and animal welfare. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, v.26, n.1, p.157-163, 2007.
- Mowat, A.M. Dendritic cells and immune responses to orally administered antigens. *Vaccine* 23:1797-1799, 2005.
- Murphy, F.A.; Gibbs, E.P.J.; Horzinek, M.C.; Studdert, M.J. *Veterinary Virology*, 3rd edition. Academic press, USA 1999.
- Nagarajan, T.; Marissen, W.; Rupprecht, C. Monoclonal antibodies for the prevention of rabies: Theory and clinical practice. *Antibody Technology Journal*, v. 4, p. 1, 2014.
- Nogueira, M. R.; de Lima, I. P.; Moratelli, R. et al. Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. *Check List. Journal of species list and distribution*. 10 (4): 808-821, 2014.
- OIE. *Terrestrial manual. Rabies*, chapter 2.1.13. p.309. 2008.
- Olival, K. J. et al. Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. *Nature* 546, 646–650 (2017).
- Oliveira RN, Souza PS, Lobo RSV, Castilho JG, Carla Isabel Macedo CI, et al. (2010). Rabies virus in insectivorous bats: Implications of the diversity of the nucleoprotein and glycoprotein genes for molecular epidemiology, *Virology*, 405: 352-360.

Ondrejko A., Suli J., Ondrejka R., Benisek Z., Franka R., Svrcek S., Madar M., Bugarsky A. Comparison of the detection and quantification of rabies antibodies in sera. *Vet. Med. – Czech*, 47, 218–221, 2002.

Páez, A. et al. Evaluation of the seroconversion as a response to rabies vaccination in dogs, Valle del Cauca, Colombia, 2009. *Biomédica*, v.31, n.4, p.474-484, 2011. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v31n4/v31n4a02.pdf> . Accessed: May. 15, 2019.

Pastoret, P.P.; Bronchier, B.; Blancou, J. et al. Development and deliberate release of a vaccinia-rabies recombinant virus for de oral vaccination of foxes against rabies. In: Smith GL, Binns M, eds. *Recombinant poxviruses*. Boca Raton: CRC Press, 1992: 163-206.

Pellegrino, P.; Clementi, E.; Radice, S. On vaccine's adjuvants and autoimmunity: Current evidence and future perspectives. *Autoimmunity Reviews*. Vol 14, Issue 10, pp. 880-888. 2015.

Perrin, P. et al., Interleukin-2 increases protection against experimental rabies. *Immunobiol.*, V. 177, p.199, 1988.

Perry, L.L. & Lodmell, D.L. Role of CD4⁺ and CD8⁺ T-Cells in Murine Resistance to Street Rabies Virus. *J Virol.*, V. 65, p. 3429-34, 1991.

Pilatti, L.M.S. Padrão de glicosilação da glicoproteína do vírus da raiva *Lyssavirus* da raiva produzida em células *Drosophila melanogaster* S2: diferentes sistemas de expressão e condições de cultivo. 2019. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2019.

Plotkin SA. Immunologic correlates of protection induced by vaccination. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20: 63-75.

Polonis, V.R.; Brown, B.K.; Rosa, B.A.; Zolla-Pazner, S.; Dimitrov, D.S.; Zhang, M.Y.; Barnett, S.W.; Ruprecht, R.M.; Scarlatti, G.; Fenyo, E.M.; Montefiori, D.C.; McCutchan, F.E.; Michael, N.L. Recent advances in the characterization of HIV-1 neutralization assays for standardized evaluation of the antibody response to infection and vaccination. *Virology*. 375:315–320. 2008.

Precausta, P.; Soulebot, J.-P. Vaccines for domestic animals In: Baer, G.M. *The Natural History of Rabies*. Boca Raton, Fl: CRC Press, p.445-459. 1991.

Queiroz, L.H.; Carvalho, C.; Buso, D.S.; Ferrari, C.I.L.; Pedro, W.A. Perfil epidemiológico da raiva na região Noroeste do Estado de São Paulo no período de 1993 a 2007. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42(1);9-14, jan-fev, 2009.

Quintilio W, Kubrusly FS, Iourtov D, Miyaki C, Sakauchi MA, Lucio F, et al. Bordetella pertussis monophosphoryl lipid A as adjuvant for inactivated split virion influenza vaccine in mice. *Vaccine* 2009;27(June (31)):4219–24.

Ramanna, B.C. et al. A study on the seroconversion in dogs vaccinated with cell culture rabies vaccine. *Journal of Communicable Diseases*, v.39, p.165-170, 2007. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18697580> . Accessed: May,15, 2019.

Reculard, P. Cell-culture vaccines for veterinary use. In: Meslin, F.X.; Kaplan, M.M.; Koprowski, H. *Laboratory Techniques in Rabies*. Geneva: WHO, p.314-323. 1996.

Reed, S.G.; Orr, M.T.; Fox, C.B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat Med*, 19, pp. 1597-1608. 2013.

Riese, P.; Schulze, K.; Ebensen, T.; Prochnow, B.; Guzman, C.A. Vaccine adjuvants: key tools for innovative vaccine design. *Curr Top Med Chem*, pp. 2562-2580, 2013.

RIEZEBOS-BRILMAN, A. et al. Recombinant alphaviruses as vectors for anti-tumor and anti-microbial immunotherapy. *Journal of Clinical Virology* 35 (2006) 233 – 243.

Rocca, M.P.; Barbosa, F.; Menozzi, B.D.; Langoni, H.; Pereira, C.A.P.; Astray, R.M. Soluble Rabies Virus Glycoprotein expressed in *Drosophila melanogaster* S2 as a candidate for recombinant veterinary vaccine. *International Journal of Infectious Diseases*. 73S. 3–398. 2018.

Rosen, G.A. *History of public health*. New York: MD; Publications; 1958.

Roth, J.A.; Henderson, L. M. New technology for improved vaccine safety and efficacy. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 17:585 – 597, vii. 2001.

Rupprecht, C. E., Charlton, K. M., Artois, M., Casey, G. A., Webster, W. A., Campbell, J. B., Lawson, K. F. and Schneider, L. G. Ineffectiveness and comparative pathogenicity of attenuated rabies virus vaccines for the striped skunk (*Mephitis mephitis*). *Journal of Wildlife Diseases*, 20, 99-102. 1990.

Rupprecht, C. E., T. J. Wiktor, D. H. Johnston, A. N. Hamir, B. Dietzschold, W. H. et al. Oral immunization and protection of raccoons (*Procyon lotor*) with a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 7947-7950. 1986.

Rupprecht, C.E. *Medical Microbiology* 4th edition. Rhabdoviruses: Rabies Virus. Chapter 61. Baron S, editor. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.

Rupprecht, C.E.; Dietzschold, B.; Wunner, W.H.; Koprowski, H. Antigenic relationships of lyssavirus *Lyssaviruses*. In: The Natural History of Rabies. Baer GM (CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 69-100. 1991.

Rupprecht, C.E.; Hanlon, C.A.; Hemachudha, T. Rabies re-examined. *Lancet Infect. Dis.* 2: 327–343, 2002.

Rupprecht, C.E.; Wiktor, T. J. et al. Oral immunization and protection of raccoons (*Procyon lotor*) with a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* Oct 1986, 83 (20) 7947-7950; DOI: 10.1073/pnas.83.20.7947

Scaramuzzi, K. Aplicação da sílica nanoestruturada SBA-15 nas imunizações pela via oral [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.

Scaramuzzi, K.; Oliveira, D.C.A. et al. Utilização da sílica nanoestruturada SBA-15 como adjuvante em imunizações com a vacina para hepatite B. *Einstein*. 2011; 9(4 Pt 1):436-41.

Schoenig, H. W. Experimental studies with killed canine rabies vaccine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v.76, p.25-27, 1930.

Seghaier C, Cliquet F, Hammami S, Aouina T, Tlatli A and Aubert M. Rabies mass vaccination campaigns in Tunisia: are vaccinated dogs correctly immunized? *American Journal Tropical Medicine Hygiene* 61: 879–84, 1999.

Seif, I. et al. Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. *Journal of Virology*, v. 53, n. 3, p. 926–934, 1985.

Semple D. The preparation of a safe and efficient antirabic vaccine. *Sci Mem Med Sanit Dept. India* 1911; 44:1–31.

Shah, N. M.; Mangat, M.G. et al. Accidental self-injection with Freund's complete adjuvant. *Journal of Associated Physicians India*. 49: 366 – 368. 2001.

Sharma, S. & Hinds, L. A. Formulation and delivery of vaccines: Ongoing challenges for animal management. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. Vol.4. 258 – 256. 2012.

Silva, V.A. et al. Humoral immune response of domestic dogs that received a single dose of rabies vaccine. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.12, n.1, p.20-25,

2014. Available from: <http://189.126.110.61/recmvz/article/view/23105/23957> . Accessed: May,15, 2019

Singh, R.; Singh, K.P.; Cherian, S. et al. Rabies – epidemiology, pathogenesis, public health concerns and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. *Veterinary Quaterly*. Vol: 37, 212:251, 2017.

Sjolander, A.; Cox, J. C.; Barr, I. G. ISCOMs: an adjuvant with multiple functions. *J. Leukoc. Biol.* 64: 713-723. 1998.

Smith JS, Yager PA, Baer GM: A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibodies. In *Laboratory techniques in rabies*. Edited by Meslin FX, Kaplan NM, Koprowsky H. Geneva: WHO, 181–192. 1996.

Sodré, M. M., Gama, A. R. & Almeida, M. F. updated list of bat species positive for rabies in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 52(2):75-81, 2010.

Souza LC, Langoni H, Silva RC, Lucheis SB. Vigilância epidemiológica da raiva na região de Botucatu-SP: importância dos quirópteros na manutenção do vírus na natureza. *ARS Veterinária*, Jaboticabal, SP, vol. 21, nº1, 062-068, ISSN 0102-6380, 2005.

Sun, H. X.; Xie, Y.; Ye, Y.P. ISCOMs and ISCOMATRIX™. *Vaccine* 27 (2009). 4388-4401.

Tang, X.; Luo, M.; Zhang, S.; Fooks, A.R; Hu, R.; Tu, C.. Pivotal role of dogs in rabies transmission, China. *Emerg. Infect. Dis.*, 11 (2005), pp. 1970-1972.

Tatsis, N.; Lasaro, M.O. et al. Adenovirus vector-induced immune responses in nonhuman primates: responses to prime boost regimens. *J. Immunol.* 2009, 182, 6587-6599.

Taylor, L.H.; Latham, S.M.; Woolhouse, M.E. Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 29;356 (1411):983-9. 2001.

Tizard, I.R. *Imunologia veterinária: uma introdução*/ Ian R. Tizard; tradução para o português Lúcia Jamli Abel. 6ª edição. São Paulo: Roca, 2002.

Tolson, N.D.; Charlton, K.M., Stewart, R.B.; Casey, G.A.; Webster, W.A.; MacKenzie, K.; Campbell, J.B.; Lawson, K.F.; (1990) Mutants of rabies viruses in skunks: immune response and pathogenicity. *Can J Vet Res* 54:178–183.

- Torrey E, F. & Yolken, R. H. Beasts of the Earth: Animals, Humans, and Disease. Reviewed by Nina Marano. *Emerg Infect Dis.*; 11(7): 1162. 2005.
- Velasco-Villa A, Reeder AS, Orciari LA, Yager PA, Franka R, Blanton JD, Zuckero L, Hunt P, Oertli EH, Robinson LE, Rupprecht CE, (2008). Enzootic rabies elimination from dogs and re-emergence in wild terrestrial carnivores, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 1849–1854.
- Vos, A. Freuling, C. M; Hundt, B.; Kaiser, C., Nemitz, S. et al. Oral vaccination of wildlife against rabies: Differences among host species in vaccine uptake efficiency. *Vaccine* 35 (2017) 3938- 3944.
- Wagner, R.R. Rhabdoviridae and their replication. In: Fields BN, Knipe DM et al. *Fundamental virology*. 2nd ed. Raven Press, 1991. p. 493-496.
- Waltzek, T.B.; Cortés-Hinojosa, G.; Wellehan, J.R. et al. Marine mammal Zoonoses: A review of disease Manifestations. *Zoonoses and Public Health*, 2012.
- Wandeler AI, Capt S, Kappeler A, Hauser R (1988) Oral immunization of wildlife against rabies: concept and first field experiments. *Rev Infect Dis* 10(Suppl 4):S649–S653
- Warrel, M. Rabies and African bat lyssavirus *Lyssavirus* encephalitis and its prevention. *International Journal of Antimicrobial Agents* 36(1): 47-52. (2010).
- Weyer J, Kuzmin IV, Rupprecht CE, Nel LH, (2008). Cross protective and cross reactive immune responses to recombinant vaccinia viruses expressing full length lyssavirus *Lyssavirus* glycoprotein genes. *Epidemiol Infect.* 136(5): 670-678.
- Whitt, M. A., BuOnocore, L. J., Prehaud, C. J., Post, K. J. Membrane fusion activity, oligomerization, and assembly of the rabies virus glycoprotein. *Virology* 185, 681-688. (1991).
- WHO. World Health Organization expert consultation on Rabies: First Report. WHO technical Report Series 931. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2004.
- WHO. World Health Organization, (2013). Expert Committee on Rabies. WHO Expert Consultation on Rabies, World Health Organization: Geneva, Switzerland. p. 982.
- WHO. World Health Organization, (2017). Rabies. Disponível em <https://www.who.int/rabies/epidemiology> (acesso: 28/05/2019).

- WHO. World Health Organization, (2018). Collaborating Centre for Rabies Research and Surveillance. Rabies Bulletin Europe, 2018. Riems: Friedrich Loeffler Institute. <http://www.who-rabies-bulletin.org> (acesso em 20/04/2019)
- Widdowson, M.-A., Morales, G.J., Chaves, S. & McGrane, J. Epidemiology of urban canine rabies, Santa Cruz, Bolivia, 1972–1997. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 458–461. 2002.
- Wiktor, T.J. et al. Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, V. 81, p. 7194-8, 1984.
- Wiktor, T.J.; Fernandes, M.V.; Koprowski, H. Cultivation of rabies virus in human diploid cell strain WI-38. *J Immunol*; 93: 353–66. 1964.
- Woods M, McDonald RA, Harris S (2003): Predation of wildlife by domestic cats *Felis catus* in Great Britain. *Mammal Rev* 33, 174-188.
- Xiang, Z. et al. Immune effector mechanisms required for protection to rabies virus. *Virol.*, V. 214, p. 398-404, 1995.
- Xiang, Z.Q.; Spitalnik, S.; Tran, M.; Wunner, W.H.; Cheng, J. et al. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology* 199: 132-140, 1994.
- Yokomizo, A.Y.; Jorge, S.A.C.; Astray, R.M.; Fernandes, I.; Ribeiro, O.G.; Horton, D.S.P.Q.; Tonso, A.; Tordo, N.; Pereira, C.A. Rabies virus glycoprotein expression in *Drosophila* S2 cells. I. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line. *J Biotechnol.* 2:102-109. 2007.