

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

“EFICÁCIA PÓS EXPOSITIVA DE RNAs DE
INTERFERÊNCIA (siRNAs) E RIBAVIRINA EM
CAMUNDONGOS INFECTADOS COM O VÍRUS
RÁBICO DE ORIGEM CANINA”

CAMILA MICHELE APPOLINÁRIO

Botucatu - SP
Dezembro 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

“EFICÁCIA PÓS EXPOSITIVA DE RNAs DE INTERFERÊNCIA
(siRNAs) E RIBAVIRINA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS
COM O VÍRUS RÁBICO DE ORIGEM CANINA”

CAMILA MICHELE APPOLINÁRIO

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Jane Megid

Botucatu – SP
Dezembro 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Appolinário, Camila Michele.

Eficácia pós-expositiva de RNAs de Interferência (siRNAs) e Ribavirina em camundongos infectados com o vírus rábico de origem canina / Camila Michele Appolinário. - Botucatu, 2010

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Jane Megid

Capes: 21201013

1. Virologia. 2. Hidrofobia – Tratamento. 3. Vírus do RNA. 4. Camundongo como animal de laboratório.

Palavras-chave: Raiva; Ribavirina; siRNA; Tratamento.

Nome do autor: Camila Michele Appolinário

Titulo: EFICÁCIA PÓS EXPOSITIVA DE RNAS DE INTERFERÊNCIA
(siRNAs) E RIBAVIRINA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM O
VÍRUS RÁBICO DE ORIGEM CANINA

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa Dra Jane Megid

Presidente e Orientadora

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof Dr Helio Langoni

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof Dr Paulo Eduardo Brandão

Membro

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

FMVZ-USP- São Paulo

Data da Defesa: 2 de dezembro de 2010.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Marli e Jair, pelo amor, compreensão e apoio incondicionais, bem como por terem me ensinado valores preciosos.

Também o dedico a minha querida irmã Louise, que mora no meu coração.

Em especial, uma dedicatória ao meu marido Luciano...pelo amor sereno, amizade, companheirismo e principalmente pelo fato de aceitar minhas escolhas e caminhos sem qualquer tipo de ressentimento ou objeção.

Agradecimentos

Agradeço especialmente minha orientadora, Dra. Jane Megid, por sempre ter acreditado no meu potencial e investido nele seu tempo e conhecimento...também agradeço a Jane amiga, pelos momentos de descontração e conselhos ao longo destes oito anos de convivência.

Aos meus queridos professores do Dpto de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Dr. Antonio Carlos Paes, Dr. Márcio Garcia Ribeiro, Dr. Helio Langoni e Dr. Paulo Francisco Domingues, pelos ensinamentos e principalmente por terem acreditado e lutado por mim nas situações de confronto.

Aos meus queridos colegas do Laboratório de Biologia Molecular das Enfermidades Infecciosas, Clóvis Fonseca, Susan Allendorf, João Marcelo P. Antunes, Luciana Fachini, Acácia Vicente e em especial, Marina Gea Peres, pois sem a sua ajuda tudo teria ficado muito mais difícil e principalmente tedioso!!!

Às minhas amigas do departamento Marta Catarina Fernandes, Priscila Barbante, Sibeles Pinheiro (FMVZ-USP), pelos momentos de descontração e palavras de estímulo.

A todos do Dpto de Higiene Veterinária e Saúde Pública, principalmente Wanderley Forlin e Sérgio Fávero pela ajuda e amizade durante todos estes anos.

Aos funcionários da Pós-Graduação José Roberto, Maria e Patrícia, por sempre me ajudarem de bom grado.

Ao Prof. Paulo Eduardo Brandão (FMVZ-USP) pelos seus conselhos e por sempre ter me acolhido em seu laboratório, também ao pós-doutorando Enio Mori, pela paciência e ajuda.

A Dra. Luzia Martorelli, do CCZ de São Paulo e a todos do seu laboratório, pela realização da sorologia dos camundongos e pelos incontáveis favores.

A todos do Laboratório de Neuroimunologia Viral do Institut Pasteur de Paris - Mireille Lafage, Christophe Prehaud, Damien Choppy, Corinne Baran e em especial a Dra. Monique Lafon, por ter aberto as portas de seu laboratório de maneira tão prestimosa e por seu imenso conhecimento compartilhado.

Aos meus queridos amigos da Maison du Brésil em Paris - Márcia Volkmer, Luana Tacuatiá, Silvana Ribeiro e Heitor Andrade, por acolherem-me carinhosamente e por terem amenizado meus momentos de solidão durante a minha estadia na França.

Agradeço à FAPESP, por conceder o Auxílio a Pesquisa e à Capes pela Bolsa de Mestrado.

Epígrafe

*“O acaso só favorece aos espíritos preparados e não
prescinde da observação” (Louis Pasteur)*

LISTA DE TABELAS

Página

TABELA 1: Resultado dos percentuais de sobrevivência e letalidade, período de estada, início das mortes e período de evolução, ao final de 30 dias nos diferentes grupos terapêuticos em animais infectados com vírus rábico.....32

TABELA 2. Titulação do vírus rábico, em sobrenadante de cultura celular de BSR-T7 e SK-N-SH, 24h ou 48h após infecção com m.o.i 3 ou 0.1 em células tratadas ou não tratados com ribavirina(1mM).....41

LISTA DE QUADROS

Página

QUADRO 1- siRNAs (Short-interfering RNAs) utilizados para o silenciamento gênico do RNAm da nucleoproteína N do vírus da raiva, apresentando a sequência de ribonucleotídeos em fita dupla.....	16
QUADRO 2. Descrição dos primers utilizados, as empresas responsáveis pela síntese e a sequência ou código de cada um.....	18

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1. Esquema de representação dos diferentes ciclos da raiva.....	02
FIGURA 2- Esquema gráfico do mecanismo de ação do RNAi.....	11
FIGURA 3. Curva de sobrevivência comparativa entre todos os grupos. Dados apresentados como curva de sobrevivência proporcional pelo método de Kaplan-Meier.....	33
FIGURA 4. Média mensal de peso dos animais infectados ou não infectados e submetidos aos mesmos protocolos terapêuticos.....	34
<i>FIGURA. 5 Gráfico de soma do escore clínico diário, dos grupos infectados submetidos aos diferentes protocolos.....</i>	<i>35</i>
FIGURA 6. Expressão do gene N do vírus rábico no cérebro de animais inoculados e tratados com diferentes protocolos. Resultados agrupados segundo o tratamento utilizado com a mediana e os valores máximos alcançados.....	36
FIGURA 7. Resultados do RT-PCR em Tempo Real para o Gene N do vírus rábico, comparados aos resultados da titulação dos anticorpos anti-rábicos soroneutralizantes, de acordo com cada grupo terapêutico.....	37

FIGURA 8. Expressão gênica de
OAS-1, IL-6, IFN-beta, TNF-alfa e CCL-2
no cérebro de camundongos positivos
para o gene N do vírus rábico,
nos diferentes protocolos terapêuticos.....39

FIGURA 9. Expressão gênica de
OAS-1, IL-6, IFN-beta, TNF-alfa e CCL-2 no
5^o dia e 10^o dia nos cérebros de camundongos
não infectados e tratados com ribavirina40

FIGURA 10. Porcentagem de infecção celular
pelo vírus rábico e acúmulo de nucleocapsídeo
em células BSR7-T7 e SK-N-SH infectadas com
m.o.i 0,1, tratadas ou não tratadas com ribavirina
por meio da técnica de Citometria de Fluxo.....41

FIGURA 11. Formação dos Corpúsculos de Negri
em células BSR7-T7 e em células SK-N-SH,
sendo as culturas infectadas ou não infectadas com
m.o.i 0,1, tratadas ou não tratadas com
1mM de ribavirina.43

FIGURA 12. Aumento relativo da expressão do gene N
do vírus rábico pela técnica de RT-PCR em Tempo Real,
em células infectadas com m.o.i 3,
tratadas ou não tratadas com ribavirina.....44

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	02
2.1 Raiva: aspectos gerais e epidemiológicos.....	02
2.2 Raiva: aspectos relacionados a patogenia e neuroimunologia.....	04
2.3 Abordagem terapêutica na raiva.....	06
2.3.1 Ketamina.....	08
2.3.2 Ribavirina.....	09
2.3.3 Amantadina.....	10
2.4 Nova abordagem terapêutica.....	11
3 OBJETIVOS.....	13
3.1 Geral.....	13
3.2 Específicos.....	13
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
4.1 Materiais.....	14
4.1.1 Animais	14
4.1.2 Vírus rábico.....	15
4.1.3 Diluente do vírus rábico.....	15
4.1.4 Ribavirina.....	15
4.1.5 Short- Interfering RNAs.....	16
4.1.6 Lipofectamina 2000 (Invitrogen®).....	16
4.1.7 Dimetilsulfóxido (DMSO).....	17
4.1.8 Linhagens celulares.....	17
4.1.9 Primers.....	17
4.2 Metodos.....	18
4.2.1 Inoculação experimental em camundongos.....	18
4.2.2 Titulação viral em camundongos.....	19
4.2.3 Extração do RNA.....	19

4.2.4 Conversão do RNA em cDNA.....	20
4.2.5 RT-PCR em tempo real.....	20
4.2.6 Processamento das células para a técnica de citometria de fluxo.....	21
4.2.7 Processamento das células para a técnica de microscopia confocal.....	22
4.2.8 Soroneutralização em cultura celular para determinação de anticorpos neutralizantes para o vírus da raiva pelo método rápido de inibição de foco de fluorescência	23
4.2.9 Preparo da solução de siRNA/Lipofectamina 2000®	25
4.2.10 Titulação viral em cultura de células.....	26
5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	27
5.1 Delineamento experimental em cultura de células BSR-T7 e SK-N-SH.....	27
5.2 Delineamento experimental em camundongos.....	28
5.3 Avaliação clínica dos animais.....	30
5.4 Análise estatística.....	30
6 RESULTADOS.....	31
6.1 Efeitos da Infecção viral em camundongos saudáveis ou experimentalmente infectados, submetidos aos diferentes protocolos terapêuticos pós expositivos.....	31
6.2 Titulação viral em camundongos.....	34
6.3 Avaliação do escore clínico nos diferentes grupos.....	34
6.4 Expressão do gene N viral em material cerebral.....	36
6.5 Resultado da titulação de anticorpos soroneutralizantes associado a expressão do gene N do vírus rábico.....	37
6.6 Expressão gênica de OAS-1, CCL-2, TNF-alfa, IFN-beta e IL-6 no tecido cerebral.....	38
6.7 Titulação viral do sobrenadante das culturas celulares.....	40

6.8 Análise das culturas de células BSR-T7 e SK-N-SHC pela técnica de citometria de fluxo.....	41
6.9 Análise das culturas de células BSR-T7 e SK-N-SH pela técnica de microscopia confocal.....	43
6.10 Análise das culturas de células SK-N-SHC pela técnica de RT-PCR em tempo real.....	44
7 DISCUSSÃO.....	45
8 CONCLUSÃO.....	52
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
10 ARTIGOS E NORMAS PARA A PUBLICAÇÃO.....	71

APPOLINÁRIO, CAMILA MICHELE. Eficácia pós-expositiva de RNAs de Interferência (siRNAs) e Ribavirina em camundongos infectados com o vírus rábico de origem canina. Botucatu, 2010. 78 p. Dissertação (Mestrado)– Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

O tratamento pós-expositivo da raiva é a principal medida para evitar o desenvolvimento da doença, e baseia-se na aplicação da vacina anti-rábica associada ou não ao soro anti-rábico, em número de doses variáveis de acordo com o tipo de exposição. Protocolos terapêuticos utilizando drogas antivirais vêm sendo aplicados em seres humanos, com resultados positivos e negativos, gerando dúvidas quanto à eficácia. A possibilidade de utilização de RNA de interferência (siRNA) e da ribavirina, associado ou não ao Dimetilsulfóxido (DMSO) no tratamento pós-expositivo da raiva experimental em camundongos, representa uma nova perspectiva. Camundongos C57BL6 foram inoculados com uma amostra de rua de vírus rábico proveniente de cão, separados em diferentes grupos e diferentes protocolos terapêuticos, sendo estes administrados 24 horas após a inoculação viral. De cada grupo, oito animais foram separados para observação durante um período de 30 dias sendo os demais sacrificados cinco e dez dias após a inoculação. O cérebro dos animais sacrificados foi coletado e RT-PCR em Tempo Real foi realizada para a detecção e quantificação do gene N do vírus rábico e avaliação da expressão de genes relacionados a resposta imune. Tanto a ribavirina como o siRNA, isoladamente ou associados ao DMSO não demonstraram diferença estatística significativa relacionada à letalidade, no entanto, os grupos tratados com ribavirina demonstraram maior percentagem de letalidade e sintomatologia clínica mais severa. Nos animais não inoculados e tratados com a ribavirina, houve um estímulo transitório da resposta imune inata, no entanto, quando associado ao vírus rábico este aumento da resposta imune não foi observado. No grupo tratado com siRNA o período de evolução da doença foi mais prolongado quando comparado ao dos demais grupos, sugerindo uma atividade

antiviral parcial desta terapia. Os resultados da ribavirina “in vivo” foram avaliados “in vitro” em fibroblastos e neuroblastomas demonstrando eficácia dependente do tipo celular.

Palavras chaves: Raiva, tratamento, siRNA, Ribavirina

APPOLINÁRIO, CAMILA MICHELE. Post-exposure efficacy of Interfering RNAs (siRNAs) and Ribavirin in canine rabies virus infected mice. Botucatu, 2010. 78 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

Rabies post-exposition treatment is the main measure to prevent disease development, and is based on the use of anti-rabies vaccine with or without anti-rabies serum, in a number of doses varying according to the exposure type. Therapeutic protocols using antiviral drugs have been applied in humans, with positive and negative results, raising doubts about effectiveness. The possibility of using RNA interference (siRNA) and ribavirin, with or without Dimethyl sulfoxide (DMSO) in post exposure treatment of experimental rabies in mice represents in rabies treatment. C57BL6 mice were inoculated with street dog rabies virus, and then separated into different groups and received different post-exposure treatment, which were administered 24 hours after the inoculation. In each group, eight animals were separated for 30 days of observation and the remaining sacrificed five and ten days after inoculation. Brains of the sacrificed animals were collected and RT-Real-Time PCR was performed for detection and quantification of the N gene of rabies virus, and for evaluation of the expression of immune response related genes. Both ribavirin and siRNA, alone or associated with DMSO showed no statistically significant differences related to mortality, however, the groups treated with ribavirin showed a greater percentage of mortality and more severe clinical symptoms. In animals not inoculated and treated with ribavirin, there was a transient stimulation of the innate immune response, however, when associated to rabies virus such increase in immune response was not observed. In the group treated with siRNA the period of the disease was more prolonged when compared to the other groups, suggesting a partial antiviral activity with this therapy. The results of ribavirin “in vivo” were evaluated “in vitro in fibroblasts and neuroblastoma cells demonstrating a cell type-dependent efficacy.

Key words: Rabies, treatment, siRNA, Ribavirin

1 Introdução

A Raiva é uma das zoonose de maior incidência, relatada em todos os continentes, fazendo-se exceção a Oceania. Causa aproximadamente 55 mil mortes ao ano, principalmente nos países asiáticos e africanos de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WUNNER e BRIGGS, 2010). O vírus rábico causa encefalite aguda e, após o início dos sinais clínicos, a letalidade é de 100% na maioria dos casos. Mesmo sendo considerada uma enfermidade letal, esta pode ser evitada por meio de terapia pós-expositiva, baseada no uso de vacina anti-rábica e soro hiper imune, aplicadas de maneira adequada e em tempo hábil. Até recentemente haviam somente cinco relatos de pacientes que sobreviveram a um suposto quadro de raiva mas sem comprovação científica. No entanto, no ano de 2004, o primeiro caso comprovado de sobrevivência e cura, sem qualquer tipo de imunoterapia pós-expositiva específica foi relatado nos Estados Unidos. A paciente recebeu tratamento baseado na indução do estado de coma e no uso da ribavirina e amantadina como drogas antivirais. Este protocolo ficou conhecido como Protocolo de Milwaukee. Tais medidas terapêuticas foram utilizadas muitas outras vezes, em diferentes situações e localidades, no entanto, somente duas outras pessoas sobreviveram, sendo que uma delas faleceu posteriormente devido à complicações clínicas (JACKSON, 2009).

Os diferentes resultados obtidos no uso deste protocolo levantam questões pertinentes relacionadas a eficácia da ribavirina como droga antiviral, ressaltando a necessidade de novas alternativas terapêuticas.

Os RNAs de interferência vem sendo avaliados no tratamento de vários processos infecciosos, com resultado promissor na infecção rábica "*in vitro*" não havendo, no entanto, trabalhos publicados relacionados a sua eficácia "*in vivo*" na infecção rábica.

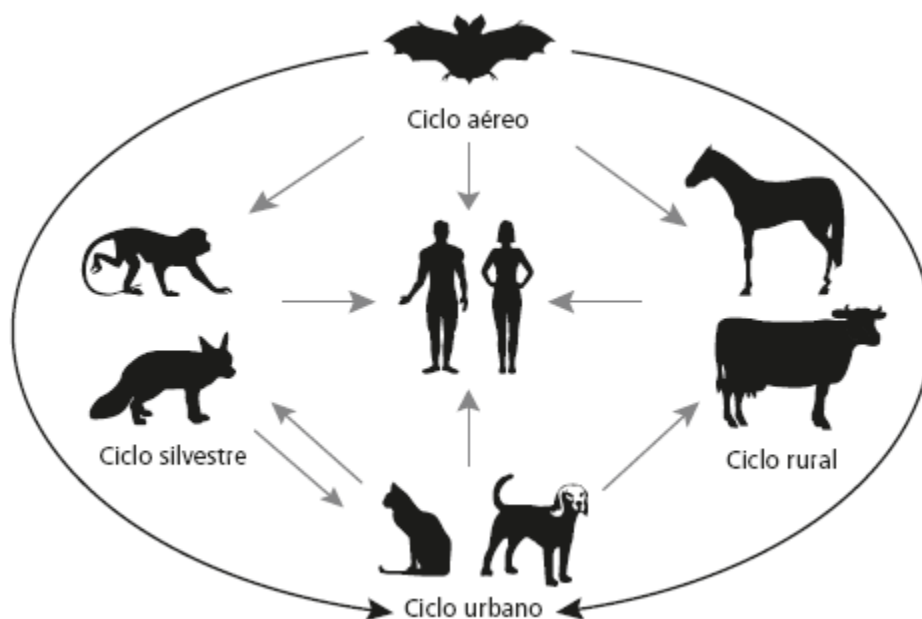
O trabalho que será apresentado a seguir teve como objetivo avaliar a ribavirina e o RNA de interferência no tratamento pós expositivo da raiva experimental em camundongos.

2 Revisão de Literatura

2.1 Raiva: aspectos gerais e epidemiológicos.

A raiva é uma enfermidade de ampla distribuição mundial, de caráter zoonótico, que atinge seres humanos e outros mamíferos. Os primeiros relatos da raiva são oriundos da Mesopotâmia (2300 a.C), onde já se associava o cão agressivo e com a boca repleta de espuma à transmissão desta enfermidade para o homem (WILKINSON, 2002). A enfermidade é causada por um vírus RNA de caráter neurotrópico, fita única e sentido negativo classificado como um *Lyssavirus*, pertencente a família *Rhabdoviridae*.

O vírus da raiva possui vários ciclos epidemiológicos, que envolvem diversas espécies de mamíferos, sendo o homem o elo final de todas as cadeias. Esquemáticamente, a epidemiologia da raiva é separada em quatro ciclos: urbano, rural, silvestre e aéreo (KOTAIT et al., 2009) (Figura 1).



Fonte: Instituto Pasteur

FIGURA 1. Esquema de representação dos diferentes ciclos da raiva

O ciclo urbano que envolve os gatos domésticos e os cães, este último como reservatório natural do vírus rábico, encontra-se controlado e até mesmo erradicado nos países em que as campanhas de vacinação contra a raiva vem sendo aplicadas de forma maciça e sistemática, mas ainda é o principal ciclo de transmissão para o homem na maioria dos países asiáticos e africanos (RITA, 2010). No Brasil, as regiões Norte e Nordeste ainda apresentam casos de raiva canina, principalmente devido à dificuldades em conseguir uma cobertura vacinal mínima na população canina (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010).

O ciclo rural está relacionado à transmissão da raiva para os animais de produção como bovinos, ovinos, caprinos e eqüinos. Nos países latino americanos, o principal reservatório do vírus, neste ciclo, é o morcego hematófago *Desmodus rotundus*, embora o cão também possa ser um potencial transmissor para os herbívoros. O risco de transmissão para os seres humanos é muito menor neste ciclo. No entanto, tornam-se vulneráveis os indivíduos que manipulam estes animais - tratadores e veterinários - como demonstra o caso de raiva humana relatada no ano de 2006 no estado de Minas Gerais (KOTAIT et al. 2009).

No ciclo aéreo, os quirópteros hematófagos e não hematófagos constituem-se os principais reservatórios e transmissores da raiva. Os seres humanos podem infectar-se quando agredidos pelos morcegos hematófagos, como observado no surto de raiva humana no estado do Pará, no ano de 2005. O desmatamento de grandes áreas florestais, associado à expansão da pecuária e às condições precárias de habitação dos povos que vivem nas margens da floresta, provocam o deslocamento das colônias de morcegos para locais de maior contato com os seres humanos, aumentando o risco de transmissão.

No ciclo silvestre terrestre, diversos mamíferos silvestres são considerados como reservatórios. Nos países europeus, a raposa vermelha e os raccon-dogs constituem-se como importantes reservatórios. Nos EUA são os cangambás, raccons e raposas. Na America Latina, os mangustos, cangambás, coiotes e lince (SLATE,

2010). No Brasil, destacam-se o sagui de tufo branco (*Callithrix jacchus*), o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e a raposinha-do-mato (*Pseudoplex vetulus*) (FAVORETTO et al., 2001; BERNARDI et al., 2005; SATO et al., 2006; CARNIELI et al., 2008).

2.2 Raiva: aspectos relacionados à patogenia e neuroimunologia.

Após um período de latência no tecido muscular ou nervoso, o vírus rábico atinge o Sistema Nervoso Central (SNC) causando encefalite aguda. A penetração viral ocorre pela adesão da glicoproteína do vírus rábico (RVG) a diferentes receptores celulares como receptor neural da molécula de adesão (NCAM), receptor de neurotropina de baixa afinidade (p75), receptor nicotínico de acetilcolina, sendo a partícula viral transportada de forma livre ou por meio de vesículas pelos axônios de neurônios sensoriais e motores até o encéfalo e medula espinhal (CHARLTON, 1994; JACKSON, 2008; SCHNELL et al., 2010). À partir da invasão neuronal não é mais possível a remissão do comprometimento neurológico e da evolução da doença, sendo letal em praticamente 100% dos humanos ou animais infectados (CAMPBELL e CHARLTON, 1988).

Apesar da elevada letalidade, processos inflamatórios no SNC são raramente observados nas necrópsias dos casos de raiva humana (TOBIUME et al, 2009). Cães infectados com uma linhagem de vírus rábico responsável por causar raiva parálitica, apresentam um período mais prolongado de evolução clínica, bem como alterações mais intensas na substância cinzenta nos exames de Ressonância Magnética, quando comparados com cães infectados com linhagens de vírus rábico responsáveis por causar um quadro de raiva furiosa. Nos animais com raiva parálitica, o padrão de expressão de RNAm (RNA mensageiro) de citocinas e quimiocinas inflamatórias é mais expressivo, quando comparado ao dos cães que apresentam a forma furiosa da doença (LAOTHAMATAS et al., 2008).

A indução de processo inflamatório, previamente à infecção rábica, por meio da administração de uma proteína mielínica pro-inflamatória (MBP) em camundongos resultou em maior taxa de sobrevivência destes animais quando desafiados. Contrariamente, quando aplicado hormônio esteróide observou-se diminuição da inflamação cerebral e aumento da taxa de letalidade (ROY e HOOPER, 2007). Faber et al. (2005) demonstraram que a infecção por vírus atenuado induz ao aumento da expressão de TNF-alfa (citocina pro-inflamatória) com maior infiltração de células T e ativação microglial. Estes últimos exemplos demonstram que o aumento do processo inflamatório pode ser benéfico à sobrevivência nos casos de raiva.

Ainda sobre o estudo da resposta imune à infecção rábica em camundongos inoculados, vários pesquisadores observaram aumento da transcrição de genes associados com a resposta imune inata como interferon- gamma ($IFN\gamma$), fator de necrose tumoral-alfa ($TNF\alpha$), interleucina-6 (IL6), $IL1\beta$, Toll-Like receptors (TLRs), C-X-C motif chemokine-10 (CXCL-10) e C-C motif chemokine ligand 5 (CCL5) (MARQUETTE et al., 1996; BALOU e LAFON, 2003; ESPERT et al., 2003; MCKIMMIE et al., 2005; NAKAMICHI et al., 2005)

A partir do momento em que as células já estão infectadas, os mecanismos imunes envolvidos no controle da disseminação viral incluem a destruição destas por meio de lise pelo sistema complemento, ação direta das células T-citotóxicas e outros mecanismos mediados por anticorpos citofílicos. A prevenção da disseminação também inclui a inibição da penetração do vírus nas células adjacentes não infectadas, e isto ocorre por meio da neutralização viral com anticorpos e fagocitose de imuno-complexos. Alternativamente, essa prevenção pode ser feita por meio de interferons ou outros mediadores solúveis, que alteram o estado metabólico das células susceptíveis (CAMPBELL e CHARLTON, 1988).

O vírus rábico possui sofisticadas estratégias para escapar do sistema imune do hospedeiro. Ele não apenas destrói os linfócitos T protetores que migram para o SNC por meio da ativação neuronal da expressão de moléculas imunossupressoras, como a proteína B7-H1 (Human B7 Homolog 1), a proteína transmembranica FasL (Fas Ligand) ou o antígeno de histocompatibilidade HLA-G (Human Leukocyte Antigen G) (BALOUL et al 2004; LAFON, 2005; LAFON et al, 2008; LAFON, 2008), como também minimiza a resposta inflamatória no tecido nervoso dos animais infectados. Quanto maior a patogenicidade da amostra viral, menos aguda é a resposta inflamatória (BALOUL e LAFON, 2003; WANG et al., 2005; LAOTHAMATAS et al., 2008; HICKS et al., 2009;).

Os mecanismos de evasão estão associados a não expressão de glicoproteína por vírus altamente patogênico, menor percentual de replicação viral, inibição da apoptose de células infectadas e indução da apoptose em linfócitos ativados que migram para o SNC por meio da Barreira Hematoencefálica (BHE) com o objetivo de destruir as células infectadas. Desta forma o vírus mantém o processo de replicação no interior da célula não sendo destruído pelos mecanismos de defesa do organismo, levando, assim, à exaustão metabólica e disfunção neuronal, sendo estas as prováveis causas da letalidade na raiva (BALOUL e LAFON, 2003; JACKSON, 2008; NADIN-DAVES e GARDINER, 2008; SCHNELL et al., 2010).

2.3 Abordagem Terapêutica na Raiva

Em 1889, tentativas terapêuticas nos casos de raiva, utilizando um soro hiper imune foram iniciadas, sendo que muitas outras surgiram, baseadas no uso de soros associados às vacinas, interferons, indutores de interferons e substâncias imunomoduladoras (HARMON e JANIS, 1975; BAER et al., 1977; MORENO et al., 1979; SODJA e HOLY, 1980; PEPIN e BLANCOU, 1985; BUSSEREAU, 1986a; BUSSEREAU, 1986b ; SODJA, 1986; CHAVALI e CAMPBELL, 1987).

Até recentemente, encontrava-se na literatura somente relatos de pessoas que sobreviveram a raiva quando um protocolo pós-expositivo baseado no uso de vacina havia sido aplicado antes do aparecimento dos sinais clínicos. Em 2004, uma paciente americana sobreviveu sem receber qualquer tratamento pós-expositivo específico (JACKSON, 2009). Este caso ocorreu em Wisconsin (EUA), onde uma jovem de 15 anos foi diagnosticada como portadora do vírus rábico e sobreviveu mesmo após o início dos sintomas. A paciente, saudável, foi mordida por um morcego, e após um mês começou a apresentar cansaço, dormência da mão esquerda (alvo da mordida), desestabilização física, diplopia, náuseas e vômitos. Sua taxa de células brancas sanguíneas, linfócitos, células vermelhas sanguíneas, glicose e concentração protéica estavam fora dos padrões de normalidade. Rapidamente ocorreu descontrole da fala, tremores da mão agredida, aumento da letargia e hipertermia. Análises de fluidos corporais da paciente revelaram anticorpos específicos contra o vírus rábico, mas o RNA viral não foi detectado, não sendo possível a identificação da variante viral. O tratamento clínico da paciente incluiu cuidados intensivos e neuroproteção acentuada com a utilização do coma induzido por ketamina, uso da ribavirina intravenosa e amantadina em protocolo experimental. A paciente foi mantida em coma por sete dias, período durante o qual houve aumento de imunoglobulina G anti-rábica. Após a suspensão da medicação para manutenção do coma, a paciente se mostrou cada vez mais alerta. Observou-se melhora gradativa, com retorno da capacidade de resolver desafios matemáticos, usar linguagem de sinais e posteriormente a fala. O conjunto de medidas terapêuticas utilizadas neste caso ficou conhecido como Protocolo de Milwaukee (WILLOUGHBY et al., 2005).

Este mesmo protocolo foi utilizado, no mínimo em outros 20 casos de raiva humana, porém nenhum outro paciente sobreviveu (HEMACHUDHA et al., 2006; JACKSON, 2010). Recentemente, no entanto, o protocolo de Milwaukee foi utilizado no Brasil em um adolescente de 15 anos que havia sido mordido por morcego hematófago, e embora submetido à 4 doses de vacina anti-rábica após a agressão, apresentou sintomatologia clínica compatível com raiva e resultado positivo para presença do vírus rábico pela técnica de RT-PCR (Transcriptase Reversa - Reação da Polimerase em Cadeia) realizada em material extraído do folículo piloso da região da nuca. A amostra viral seqüenciada apresentou compatibilidade para variante 3 de morcego *Desmodus rotundus*. De acordo com estes resultados, a Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, elaborou o I Protocolo para o Tratamento da Raiva Humana no Brasil, também conhecido como Protocolo de Recife (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2009).

A característica de alguns dos fármacos adotados no Protocolo de Milwaukee, são apresentadas abaixo.

2.3.1 Ketamina

A ketamina caracteriza-se como um antagonista não-competitivo. Além de suas propriedades conhecidas como anestésico dissociativo, também demonstrou efeito antiviral, conforme mostram trabalhos do início da década de 1990, realizados por Lockhart et al. (1991; 1992) no Institut Pasteur de Paris. Os efeitos relacionados a atividade antiviral e neuroprotetora descritos na literatura, são baseados em doses muito maiores do que a utilizada nos pacientes que receberam o protocolo de Milwaukee, o que não garante os efeitos pretendidos. Acredita-se que a ketamina atue por meio de mecanismos anti excitotóxicos, no entanto, estudos realizados *"in vivo"* e *"in vitro"*, não demonstram a ocorrência de excitotoxicidade na raiva, não justificando a atividade neuroprotetora

deste fármaco (WELI et al., 2006 ; JACKSON et al., 2007; JACKSON et al., 2008; JACKSON, 2009).

2.3.2 Ribavirina

Ribavirina (1-d-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida) é um nucleosídeo análogo e não-tóxico com um amplo espectro de ação antiviral, aprovado para o tratamento de hepatite C associado a interferon (FERENCI et al., 2001; MARTIN e JENSSEN, 2008), influenza virus (GILBERT e KNIGH, 1986) e infecções severas por vírus Sincicial Respiratório (WEISMAN, 2009; EMPEY et al, 2010). Esta droga também vem sendo experimentalmente utilizada no tratamento de pacientes acometidos de Febre de Lassa, Hantavirose, SARS, infecções por Herpesvirus (GRACIE e CAMERON, 2008) Febre Hemorrágica de Crimea-Congo (ERGONUL, 2008) e raiva, conforme descrito por vários pesquisadores (WARRELL et al. 1989; JACKSON, 2003; WILLOUGHBY et al, 2005; MAIER et al, 2010).

Em cultura de células, a ribavirina inibe os processos de transcrição e “capping” viral de muitos agentes como o vírus da Estomatite Vesicular (TOLTZIS e HUANG, 1986; TOLTZIS et al., 1988; SHAH et al., 2010) e o vírus da Doença de Borna (JORDAN et al.,1999); é também responsável por causar uma mutação letal no genoma viral, conforme descrito por Cameron e Castro (2001).

A atividade antiviral da ribavirina não se restringe apenas ao processo de interferência na multiplicação viral, mas também a sua capacidade de interferir diretamente no controle da resposta imune do hospedeiro (TAM et al., 1999; VOLLMER et al., 2004), no entanto, efeitos positivos e negativos referentes a ribavirina foram relatados. Sookoian et al. (2004) demonstraram que a ribavirina aumentou a produção de IL-2, IFN- gamma e TNF- alfa pelos linfócitos-T e também potencializou a sinalização de ISRE (Interferon Stimulated Regulatory Element), levando ao aumento da expressão de ISGs (Interferons Induced Genes) antivirais no epitélio de células infectadas com Vírus

Sincicial Respiratório (ZHANG et al., 2003). Em contraste, esta droga também levou a inibição de quimiocinas como CCL3, CCL4 e a produção de IFN, além de causar uma diminuição no número de células da microglia no cérebro dos gerbils inoculados por via intracerebral, com vírus da Doença de Borna (LEE et al., 2008).

2.3.3 Amantadina

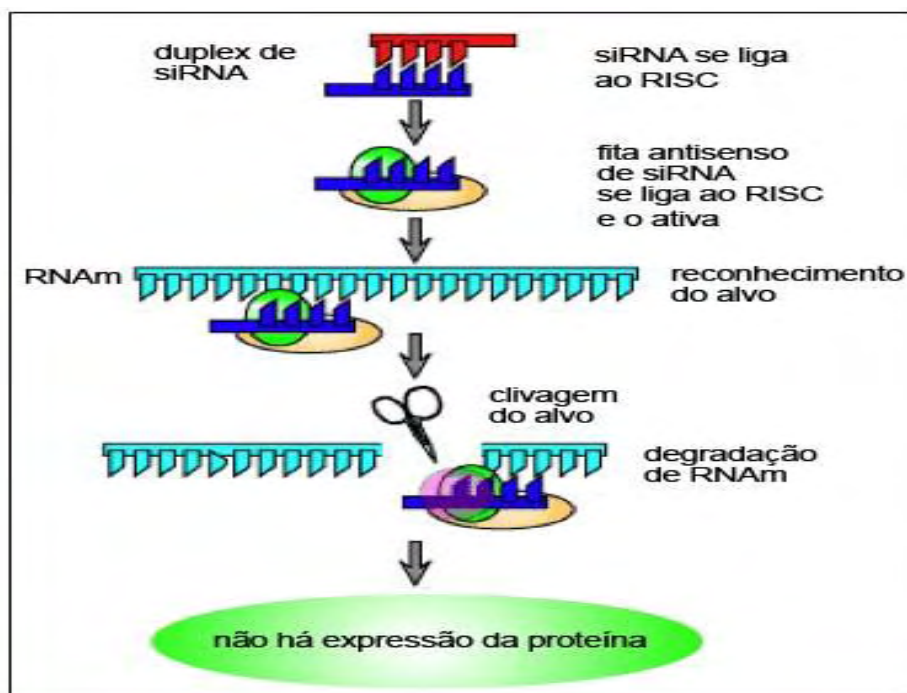
Amantadina é um agente lipossomotrópico, sendo o primeiro composto descrito capaz de inibir a replicação do vírus da Influenza. Este agente bloqueia a migração dos íons H^+ para o endossomo das células do hospedeiro, inibindo o processo de acidificação. A acidificação é fundamental para que haja uma desestabilização do capsídeo, permitindo o desnudamento da partícula viral, necessário para o início da replicação. O mecanismo de ação da amantadina é baseado na inibição da acidificação do endossomo, impossibilitando, desta maneira, a replicação viral (LEYSEN et al., 2008). Estudos experimentais na raiva, utilizando modelo animal e cultura, não demonstraram uma eficácia que justificasse seu emprego nos casos clínicos (SUPERTI et al., 1985; BUSSEAU et al., 1988).

2.4 Nova abordagem terapêutica

Uma alternativa terapêutica na raiva foi descrita por Brandão et al. (2007), que realizaram um estudo com o objetivo de testar a eficácia de um novo tratamento contra o vírus rábico, em cultura de células, baseado na interferência do RNA (RNAi). Utilizou-se para isto, pequenas sequências de RNA fita-dupla específicas, também conhecidos como short-interfering RNA (siRNA), que impedem a tradução do gene N do vírus rábico. Células BHK-21 foram infectadas com diversas diluições de vírus rábico cepa PV e foram tratadas com três sequências distintas de siRNAs. A análise com IFD mostrou uma queda de cinco vezes na taxa viral nas culturas tratadas quando

comparado com as culturas não tratadas. Os controles negativos provaram a ausência de citopatogenicidade, demonstrando uma nova e promissora possibilidade de tratamento antiviral contra o vírus rábico.

O mecanismo de inibição ou silenciamento foi descoberto por Napoli et al. (1990) em trabalhos com flores e elucidado por Fire et al. (1998). O mecanismo se baseia no princípio de que uma fita dupla de RNA, composta por cerca de 20 pares de bases (siRNA), e com a sequência anti-senso complementar ao RNAm alvo, seja capaz de desencadear a clivagem do RNAm, impossibilitando assim a sua decodificação. Internalizado pela célula, já no citoplasma, o siRNA é capturado por um complexo ubiquitário de proteínas denominado RISC (complexo silenciador induzido por RNA), o qual possui um domínio de ligação RNA dupla-fita e um domínio com atividade de ribonuclease. A ligação siRNA-RISC ativa o complexo e leva à separação da fita-dupla de RNA e à degradação do RNAm alvo que está ligado com a fita anti-senso do siRNA, impossibilitando sua transcrição e consequentemente a síntese protéica (AKHTAR e BENTER, 2007)(Figura 2).



Fonte: Durymanova-Ono, 2010

FIGURA 2- Esquema gráfico do mecanismo de ação do RNAi.

As aplicações terapêuticas dos siRNAs são diversas, sendo que alguns estudos já foram realizados com o objetivo de testar os siRNAs no tratamento de doenças não infecciosas, como problemas cardíacos, doença de Huntington, vários tipos de câncer e tumores, problemas capilares, doenças oculares, artrite autoimune (ARAÚJO et al., 2010; CHEN e ZHAORI, 2010; ZHENG et al., 2010), assim como em doenças infecciosas como dengue (SANCHEZ-VARGAS et al., 2004; MUKHERJEE e HANLEY, 2010), problemas respiratórios causado por Vírus Sincicial Respiratório, (CHANG et al., 2007), Influenza (SCULL e RICE, 2010), tuberculose (JAYASWAL et al., 2010), SARS (WANG et al., 2010), AIDS (CHEN e ZHAORI, 2010) e Herpes Simplex tipo 2 (KATAKOWSKY e PALLISER, 2010) dentre outras.

Um dos principais desafios quanto ao uso do siRNA, consiste no desenvolvimento de um sistema de transporte desta molécula para o interior da célula alvo, uma vez que a polaridade e tamanho não permitem que ela passe pela membrana celular com facilidade. Dois tipos de transporte são descritos, os vetores virais ou plasmídeos de DNA que podem carrear o shRNA (*short-harpin RNA*) que no interior da célula hospedeira se transformará em siRNAs e os vetores não virais como polímeros, lipossomos catiônicos e complexos peptídicos (CHEN e ZHAORI, 2010)

Uma outra maneira de aumentar a penetração de componentes para o interior da célula dá-se pelo aumento da permeabilidade de membrana, sendo o Dimetilsulfóxido (DMSO) uma substância que pode ser utilizada para a obtenção deste efeito. O DMSO é uma molécula com uma extremidade altamente polar e dois grupos apolares, fazendo-a solúvel em meios aquosos e orgânicos. Devido a essas propriedades físico-químicas, é um solvente muito eficiente de componentes insolúveis em água. O DMSO atravessa a barreira hematoencefálica, e tem sido efetivo em tratamento de edema cerebral traumático. Também vem sendo utilizado no tratamento de desordens músculo-esqueléticas, adenocarcinoma pulmonar, doenças

reumatóides, prostatites crônicas, doenças dermatológicas, esquizofrenia, assim como um analgésico tópico, dentre outras aplicações. Foi provado que o DMSO ativa mielinases e acelera a mobilização intracelular de colesterol de baixa densidade, aumentando também o transporte de colesterol entre membranas (SANTOS et al., 2003).

Embora a raiva seja uma enfermidade muito antiga, muito pouco foi observado de evolução na sua terapia e os trabalhos recentes abrem novas perspectivas e esperança na cura de pacientes enfermos.

3 Objetivos

3.1 Geral

O objetivo geral deste projeto foi avaliar a eficácia da terapia pós-expositiva utilizando Short-Interfering RNAs (siRNAs) e ribavirina isoladamente ou associados ao DMSO em camundongos infectados com uma amostra de vírus rábico de rua, de origem canina (variante 2).

3.2 Específicos

- Avaliação do efeito antiviral induzido por estes dois agentes por meio da quantificação do RNA viral
- Avaliação da resposta imune induzida nos animais infectados e submetidos aos protocolos pós-expositivos, por meio da quantificação da expressão gênica de citocinas associadas com a resposta imune.
- Avaliação do efeito da associação do DMSO associado ao siRNA a ribavirina, tomando como base o percentual de

sobrevivência nos diferentes grupos e os resultados da expressão gênica.

- Avaliação dos possíveis efeitos colaterais induzidos por estes protocolos, por meio da observação de sinais clínicos e/ou mortalidade nos grupos não infectados e tratados com o siRNA e ribavirina, isoladamente ou associados ao DMSO.
- Avaliação do efeito antiviral da ribavirina “*in vitro*” em dois tipos celulares distintos, fibroblastos e células de origem neuronal humana (neuroblastoma).

4 Materiais e Métodos

4.1 Materiais

4.1.1 Animais

- Cento e vinte (240) camundongos C57BL6, entre 4 e 6 semanas de idade, SPF (Specific Pathogens Free), fêmeas, oriundos do Cemib (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório - Unicamp) foram utilizados para o estudo dos protocolos pós expositivos da raiva
- Cinquenta camundongos Suiços, 21 dias de vida, SPF, fêmeas, oriundos do Cemib (Unicamp) foram utilizados para a titulação viral.

4.1.2 Vírus Rábico

- Foi utilizada amostra de vírus de rua, oriunda de cão (CCZ-398), classificada como variante 2, segundo o painel de anticorpos monoclonais do CDC, gentilmente cedida por Dra Marilene de Almeida, do Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo. Realizou-se o seqüenciamento parcial do gene N desta amostra que demonstrou homologia de 98% com a amostra AB263342.1, depositada no GeneBank, caracterizada como amostra de canídeo de origem brasileira. O cérebro dos camundongos infectados com esta amostra foi macerado na proporção 1:5 com diluente viral, centrifugado durante cinco minutos a 14.000 x g. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer em temperatura de – 80 °C (graus Celsius) até o momento de sua utilização.
- Para a infecção em cultura celular, utilizou-se vírus rábico CVS (Challenge Virus Strain, ATCC 959) pertencente ao Instituto Pasteur de Paris .

4.1.3 Diluente do Vírus Rábico

Constituído de solução fisiológica (NaCl a 0,9%) estéril, acrescida de 2% de soro fetal bovino (SFB) e 40 mg (miligramas) de gentamicina por 100 mL de solução, armazenados em freezer a – 20 °C.

4.1.4 Ribavirina

- Para o tratamento pós-expositivo dos camundongos, foi utilizada ribavirina, princípio ativo, de uso humano, em cápsulas, na concentração de 250 mg/cápsula. Diluiu-se 500 mg do produto em 60 mL de água estéril. Os animais receberam diariamente uma dose de 1,67mg/ 0,2 mL. O medicamento foi administrado 24h,48 h

e 72 h após a inoculação viral ou inoculação do diluente viral nos grupos não infectados.

- Para a avaliação do efeito da ribavirina em cultura celular, foi utilizada ribavirina da MP Biomedicals® (número do catálogo 196066), que apresenta-se na forma de pó sendo reconstituída em água estéril, na concentração de 1mM.

4.1.5 Short- Interfering RNAs

Cada siRNA foi sintetizado pela IDT® no formato dupla-fita com duas desoxitimidinas nas terminações 3' de cada fita senso e anti-senso. As sequências dos nucleotídeos foram descritas por Brandão et al. (2007) e podem ser consultadas abaixo (Quadro 1)

QUADRO 1- siRNAs (Short-interfering RNAs) utilizados para o silenciamento gênico do RNAm da nucleoproteína N do vírus da raiva, apresentando a sequência de ribonucleotídeos em fita dupla.

siRNA		Seqüência da dupla fita
RNA124	senso	5'GCCUGAGAUUAUCGUGGAG 3'
	antisenso	5'AUCCACGAUAAUCUCAGGC 3'
RNA750	senso	5'GCACAGUUGUCACUGCUUC3'
	antisenso	5'UAAGCAGUGACAACUGUGC 3'
RNA B	senso	5'GACAGCUGUCCUCACUCG 3'
	antisenso	5'AGAGUGAGGAACAGCUGUC 3'

4.1.6 Lipofectamina 2000 (Invitrogen®)

A Lipofectamina 2000 (Invitrogen®), foi preparada de acordo com as recomendações do fabricante, numa proporção de 1:50. No preparo de 10 mL (mililitros) de Lipofectamina 2000® 1:50, utilizou-se 9,8 mL de MEM (meio essencial mínimo) livre de soro fetal bovino e 0,2 mL de Lipofectamina 2000® pura. As duas soluções foram homogeneizadas

delicadamente e esta mistura foi incubada a temperatura ambiente durante 5 minutos, para posteriormente ser combinada ao siRNA.

4.1.7 Dimetilsulfóxido (DMSO)

Foi utilizado DMSO Merck® P.A numa proporção de 20 % (por cento) do volume total da solução de siRNA/ Lipofectamina 2000® e da solução de ribavirina, descontando-se este volume da solução de diluição.

4.1.8 Linhagens Celulares

Duas linhagens celulares distintas foram utilizadas, a BSR-T7, que são células fibroblásticas derivadas de BHK-21 (Baby Hamster Kidney) (BUCHHOLZ et al., 1999), consideradas sensíveis a ação da ribavirina, segundo Shah et al. (2010), e células SK-N-SH, que são células nervosas derivadas de neuroblastoma humano (ATCC, HTB-11).

4.1.9 Primers

Os primers, utilizados nas reações de RT-PCR em Tempo Real para a avaliação da expressão das citocinas de camundongos foi baseado nos artigos de Baloul e Lafon (2003), Baloul et al. (2004), Prehaud et al. (2005), Fragkoudis et al. (2007) e Mahdi et al. (2008). Os primers para avaliação do gene N viral foi baseado em Soares et al. (2002). Os primers foram sintetizados pela Qiagen® ou pela Eurogentec®, sendo diluídos , para a solução de trabalho, na concentração de 0,1 micrograma/ microlitro ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

As sequências dos primers ou respectivos códigos podem ser visualizados abaixo (Quadro 2)

QUADRO 2. Descrição dos primers utilizados, as empresas responsáveis pela síntese e a sequencia ou código de cada um.

Primer	Empresa	Sequencia (5' ⇒ 3')	Código
18S-F	Eurogentec®	CTT AGA GGG ACA AGT GGC G	-----
18S-R	Eurogentec®	ACG CTG AGC CAG TCA GTG TA	-----
Glico N 510	Eurogentec®	ATA GAG GAG ATT TTC GAG ACA GC	-----
Glico N- 784	Eurogentec®	CCT CAA AGT TCT TGT GGA AGA	-----
IL6	Qiagen®	----- ---	QT00098875
IFNβ	Qiagen®	----- ---	QT00249662
TNFα	Qiagen®	-----	QT00104006
OAS1	Qiagen®	-----	QT01056048
CCL2	Qiagen®	-----	QT00167832

4.2 Métodos

4.2.1 Inoculação Experimental em Camundongos

Realizada com base na metodologia descrita por Kaplan e Koprowski (1976), modificando-se a via de inoculação que foi intramuscular, como segue:

Utilização de 0,04 mL de vírus rábico, inoculado via intra muscular (i.m.) em pata posterior direita dos camundongos C57BL6, sendo parte destes animais separados dos demais, a fim de realizar-se a observação por um período mínimo de 30 dias, para verificação de sintomatologia rábica e percentual de mortalidade.

4.2.2 Titulação Viral em Camundongos

Foi realizada em camundongos Suiços de 21 dias, no mesmo momento da inoculação intramuscular dos camundongos C57BL6. Utilizou-se o vírus rábico CCZ-398 num volume de 0,03 mL nas diluições 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} inoculado por via intra cerebral (i.c.) sendo 10 animais inoculados para cada diluição. Realizou-se o cálculo da DL50 (Dose Letal 50%) através do método de Reed & Muench (KAPLAN E KOPROWISKI ,1976).

4.2.3 Extração do RNA

Os cérebros coletados foram imediatamente imersos em RNA Lateral® (Qiagen) na proporção de 1:3 (v/v) e conservados em freezer - 80°C até o momento da utilização. As amostras foram descongeladas em pequenas quantidades e pesadas para obtenção de 15 a 20 mg de tecido a ser utilizado na extração, retornando imediatamente ao freezer - 80°C até o momento da extração. A extração foi realizada com as alíquotas mantidas em cooler durante a fase de maceração, sendo processadas no máximo 8 amostras a cada vez para evitar degradação de RNA. Foi utilizado para assegurar a ausência de contaminação cruzada solução salina estéril como controle negativo e cérebro de camundongo inoculado com CVS (Challenge Virus Strain) como controle positivo.

A extração de RNA total foi realizada utilizando-se kit de extração comercial específico para RNA total da Invitex® (RNA Spin Tissue Mini Kit), segundo o manual fornecido pelo fabricante. O RNA extraído foi ressuspendido em 30 µL do Elution Buffer (fornecido com o kit) e mantido em freezer - 80°C.

Imediatamente após o término da extração, 2,5 µL foram separados para a quantificação do RNA em espectrofotômetro (NanoDrop ND-2000, NanoDrop®, EUA) de espectro completo - 190 a 840 nanômetros (nm) - com absorbância na faixa de 260 nm e avaliação da qualidade do material extraído pela relação 260/280.

4.2.4 Produção de cDNA

A reação de síntese do cDNA (DNA complementar) consistiu no uso de 1µg do RNA extraído em um volume máximo de 6 µL contendo 1µL de Oligo-DT (Invitrogen®) e 1µL de dNTP (10mM). Estes três componentes foram homogeneizados, incubados a 65°C durante 5 minutos e imediatamente colocados no gelo. Na segunda etapa acrescentou-se 4 µL de RT-Buffer (5x), 2 µL de DTT a 0,1 mM, 4 µL de MgCl₂ (50 mM), 1 µL de RNase Out (Invitrogen®) e 1 µL de enzima conversora SuperScript II (Invitrogen®), totalizando 20µL. Os microtubos foram levados para o termociclador no seguinte ciclo:

- 25 °C por 10 minutos
- 42 °C por 1h35m
- 70 °C por 15 minutos
- 4 °C após o fim do ciclo

4.2.5 RT-PCR em tempo real

A reação de PCR em tempo real, foi realizada em placas de 96 poços seladas com película transparente próprias para Real-Time (Applied Biosystems®).

A reação foi composta de 2 µL do cDNA, diluído na proporção de 1/50, 1 µL de cada primer, na concentração de 0,1 µg e 21 µL de Sybr Green (Promega®), num volume final de 25 µL. A placa foi selada, recoberta com papel alumínio e centrifugada durante 1 minuto para evitar a presença de bolhas de ar, sendo posteriormente submetida à reação de PCR em Tempo Real em máquina de Real-Time Applied Biosystems® (modelo ABI 7500 Fast), sendo selecionado o programa contendo reagente Syber Green e o ciclo Standard (40 ciclos de 50°C/20segundos, 95°C/10minutos, 95°C/15segundos, 60°C/1minuto) . A análise dos resultados foi realizada com base em delta CT(Δ CT) comparativo sem análise da curva de melting. Os resultados da expressão gênica foram calculados por meio da fórmula utilizando

como valor basal o ΔCT dos animais não inoculados submetidos a tratamento idêntico. Para a avaliação do efeito do tratamento sob a resposta imune dos animais infectados considerou-se como valor de referencia o obtido nos animais infectados e não submetidos ao tratamento pós expositivo.

4.2.6 Processamento das células para a técnica de Citometria de Fluxo

Foram avaliadas as culturas celulares BSR-T7 e SK-N-SH com infecção viral correspondente a 24 e 48h.

- As culturas celulares foram realizadas em placas de 6 poços.
- O meio de cultura presente nos poços dos cultivos celulares, foi aspirado e cada um foi lavado primeiramente com 2 mL de D - PBS Gibco® (catálogo número 14200166), seguida de uma lavagem com 2 mL de Ultra Pure® EDTA 0,5M pH 8,0 (Gibco®- catálogo numero 15575020).
- Para o descolamento das células que estavam aderidas à parede da placa utilizou-se 50 μ L de Tripsina 0,5M (10x) (Gibco®- catálogo numero 15400054) e incubação em estufa a 37 °C durante 2 - 4 minutos.
- Após o descolamento da monocamada, todo o conteúdo do poço foi coletado e colocado em pequenos tubos plásticos acrescidos de 500 μ L de D - PBS Gibco®.
- Os tubos foram centrifugados a 4 °C durante 5 minutos a 1200 x g.
- Foram realizadas duas lavagens com D - PBS Gibco®, seguida de centrifugação, pelo mesmo tempo, rotação e temperatura sendo o pellet final ressuspensionado em 450 μ L de D-PBS Gibco®. e homogenizado em vórtex.
- Adicionou-se 50 μ L de Cell-Fix® (BD®), procedeu-se a homogeneização em vórtex e mantidas em temperatura ambiente durante 20 minutos para fixação das células, sendo posteriormente centrifugadas a 4 °C durante 5 minutos a 1200 x g.

- Após esta etapa, 500 µL de Tampão de Permeabilização (PBS, 1% SFB, 0.1% Azida Sódica, 0.1% Saponina) foram acrescentados em cada tubo e estes foram levados ao vórtex e depois centrifugados a 4 °C durante 5 minutos a 1200 x g.
- Após a centrifugação o sobrenadante foi aspirado e foram adicionados 100 µL de anticorpo anti-rábico fluorescente antinucleocapsídeo viral (diluído em PBS a 1/50) a cada tubo sendo os mesmos incubados a 37 °C durante duas horas. Durante este período, foram realizadas várias homogeneizações por meio de vórtex de forma a garantir a ligação do conjugado de forma adequada a todas as células.
- Após este período adicionou-se 500 µL de Tampão de Saturação (PBS, 1% SFB, 0,1% de Azida Sódica) e os tubos foram novamente centrifugados a 4 °C durante 5 minutos a 1200 x g.
- Após a centrifugação, o sobrenadante foi aspirado, acrescentou-se o mesmo volume de Tampão de Saturação e os tubos foram homogeneizados utilizando o vórtex.

As amostras assim preparadas foram submetidas à leitura no aparelho FACScalibur® (BD® catálogo numero 340181)

4.2.7 Processamento das Células para a Técnica de Microscopia Confocal

Especificamente para esta técnica, uma lâmina circular foi colocada no fundo de cada poço da placa, sendo que em cada poço foi colocada uma concentração inicial de células de $0,5 \times 10^6$ / mL. Após a formação da monocamada celular e execução de todo o delineamento experimental, nas culturas, as células foram processadas para a realização da técnica de Microscopia Confocal, como demonstrado a seguir.

- Todo o meio de cultura foi aspirado e as células foram lavadas com 2 mL de PBS (Solução Tampão Salina Fosfatada). Cada poço foi preenchido com 50 µL de solução de paraformaldeído a 4% e a placa incubada durante 20 minutos a temperatura ambiente
- Após a incubação, 500 µL de 0.3% Triton X-100-PBS (Gibco®- catálogo número HFH10) foram acrescentados e a placa foi incubada durante 20 minutos a temperatura ambiente
- Posteriormente, todo o conteúdo do poço foi aspirado e acrescentou-se 500 µL de Buffer ST (PBS contendo 2% de albumina bovina e 5% de SFB) e a placa foi novamente incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente
- Todo o conteúdo foi aspirado e acrescentou-se 100 µL de conjugado anti-rábica de coelho anti-nucleocapsídeo associado ao isotiocianato de fluoresceína (Bio-Rad®), diluído a 1/50 em Buffer ST, o material foi homogeneizado e incubado durante 30 minutos a 4 °C
- Após a incubação, as lâminas foram retiradas dos poços e os núcleos celulares foram corados com Hoechst 33342® (Invitrogen® - catálogo número H3570), e submetidas a três lavagens sendo duas com PBS e a última com água destilada.
- As lâminas foram montadas com Fluoromount-G® (SouthernBiotech®- catálogo número 0100-01) e recobertas por lamínulas.
- A leitura das lâminas foi realizada sob iluminação ultra-violeta com microscópio Leica DM 5000B® associado a câmera MIC CTR 5000® e software de análise FW4000I®.

4.2.8 Soroneutralização em Cultura Celular para Determinação de Anticorpos Neutralizantes para o Vírus da Raiva pelo Método Rápido de Inibição de Foco de Fluorescência

O teste rápido de inibição de focos fluorescentes (RFFIT) para determinação de anticorpos neutralizantes antivírus da raiva foi realizado utilizando CVS (Challenge Virus Standard) inoculados em células BHK-21, de acordo com Smith et al., (1973). Considerou-se como título do

soro a diluição na qual, 50% dos vírus, encontravam-se neutralizados sendo este expresso em Unidades Internacionais / mililitro (UI/mL) após comparação com o título de um soro padrão diluído nas mesmas condições do soro teste (WHO, 1992). A sorologia foi realizada conforme a técnica descrita por Zalan et al. (1979) e Perrin et al. (1985) com algumas modificações:

- A técnica foi realizada em placa de 96 orifícios
- Os soros foram inativados a 56°C, em banho-maria, durante 30 minutos. Na cabine de segurança biológica foram realizadas 8 diluições seriadas dos soros diretamente na placa de microtitulação, na razão 5 (1:5 até 1:640).
- Em todos os lotes de soros adicionou-se soro padrão, um soro controle positivo e um controle negativo.
- Nos poços das colunas H1 à H12 foram colocados 80 µL de meio Eagle enriquecido com 2,5 % de SFB e nos restantes 50 µL do mesmo meio.
- A primeira diluição foi realizada adicionando-se 20 µL de cada soro teste nos poços H1 à H12
- A homogeneização do meio com o soro foi realizada utilizando-se pipeta multicanal e em seguida transferiu-se 50µL para a segunda coluna , repetindo este procedimento sucessivamente até a última coluna e descartando-se os 50 µL da última coluna, para que todos os poços ficassem com o volume de 50µL
- Após a diluição de todos os soros, 50 µL de vírus desafio (cepa CVS-11, previamente titulado), foi adicionado em todos os poços.
- A placa foi incubada em estufa a 37°C e 5% de CO₂, durante uma hora.
- Adicionou-se 50µL da suspensão de células BHK-21 a $3,7 \times 10^5$ células/mL em todos os poços da placa, sendo esta incubada novamente em estufa a 37°C e 5% de CO₂, durante 24h
- Ao término do período de incubação, as placas foram retiradas da estufa e o meio aspirado utilizando uma pipeta multicanal.

- A fixação das células nas placas foi realizada pela adição de 70 μL de acetona gelada a 80% (diluída em água MiliQ®), seguindo-se uma incubação em freezer a -20°C , durante 10 minutos
- A acetona foi desprezada por inversão das placas, sendo estas colocadas para secar em estufa a 37°C por 10 minutos.
- Após a secagem, acrescentou-se 40 μL de globulina monoclonal antirábica para RIFFT (Fujirebio® - catálogo numero 800-092) diluída segundo as instruções do fabricante, sendo as placas incubadas a 37°C em câmara úmida, durante uma hora
- O conjugado foi desprezado por inversão das placas, sendo estas lavadas por imersão, duas vezes em PBS e uma última vez com água destilada. O excesso de água foi retirado colocando-se as placas invertidas sobre papel absorvente, seguido de secagem em estufa a 37°C .
- Após a secagem completa, adicionou-se em toda placa uma solução de glicerina tamponada pH 8,5 (1 gota/poço)
- A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência, e os títulos calculados de acordo com o método de Spearman-Kärber (TRIMARCHI et al., 1996)

4.2.9 Preparo da solução de siRNA/Lipofectamina 2000®

A solução de cada um dos siRNAs foi preparada acrescentando-se 500 μL de água livre de DNase e RNase (Gibco®) no microtubo, previamente passado no vórtex, contendo 10 nanomoles (nmoles) de siRNA liofilizado, obtendo-se uma solução a 20 picomoles/ microlitro (pmoles/ μL). Esta mistura foi incubada durante 5 minutos em temperatura ambiente e após a incubação, os diferentes siRNAs foram colocados em um mesmo tubo onde foram acrescentados 1500 μL da Lipofectamina 2000®, que havia sido previamente diluída, conforme descrito no item 4.1.6, obtendo-se uma solução contendo 10 pmoles/ μL da solução de siRNA. A solução permaneceu em repouso durante 20 minutos, em temperatura ambiente antes de sua aplicação nos

camundongos, na dose de 3,3 μ M de cada siRNA num total de 0,06 mL da mistura de siRNAs, por via intraperitoneal.

4.2.10 Titulação Viral em Cultura de Células

A titulação viral do sobrenadante coletado das culturas de BSR-T7 e SK-N-SH, coletadas 24h e 48h após a infecção viral, foi realizada em células BSR de acordo com Faul et al. (2010) como segue:

- Num frasco T75 de cultura de células BSR confluentes, 2 mL de Tripsina 0,5% (10x), foi acrescentado para que houvesse o desprendimento celular das paredes do recipiente, sendo que imediatamente após o desprendimento, 8 mL de MEM contendo 10 % de SFB foram acrescentados. A solução foi homogeneizada com cuidado, utilizando-se uma pipeta, para que os aglomerados celulares fossem desfeitos e as células foram então transferidas para um recipiente estéril.
- Os sobrenadantes dos cultivos celulares de 24 e 48h foram diluídos inicialmente a 10^{-1} com MEM contendo 10% de SFB e submetidos a diluições sucessivas nesta mesma razão até uma diluição final a 10^{-8}
- Posteriormente, 15 μ L do meio contendo as células BSR foram acrescentados em todos os poços e a placa foi incubada a 37°C durante 48 h.
- Após o período de incubação, as células foram fixadas com solução de acetona a 80 %, acrescentada sobre o meio de cultura que já estava presente em cada poço, aguardou-se 5 minutos e todo o conteúdo dos poços foi desprezado com cuidado preenchendo-se os mesmos com solução de acetona a 80% incubando-se a 4 °C durante 30 minutos.
- A seguir, a solução de acetona foi descartada e a placa foi secada por meio de inversão.

- Seguido à secagem da placa, 50 µL de conjugado anti-rábico fluorescente antinucleocapsídeo viral foi adicionado em cada poço incubando-se a 37 °C durante 30 minutos. A placa foi lavada cuidadosamente com água destilada uma única vez e secada completamente.
- A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência em objetiva de aumento 10 x.
- O título considerado foi aquele em que havia presença de menos de 10 focos de fluorescência por poço.

5 Delineamento Experimental

5.1 Delineamento Experimental em Cultura de Células BSR-T7 e SK-N-SH

O experimento em células foi realizado em duas linhagens celulares distintas, BSR-T7 e SK-N-SH segundo o protocolo descrito a seguir.

- As células foram descongeladas e cultivadas em garrafas T75, a 37°C em estufa de CO₂ a 5%, até a formação de uma monocamada celular, homogênea em toda a superfície do frasco.
- Adicionou-se a todos os poços 2 mL da mistura MEM (2% de SFB) contendo aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células/ mL. A placa foi incubada a 37 °C por aproximadamente 48 h até que houvesse formação de uma monocamada com aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ mL
- Os poços foram tratados com 1mM de ribavirina por um período de 24 h. Após este período o conteúdo foi aspirado e as células submetidas a uma lavagem com 2 mL de MEM contendo 2%SFB
- Adicionou-se novamente 1mL de MEM (2%SFB) e procedeu-se a infecção celular com vírus rábico CVS, previamente titulado, utilizando-se multiplicidade de infecção (m.o.i) 3 ou m.o.i 0,1.

- A placa contendo células infectadas foi incubada em estufa a 37 °C e 5 % CO₂ durante duas horas
- Após a incubação, todo o conteúdo dos poços foi aspirado, as células foram lavadas com MEM (1 % SFB) e os poços foram preenchidos com 1mL de MEM (2 % SFB) acrescido ou não de ribavirina a 1mM, sendo as células processadas para a técnica de Citometria de Fluxo e Microscopia Confocal como já descrito.

As diferentes linhagens celulares foram infectadas com multiplicity of infection (m.o.i) 3 ou m.o.i 0,1 para a técnica de Citometria de Fluxo e somente infectadas com m.o.i 0,1 para a técnica de Microscopia Confocal, sendo as culturas tratadas ou não com ribavirina a 1mM. Os sobrenadantes das culturas preparadas para a Citometria de Fluxo, foram coletados 24h ou 48 h após a infecção viral e armazenados em freezer a - 80 °C para a realização de titulação viral deste material.

5.2 Delineamento Experimental em Camundongos:

O experimento foi composto por 10 grupos, sendo 5 grupos constituídos de animais infectados e 5 grupos constituídos de animais não infectados, também chamados de grupos controle. Os grupos de animais infectados e os grupos controle foram submetidos a protocolos pós-expositivos idênticos. Cada grupo foi composto de 24 animais, sendo 8 animais de cada grupo separados para observação por um período de 30 dias, como segue:

Grupos Infectados com vírus rábico

- Grupo 1: grupo infectado com vírus rábico por via intramuscular
- Grupo 2: grupo infectado com vírus rábico e tratado com siRNA/Lipofectamina® em dose única, por via intraperitoneal, 24 h após a inoculação viral.
- Grupo 3: grupo infectado com vírus rábico e tratado, 24h após inoculação viral com siRNA/Lipofectamina® e DMSO por via intraperitoneal.
- Grupo 4: grupo infectado com o vírus rábico e tratado 24 h, 48 h e 72 h após a inoculação viral com ribavirina e DMSO por via oral.
- Grupo 5: grupo infectado com o vírus rábico e tratado 24 h, 48 h e 72 h após a inoculação viral com ribavirina por via oral.

Grupos Controle

- Grupo 1: grupo inoculado com diluente viral por via intramuscular
- Grupo 2: grupo inoculado com diluente viral e tratado com siRNA/Lipofectamina® por via intraperitoneal, em dose única, 24 h após a inoculação do diluente
- Grupo 3: grupo inoculado com diluente viral e tratado com siRNA/Lipofectamina® e DMSO por via intraperitoneal, em dose única 24 h após a inoculação do diluente
- Grupo 4: grupo inoculado com diluente viral, tratados com ribavirina e DMSO por via oral, 24h, 48h e 72h após a inoculação do diluente.
- Grupo 5: grupo inoculado com diluente viral, tratados com ribavirina por via oral, 24h, 48h e 72h após a inoculação do diluente.

Os animais foram mantidos em estantes ventiladas, climatizadas, com filtros HEPA na entrada/saída de ar; as caixas foram forradas com maravalha estéril; água autoclavada e ração irradiada foram fornecidas “*ad libitum*”.

Os oito animais, de cada grupo, separados para avaliação clínica e percentual de letalidade foram observados e avaliados diariamente, durante 30 dias. Oito camundongos de cada grupo foram eutanasiados com isoflurano, no 5^o e 10^o dia após a inoculação viral ou após a inoculação do diluente viral. Coletou-se sangue, que foi imediatamente dessorado e armazenado em freezer – 80 ° C, e cérebro, que no momento da coleta foi tratado com RNA Later® e congelado em freezer – 80 ° C.

5.3 Avaliação Clínica dos Animais

Os animais separados para observação durante o período de 30 dias, foram avaliados quanto ao peso e sinais clínicos da seguinte maneira:

- Pesagem diária, realizada individualmente, em balança digital de uso doméstico, com marcação mínima de 0,1g.
- As manifestações clínicas observadas foram denominadas com diferentes símbolos e estes, posteriormente, receberam um valor numérico aleatoriamente escolhido, como descrito: (. = 0) animais saudáveis, pêlos brilhantes, peso adequado, (? = 2) pêlos arrepiados, perda de peso, sinais de depressão ou excitabilidade, mas sem sinal de paresia ou paralisia), (D = 3) sinais de paresia e paralisia, (M = 5) morte.

5.4 Análise Estatística

A expressão gênica foi avaliada pela diferença de expressão do gene de referência (18S) e dos genes de resposta imune,

comparativamente entre os grupos infectados com vírus rábico e os não infectados, submetidos aos mesmos protocolos terapêuticos, por meio do cálculo do Δ -Ct e, posteriormente, o fold increase por meio da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A análise estatística dos resultados do fold increase comparativamente entre os diferentes grupos foi realizada pelo método de Kruskal-Wallis.

A análise estatística da dosagem de anticorpos antirábicos entre os diferentes grupos foi realizada utilizando-se o método de Kruskal-Wallis.

A análise do score clínico foi realizada pelo método de Student T-test.

A análise da média mensal do peso entre os diferentes grupos, foi realizada pelo método de Kruskal-Wallis

A análise do percentual de sobrevivência foi realizada pelo método de Kaplan-Meier

Todas as análises estatísticas foram executadas pelo software GRAPH PRISM 5.0 ®.

6 Resultados

6.1 Efeitos da Infecção viral em camundongos sadios ou experimentalmente infectados, submetidos aos diferentes protocolos terapêuticos pós expositivos

O percentual de sobrevivência, letalidade, período de incubação, início das mortes e período de estada dos animais infectados estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1: Resultado dos percentuais de sobrevivência e letalidade, período de incubação, início das mortes e período de estada, ao final de 30 dias nos diferentes grupos terapêuticos em animais infectados com vírus rábico.

<i>Animais infectados e tratados com diferentes protocolos</i>					
Grupo	Sobrevida (%)	Letal.* (%)	P.I.** (dias)	Início Morte (dias.pós infecção)	Período de estada (dias)
somente virus	75%	25%	11	15	5
virus+siRNA	50%	50%	7	18	12
virus+siRNA+DMSO	50%	50%	8	15	8
virus +Ribavirina	12,5%	87,5%	8	16	9
virus+Ribavirina+DMSO	37,5%	62,5%	12	17	6

* Letal.= Letalidade; ** P.I= Período de Incubação

Nos animais infectados e tratados com ribavirina foi observada uma menor porcentagem de sobrevivência comparativamente aos demais grupos (Figura 3), no entanto, não foi encontrada diferença estatística entre os tratamentos.

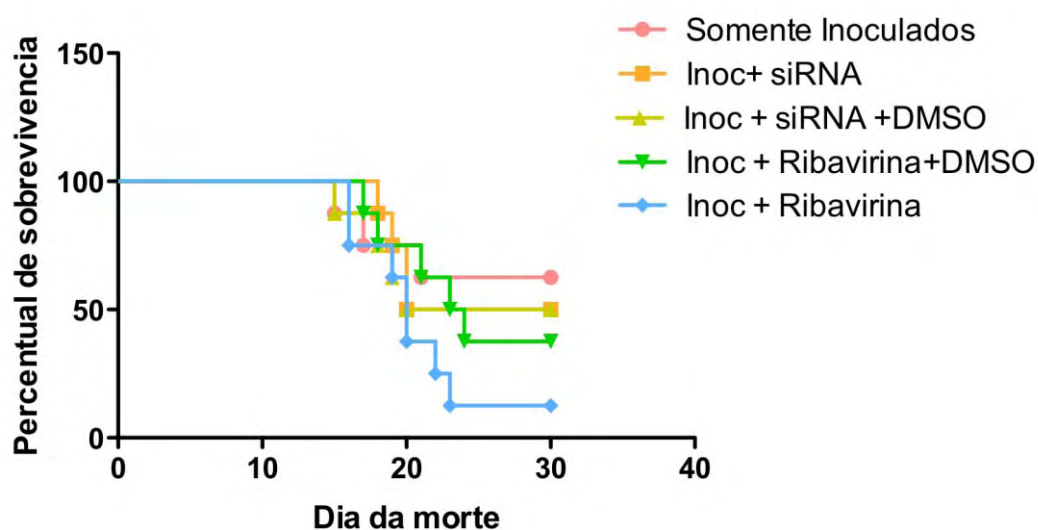


FIGURA 3. Curva de sobrevivência comparativa entre todos os grupos. Dados apresentados como curva de sobrevivência proporcional pelo método de Kaplan-Meier ($p = 0,0916$), não demonstrando diferença estatística significativa.

Os animais dos grupos controle, que somente receberam diluente viral por via intra muscular e foram tratados com protocolo terapêutico idêntico aos animais inoculados com vírus rábico, não morreram e não apresentaram apatia, perda de peso ou qualquer outra alteração clínica.

A média de peso dos animais nos diferentes grupos, infectados ou não infectados está demonstrada na Figura 4. Embora aparentemente possa ser observada média de peso menor nos animais infectados comparativamente aos não infectados não se observou diferença estatística entre eles.

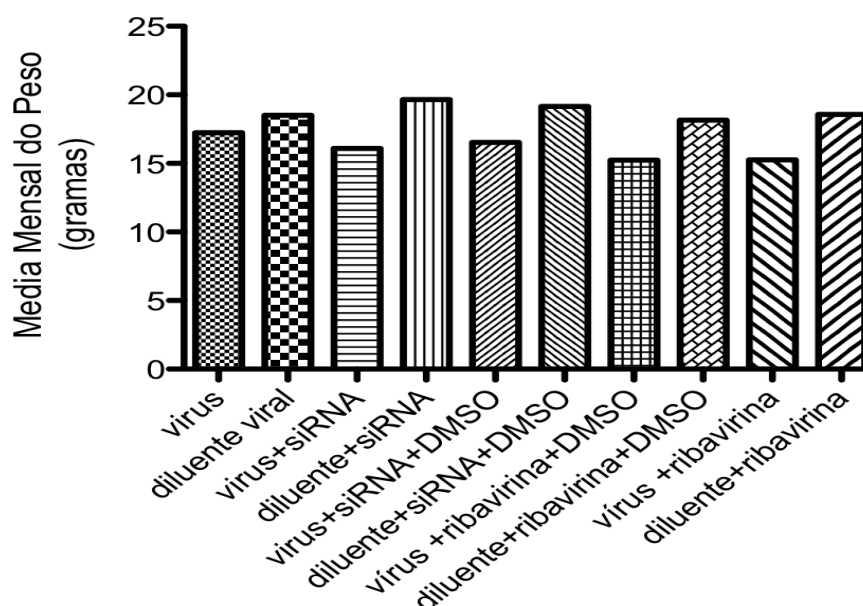


FIGURA 4. Média mensal de peso dos animais infectados ou não infectados submetidos aos mesmos protocolos terapêuticos. Análise pelo método de Kruskal-Wallis não demonstrou diferença estatística significativa entre os grupos ($p=0,4393$).

6.2 Titulação Viral em Camundongos

A titulação viral foi realizada de acordo com método de Reed & Muench (KAPLAN e KOPROWISKI, 1976), resultou em $DL_{50\%} 10^{-3.39}/0,03 \text{ mL}$.

6.3 Avaliação do Escore Clínico nos Diferentes Grupos

Cada animal recebeu uma pontuação de acordo com os sinais clínicos apresentados em cada dia de observação. Estes valores foram somados para cada dia em cada grupo, resultando em score clínico diário do grupo. A Figura 5 apresenta os valores obtidos demonstrando a severidade dos sinais clínicos de forma comparativa entre os diferentes grupos.

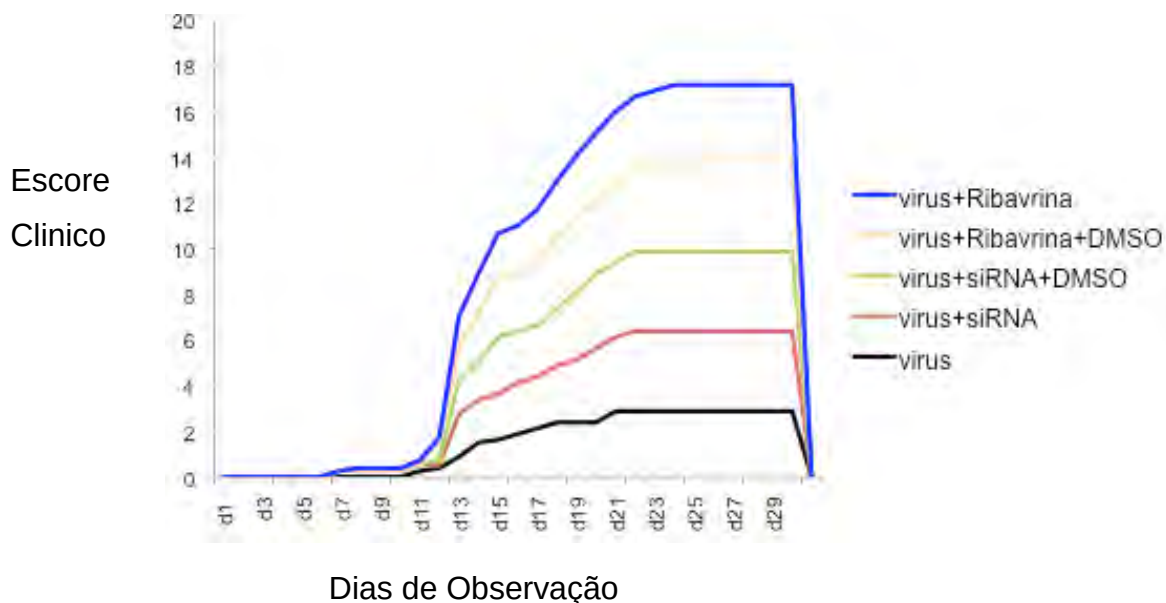


FIGURA. 5 Gráfico de soma do score clínico diário, dos grupos infectados submetidos aos diferentes protocolos. Comparação entre grupo de animais somente infectados com vírus rábico (preto), infectados e tratados com siRNA (vermelho), infectados e tratados com siRNA+DMSO (verde), infectados e tratados com ribavirina + DMSO (amarelo) e infectados e tratados com ribavirina (azul). Classificação entre 0 (sem sinais clínicos), 2 (pelos eriçados, excitabilidade/depressão, sem sinais de paresia/paralisia), 3 (paresia/paralisia) e 5 (morte). Análise estatística Student T test $p > 0,001$.

6.4 Expressão do gene N viral em Material Cerebral

As oitenta amostras de cérebro, coletadas durante o sacrifício dos animais inoculados, foram analisadas pela RT-PCR em Tempo Real para a quantificação do gene N do vírus rábico (Figura 6).

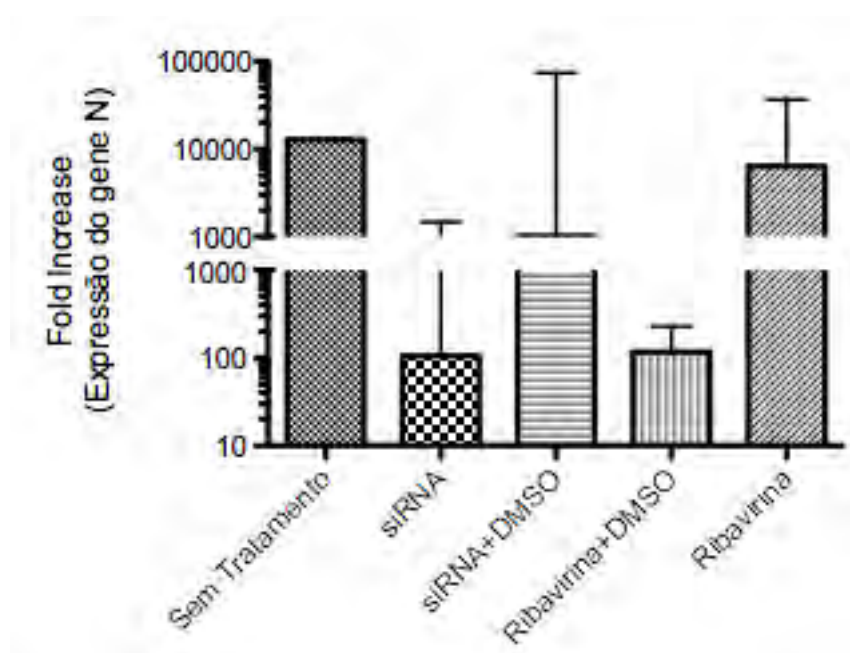


FIGURA 6. Expressão do gene N do vírus rábico no cérebro de animais inoculados e tratados com diferentes protocolos. Resultados agrupados segundo o tratamento utilizado com a mediana e os valores máximos alcançados. A análise estatística pelo método de Kruskal-Wallis não demonstrou diferença estatística significativa entre os grupos ($p=0,3135$).

Resultados positivos foram observados somente nos animais sacrificados no 10º dia após a inoculação. Resultaram positivas amostras de dois animais do grupo somente infectados, quatro no grupo de animais infectados e tratados com siRNA, quatro no grupo infectado e tratado com siRNA/DMSO, dois no grupo infectado e

tratado com ribavirina/DMSO e três no grupo de animais infectados e tratados com ribavirina.

6.5 Resultado da Titulação de Anticorpos Soroneutralizantes Associado a Expressão do Gene N do Vírus Rábico.

A titulação de anticorpos anti-rábicos soroneutralizantes pela técnica de RIFFT não mostrou diferença estatística pelo teste de Kruskal-Wallis na comparação entre os diferentes grupos terapêuticos e entre os resultados da sorologia.

Os dados obtidos na quantificação do gene N do vírus foram associados aos resultados obtidos na sorologia, por grupo terapêutico, como demonstrado na Figura 7.

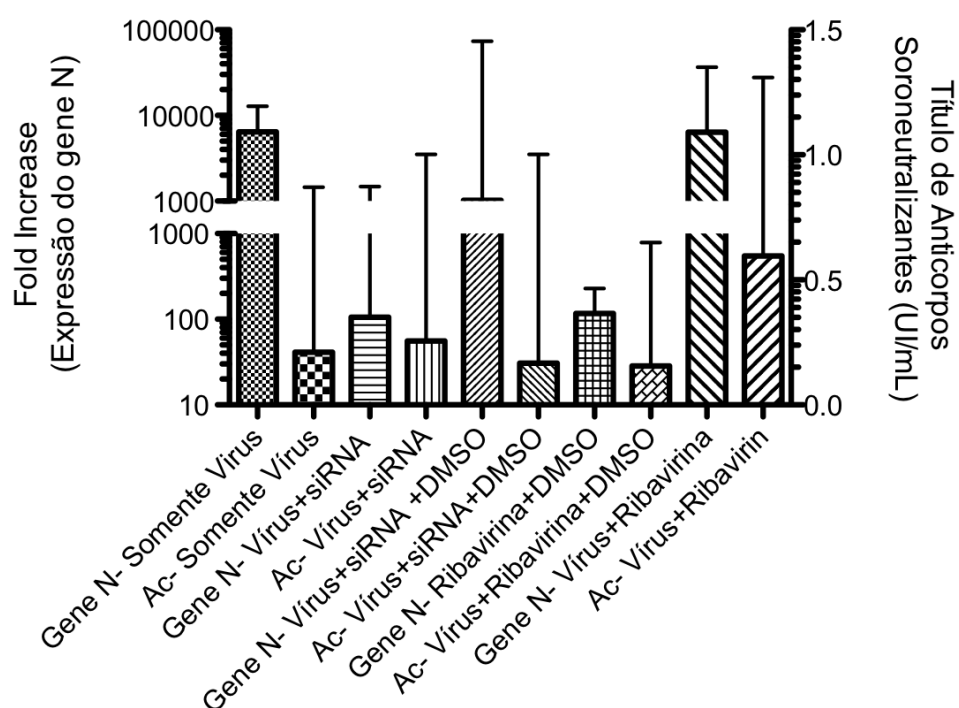


FIGURA 7. Resultados da RT-PCR em Tempo Real para o Gene N do vírus rábico, comparados aos resultados da titulação dos anticorpos anti-rábicos soroneutralizantes, de acordo com cada grupo terapêutico. Análise estatística pelo método de Kruskal-Wallis não demonstrou

diferença estatística significativa entre os resultados da expressão do gene N e o título de anticorpos soroneutralizantes entre os diferentes grupos ($p>0,01$).

6.6 Expressão Gênica de OAS-1, CCL-2, TNF-alfa, IFN-beta e IL-6 no Tecido Cerebral

A expressão dos genes da resposta imune CCL-2, OAS-1 (2',5'-oligoadenilato sintetase 1), IL-6, TNF-alfa e IFN-beta no tecido cerebral foi avaliada nos materiais que resultaram positivos para o gene N viral e nos materiais de camundongos não infectados submetidos ou não ao tratamento com ribavirina. Maior ênfase foi dada aos cérebros de animais tratados com ribavirina em função dos resultados de letalidade obtidos. Na Figura 8 podemos observar a expressão de cada citocina em animais positivos para o vírus rábico em cada protocolo terapêutico. Na Figura 9 podemos observar a expressão de cada citocina no 5º e 10º dia em animais não infectados e tratados com ribavirina.

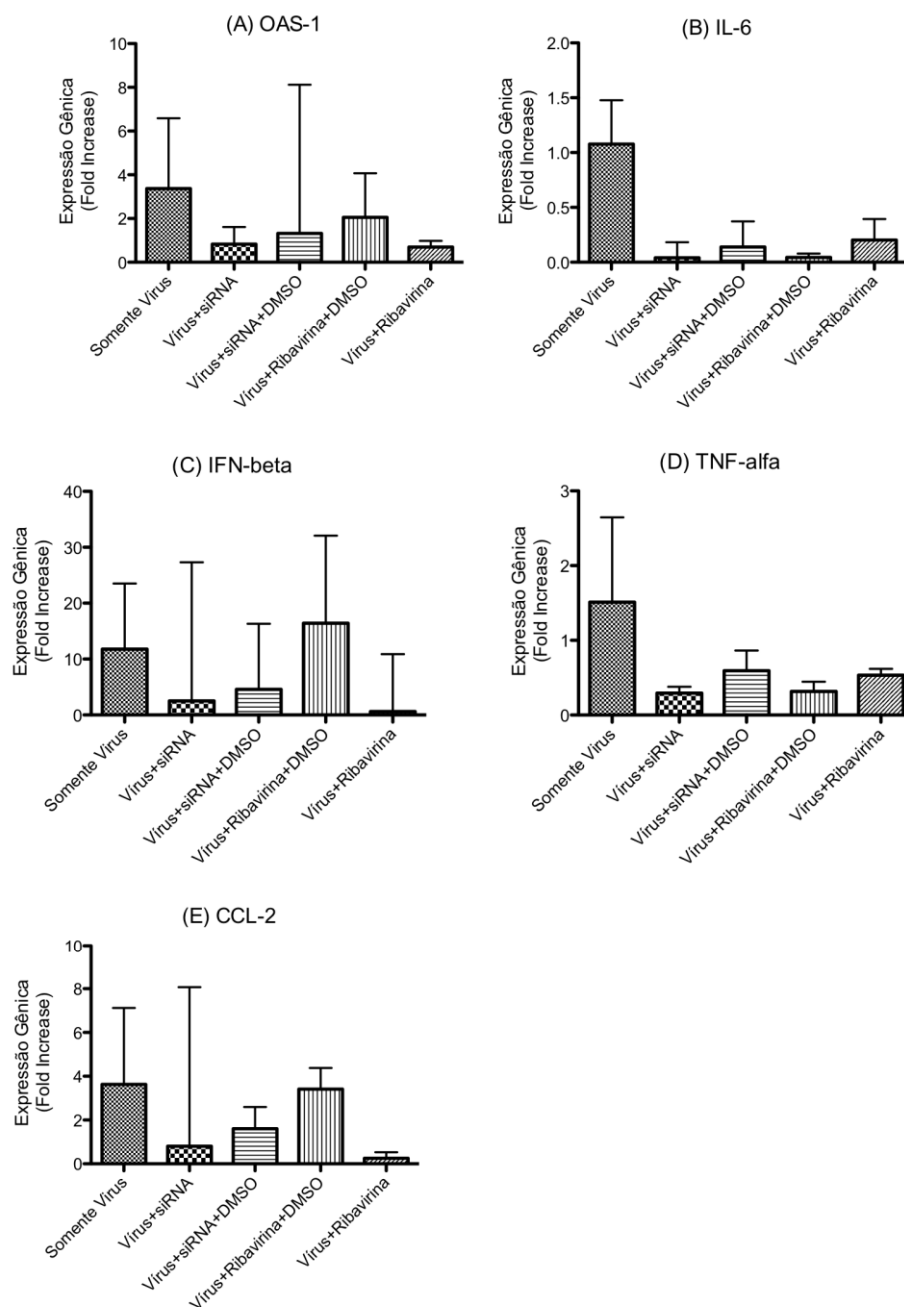


FIGURA 8. Expressão gênica de OAS-1 (A), IL-6 (B), IFN-beta (C), TNF-alfa (D) e CCL-2 (E) no cérebro de camundongos positivos para o gene N do vírus rábico, nos diferentes protocolos terapêuticos. Análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis não revelou diferença significativa na expressão de citocinas entre os diferentes grupos terapêuticos ($p>0,01$).

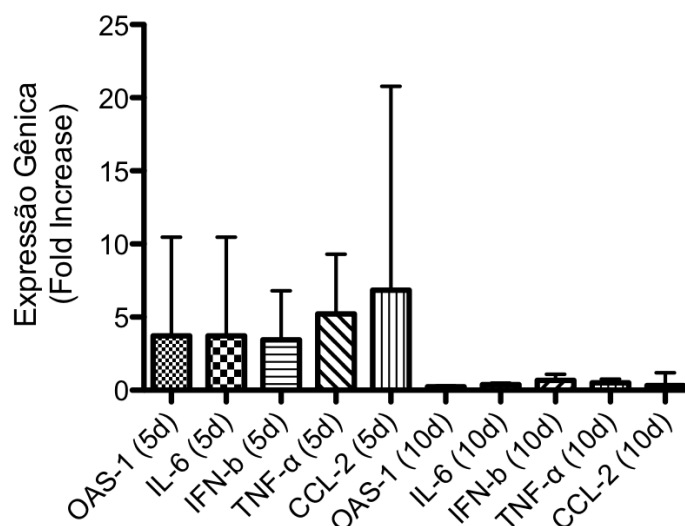


FIGURA 9. Expressão gênica de OAS-1, IL-6, IFN-beta, TNF-alfa e CCL-2 no 5^o dia e 10^o dia nos cérebros de camundongos não infectados e tratados com ribavirina . Análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis ($p=0,0020$) revelou diferença significativa entre a expressão de citocinas comparativamente entre o 5^o dia e 10^o dia.

6.7 Titulação Viral do Sobrenadante das Culturas Celulares

Nenhuma positividade foi encontrada no sobrenadante das células tratados com ribavirina, seja BSR-T7 ou SK-N-SH, no entanto, nas células não tratadas os títulos virais foram maiores na linhagem SK-N-SH, independentemente do m.o.i, indicando maior adaptação do vírus rábico ao neuroblastoma, como pode-se observar na Tabela 2.

TABELA 2. Titulação do vírus rábico, em sobrenadante de cultura celular de BSR-T7 e SK-N-SH, 24h ou 48h após a infecção com m.o.i 3 ou 0.1 em células tratadas ou não tratadas com ribavirina (1mM)

Linagem	Horas pós infecção	m.o.i	<i>Título Viral (UFF/mL)</i>	
			Células Não Tratadas com Ribavirina	Células Tratadas com Ribavirina
BSR-T7	24h	3	2.3 E+ 05 +/- 3.0E+04	0
BSR-T7	48h	3	2.0 E+ 06 +/- 0	0
SK-N-SH	24h	3	6.6 E + 02 +/- 6.0 E + 01	0
SK-N-SH	48h	3	7.0 E + 02 +/- 1.0 E + 02	0
BSR-T7	24h	0.1	2.0 E + 05 +/- 0	0
BSR-T7	48h	0.1	4.6 E + 07 +/- 6 E + 06	0
SK-N-SH	24h	0.1	7.3 E + 04 +/- 3.0 E + 03	0
SK-N-SH	48h	0.1	2.3 E + 05 +/- 3.0 E + 04	0

6.8 Análise das Culturas de Células BSR-T7 e SK-N-SHC pela Técnica de Citometria de Fluxo

A porcentagem de células infectadas e a intensidade de fluorescência, que representam o acúmulo de nucleocapsídeo do vírus rábico nas células analisadas, foi determinada por meio da Citometria de Fluxo. A intensidade e porcentagem de células fluorescentes tratadas com Ribavirina foi avaliada em comparação à intensidade e porcentagem de células fluorescentes não tratadas com ribavirina.

Como demonstrado (Figura 10), tanto a porcentagem de células infectadas como a intensidade de fluorescência detectadas foram menores nas células tratadas com ribavirina de ambas as linhagens

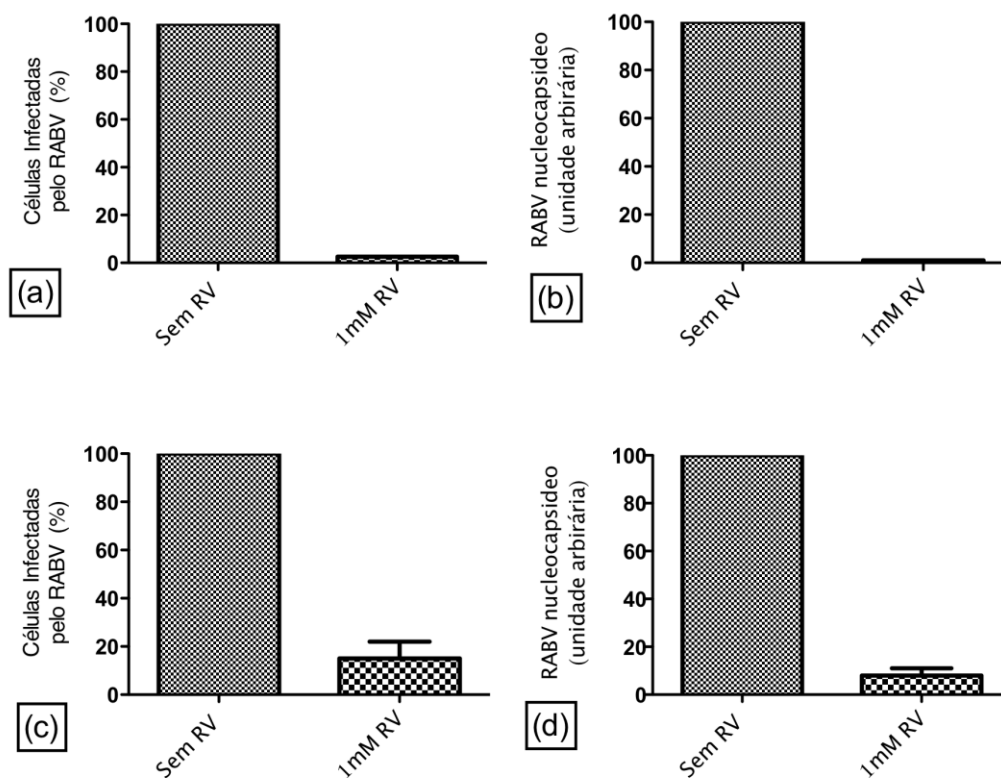


FIGURA 10. Porcentagem de infecção celular pelo vírus rábico (a, c) e acúmulo de nucleocapsídeo (b,d) em células BSR7-T7 (a,b) e SK-N-SH (c,d) infectadas com m.o.i 0.1, tratadas (1mM RV) ou não tratadas (Sem RV) com ribavirina por meio da técnica de Citometria de Fluxo.

6.9 Análise das Culturas de Células BSR-T7 e SK-N-SH pela Técnica de Microscopia Confocal

Após a infecção celular com vírus rábico m.o.i 3 ou 0,1, nas células BSR-T7 tratadas com ribavirina não se observou a presença de Corpúsculos de Negri (CN), contrariamente, nas células SK-N-SH, quando infectadas com m.o.i 3 e tratadas com ribavirina, foram observados CN de menor tamanho comparativamente às células não tratadas. Quando esta mesma linhagem foi infectada com vírus rábico m.o.i 0,1 e tratada com ribavirina, algumas células ainda apresentavam os Corpúsculos de Negri (Figura 11).

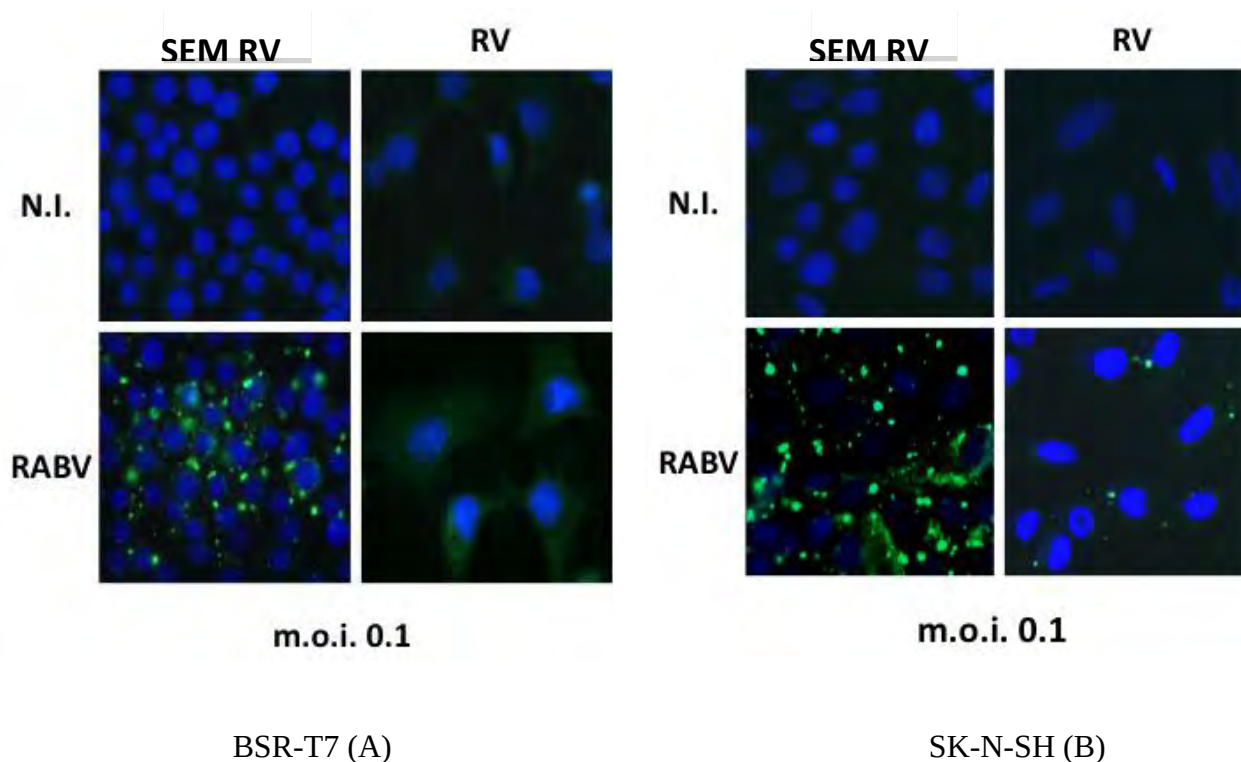


FIGURA 11. Formação dos Corpúsculos de Negri em células BSR7-T7 (A) e em células SK-N-SH (B), sendo as culturas infectadas (RABV) ou não infectadas (N.I.) com m.o.i 0,1, tratadas (RV) ou não tratadas (SEM RV) com 1mM de ribavirina. Os Corpúsculos de Negri apresentam-se fluorescentes (verde) e os núcleos celulares estão corados de azul.

6.10 Análise das Culturas de Células SK-N-SHC pela Técnica de RT-PCR em Tempo Real

A fim de investigar o efeito da ribavirina nos processos de transcrição e replicação do vírus rábico em células SK-N-SH, as culturas de células infectadas com m.o.i 3 tratadas ou não com ribavirina foram submetidas ao RT-PCR em Tempo Real, conforme descrito anteriormente para a pesquisa do gene N do vírus rábico. O nível de transcrição do gene N foi reduzido (> 2000 vezes) nas células tratadas com ribavirina (Figura 12).

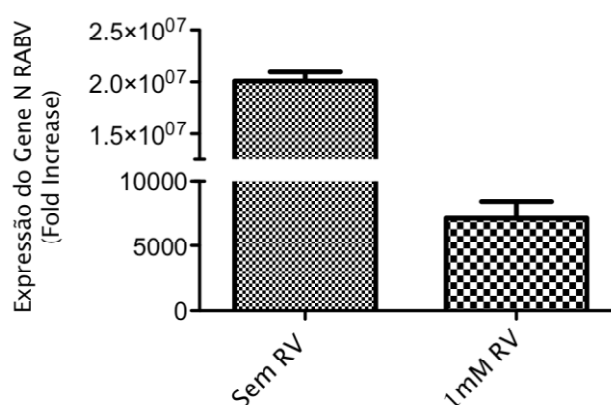


FIGURA 12. Resultado do fold increase da expressão do gene N do vírus rábico pela técnica de RT-PCR em Tempo Real, em células infectadas com m.o.i 3, tratadas com ribavirina (1mMRV) ou não tratadas com ribavirina (Sem RV).

7 Discussão

Não foi observado, nos animais dos grupos controle, qualquer efeito de toxicidade quando os animais foram submetidos a ribavirina ou ao siRNA/Lipofectamina® associados ou não ao DMSO na frequência, via de administração e doses utilizadas neste estudo. A ribavirina administrada sistemicamente, em altas doses, pode causar efeitos indesejáveis, como anemia, supressão da medula óssea, aumento de bilirrubina, ferro e ácido úrico no soro, perda de peso, prurido, erupção cutânea aguda, náuseas, depressão, tosse e sintomas respiratórios (HAYDEN e DOUGLAS, 1990; BEAN, 1992; TAKAHASHI et al., 1998; HOSOYA et al., 2001; PAPICH et al., 2003). No entanto, os efeitos colaterais ocorrem quando a droga atinge níveis sistêmicos, após duas a três semanas de tratamento (INOUE et al., 2004), o que justifica a ausência de efeitos adversos neste experimento, uma vez que a ribavirina foi administrada por um curto período de tempo. Segundo Chen e Zhaori (2010), nenhum efeito colateral notório foi relatado em todos os testes clínicos já efetuados com siRNAs o que está de acordo com o presente estudo.

Os grupos de animais infectados e os infectado e submetidos ao tratamento com ribavirina associada ao DMSO, apresentaram o menor número de amostras positivas ao gene N viral no material correspondente ao 10º dia pós infecção. Este menor número de amostras positivas está associado ao maior período de incubação, 11 dias e 12 dias, respectivamente, demonstrando, portanto, a ausência de vírus rábico no cérebro e a provável persistência viral por um maior período de tempo no local de inoculação. Estes resultados concordam com a literatura que refere que durante o período de incubação, antes do comprometimento do SNC, a presença do vírus não pode ser evidenciada no SNC (CREPIN et al., 1998). A replicação local e persistência viral por períodos indeterminados, justificam períodos de incubação mais prolongados e demonstram, mais uma vez, que a sintomatologia rábica decorre da presença do vírus no SNC, como

observado em trabalhos utilizando uma amostra de campo de vírus rábico isolada em gambás, que foi utilizada para infectar gambás sadios, que receberam diferentes concentrações virais por via intramuscular e constatou-se que nos animais que sobreviveram ao período de observação de dois meses, o vírus não podia ser detectado no SNC, mas podia ser encontrado no tecido muscular na periferia do local de inoculação, enquanto nos animais que adoeceram e morreram antes deste período, o vírus pode ser encontrado abundantemente no SNC, estando estes resultados em concordância com o observado nos grupos que apresentaram menor período de incubação associado com a detecção de maior número de amostras positivas ao gene N em SNC (CHARLTON, 1988; CHARLTON et al., 1997).

O maior percentual de letalidade, apresentado no grupo dos animais infectados e tratados com ribavirina, embora sem diferença estatística significativa em relação aos demais protocolos utilizados, está diretamente relacionado ao maior score clínico, sugerindo maior patogenicidade viral nos animais submetidos a este tratamento. Esta severidade não se encontrou relacionada a expressão do gene N viral, uma vez, que os resultados observados neste grupo foram similares aos do grupo dos animais apenas infectados. Não se pode afirmar, no entanto, que a expressão de genes associados à patogenicidade como G, M e P (WUNNER, 2007) não apresentem diferença que justifiquem os resultados observados. Adicionalmente, sabe-se que um dos possíveis mecanismos de escape viral associados com a patogenicidade é a redução da expressão dos genes virais de níveis máximos para níveis ótimos, o que possibilita a replicação viral abaixo dos níveis críticos, preservando a célula do hospedeiro (; MORIMOTO et al., 1999; FABER et al., 2002). Esta possibilidade é reforçada pela ausência de associação entre os resultados obtidos na expressão do gene N frente ao título de anticorpos soroneutralizantes. A indução de anticorpos soroneutralizantes é dependente da expressão da glicoproteína G, proteína associada com patogenicidade e virulência viral (DIETZSCHOLD et al., 1983; ETESSAMI et al., 2000).

Na presente pesquisa, o título de anticorpos soroneutralizantes mais elevado está associado a maior taxa de letalidade, observado no grupo submetido a ribavirina, sugerindo uma maior expressão da glicoproteína G. Estes resultados, no entanto, são contrários ao conceito de que a maior virulência estaria associada com menor expressão da glicoproteína G, com maior intensidade de replicação e persistência viral no SNC (JACKSON, 2008, NADIN-DAVIES e GARDINER, 2008 ; SCHENELL et al., 2010). Por outro lado, percentual de letalidade elevado e baixos títulos de anticorpos soroneutralizantes foram observados no grupo infectado e submetido ao tratamento com ribavirina associada ao DMSO, contrariamente ao observado no grupo somente tratado com ribavirina, sugerindo ausência de associação entre o título de anticorpos soroneutralizantes e a letalidade nestes animais, sendo também contrário aos estudos que afirmam que os anticorpos soroneutralizantes desempenham uma importante função relacionada ao clearance viral e consequentemente uma redução na letalidade (MOORE e HANLON, 2010).

Os animais infectados e tratados com siRNA não apresentaram diferença significativa quanto a letalidade letalidade, porém, apresentaram um maior período de estada da doença quando comparado aos demais grupos. Este fato poderia ser explicado por uma ação direta do siRNA, que quando aplicado em baixas concentrações pode ter sido responsável por uma inibição parcial da replicação viral, em concordância com os resultados de Zhang et al.,(2010) utilizando siRNA em infecção experimental em camundongos com vírus da Hepatite B. O aumento do período de estada observado é um aspecto importante que deve ser ressaltado, uma vez que, sugere que a utilização do siRNA de forma pós expositiva pode apresentar resultados mais satisfatórios com outras doses e eventualmente outra via de administração. Esta possibilidade concorda com os resultados obtidos por Durymanova-Ono (2010) que demonstrou uma diminuição na letalidade, embora não estatisticamente significativa, de camundongos inoculados com 100 DL50 de vírus rábico fixo e tratados

com um pool dos mesmos siRNAs, na dose de 10 μ M de cada siRNA por via intracerebral, diferindo, portanto, da concentração e via utilizadas neste experimento.

Não se observou diferença na taxa de letalidade dos animais submetidos ao siRNA isoladamente ou associado ao DMSO, demonstrando ineficácia do DMSO em aumentar a penetração do siRNA contrariamente ao esperado, uma vez que, um dos mecanismos do DMSO é facilitar a penetração de diferentes drogas nas células pelo aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática celular (BRAYTON, 1986; LEEKUNJORN e SUM, 2006).

O maior percentual de letalidade foi observado no grupo submetido a ribavirina seguido pelo grupo submetido a ribavirina com DMSO, indicando um provável efeito deletério da ribavirina no tratamento pós expositivo da raiva nestes animais. Em estudo recente, a ribavirina vem sendo associada a um efeito de interferência com genes da resposta imune (WILLOUGHBY, 2010) fato que poderia justificar a maior letalidade observada nos grupos submetidos a este tratamento (HAYDEN e DOUGLAS, 1990; CAMERON e CASTRO, 2001; ZHANG et al., 2003; LEE et al., 2008;).

O grupo tratado com ribavirina associada ao DMSO apresentou um percentual de letalidade levemente inferior ao da ribavirina utilizada isoladamente. Esta diminuição na letalidade poderia ser justificada pela ação do DMSO e penetração da droga no local de replicação viral, em concordância com Paes (1999), que utilizou o DMSO associado à Isoniazida, no tratamento de hamsters infectados com *Mycobacterium tuberculosis*, obtendo melhor penetração desta droga, bem como com Venkatesh et al. (2007), que obtiveram uma melhor absorção de atenolol e propanolol associados ao DMSO, em ratos.

O uso da ribavirina no tratamento pós-expositivo dos camundongos infectados, embora sem estatística significativa, demonstrou diferença biológica quanto a letalidade e maior gravidade no score clínico dos animais que foram submetidos a este protocolo.

Nos animais não infectados e tratados com ribavirina, um incremento significativo da resposta imune inata foi observado no cérebro destes animais no 5º dia devido ao aumento da expressão de OAS-1, CCL-2, IFN-beta, IL-6 e TNF-alfa (NING et al.1998; VOLLMER et al., 2004). No entanto, este efeito de estimulação ocasionado pela ribavirina desapareceu no 10º dia após o início do tratamento, indicando que a ribavirina foi capaz de estimular a resposta imune inata dois dias após o término do tratamento, mas esta resposta é transitória e insustentável, uma vez que retorna ao nível basal das células não tratadas sete dias após o término do tratamento, em concordância com Jordan et al.(1999).

Nas amostras de cérebro positivas para o gene N do vírus rábico, a expressão de OAS-1, CCL-2, IFN-beta, IL-6 e TNF-alfa dos animais tratados com ribavirina não houve diferença estatística quando comparada aos animais não inoculados e tratados. No entanto, podemos perceber que nos animais infectados e tratados com ribavirina, a expressão de OAS-1, CCL-2 e IFN-beta, componentes da resposta celular envolvidos no combate às infecções virais, está diminuída quando comparada ao grupo dos animais inoculados e dos inoculados e submetidos aos outros protocolos, o que de certa forma poderia explicar a maior letalidade no grupo tratado com ribavirina, com 87,5% de letalidade, comparado ao grupo não tratado, que apresentou 25%, ou aos grupos tratados com siRNA, com letalidade de 50%.

Levando em consideração estes resultados, foi estudada a resposta imune de animais infectados ou não infectados, tratados com ribavirina, assim como o efeito *"in vitro"* deste fármaco em duas linhagens celulares distintas, uma das quais derivada de célula nervosa humana.

O efeito “*in vitro*” da ribavirina foi avaliado em células BSR-T7, fibroblasto derivado de células BHK-21, sendo considerada uma linhagem sensível à ação deste fármaco segundo estudo realizado Shah et al. (2010). Também foi utilizada a linhagem SK-N-SH, proveniente de neuroblastoma humano, sendo muito importante averiguar o efeito nesta última, uma vez que, nos casos de raiva, a droga deve apresentar uma boa ação em células do sistema nervoso.

O sobrenadante das culturas das células infectadas e tratadas com ribavirina, foi coletado e titulado e, ao contrário das culturas não tratadas, a titulação do sobrenadante não evidenciou nenhum foco de fluorescência demonstrando o efeito antiviral “*in vitro*”. O efeito antiviral pode ser resultado de dois mecanismos, o primeiro é a própria resistência das células a infecção, neste caso a ribavirina seria inútil, e o segundo é a capacidade da ribavirina de bloquear a produção de novas partículas virais infectantes (SHAH et al, 2010)

Para avaliar a ação da ribavirina no controle da infecção celular, proteínas do RABV e os sítios de replicação viral no interior das células, os Corpúsculos de Negri (CN), foram pesquisados utilizando-se anticorpo antinucleocapsídeo (MÉNAGER et al., 2009; LAHAYE et al., 2009) por meio de Microscopia Confocal. Os resultados demonstraram que a ribavirina inibiu a formação dos CN nos fibroblastos, no entanto, nos neuroblastomas, a presença de pequenos CN nas culturas tratadas com ribavirina foram detectadas proporcionalmente ao m.o.i utilizado. Estes resultados indicaram que nos fibroblastos, a ribavirina foi capaz de tornar as células refratárias à infecção pelo vírus rábico, porém, o mesmo não aconteceu nos neuroblastomas, que continuaram permissivos à entrada do vírus. Considerando-se que o vírus rábico é essencialmente neurotrópico e que as alterações fisiopatológicas estão relacionadas à complexos mecanismos de alteração funcional das células afetadas mediadas pelo vírus rábico, principalmente durante o processo de replicação viral (BALOUL e LAFON, 2003; CHELBY- ALIX et al., 2006; WUNNER, 2007) os resultados obtidos nas culturas celulares, bem como a

ineficácia da ribavirina nos camundongos experimentalmente infectados com vírus rábico neste estudo, estão em concordância com os resultados negativos desta droga no tratamento da raiva nos seres humanos (JACKSON, 2010).

A fim de investigar se a ação da ribavirina em células SK-N-SH poderia estar relacionada a interferência nos processos de transcrição e/ou replicação viral, foi realizada a quantificação do gene N do vírus rábico em células tratadas e não tratadas com ribavirina, pela técnica de RT-PCR em Tempo Real, segundo Prehaud et al. (2005). Os resultados demonstraram que nas células tratadas com ribavirina a transcrição do gene N foi menor quando comparada a transcrição das células não tratadas. Este resultado associado ao da Microscopia Confocal, que demonstrou a presença de CN de menor tamanho quando comparado ao de células não tratadas, reiteram a hipótese de que a ribavirina, de alguma maneira, prejudicou o mecanismo de transcrição e/ou replicação do vírus rábico. No entanto, considerando que a diferença entre a expressão do gene N nas células tratadas e no controle não foi estatisticamente significativa, pode-se afirmar que o efeito da ribavirina é dependente do tipo celular, apresentando menor eficácia nos neuroblastomas quando comparado em fibroblastos em concordância com o estudo de Shah et al.,(2010).

A técnica de Citometria de Fluxo foi utilizada a fim de comparar precisamente a porcentagem de células infectadas e a quantidade de nucleocapsídeo acumulada no interior das células tratadas ou não tratadas com ribavirina. Como demonstrado nos resultados, redução na porcentagem de células infectadas e na quantidade de nucleocapsídeo no interior das células tratadas com ribavirina foram observadas tanto nas células BSR-T7 como em SK-N-SH. No entanto, por meio da Microscopia Confocal, uma pequena porcentagem de células infectadas, assim como, um pequeno acúmulo de nucleocapsídeo puderam ser observados nas células SK-N-SH, enquanto nada foi detectado nas células BSR-T7. Estes resultados estão em concordância com os obtidos na Microscopia Confocal e na

quantificação do gene N, e novamente, sugerem que as células da linhagem SK-N-SH são menos susceptíveis ao efeito antiviral da ribavirina quando comparadas às células da linhagem BSR-T7.

Os protocolos terapêuticos utilizados neste experimento foram exclusivamente pós-expositivos. Neste sentido, a utilização do siRNA tem como desvantagem específica o custo elevado. A ribavina, neste protocolo, não se mostrou uma alternativa adequada para o tratamento pós-expositivo da raiva. Novos experimentos e drogas devem ser pesquisados, visando uma melhor eficácia, com baixo custo, além de minimizar a necessidade de doses repetidas de vacina antirábica e os riscos associados à aplicação do soro hiperimune.

8 Conclusão

A utilização do pool de siRNAs na dose e via escolhidas, foi responsável pelo maior período de estado da doença.

Não foi observado benefício na associação do DMSO nos protocolos pós-expositivos utilizados.

A ribavirina não demonstrou eficácia *“in vivo”* no tratamento pós-expositivo da raiva em camundongos inoculados com vírus rábico de origem canina.

A ribavirina induz um aumento da expressão de OAS-1, CCL-2, IFN-beta, IL-6 e TNF-alfa no cérebro de camundongos não infectados, levando a um incremento da resposta imune inata, no entanto, esta resposta é passageira e desaparece nas amostras analisadas no 10^o dia.

A ribavirina não demonstrou completa atividade antiviral em neuroblastomas, o que já ocorreu em fibroblastos.

9 Referências Bibliográficas

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

ARAÚJO, R.; FERNANDES M.; CAVACO-PAULO, A.; GOMES, A. Biology of Human Hair: Know Your Hair to Control It. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* v. 12, 2010.

BAER, G. M.; SHADDOCK, J. H.; MOORE, S. A.; YAGER, P. A.; BARON, S. S.; LEVY, H. B. Successful prophylaxis against rabies in mice and rhesus monkeys: the interferon system and vaccine. *Journal Infectious Diseases*, v.136, p.286-91, 1977.

BALOUL, L, CAMELO, S., LAFON, M. Up-regulation of Fas ligand (FasL) in the central nervous system: a mechanism of immune evasion by rabies virus. *J.neurovirol*, v.10, n.6, p.372-382, 2004.

BALOUL, L.; LAFON, M. Apoptosis and rabies virus neuroinvasion. *Biochimie*, v. 85, p. 777-788, 2003.

BEAN, B. Antiviral therapy: current concepts and practices. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 5, n. 2, p. 146-182, 1992.

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

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

BRAYTON, C. F. Dimethyl Sulfoxide (DMSO): A Review. *Cornell Veterinarian*, v. 76, p. 61-90, 1986.

BUCHHOLZ, U. J.; FINKE, S.; CONZELMANN, K. K. Generation of Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol*, v. 1, p. 251–259, 1999.

BUSSEREAU, F. Chimiothérapie de la rage. *Bulletin Academie Veterinaire de France*, v.59, p. 451-6, 1986a.

BUSSEREAU, F. Efficacy of heteropolyanions against rabies virus infection in mice. *Annales Institut Pasteur Virology*, v.137, p.391-400, 1986b.

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

CAMERON, C. E.; CASTRO, C. The mechanism of action of ribavirin: lethal mutagenesis of RNA virus genomes mediated by the viral RNA-dependent RNA polymerase. *Curr. Opin. Infect. Dis.* v.14, p. 757-764, 2001.

CAMPBELL, J.B.; CHARLTON, K. M. *Rabies*. Kluwer Academic London., 431p., 1988.

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

CHANG, Z.; BABIUK L.A.; HU, J. Therapeutic and prophylactic potential of small interfering RNAs against severe acute respiratory syndrome: progress to date. *BioDrugs*. v. 21, n. 1, p. 9-15, 2007

CHARLTON K.M. The pathogenesis of rabies. In: CAMPBELL, J.B.; CHARLTON, K. M. *Rabies*. Kluwer Academic London, 1988. P.101-150.

CHARLTON, K.M. The pathogenesis of rabies and other lyssaviral infections: recent studies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* v.187, p. 195-119, 1994.

CHARLTON, K.M.; NADIN-DAVIS, S.; CASEY, G.A.; WANDELER, A.I. The long incubation period in rabies: delayed progression of infection in muscle at the site of exposure. *Acta Neuropathol.* v. 94, p. 73–77, 1997.

CHAVALI, S.R.; CAMPBELL, J.B. Immunomodulatory effects of orally-administered saponins and non-specific resistance against rabies infection. *Arch Allergy Appl Immunol.* v.84, p. 129-134, 1987.

CHELBI-ALIX, M.K.; VIDY, A.; BOUGRINI, J. E.; BLONDEL, D. Rabies Viral Mechanisms to Escape the IFN System: The Viral Protein P Interferes with IRF-3, Stat1, and PML Nuclear Bodies. *Journal of Interferon & Cytokine Research.* v. 26, p. 271–280, 2006.

CHEN, S.H.; ZHAORI, G. Potential clinical applications of siRNA technique: benefits and limitations. *European Journal of Clinical Investigation*. 2010. No prelo

CREPIN, P.; AUDRY, L.; ROTIVEL, Y.; GACOIN, A.; CAROFF, C.; BOURHY, H. Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 36, p. 1117-1121, 1998.

DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. I Protocolo para tratamento da raiva humana. *Epidemiol. Serv. Saúde*. v. 18, n.4, p.385-394, 2009.

DIETZSCHOLD, B.; WUNNER, W.H.; WIKTOR, T.J.; LOPES, A.D.; LAFON, M.; SMITH, C.L.; KOPROWSKI, H.; Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v. 80, p. 70–74, 1983.

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

EMPEY, K.M.; PEEBLES, R.S. JR.; KOLLS, J.K. Pharmacologic advances in the treatment and prevention of respiratory syncytial virus. *Clin Infect Dis*, v. 50, p.1258-1267, 2010.

ERGONUL, O. Treatment of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Research*, v.78, n.1, p. 125-131, 2008.

ESPERT, L.; GONGORA, C.; MECHTI, N., Interferon: une barriere efficace que a ses faiblesses. *Bull. du Câncer*, v. 90, p. 131-141, 2003.

ETESSAMI, R.; CONZELMANN, K.K.; FADAI-GHOTBI, B.; NATELSON, B.; TSIANG, H.; CECCALDI, P.E. Spread and pathogenic characteristics of a G-deficient rabies virus recombinant: an in vitro and in vivo study. *J. Gen. Virol.* v. 81, p. 2147–2153, 2000.

FABER, M.; PULMANAUSAHAKUL, R.; HODAWADEKAR, S.S.; SPITSIN, S.; MCGET-TIGAN, J.P.; SCHNELL, M.J.; DIETZSCHOLD, B. Overexpression of the rabies virus glycoprotein results in enhancement of apoptosis and antiviral immune response. *J. Virol.* 76, 3374–3381, 2002.

FABER, M.; FABER, M.; PAPANERI, A.; BETTE, M.; WEIHE, E.; DIETZSCHOLD, B.; SCHNELL, M.J. A Single Amino Acid Change in Rabies Virus Glycoprotein Increases Virus Spread and Enhances Virus Pathogenicity. *J Virol*, v. 79, p. 14141-14148, 2005.

FAUL E.J.; WANJALLA, C.N.; SUTHAR, M.S.; GALÉ, M.; WIRBLICH, C.; SCHNELL, M.J. Rabies virus infection induces type I interferon production in an IPS-1 dependent manner while dendritic cell activation relies on IFNAR signaling. *PLoS Pathog*, v. 6, e1001016, 2010

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

FERENCI, P.; BRUNNER, H.; NACHBAUR, K.; DATZ, C.; GSCHWANTLER, M.; HOFER, H.; STAUBER, S.; HACKL, F.; JESSNER, W.; ROSENBEIGER, M.; MUNDA-STEINDL, P.; HEGENBARTH, K.; GANGL, A.; VOGEL, W. Combination of interferon induction therapy and ribavirin in chronic hepatitis C. *Hepatology*, v. 34, p. 1006–1011, 2001.

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

FRAGKOUDIS, R.; BREAKWELL, L.; MCKIMMIE, C.; BOYD, A.; BARRY, G.; KOHL, A.; MERITS, A.; FAZAKERLEY, J.K. The type I interferon system protects mice from Semliki Forest virus by preventing widespread virus dissemination in extraneural tissues, but does not mediate the restricted replication of avirulent virus in central nervous system neurons. *Journal of General Virology*, v. 88, p.3373-3384, 2007.

GILBERT, B.E.; KNIGHT, V. Biochemistry and clinical applications of ribavirin. *Antimicrobialagents and Chemotherapy*, v. 3, p. 201-205, 1986.

GRACI, J.; CAMERON, C. Therapeutically targeting RNA viruses via lethal mutagenesis. *Future Virol*, v. 3, p. 553-566, 2008.

HARMON, M.W.; JANIS, B. Therapy of murine rabies after exposure: efficacy of polyriboinosinic-polyribocytidylic acid alone and in combination with three rabies vaccines. *Journal Infectious Diseases*, v.132, p.241-9, 1975.

HAYDEN, F. G.; DOUGLAS, R. G. JR. Antiviral Agents. In: MANDELL, G. L.; DOUGLAS, R. G. JR; BENNETT, J. E. (Eds). *Principles and Practice of Infectious Disease*. New York: Churchill Livingstone, 1990. p. 370-393.

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

HICKS, D.J.; NUÑEZ, A.; HEALY, D.M.; BROOKES, S.M.; JOHNSON, N.; FOOKS, A.R. Comparative pathological study of the murine brain after experimental infection with classical rabies virus and European bat lyssaviruses. *J Comp Pathol*, 140, 113-126, 2009.

HOSOYA, M.; SHIGETA, S.; MORI, S.; TOMODA, A.; SHIRAISHI, S.; MIIKE, T.; SUZUKI, H. High-dose intravenous ribavirin therapy for subacute sclerosing panencephalitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 3, p. 943-945, mar. 2001.

INOUE, Y.; HOMMA, M.; MATSUZAKI, Y.; SHIBATA, M.; MATSUMURA, T.; ITO, T.; MITAMURA, K.; TANAKA, N.; KOHDA, Y. Liquid Chromatography assay for routine monitoring of cellular ribavirin levels in blood. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 10, p. 3813-3816, out. 2004.

JACKSON, A. Rabies virus infection: An update. *J Neurovirol*, v. 9, p. 253–258, 2003.

JACKSON, A.C.; SCOTT, C.A.; OWEN, J.; WELI, S.C.; ROSSITER, J.P. Therapy with minocycline aggravates experimental rabies in mice. *Journal of Virology*, v. 81, n.12, p. 6248-6253, 2007.

JACKSON, A.C.; SCOTT, C.A.; OWEN, J.; WELI, S.C.; ROSSITER, J.P. Human rabies therapy: lesson learned from experimental studies in mouse models. *Dev. Biol (Basel)*, v. 131, p. 377-385, 2008.

JACKSON, A.C. Rabies. *Neurol. Clin.*, v. 26, p. 717-26, 2008.

JACKSON, A.C. Therapy of rabies encephalitis. *Biomédica*. v.29, 2009.

JACKSON, A.C. Why does the prognosis remain so poor in human rabies? *Expert Rev Anti Ther.* v. 8, p.623-625, 2010.

JAYASWAL, S.; KAMAL, A.; DUA, R.; GUPTA, S.; MAJUMDAR, T.; DAS, G.; KUMAR, D. ; RAO, K. V. S. Identification of Host-Dependent Survival Factors for Intracellular Mycobacterium tuberculosis through an siRNA Screen. *PLoS Pathogens* . v. 6, n. 4, p. e1000839, 2010.

JORDAN, I.; BRIESE, T.; AVERRET, D.R.; LIPKIN, W.I. Inhibition of Borna disease virus replication by ribavirin, *Journal of Virology*. v. 73, p. 7903- 7906, 1999.

KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. *La rabia, tecnicas de laboratorio*. 3ed. Geneva. Organizacion Mundayal de la Salud, 1976, 389 p.

KATAKOWSKI, J.A.; PALLISER, D. siRNA-based topical microbicides targeting sexually transmitted infections. *Curr Opin Mol Ther.* v. 12, n. 2, p. 192-202, 2010.

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

LAFON, M. Immune evasion, a critical strategy for rabies virus. *Dev Biol (Basel)*, v. 131, p. 413-419, 2008.

LAFON, M.; MÉGRET, F.; MEUTH, S.G.; SIMON, O.; VELANDIA ROMERO, M.L.; LAFAGE, M.; CHEN, L.; ALEXOPOULOU, L.; FLAVELL, R.A.; PREHAUD, C.; WIENDL, H. Detrimental contribution of the immuno-inhibitor B7-H1 to Rabies Virus encephalitis. *The Journal of Immunology*, v.180, p. 7506 -7515, 2008.

LAHAYE, X.,; VIDY, A.; POMIER, C.; OBIANG, L.; HARPER, F.; GAUDIN, Y.; BLONDEL, D. Functional characterization of Negri Bodies (NBs) in Rabies Virus-infected cells: Evidence that NBs are sites of viral transcription and replication. *J Virol*, v. 83, p. 7948-7958, 2009.

LAOTHAMATAS, J.; WACHARAPLUESADEE, S.; LUMLERTDACHE, B.; AMPAWONG, S.; TEPSUMETHANON, V.; SHUANGSHOTI, S.; PHUMESIN, P.; ASAVAPHATIBOON, S.; WORAPRUEKJARU, L.; AVIHINGSANON, Y.; ISRASENA, N.; LAFON, M. Furious and paralytic rabies of canine origin: Neuroimaging with virological and cytokine studies. *J Neurovirol*, v. 14, p. 119–129, 2008.

LEE, B.J.; MATSUNAGA, H.; IKUTA, K.; TOMONAGA, K. Ribavirin inhibits Borna disease virus proliferation and fatal neurological diseases in neonatally infected gerbils. *Antiviral Research*, v. 80, p. 380-384, 2008.

LEEKUMJORN, S.; SUM, A. K. Molecular study of the diffusional process of DMSO in double lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1758, p. 1751-1758, 2006.

LEYSEN, P.; CLERCG, E.D.; NEYTS, J. Molecular strategies to inhibit the replication of RNA viruses. *Antiviral Research*, v.78 , p. 9–25, 2008.

LOCKHART, B.P; TSIANG, T.; CECCALDI, P.E.; GUILMER, S. Ketamine-mediated inhibition of rabies virus infection in vitro and in rat brain. *Antiviral Chem. Chemother.* v. 2, p. 9-15, 1991.

LOCKHART, B.P; TORDO, N.; TSIANG, T. Inhibition of rabies virus transcription in rat cortical neurons with the dissociative anesthetic ketamine. *Antimicrob Agents Chemother.* v. 36, p. 1750-1755, 1992.

MAHDI, L. K.; OGUNNIYI, A.D.; LEMESSURIER, K.S.; PATON, J.C. Pneumococcal virulence gene expression and host cytokine profiles during pathogenesis of invasive disease. *Infection and Immunity.* v. 76, n. 2, p. 646-657, 2008.

MAIER, T.; SCHWARTING, A.; MAUER, D.; ROSS, R.S.; MARTENS, A, KLIEM, V.; WAHL, J.; PANNING, M.; BAUMGARTE, S.; MÜLLER, T.; PFEFFERLE, S.; SCHMIDT, J.; TENNER-RACZ, K.; RACZ, P.; SCHMID, M.; STRÜBER, M.; WOLTERS, B.; GOTTHARDT, D.; BITZ, F.; FRISCH, L.; PFEIFFER, N.; FICKENSCHER, H.; SAUER, P.; RUPPRECHT, C.E.; ROGGENDORF, M.; HAVERICH, A.; GALLE, P.; HOYER, J.; DROSTEN, C . Management and outcomes after multiple corneal and solid organ transplantation from a donor infected with rabies ribavirin. *Clin Infect Dis.* v. 50, p.1112-1119, 2010

MARQUETTE, C.; CECCALDI, P.E.; BAN, E.; WEBER, P.; TSIANG, H.; HAOOUR, F. Alteration of interleukin- α and interleukin-1 α binding sites in mouse brain during rabies infection. *Arch. Virol.*,v.141, p.573-585,1996.

MARTIN P.; JENSEN D.M. Ribavirin in the treatment of chronic hepatitis C. *Hepatology* , v. 23, p. 844-855, 2008.

MCKIMMIE, C.S.; JOHNSON, N.; FOOKS, A.R.; FAZAKERLEY, J.K. Viruses selectively upregulate Toll-like receptors in the central nervous system. *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, v. 336, p. 925-933, 2005.

MÉNAGER, P.; ROUX, P.; MÉGRET, F.; BOURGEOIS, J.P.; LE SOURD, A.M.; DANCKAERT, A.; LAFAGE, M.; PRÉHAUD, C.; LAFON, M. Toll-like receptor 3 (TLR3) plays a major role in the formation of rabies virus Negri Bodies. *PLoS Pathog.* v. 5, p. e1000315, 2009.

MOORE, S., HANLON, C. Rabies-Specific Antibodies: Measuring Surrogates of Protection against a Fatal Disease. *PLoS Neglected Trop Dis.* v. 4, p. e595, 2010.

MORENO, J.A.; BAUGHUM, S.D.; LEVY, H.B.; BAER, G.M. Further studies on rabies postexposure prophylaxis in mice: a comparison of vaccine with interferon and vaccine. *J Gen Virol*, v.42, p.219-22, 1979.

MORIMOTO, K.; HOOPER, D.C.; SPITSIN, S.; KOPROWSKI, H.; DIETZSCHOLD, B. Pathogenicity of different rabies virus variants inversely correlates with apoptosis and rabies virus glycoprotein expression in infected primary neuron cultures. *J. Virol.* v. 73, p. 510–518, 1999.

MUKHERJEE, S.; HANLEY, K.A. RNA interference modulates replication of dengue virus in *Drosophila melanogaster* cells Swati. *BMC Microbiology* . v. 10, n. 127, 2010.

NADIN-DAVIS, S.; FEHLNER-GARDINER, C. Lyssavirus-Current Trends. *Adv. Virus Res.* v.71:207-50, 2008

NAKAMICHI, K.; SAIKI, M.; SAWADA, M.; YAMAMURO, Y.; MORIMOTO, K.; KURANE, I. Double-stranded RNA stimulates chemokine expression in microglia through vacuolar pH-dependent activation of intracellular signaling pathways. *J. Neurochem.*, v.95, n. 1, p. 273-283, 2005.

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

NING, Q.; BROWN, D.; PARODO, J.; CATTRAL, M.; GORCZYNSKI, R.; COLE, E.; FUNG, L.; DING, J.W.; LIU, M.F.; ROTSTEIN, O.; PHILLIPS, M.J.; LEVY, G.; Ribavirin inhibits viral-induced macrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant fgl2 prothrombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response. *J. of Immunol.* v. 160, p. 3487-3493, 1998.

PAES, A. C. *Estudo da Potencialização da Ação Terapeutica da Isoniazida pelo Dimetil-Sulfóxido (DMSO) no Tratamento de Hamsters (Mesocricetus auratus) Experimentalmente Infectados com Mycobacterium bovis (Cepa AN5).* 1999. Dissertação (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PAPICH, M. G.; HEIT, M. C.; RIVIERE, J. E. Fármacos Antifúngicos e Antivirais. In: ADAMS, H. R. (8a Eds). *Farmacologia e Terapeutica em Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2003. p. 767-790.

PEPIN, M.; BLANCOU, J. Ammonium-5-Tungsto-2-Antimoniate (HPA23) can prevent fox rabies. *Archives Virology*, v.83, p.327-329, 1985.

PERRIN, P.; LAFON, M.; VERSMISSE, P.; SUREAU, P.; Application of an immunoenzyme method to the titration of neutralized rabies antibodies in cell culture. *J Biol Stand.* v. 13, n. 1, p. 35-42, 1985.

PHEHAUD, C.; MEGRET, F.; LAFAGE, M.; LAFON, M. Virus infection switches TLR-3 positive human neurons into high producers of interferon-beta. *J Virol*, v. 79, p. 12893-12904, 2005

RITA - INTERNATIONAL MEETING ON RABIES IN THE AMERICAS, 21, 2010, Guadalajara. *Electronic Abstracts – XXI RITA*. SENASICA, 2010. Disponível em: <<http://www.senasica.gob.mx/?id=2511&idioma=2>> Acesso em: 30 de outubro de 2010.

ROY, A.; HOOPER, D.C. Lethal Silver-Haired Bat Rabies Virus Infection Can Be Prevented by Opening the Blood-Brain Barrier. *J Virol*, v. 81, p. 7993–7998, 2007.

SANCHEZ-VARGAS, I.; TRAVANTY, E. A.; KEENE, K. M.; FRANZ, A. W.E.; BEATY, B.J.; BLAIR, C.D.; OLSON, K.E. RNA interference, arthropod-borne viruses, and mosquitoes. *Virus Research*, v. 102, p. 65–74, 2004.

SANTOS, N.C.; FIGUEIRA-COELHO, J.; MARTINS-SILVA, J.; SALDANHA, C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochemical Pharmacology*, v. 65, p.1035–1041, 2003.

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

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia de vigilância epidemiológica. 7. ed. Brasília. 2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/saude>>. Acesso em: 10 de Outubro de 2010.

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

SCULL, M.A.; RICE, C.M. A big role for small RNAs in influenza virus replication. *PNAS.* v. 107, n. 25, p. 11153–11154, 2010.

SHAH, N.R.; SUNDERLAND, A.; GRDZELISHVILI, V.Z. Cell type mediated resistance of Vesicular Stomatitis Virus and Sendai Virus to Ribavirin. *PLoS One.* v. 5, p. e11265, 2010.

SLATE, D. Future perspectives and research advances to the field of wildlife rabies. In: RITA - INTERNATIONAL MEETING ON RABIES IN THE AMERICAS, 21, 2010, Guadalajara. *Electronic Abstracts – XXI RITA.* SENASICA, 2010. Disponível em: <<http://www.senasica.gob.mx/?id=2511&idioma=2>> Acesso em: 30 de outubro de 2010.

SMITH, J.; YAGER, P.; BAER, G.M. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibodies. *Bull W.H.O.* v. 48, p. 535-541, 1973.

SOARES, R.M.; BERNARDES, F.; SAKAMOTO, S.M.; HEINEMANN, M.B.; CORTEZ, A.; ALVES, L.M.; MEYER, A.D.; HITO, F.; RICHTZENHAIN, L.J. A heminested polymerase chain reaction for the detection of Brazilian rabies isolates from vampire bats and herbivores. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* v. 97, p. 109-111, 2002.

SODJA, I. Experimental chemotherapy of rabies: Preliminary results. *Acta Virologica,* v.30, p.63-68, 1986.

SODJA, I.; HOLY, A. Effect of 9-(S)-(2, 3-Dihydroxypropyl) adenine on experimental rabies infection in laboratory mice. *Acta Virologica*, v.24, p.317-24, 1980.

SOOKOIAN, S.; CASTAÑO, G.; FLICHMAN, D.; CELLO, J. Effects of ribavirin on cytokine production of recall antigens and phytohemagglutinin-stimulated peripheral blood mononuclear cells. (Inhibitory effects of ribavirin on cytokine production). *Annals of Hepatology*, v. 3, p. 104-107, 2004.

SUPERTI, F.; SEGANTI, L.; PANÀ, A.; ORSI, N. Effect of amantadine on rhabdovirus infection. *Drugs Exp Clin Res.*; v. 11, n.1, p. 69-74, 1985.

TAKAHASHI, T.; HOSOYA, M.; KIMURA, K.; OHNO, K.; MORI, S.; TAKAHASHI, K.; SHIGETA, S. The cooperative effect of interferon- α and ribavirin on subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus infections, in vitro and in vivo. *Antiviral Research*, v. 37, p. 29-35, 1998.

TAM, R.C.; PAI, B.; BARD, J.; LIM, C.; AVERETT, D.R.; PHAN, U.; MILOVANOVIC, T. Ribavirin polarizes human T cell response toward a type 1 cytokine profile. *Journal of Hepatology*, v. 30, p. 376-382, 1999.

TOBIUME, M.; SATO, Y.; KATANO, H.; NAKAJIMA, N.; TANAKA, K.; NOGUCHI, A.; INOUE, S.; HASEGAWA, H.; IWASA, Y.; TANAKA, J.; HAYASHI, H.; YOSHIDA, S.; KURANE, I.; SATA, T. Rabies virus dissemination in neural tissues of autopsy cases due to rabies imported into Japan from the Philippines: Immunohistochemistry. *Pathology International*, v. 59, p. 555–566, 2009.

TOLTZIS, P.; HUANG, A. Effect of ribavirin on macromolecular synthesis in vesicular stomatitis virus-infected cells. *Antimicrob Agents Chemother.* v. 29, 1010-1016, 1986.

TOLTZIS, P.; O'CONNELL, K.; PATTERSON, J.L. Effect of phosphorylated ribavirin on vesicular stomatitis virus transcription. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 32, p. 492-497, 1988.

TRIMARCHI, C.V.; RUDD, R.D.; SAFFORD, M. JR. An in vitro neutralization test for rabies antibody. In: MESLIN, F-X; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. *Laboratory techniques in rabies* - WHO, 1996 - 4^a ed.

VENKATESH, G.; RAMANATHAN, S.; NAIR, N. K.; MANSOR, S. M.; SATTAR, M. A.; KHAN, A. H.; NAVARATNAM, V. Permeability of atenolol and propanolol in the presence of dimethyl sulfoxide in rat single-pass intestinal perfusion assay with liquid chromatography/UV detection. *Biomedical Chromatography*, v. 21, p. 484-490, 2007.

VOLLMER, J.; RANKIN, R.; HARTMANN, H.; JURK, M.; SAMULOWITZ, U.; WADER, T.; JANOSCH, A.; SCHETTER, C.; KRIEG, A.M. Immunopharmacology of CpG Oligodeoxynucleotides and Ribavirin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 48, p. 2314-2317, 2004.

WANG, Z.W.; SARMENTO, L.; WANG, Y.; LI, X.; DHINGRA, V.; TSEGGAI, T.; JIANG, B.; FU, Z. Attenuated rabies virus activates, while pathogenic rabies virus evades the host innate immune responses in the central nervous system. *J. Virol.*, v. 79, p. 12554-12565, 2005.

WANG, Y.; CAO, Y.L.; YANG, F.; ZHANG, Y.; WANG, S.H.; LIU, L. Small interfering RNA effectively inhibits the expression of SARS coronavirus membrane gene at two novel targeting sites. *Molecules*. v. 15, n. 10, p. 7197-7207, 2010.

WARRELL, M. J.; WHITE, N. J.; LOOAREESUWAN, S.; PHILLIPS, R. E.; SUNTHARASAMAI, P.; CHANTHAVANICH, P.; RIGANTI, M.; FISHER-HOCH, S. P.; NICHOLSON, K. G.; MANATSATHIT, S.;

VANNAPHAN, S.; WARRELL, D. A. Failure of interferon alfa and tribavirin in rabies encephalitis. *British Medical Journal*, v. 299, n. 6703, p. 830-833, 1989.

WEISMAN, L.E. Respiratory syncytial virus (RSV) prevention and treatment: past, present, and future. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, v. 7, p. 223-233, 2009.

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

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION – *Technical Report Series* – Expert Committee on rabies – 8th report, Geneve, 1992.

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

WILLOUGHBY, R.; TIEVES, K.S.; HOFFMAN, G.M.; GHANAYEM, N.S.; AMLIE-LEFOND, C.M.; SCHWABE, M.J. Survival after treatment of rabies with induction of coma. *New England J. Med*, v.352, p.2508-2514, 2005.

WILLOUGHBY, R. Cytokine/chemokine kinetics in cerebrospinal fluid during treatment of human rabies. In: RITA - INTERNATIONAL MEETING ON RABIES IN THE AMERICAS, 21, 2010, Guadalajara. *Electronic Abstracts* – XXI RITA. SENASICA, 2010. Disponível em: <<http://www.senasica.gob.mx/?id=2511&idioma=2>> Acesso em: 30 de outubro de 2010.

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

WUNNER, W.H.; BRIGGS, D.J. Rabies in the 21st Century. *PLoS Negl. Trop. Dis.* v. 4, n. 3, p. e591, 2010.

ZALAN, E.; WILSON, C.; PUKITIS, D.; A microtest for the quantitation of rabies virus neutralizing antibodies. *J Biol Stand.* v. 7, n. 3, p. 213-220, 1979.

ZHANG, Y.; JAMALUDDIN, M.; WANG, S.; TIAN, B.; GAROFALO, R.; CASOLA, A.; BRAISIER, A.R. Ribavirin treatment up-regulates antiviral gene expression via the Interferon-Stimulated Response Element in Respiratory Syncytial virus-infected epithelial cells. *Journal of Virology*, v. 77, p. 5933-5947, 2003.

ZHENG, X.; SUZUKI, M.; ICHIM, T. E.; ZHANG, X.; SUN, H.; ZHU, F.; SHUNNAR, A.; GARCIA, B.; INMAN, R.D.; MIN, W. Treatment of Autoimmune Arthritis Using RNA Interference-Modulated Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*. v. 184, n. 11, p. 6457-6464, 2010.

ARTIGO

Artigo enviado para Journal of NeuroVirology.

Normas para Publicação

Instructions to Authors submitting manuscript to the Journal of NeuroVirology

Scope

The Journal of NeuroVirology (JNV) provides a unique platform for the publication of high-quality basic science and clinical studies on the molecular biology and pathogenesis of viral infections of the nervous system, and for reporting on the development of novel therapeutic strategies using neurotropic viral vectors. The Journal publishes original research articles, reviews, case reports, coverage of various scientific meetings, along with supplements and special issues on selected subjects.

The Journal is currently accepting submissions of original work from the following basic and clinical research areas: Aging & Neurodegeneration, Apoptosis, CNS Signal Transduction, Emerging CNS Infections, Molecular Virology, Neural-Immune Interaction, Novel Diagnostics, Novel Therapeutics, Stem Cell Biology, Transmissible Encephalopathies/Prion, Vaccine Development, Viral Genomics, Viral Neurooncology, Viral neurochemistry, Viral Neuroimmunology, Viral Neuropharmacology

Submission of Manuscripts

All manuscripts should be submitted to the Journal of NeuroVirology via the Journal's online web-based Scholar One Manuscript Central submission system at the following link:
<http://mc.manuscriptcentral.com/jneurovirol>

Authors are urged to submit manuscripts as MS Word or Adobe PDF files. Authors are responsible for verifying all files have uploaded correctly. Authors are responsible for obtaining permission to reproduce copyrighted material from other sources and must sign an agreement for transfer of copyright to the publisher upon acceptance. All accepted manuscripts, artwork, and photographs become property of the publisher.

Authors may log on or create an account by providing the corresponding author's complete address, telephone number, fax number, and email address. To expedite the review process, authors may recommend 3 to 5 reviewers. Please provide the name, address, telephone number, fax number, email address, and area of expertise for each. Note that recommended reviewers will be used at the discretion of the editor. Acknowledgment of receipt of the manuscript by the editorial office will be sent to the corresponding author, including an assigned manuscript number that should be included in all subsequent correspondence. Revised manuscripts should be submitted via Scholar One Manuscript Central's Author Center to ensure that they are linked to the original submission.

Important notes regarding electronic submission of manuscripts

All manuscripts should be submitted via the Scholar One Manuscript Central online submission system at the following link:
<http://mc.manuscriptcentral.com/jneurovirol>.

Note that uploading of higher resolution images may take significantly longer, therefore authors are strongly encouraged to submit lower resolution images during the review process to streamline uploading. We recommend submitting one or more pdf documents which contain all text, tables and figures during initial review. Upon resubmission and acceptance, authors will be able to submit publication quality high resolution images as needed.

Note that Scholar One Manuscript Central will automatically assign page a running head and footer, as well as page numbers and line numbers to your manuscript. Best online viewing results for authors and reviewers will be obtained with original files that DO NOT contain page numbers, line numbers, or any information in the manuscript header or footer.

Contact the JNV Editorial Office for assistance if you have any difficulty with submitting your manuscript online. For the fastest response to your questions, please email us at jnv@jneurovirol.com.

Editorial Policy

All contributions should be submitted via Scholar One Manuscript Central. All general correspondence regarding editorial matters should be addressed to the Editor-in-Chief and sent to the editorial office at the following address:

Kamel Khalili, Ph.D., Editor-in-Chief
Journal of NeuroVirology
Department of Neuroscience
Center for Neurovirology
Temple University School of Medicine
Bio-Life Sciences Building, MS 015-96
1900 North 12th Street, Room 203

Philadelphia, PA 19122, USA

Tel: (215) 204-0680 Fax: (215) 204-0681

Email: jnv@jneurovirol.com

www.jneurovirol.com

Manuscripts submitted to the Journal must represent reports of original research. Members of the Editorial Board or others of similar standing in the field will provide anonymous reviews of submitted manuscripts. Authors will be notified of acceptance, rejection, or need for revision within six weeks or less. When a manuscript is returned to the corresponding author for revision, it should be returned to the editors within 2 months, otherwise it will be considered withdrawn. By publishing a paper in the Journal of NeuroVirology, authors agree to make freely available to colleagues in academic research any plasmids, viruses, antibodies, nucleic acids, and living materials such as microbial strains and cell lines, eg, used in the research reported and that are not available from commercial suppliers.

Preparation of Manuscripts

All manuscripts should be in English. Figures should not be included within the main text document. Tables may be submitted as part of the main text documents or may be uploaded as separate text documents. See "Important notes regarding electronic submission of manuscripts" above for more details.

The title should be brief and contain no abbreviations. Include author(s)' full name and address. A corresponding author should be indicated with telephone, fax, and email address provided. Please provide a running title of not more than 50 characters, along with 3 to 6 keywords. Terms not contained within the title are preferred.

Abstracts should be 1 paragraph, not exceeding 250 words. Please avoid abbreviations/reference citations. The Introduction should assume the reader is knowledgeable in the field and should, therefore, be brief, not exceeding 1500 words.

References

Authors will be responsible for the accuracy of references. In the text, cite references by name and date. No more than 2 authors may be cited per reference in the narrative; if there are more than 2 authors, use 'et al'. The reference page must list all contributing authors per citation. Please use the following style:

Journal

Lipton, HL, Dal Canto, MC (1976). Theiler's virus-induced demyelination: Prevention by immunosuppression. *Science*, 192, 62–64.

Book

Griffin, DE (1998). HIV infection of the brain: Viruses, cytokines, and immune regulatory factors associated with dementia. In *The Neurology of AIDS*. Gendelman, HE, Lipton, SA, Epstein, L, and Swindells, S (eds). Chapman & Hall: New York, pp. 73–85. Roos, R. (1992) *Molecular Neurovirology*. Humana Press: New Jersey.

Illustrations

See “Important notes regarding electronic submission of manuscripts” above for information on online submission to streamline the review process. Illustrations for revised and accepted manuscripts should be submitted as high resolution digital files. These guidelines must be followed when submitting high quality digital files for revised and accepted manuscripts:

- * 300 dpi or higher, sized to fit on the journal page
- * .PDF, .JPEG, or .GIF format only
- * submitted as separate files, not embedded in text files

Color illustrations will be considered for publication; however, the author will be required to bear the full cost involved in their printing and publication. The charge for the first page with color is \$900.00. The next three pages with color are \$450.00 each. A custom quote will be provided for color art totaling more than 4 journal pages. Digital files should be provided at high resolution when in their final size. The publisher has the right to refuse publication of color digital files which are of unsuitable quality.

Tables

A short descriptive title should appear above each table with a clear legend and any footnotes below. All units must be included.

Nucleotide Sequences

It is expected that GenBank/EMBL accession numbers for primary nucleotide and/or amino acid sequence data will be included in the original manuscript or be inserted upon revision. The accession number should be included as a separate paragraph at the end of the Materials and Methods sections.

Abbreviations

These should be defined in parentheses after their first mention in the text, except for the use of accepted abbreviation, such as SI symbols, which need not be defined. Use generic names when referring to drugs; trade names may be given in parentheses at first mention.

Proofs

Manuscripts will be scheduled for online publication upon receipt of proofs. Proofs must be checked immediately for typographical errors and returned to the publisher. Extensive changes will result in publication delay. Important new information that has become available between acceptance of the manuscript and receipt of the proofs may be inserted as Addendum in proof only with the permission of the editor. To speed publication time, accepted manuscripts will be indexed and published when final typeset and corrected proofs are available and therefore may be published prior to appearing in print. Manuscripts will appear in the print version of the Journal in the next available issue, normally within 2 to 4 months after acceptance. Manuscript drafts will not be published ahead of print, only final typeset and corrected proofs identical to that appearing in print will be published online.

Offprints/Page Charges

An offprint order form and a bill for page charges will accompany the proofs. It is anticipated that page charges will be paid by authors whose research was supported by special funds, grants, or contracts (departmental, governmental, institutional, etc.), or whose research was done as part of their official duties.

Short Communications are submitted and reviewed in the same way as full-length articles. The Short Communication format is intended for the presentation of observations that do not warrant full-length papers. Abstracts should be under 100 words and text should be brief.

Case Reports should highlight novel or interesting features of virological diseases affecting the nervous system, be less than 1000 words in

length, have 15 references or fewer, and contain no more than 3 figures or tables.

Mini-reviews are brief summaries of not more than 4 single-sided printed pages of developments in fast-moving areas within the scope of JNV that are based on published articles. Mini-reviews may be either solicited or proffered by authors responding to a recognized need and are subject to editorial review.

Letters to the Editor should not be more than 500 words and must include data to support the writer's argument and are intended only for comments on articles published previously in the journal. If the editor believes that publication of the letter is warranted, a reply from the corresponding author of the article.

“Post-exposure treatment with ribavirin does not provide benefit in experimental Rabies in mice.”

Camila Michele Appolinário*\$, Christophe Prehaud** £, Susan Dora Allendorf*,
João Marcelo Azevedo de Paula Antunes*, Marina Gea Peres*, Monique Lafon**
£, Jane Megid*§

*College of Veterinary Medicine and Animal Production- Department of
Veterinary Hygiene and Public Health - Distrito de Rubião Jr. s/no – Botucatu-
São Paulo- Brazil- 18.618-970

\$ on two months leave in Unité de Neuroimmunologie Virale, Institut Pasteur
Paris France

** Institut Pasteur- Unité de Neuroimmunologie Virale, Département de
Virologie, F-75015 Paris, France

£ CNRS, URA3015, F-75015 Paris, France

§ corresponding author : Pr Jane Megid

Running title : Ribavirin antiviral effect in rabies infection

Key words : ribavirin, rabies virus, human neuroblastoma, chemokine, cytokine

Acknowledgments / Damien Chopy is fully acknowledged for his help in RT Q
PCR. We thank the Center of Zoonosis Control (SP) people who give the dog
virus strain; This research was supported by the grants of FAPESP and CNPq
and Camilla 's fellowship from CAPES

Abstract

The nucleosid analog (1-d-ribofuranosyl-1,2,4-triaole-3-carboxamide) ribavirin, is one of the antiviral drug recommended in the management of rabies in human. Nevertheless its efficacy has not been formally proven yet.

In the present work, ribavirin effect on rabies virus multiplication was evaluated *in vitro* in a fibroblast cell line (BSR-T7) and in human neuroblastoma SK-N-SH infected with a Challenge Virus Standard (CVS) rabies virus strain and also *in vivo* in an experimental rabies post-exposure treatment in C57BL6 mice inoculated with a rabies virus strain originated from a rabid dog in Brazil.

In vitro, ribavirin (1mM) showed a significant antiviral effect which was observed in both fibroblast and neuroblastoma cell lines. The Ribavirin effect affected different steps of the RABV viral cycle in human neuroblastoma and in hamster fibroblasts. In vivo, when orally given, ribavirin triggers a transient innate immune response in the brain. Nevertheless, when RABV infected mice where orally treated with ribavirin in a post exposure protocol (7mM at day 1, 2 and 3 post virus injection) mice did not show any benefit in survival. These results suggest that despite significant effects of ribavirin on rabies virus multiplication *in vitro* and on boosting brain local immune response there is no evidence that post exposure orally given ribavirin treatment provides any benefit against rabies.

INTRODUCTION

Ribavirin (1-d-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) is a non toxic nucleosid analog with a broad-spectrum antiviral activity which is formally approved to treat Hepatitis C virus in association with pegylated interferon (Martin and Jenssen, 2008, Ferenci et al, 2001), influenza virus (Gilbert and Knight, 1986) and severe Respiratory Syncytial Virus infections (Weisman, 2009, Empey et al, 2010) This drug has also been used in empirical treatment of patients infected with Lassa fever, hantavirus, SARS-associated coronavirus, herpes virus infection (Gracie and Cameron, 2008) Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (Ergonul, 2008) and rabies virus (RABV) (Warrell et al, 1989, Willoughby et al, 2005, Jackson et al, 2003, Maier et al, 2010).

In cell culture, Ribavirin has been demonstrated to inhibit transcription and capping of several viruses such as vesicular stomatitis virus (Toltzis et al, 1988, 1986, Shah et al, 2010) or Borna disease virus (Jordan 1999) and to cause lethal mutagenesis of viral genome (Cameron and Castro, 2001).

The antiviral activity of ribavirin seems to rely not only on its capacity to alter virus multiplication but also to its property to control the host immune response itself (Tam et al. 1999; Vollmer et al., 2004). Nevertheless, both positive and negative effects have been reported. Ribavirin was found to increase the production of IL2, IFN-gamma and TNF-alpha by T cells (Sookoian et al, 2004) and to potentiate virus-induced ISRE signaling to enhance the expression of antiviral ISGs in epithelial cells infected with respiratory syncytial virus (Zhang et al. 2003). In contrast, this drug was also found to inhibit CC chemokines (CCL3/CCL4) and IFN production and to decrease the number of microglial cells in the brain of gerbils after intracerebral inoculation of Borna disease virus (Lee et al. 2008).

RABV is a neurotropic virus causing fatal encephalitis. This virus has selected exquisitely sophisticated strategies to escape the host immune response. RABV not only kills the protective T cells migrating into the infected nervous system by triggering the neural expression of immunosubversive molecules such as B7-H1, FasL or HLA-G (Lafon et al, B7-H1 2008, Baloul et al, 2003, Lafon et al, 2005

and Lafon 2008), this virus also seems to minimize the inflammation in the nervous tissues it infects. The more pathogenic the virus strain is, the less acute is the inflammatory response (Baloul & Lafon, Biochimie 2003; Wang et al, 2005) (Hicks et al, 2009, Laothamatas et al, 2008). Neuroinflammation is rarely observed in rabies autopsy cases (Tobium et al, 2009). Dogs infected with paralytic strain of RABV showed longer period of illness and more intense nuclear magnetic resonance (NMR) signals than dogs infected with strains causing furious rabies and in the meantime, the pattern of cytokines and chemokines mRNAs expression was larger in paralytic than in furious rabies (Laothamatas, et al, 2008). Mice immunization with a proinflammatory myelin protein (MBP) prior to RABV infection improved the survival to a challenge with a silver haired bat RABV strain (SHBRV) and conversely a treatment with a steroid hormone decreasing brain inflammation, increased the virus death rate (Roy et al, 2007). In the same line, the overexpression of TNF-alpha (a pro-inflammatory cytokine) by a recombinant virus attenuates replication by inducing strong T cell infiltration and microglial activation (Faber et al, 2005). These two last examples illustrate that increasing the inflammatory response may be beneficial for rabies survival.

The fact that ribavirin has been described as an antiviral drug for the vesicular stomatitis virus, a rhabdovirus closely related to RABV, and that ribavirin could have pro-inflammatory properties, a function which might be protective against rabies, urges us to analyse the effect of ribavirin in RABV infection. In this purpose, we studied 1) whether Ribavirin functions as antiviral in RABV-infected fibroblast and neuroblastoma cells, 2) whether ribavirin stimulates the brain innate immune response by measuring *OAS-1*, *CCL-2*, *TNF-alpha*, *IL-6* and *IFN-beta* mRNAs expression by Real Time PCR, and finally 3) whether ribavirin given orally is beneficial in an experimental mouse rabies model.

Antiviral effect of ribavirin treatment in RABV-infected cell cultures

At first, the effect of ribavirin on RABV infection was analyzed *in vitro* using BSR-T7, a fibroblast cells derived from BHK-21 (Buchholz al, 1999) which is a ribavirin sensitive cell (Shah et al. 2010), and SK-N-SH, a human neuroblastoma

cell line, (ATCC, HTB-11). Cells were cultivated in 6 well-culture plates and treated with 1mM of ribavirin diluted in sterile water 24h before viral infection. CVS (Challenge Virus Strain, ATCC vr959) was used to infect cells with a multiplicity of infection (moi) of 3 or 0.1. Infection was carried out in ribavirin free medium. Two hours after infection, cells were washed to remove unbound virus particles and cells were re-fed with medium supplemented with Ribavirin. There was no sign of cell toxicity in the ribavirin-treated cells. Cell culture supernatants were collected 24h and 48h post-infection and assayed for RABV titration as described (Faul et al, 2010). As shown in Table 1, on the contrary to non-treated cultures, supernatants of ribavirin-treated cells, even those collected 48h after infection, did not trigger cell infection in the titration assays, suggesting that ribavirin has an antiviral effect.

The antiviral effect of ribavirin is cell type dependent

The antiviral effect may result from two mechanisms: 1) Ribavirin treated cells are resistant to infection or 2) Ribavirin-treated cells block the production of infectious virions. To analyze how ribavirin controls RABV infection in cells, detection of RABV proteins and presence of sites of replication (Negri Bodies, NBs) (Menager et al, 2009, Lahaye et al, 2009) were analyzed by immunocytochemistry using antibodies directed against the RABV nucleocapsid (NC) a component of NB. Cells were either RABV-infected (moi 3 or 0.1) or mock-infected and treated or not treated with ribavirin. Initially, a moi of 3 was chosen in order to achieve more than 90% of infection in the control cells (i.e. not treated with ribavirin). A moi of 0.1 was tested in order to visualize the infection after a virus cycle was completed (RABV viral cycle duration is 20h-24h in these cell lines). Forty-eight hours or 24h later, RABV-infected and mock-infected cells were washed once with PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$, fixed with 4% PFA for 20 min at room temperature (RT) and washed again. The samples were then incubated for 20 min at RT in 0.3% Triton X-100-PBS; surface IgG receptors were blocked with a saturating buffer (ST) (2% bovine serum albumin and 5% FBS in PBS) for 30 min at RT. Slides were incubated 30 min at 4°C with FITC conjugated anti RABV NC rabbit Ab (Biorad, ref 357-2114, Garches, France) diluted in ST. Nuclei were stained with Hoechst 33342. Slides were washed with PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$, using water

for the last wash. Coverslips were mounted in Fluoromount-G™ and analyzed under UV illumination with Leica Microscope DM 5000B coupled with MIC CTR 5000 Camera and Software FW4000I.

As shown in Fig 1A, after an infection with a moi of 3 or 0.1 a ribavirin treatment drastically decreases the formation of NBs (green dots seen in the cytoplasm of infected non treated cells) in the fibroblast cell line. An identical result is obtained with an moi of 3 (data not shown). On the contrary, at a moi of 3, the human neuroblastoma cells exhibited infection even though most of the infected cells showed smaller NBs in the ribavirin treated cells as compared to the non-treated. At a moi of 0.1, only 10 % of the SK-N-SH exhibited NBs, and the neighbouring cells were not infected (NBs were not detected).

Altogether, these results indicated that in fibroblast cells, a ribavirin treatment renders the cells refractory to RABV infection. This does not occur in human neuroblastoma cells, which remain permissive to RABV infection but which do not produce infectious virions.

In order to investigate whether the ribavirin effect in SK-N-SH could be linked to a disabled viral transcription/replication, RABV N transcripts were measured in moi 3 infected cells treated or not with Ribavirin by real time RT-Q-PCR following the procedures described by Prehaud et al (2005). As shown on Fig 1B, the level of RABV N transcripts dropped dramatically (>X2000) in the ribavirin-treated cells. This result and the fact that the NBs are smaller in the ribavirin-treated human neuroblastoma cells, are in agreement with the idea that RABV transcription/replication is impaired by ribavirin.

To precisely compare the percentages of infected cells and the amount of NC that accumulates in the cytoplasm of infected cells (moi 0.1) after a ribavirin treatment or without treatment, cell cultures stained with a NC specific Ab were analysed by flow cytometry (Fig 1 C).

Samples were prepared as follows : 24h-RABV-infected cells were washed once with phosphate-buffered saline (PBS) containing $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ (PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$), scraped and pelleted in staining buffer (SB) (PBS, 1% inactivated foetal bovine serum (FBS), 0.1% sodium azide, pH 7.5). Cells were fixed in 4%

paraformaldehyde (PFA)/PBS for 20 min at 4°C, and resuspended in permeabilisation buffer (PB) (PBS, 1% FCS, 0.1% sodium azide, 0.1% saponin). Cells were then incubated with FITC-conjugated anti NC Ab (Biorad) for 2h at 37°C. Cells were then washed with PB and resuspended in CellFIX™ (BD Biosciences, USA) for flow cytometry analysis to determine the percentages of infected cells and the accumulation of RABV NC. The accumulation of NC was measured by the mean fluorescence of FITC-conjugated anti-NC in the culture. Mean fluorescence of the ribavirin-treated cultures was expressed as a percentage of the mean fluorescence obtained in non-treated cells (results are given in arbitrary units). As shown in Fig 1C, both the percentage of the infected cells and the accumulation of viral NC were severely decreased in ribavirin-treated BSRT7 and SK-N-SH infected cells. As previously observed by UV microscopy, a low percentage (15%) of infected cells was still seen detected in ribavirin-treated SK-N-SH and low NC accumulation can still be observed (less than 10 arbitrary units), whereas none were detected in BSR-T7 cells, suggesting that RABV-infected SK-N-SH were less susceptible to the anti viral effect of ribavirin than RABV- infected BSR7-T7 cells.

In summary, human neuroblastoma which are representative of the RABV host cell type are still sensitive to infection under ribavirin treatment, they still allow a slight but highly disabled viral transcription/replication to occur but they do not release infectious virus particles.

Orally given ribavirin triggers a transient innate immune response in the brain

Twenty-four C57BL6 S.P.F females mice, 4 week-old were either treated with ribavirin (7mM of Ribavirin in 0.2ml of water given orally at day 1, 2 and 3) or inoculated with sterile water in order to evaluate putative ribavirin side effects and Ribavirin action on the host innate immune response in the brain. Mice were sacrificed day 5 and 10 post inoculation of water or Ribavirin. Brains were collected and stored at -80°C for real-time RT-PCR experiments. RNA from brain tissues was extracted using Invitex® kit and stored at -80°C. Reaction for cDNA synthesis consists in 1µg of extracted RNA, 1µl of Oligo-DT primer (Invitrogen®) and 1µl of SuperScript II (Invitrogen®), according to manufacturer's

instructions. Real-time PCR reaction was performed with 2µL of 1/50 diluted cDNA, 1µL of 0.1 µg of each primers and Syber Green (Promega®) in a final volume of 25µL according manufacturer's instruction. Primers for mouse genes (*OAS-1*, *CCL-2*, *IL-6*, *IFN-beta* and *TNF-alpha*) were supplied by Qiagen®.

In ribavirin-treated mice, no obvious toxic effects such as weight lost or alterations in the animal behavior were observed.

Five days after the start of the ribavirin treatment (three doses at day 1, 2 and 3) a significant innate immune response in the brain with an increase of the mRNAs of the antiviral *OAS1* gene, chemokine *CCL2*, inflammatory cytokines *IL6* and *TNF-alpha* and an increase of mRNAs of *IFN-beta* was observed. The ribavirin-mediated stimulation of innate immune gene response in brain has vanished by day 10 after the start of the drug treatment. These results indicate that ribavirin can stimulate the brain innate immune response three days after the end of the treatment. Nevertheless, the drug effect on the brain innate immune is not a long lasting effect since the brain innate immune response has returned to the non-treated basal level seven days after the end of treatment.

RABV-infected mice treated with ribavirin did not show any increase in the survival rate

Twenty-four C57BL6 S.P.F females mice, 4-week-old were inoculated with street RABV variant 2 originated from dog in Brazil (sequence with 98% of homology to AB263342.1 gene bank access number) kindly provided by the Zoonosis Center Control of Sao Paulo, in a dose of 0,04mL ($DL_{50} 10^{-3,39}$) in the right limb. After inoculation, one group was left untreated and the second group was treated orally with Ribavirin 24h, 48h and 72 h after the inoculation, with 0.2 mL of ribavirin (7mM) diluted in sterile water. Eight mice from each group were sacrificed 5 and 10 days post-virus injection and eight mice were maintained for 30 days for evaluation of clinical signs and mortality. Brains were collected and stored at -80°C, for further real-time RT-PCR experiments, which were performed as above. Primers for RABV N-gene were manufactured according to Soares et al (2002)

In RABV infected and treated animals, higher percentage of lethality was observed compared to the non-treated group (Fig3A), although statistical

significance was not reached indicating that Ribavirin treatment was not protective (Mantel-Cox test; Chi square=2,847 and p value= 0,0916) Infected and ribavirin-treated mice showed more severe clinical signs, but not statistically significant ($p>0.05$) than infected mice non-treated with ribavirin (Fig3B). RABV N-gene expression was measured by Real-Time PCR in day 10 infected mice of the two groups. No difference was seen between the two groups (data not shown).

The samples positive for RABV N protein identified by real time RT PCR and samples from non-inoculated and ribavirin-treated mice were assayed for mRNAs of *OAS-1*, *CCL-2*, *IL-6*, *IFN-beta* and *TNF-alpha*. Virus-inoculated and ribavirin-treated mice at day 10 showed no difference in the gene expression of innate immune response compared to the only inoculated animals (Fig3C).

Conclusion

In conclusion, our study demonstrated that despite activation of an innate immune response in the brain and an antiviral effect in vitro in neuronal cultures, an orally given ribavirin treatment in rabies inoculated mice did not improve survival rate.

We observed that stimulation of inflammatory reaction (TNF, IL6) chemoattractive stimulation (CCL2) and antiviral genes (IFN-beta and OAS1) were transient and vanished at day 10. This may suggest that ribavirin treatment could have been given a second time at day 5 in order to provide a sustained inflammatory antiviral and chemoattractive reaction in the infected brain. In addition, our experiments indicated that neuroblastoma cells were more resistant to ribavirin treatment than fibroblast. This may suggest that ribavirin doses recommended to treat disease in the periphery (liver or lungs) might be increased in the case of a viral infection targeting neuronal cells. This may indicate also that, in case of rabid patients, giving ribavirin orally or by perfusion may not be optimal. It has to be remembered that ribavirin has not been shown to pass the blood brain barrier very efficiently and in a Borna virus model ribavirin is an efficient antiviral when administered intracranially (Solbrig, et al, 2002; Willoughby. et al, 2005).

All together, these data argue for the need of further studies in order to validate and/or improve the ribavirin protocol in rabies.

References

Baloul, L, Lafon, M (2003). Apoptosis and rabies virus neuroinvasion. *Biochimie*, 85, 777-788.

Buchholz, UJ, Finke, S, Conzelmann, KK (1999). Generation of Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol*, 1, 251–259.

Cameron, C.E; Castro C. (2001) The mechanism of action of ribavirin: lethal mutagenesis of RNA virus genomes mediated by the viral RNA-dependent RNA polymerase. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 14, 757-764.

Empey KM, Peebles RS Jr, Kolls JK (2010). Pharmacologic advances in the treatment and prevention of respiratory syncytial virus. *Clin Infect Dis*, 50, 1258-1267.

Ergonul, O. (2008) Treatment of Crimean-Congo hemorrhagic fever., *Antiviral Research*, 78, 125-131.

Faber, M, Bette, M, Preuss, MAR, Pulmanusahakul, R, Rehnelt, J, Schnell, MJ, Dietzschold, B, Weihe, E (2005). Overexpression of Tumor Necrosis Factor Alpha by a Recombinant Rabies Virus Attenuates Replication in Neurons and Prevents Lethal Infection in Mice. *J Virol*, 79, 15405-15416.

Faul EJ, Wanjalla CN, Suthar MS, Gale M, Wirblich C, Schnell MJ.(2010) Rabies virus infection induces type I interferon production in an IPS-1 dependent manner while dendritic cell activation relies on IFNAR signaling. *PLoS Pathog*, 6, e1001016

Ferenci, P, Brunner, H, Nachbaur, K, Datz, C, Gschwantler, M, Hofer, H, Stauber, S, Hackl, F, Jessner, W, Rosenbeiger, M, Munda-Steindl, P, Hegenbarth, K, Gangl, A, Vogel, W (2001)Combination of interferon induction therapy and ribavirin in chronic hepatitis C. *Hepatology*, 34, 1006–1011.

Gilbert, BE, Knight, V (1986). Biochemistry and clinical applications of ribavirin. *Antimicrobialagents and Chemotherapy*, 3,201-205.

Graci, J, Cameron, C (2008). Therapeutically targeting RNA viruses via letal mutagenesis. *Future Virol*, 3, 553-566.

Hicks, DJ, Nuñez, A, Healy, DM, Brookes, SM, Johnson, N, Fooks, AR (2009). Comparative pathological study of the murine brain after experimental infection with classical rabies virus and European bat lyssaviruses. *J Comp Pathol*, 140, 113-126.

Jackson, A (2003). Rabies virus infection: An update. *J Neurovirol*, 9, 253–258.

Jordan, I, Briesse, T, Averret, DR, Lipkin, WI (1999). Inhibition of Borna disease virus replication by ribavirin, *Journal of Virology*. 73, 7903- 7906.

Lafon, M, Mégret, F, Meuth, SG, Simon, O, Velandia Romero, ML, Lafage, M, Chen, L, Alexopoulou, L, Flavell, RA, Prehaud, C and Wiendl, H (2008). Detrimental contribution of the immuno-inhibitor B7-H1 to Rabies Virus encephalitis. *The Journal of Immunology*, 180, 7506 -7515

Lafon, M. (2005), Rabies virus receptors. *J Neurovirol* 11: 82-87

Lafon, M (2008). Immune evasion, a critical strategy for rabies virus. *Dev Biol (Basel)*, 131, 413-419.

Lahaye, X, Vidy, A, Pomier, C, Obiang, L, Harper, F, Gaudin, Y, Blondel, D (2009). Functional characterization of Negri Bodies (NBs) in Rabies Virus-infected cells: Evidence that NBs are sites of viral transcription and replication. *J Virol*, 83, 7948-7958.

Laothamatas, J, Wacharapluesadee, S, Lumlertdache, B, Ampawong, S, Tepsumethanon, V, Shuangshoti, S, Phumesin, P, Asavaphatiboon, S, Woraprukjaru, L, Avihingsanon, Y, Israsena, N, Lafon, M (2008). Furious and paralytic rabies of canine origin: Neuroimaging with virological and cytokine studies. *J Neurovirol*, 14, 119–129.

Lee, BJ, Matsunaga, H, Ikuta, K, Tomonaga, K (2008). Ribavirin inhibits Borna disease virus proliferation and fatal neurological diseases in neonatally infected gerbils. *Antiviral Research*, 80, 380-384.

Maier T, Schwarting A, Mauer D, Ross RS, Martens A, Kliem V, Wahl J, Panning M, Baumgarte S, Müller T, Pfefferle S, Ebel H, Schmidt J, Tenner-Racz K, Racz P, Schmid M, Strüber M, Wolters B, Gotthardt D, Bitz F, Frisch L, Pfeiffer N, Fickenscher H, Sauer P, Rupprecht CE, Roggendorf M, Haverich A, Galle P, Hoyer J, Drosten C (2010). Management and outcomes after multiple corneal and solid organ transplantation from a donor infected with rabies ribavirin. *Clin Infect Dis*. 50, 1112-1119.

Martin P, Jensen DM (2008). Ribavirin in the treatment of chronic hepatitis C. *Hepatology*, 23, 844-855.

Ménager P, Roux P, Mégret F, Bourgeois JP, Le Sourd AM, Danckaert A, Lafage M, Préhaud C, Lafon M (2009). Toll-like receptor 3 (TLR3) plays a major role in the formation of rabies virus Negri Bodies. *PLoS Pathog*. 5, e1000315

Phehaud, C, Megret, F, Lafage, M, Lafon, M (2005). Virus infection switches TLR-3 positive human neurons into high producers of interferon-beta. *J Virol*, 79, 12893-904

Roy, A, Hooper, DC (2007). Lethal Silver-Haired Bat Rabies Virus Infection Can Be Prevented by Opening the Blood-Brain Barrier. *J Virol*, 81, 7993–7998.

Shah, NR, Sunderland, A, Grdzlishvili, VZ (2010). Cell type mediated resistance of Vesicular Stomatitis Virus and Sendai Virus to Ribavirin. *PlosOne*. 5, e11265.

Soares, RM, Bernardes, F, Sakamoto, SM, Heinemann, MB, Cortez, A, Alves, LM, Meyer, AD, Hito, F, Richtzenhain, LJ (2002). A heminested polymerase chain reaction for the detection of Brazilian rabies isolates from vampire bats and herbivores. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97, 109-111.

Sookoian, S, Castaño, G, Flichman, D, Cello, J (2004). Effects of ribavirin on cytokine production of recall antigens and phytohemagglutinin-stimulated peripheral blood mononuclear cells. (Inhibitory effects of ribavirin on cytokine production). *Annals of Hepatology* 3, 104-107.

Tam, RC, Pai, B, Bard, J, Lim, C, Averett, DR, Phan, U, Milovanovic, T (1999). Ribavirin polarizes human T cell response toward a type 1 cytokine profile. *Journal of Hepatology*, 30, 376-382.

Tobiume, M, Sato, Y, Katano, H, Nakajima, N, Tanaka, K, Noguchi, A, Inoue, S, Hasegawa, H, Iwasa, Y, Tanaka, J, Hayashi, H, Yoshida, S, Kurane, I, Sata, T (2009). Rabies virus dissemination in neural tissues of autopsy cases due to rabies imported into Japan from the Philippines: Immunohistochemistry. *Pathology International*, 59, 1555–566,

Toltziz, P, O'Connell, K, Patterson, JL (1988). Effect of phosphorylated ribavirin on vesicular stomatitis virus transcription. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 32, 492-497.

Toltzis, P, Huang, AS (1986). Effect of ribavirin on macromolecular synthesis in vesicular stomatitis virus-infected cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 29, 1010-1016.

Vogel, W (2001) Combination of interferon induction therapy and ribavirin in chronic hepatitis C. *Hepatology*, 34, 1006–1011.

Vollmer, J, Rankin, R, Hartmann, H, Jurk, M, Samulowitz, U, Wader, T, Janosch, A, Schetter, C, Krieg, AM (2004). Immunopharmacology of CpG Oligodeoxynucleotides and Ribavirin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 48, 2314-2317.

Wang, ZW, Sarmento, L, Wang, Y, Li, X, Dhingra, V, Tsegai, T, Jiang, B, Fu, Z (2005). Attenuated rabies virus activates, while pathogenic rabies virus evades the host innate immune responses in the central nervous system. *J. Virol.*, 79, 12554-12565.

Warrell, MJ, White, NJ, Looareesuwan S, Phillips, RE, Suntharasamai, P, Chanthavanich, P, Riganti, M, Fisher-Hoch, SP, Nicholson, KG, Manatsathit, S, Vannaphan, S, Warrell, DA (1989). Failure of interferon alfa and ribavirin in rabies encephalitis. *BMJ*, 299.

Weisman LE (2009). Respiratory syncytial virus (RSV) prevention and treatment: past, present, and future. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 7, 223-233.

Willoughby, R, Tieves, KS, Hoffman, GM, Ghanayem, NS, Amlie-Lefond, CM, Schwabe, MJ (2005). Survival after treatment of rabies with induction of coma. *New England J. Med*, 352, 2508-2514.

Zhang, Y, Jamaluddin, M, Wang, S, Tian, B, Garofalo, R, Casola, A, Braisier, AR (2003) Ribavirin treatment up-regulates antiviral gene expression via the

Interferon- Stimulated Response Element in Respiratory Syncytial virus- infected epithelial cells. Jornal of Virology, 77, 5933-5947.

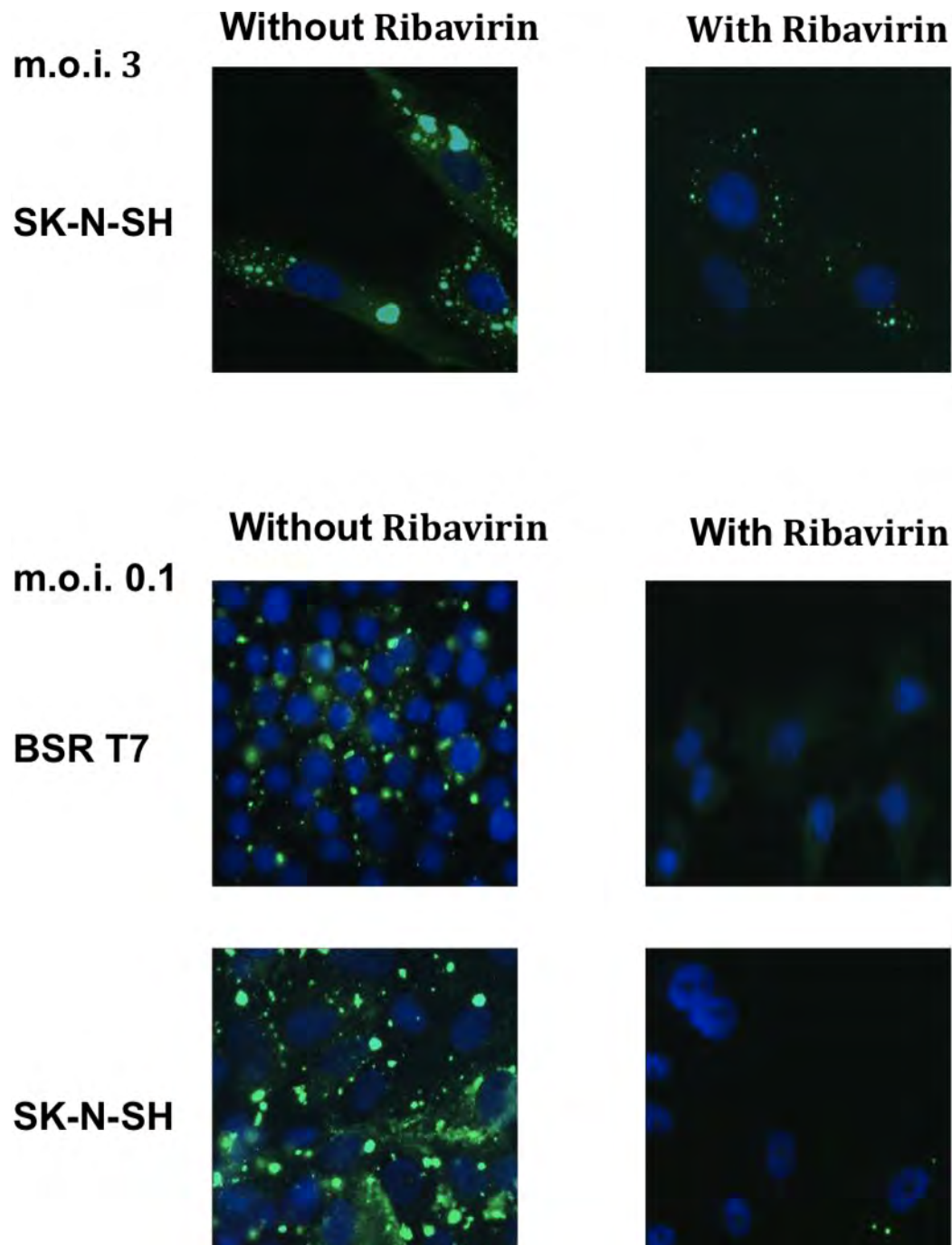
Legends

Table 1. RABV titration, 24 hours and 48 hours post infection in cell culture supernatant of BSR-T7 and SK-N-SH cell culture, with moi 0.1 or 3, treated with ribavirin (1mM RV) or non-treated cells.

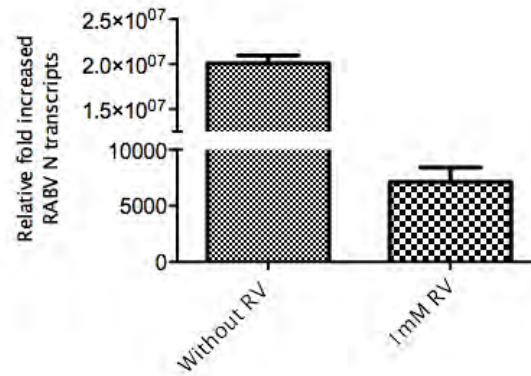
<i>VIRAL TITER (FFU/ML)</i>				
Cell line	Hours post cell infection	MOI	Without Ribavirin	With Ribavirin
BSR-T7	24	3	2.3 E+ 05 +/- 3.0E+04	0
BSR-T7	48	3	2.0 E+ 06 +/- 0	0
SK-N-SH	24	3	6.6 E + 02 +/- 6.0 E + 01	0
SK-N-SH	48	3	7.0 E + 02 +/- 1.0 E + 02	0
BSR-T7	24	0.1	2.0 E + 05 +/- 0	0
BSR-T7	48	0.1	4.6 E + 07 +/- 6 E + 06	0
SK-N-SH	24	0.1	7.3 E + 04 +/- 3.0 E + 03	0
SK-N-SH	48	0.1	2.3 E + 05 +/- 3.0 E + 04	0

Figure 1. Antiviral effect of ribavirin in RABV - infected cell cultures.

A. Formation of Negri Bodies (NBs) in BSR7-T7 (upper panels) or SK-N-SH (bottom panels) infected with RABV(RABV) at a moi of 0.1 or non infected (NI) and treated with ribavirin (RV) or non treated cells (NO RV). Cells were permeabilised, fixed and stained with a FITC conjugated anti RABV NC Ab (green). Nuclei were stained in blue (Hoescht 33342).



B. Measure of RABV transcription/replication by RT-Q-PCR (N gene target) in RABV-infected, Ribavirin treated or non treated cells



C. Measure of RABV infection (a, c) and RABV NC accumulation (b,d) in BSR7-T7 (a/b) and SK-N-SH (c/d) infected cells with an moi 0.1 Ribavirin treated (1mM RV) and non treated (without RV) cells BSR-T7 by flow cytometry.

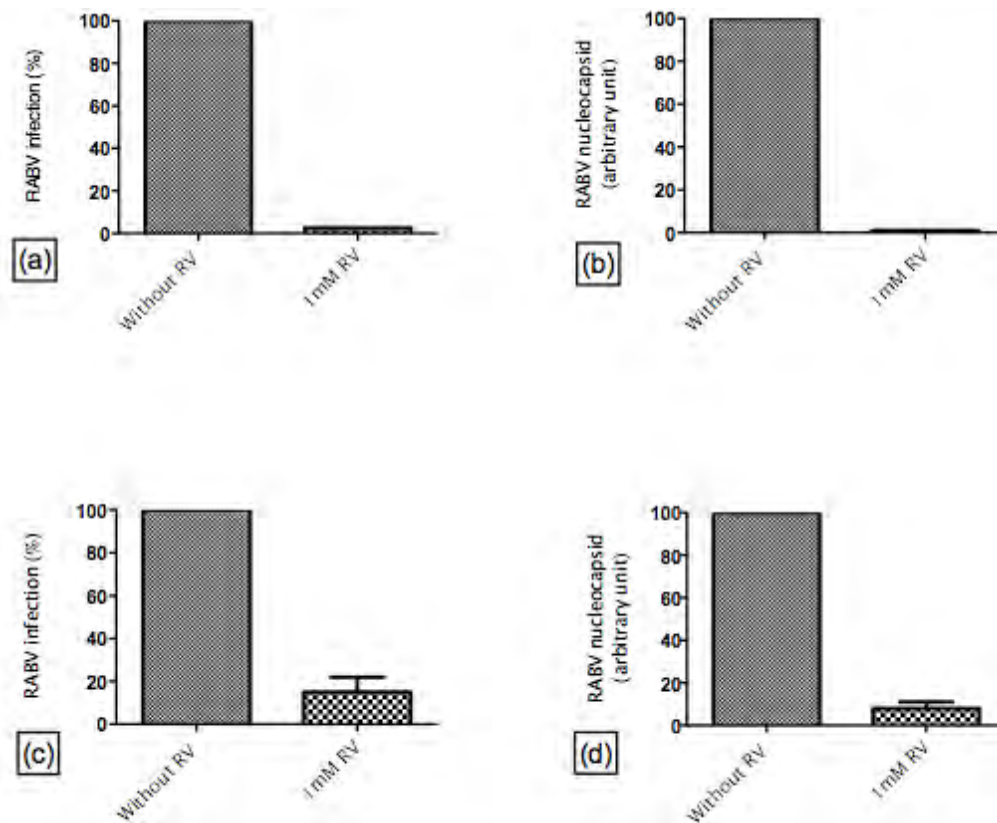


Figure 2. Orally given ribavirin stimulates innate immune response in brain

Expression of innate immune response related genes *OAS-1*, *CCL-2*, *TNF-alpha*, *IL-6* and *IFN-beta* mRNAs measured by Real-Time Q-PCR in brains of non treated (saline) and ribavirin treated mice, 5 days (5d) and 10 days (10d) post Ribavirin or saline treatment . Results are expressed by taking sterile water inoculation as standard value of 1. Results at day 5 and day 10 are statically significant different at $p < 0.001$ (Student's T test).

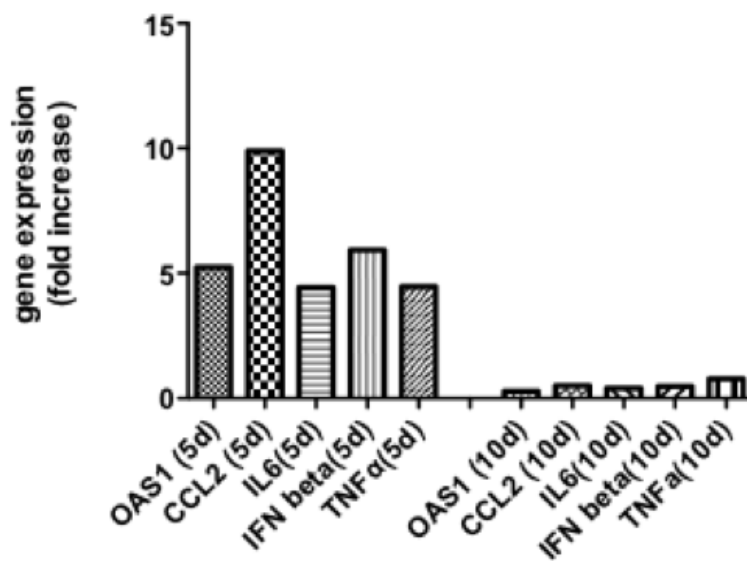
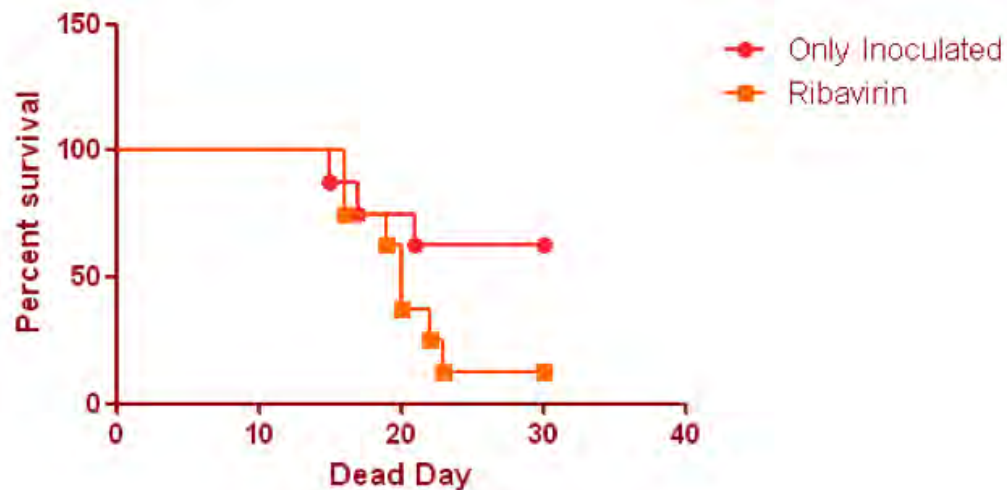
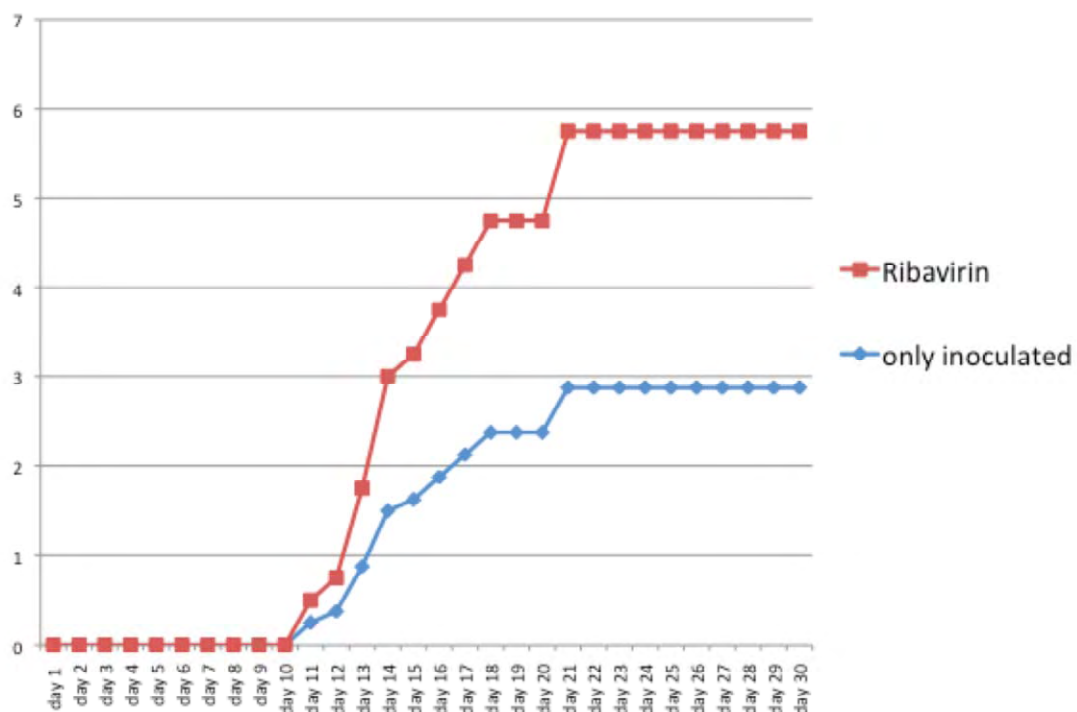


Figure3. Effect of orally given ribavirin on experimental rabies in mice.

A. Survival curves were compared between only inoculated group (red line) and inoculated and ribavirin-treated group (orange line). Data are presented as Kaplan-Meier survival curves. Differences between the two groups are not statistically significant.



B. Cumulative clinical scores. Comparison between infected group (blue) and infected and Ribavirin treated group (red). Classification between 0 (no clinical signs), 2(hair bristling, hyperexcitability or depression with no signs of paralysis), 3(paralysis of one or both limbs) and 5 (death). Statistical analysis Student T test, $p = 0,01784$



C. Expression of immune gene, *OAS-1*, *CCL-2*, *TNF-alpha*, *IL-6* and *IFN-beta* by Real-Time Q-PCR in brain samples harvested 10 day post virus inoculation in the infected mice either treated with ribavirin treated (T) and non-ribavirin treated mice (NT). Not statistically different (Student 's T test).

