



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PATOLOGIA DAS DOENÇAS TROPICAIS**

LIVIA MEDEIROS NEVES CASSEB

**IMUNOPATOLOGIA EXPERIMENTAL DO VÍRUS DA RAIVA, COM AS
VARIANTES ANTIGÊNICAS 2 E 3**

BELÉM-PA

2015

LIVIA MEDEIROS NEVES CASSEB

**IMUNOPATOLOGIA EXPERIMENTAL DO VÍRUS DA RAIVA, COM AS
VARIANTES ANTIGÊNICAS 2 E 3**

Tese de Doutorado apresentado ao Curso de Pós-
Graduação em Doenças Tropicais da Universidade
Federal do Pará.

Orientador: Dr. Pedro Fernando da Costa
Vasconcelos

BELÉM-PA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto Evandro Chagas

Casseb, Livia Medeiros Neves.

Imunopatologia experimental do vírus da raiva, com as variantes antigênicas 2 e 3. / Livia Medeiros Neves Casseb. – Belém, 2015.
156 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos

Tese (Doutorado em Doenças Tropicais) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, 2015.

1. Rabies virus. 2. Sistema nervoso central. 3. Imunopatologia.
I. Vasconcelos, Pedro Fernando da Costa, *orient.* II. Universidade Federal do Pará. III. Título.

CDD: 614.563

Livia Medeiros Neves Casseb

**IMUNOPATOLOGIA EXPERIMENTAL DO VÍRUS DA RAIVA, COM AS
VARIANTES ANTIGÊNICAS 2 E 3**

Tese apresentada para obtenção do grau de
Doutor em Patologia das Doenças Tropicais,
Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal
do Pará.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa
Vasconcelos

Data de aprovação: 02/06/2015

Banca examinadora:

_____ - Orientador

Pedro Fernando da Costa Vasconcelos
Doutor
Instituto Evandro Chagas (IEC)

Rita Catarina Medeiros de Souza
Doutora
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Carla Pagliari
Doutor
Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP)

Juarez Antônio Simões Quaresma
Doutor
Universidade Federal do Pará (UFPA)
Universidade do Estado do Pará (UEPA)

Livia Carício Martins
Doutora
Instituto Evandro Chagas (IEC)

A Deus, aos meus pais e irmãs, ao meu marido e filhos, dedico esta Tese.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial a Deus, aos meus pais e familiares que sempre me apoiaram para que este dia chegasse, mesmo que com broncas ou reclamações, as orientações sempre foram para o crescimento moral, espiritual e profissional.

À família que construí, meus filhos (Iago Manssour, Hugo e Aída), por aturarem todas as minhas irritações até a finalização deste trabalho, mesmo que por muitas vezes tenham contribuído para perda de alterações e até mesmo de arquivos.

Ao Alexandre Casseb (Amor), que além de marido, contribuiu muito para minha formação profissional e neste trabalho em especial, colaborou desde a fase experimental, aos finais de semana me ajudando nas coletas, até a fase final.

Ao Instituto Evandro Chagas (IEC) na pessoa da diretora Dr^a. Elisabeth Conceição de Oliveira Santos, que no início do trabalho ainda dirigia a instituição, por gentilmente fornecer as amostras e dados utilizados no estudo.

A Dr^a. Sueli (Su) Rodrigues e Socorro (Help) Azevedo, por compreenderem minha “ausência” nesta etapa de finalização da tese.

Ao meu orientador Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos (*big boss*), pela confiança em deixar-me conduzir este trabalho, por aceitar orientar-me, por suas broncas e acolhidas amigas, e também por incentivar na conclusão deste trabalho e no crescimento profissional.

À Dr^a. Elizabeth Salbé Travassos da Rosa (chefa), minha orientadora de laboratório, com quem aprendi todas as técnicas empregadas no diagnóstico da Raiva. E, por sua demonstração de amizade e carinho adquiridos após anos de trabalho juntas, carinhosamente considero como uma mãe profissional.

Ao Armando Pereira, que além de amigo é técnico do Laboratório de Raiva, por todos os ensinamentos e companheirismo.

Aos técnicos e companheiros de laboratório, Mário Ferro e o recém-chegado, mas também presente Francisco Amilton dos Santos Paiva, que sempre estiveram presentes.

A Taiana Freitas e Érika Rodrigues, que enquanto estagiárias contribuíram com a elaboração deste trabalho e por aturarem minhas *rabugices*

À Taciana Barbosa, que colaborou comigo na execução deste trabalho, em todas as suas etapas, e ainda por ter aceitado dividir comigo algumas responsabilidades externas ao laboratório de raiva, “dando cobertura” para minhas ausências da rotina no período de finalização deste.

À Edna Franco e toda a equipe do Laboratório de Imunopatologia Experimental (IPE) da SAARB pela realização das técnicas de IHQ no período que estive ausente em decorrência da licença maternidade.

Aos senhores Osvaldo Leal (CENP) e Valter Campos (SAPAT) pelos ensinamentos e na inclusão dos materiais em blocos de parafina, bem como nos cortes histológicos e coloração de HE.

À Tinara Aarão (UFPA e UEPA) e Jorge (aluno de PIBIC/UFPA) por nos auxiliarem na implantação das técnicas de IHQ no laboratório de IPE/SAARB/IEC.

Ao Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma por ter emprestado seus pupilos para nós e por ter sido o patologista responsável pela leitura das lâminas, captura das imagens e responsável pelo nosso treinamento nas técnicas usadas nesta tese.

À Daniele Medeiros, que colaborou na edição das imagens, incentivos e empurrões.

Aos membros da banca examinadora Professores Doutores Carla Pagliari, Rita Medeiros, Elizabeth Travassos da Rosa e Juarez Quaresma que farão colocações e trarão contribuições importantes e que com certeza engrandecerão este trabalho.

À Daniele Henriques minha companheira desde o mestrado, por todo o apoio em disciplinas que fizemos juntas e também pela semelhança nos trabalhos e dúvidas.

Ao José Antônio Picanço Diniz pelo auxílio despendido na captura de algumas fotos.

Aos demais servidores, contratados e estagiários da SAARB/IEC, pelo ambiente familiar e de confraternização que é mantido na seção, em especial as *Cats* e *Plocs* que criam um ambiente descontraído em cada lanche ou almoço.

Os amigos, àqueles da faculdade, que neste ano completamos 10 anos de formados sem ter perdido contato, e também aos amigos do *Caldeirão da CENE* que nos reencontramos depois de 17 anos, é sempre bom reencontrar pessoas especiais e que fizeram parte de sua vida até nos seus momentos mais bizarros.

Em especial a tia Dida (Ligia Sousa) por cumprir seu papel de madrinha de mãe e filha, sendo mais uma mãe, cozinheira, motorista e babá.

A Hera e Shayla, a dama e a vagabunda, que alegram os dias da casa.

Agradeço também aos computadores e *pendrivers* que resolveram fazer greve e pararam de funcionar por alguns dias, mas graças à SOINF voltaram a funcionar e apenas poucas informações foram perdidas.

A CAPES pelo provimento da bolsa de doutorado recebida por um grande período do desenvolvimento da tese

Ao CNPq e MAPA pelo financiamento do projeto através do processo n°578094/2008-8, submetido e aprovado no edital n° 064/2008

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembramos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Chales Chaplin

RESUMO

CASSEB, L.M.N. Imunopatologia experimental do vírus da raiva, com as variantes antigênicas 2 e 3. [tese] Pará: Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará; 2015. 156p.

A raiva é uma zoonose por ter como hospedeiros, reservatórios e transmissores, mamíferos silvestres ou domésticos, caracterizada por doença aguda, causada pelo vírus da raiva (RABV) que compromete o sistema nervoso central, caracterizando-se por encefalite, com prognóstico fatal em quase todos os casos, em qualquer espécie de mamíferos. O objetivo deste trabalho foi descrever achados patológicos e imunopatologia de diferentes cepas de vírus da raiva nos tecidos do sistema nervoso central (SNC) verificando a resposta imunológica celular e humoral durante infecção experimental de camundongos *Mus musculus*. Os animais foram inoculados experimentalmente com duas variantes antigênicas do RABV (VAg2 e VAg3), por diferentes vias de infecção, e um grupo controle. Os animais foram observados quanto ao desenvolvimento de sinais clínicos e sintomas, sendo coletados e eutanasiados seguindo uma cinética. Os tecidos foram fixados em formaldeído a 10%, incluídos em blocos de parafina, corados por hematoxilina-eosina para análise histopatológica, e marcados com anticorpos específicos para imunohistoquímica a fim de caracterizar e quantificar *in situ* a distribuição do antígeno e a resposta inflamatória. Antígenos do RABV foram encontrados no SNC de maneira difusa, mas principalmente nos neurônios. Foi observada supressão dos linfócitos TCD4+, com aumento dos linfócitos TCD8+. Observou-se apoptose importante, com morte de células da glia. Houve aumento de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-1 β e IL-8), anti-inflamatórias (TGF- β e IL-4) e iNOS em ambas as variantes antigênicas do RABV, mas sem observação de um perfil TH17. Esta análise possibilitou caracterizar a raiva como uma meningoencefalite, por acometer os microambientes meningeal, perivascular e intraparenquimatoso. E o processo inflamatório foi verificado mesmo quando na presença de corpúsculos de Negri, porém com menor intensidade.

Palavras Chave: *Rabies virus*, Sistema Nervoso Central, Imunopatologia.

ABSTRACT

Casseb, L.M.N. Immunopathology of antigenic variants 2 and 3 of the rabies virus. [Thesis] Para State: Tropical Medicine Center, Federal University of Pará State; 2015. 156p.

The rabies is considered a zoonosis due have as host, reservoirs and transmitters the domestic or wild mammals. It's characterized in acute disease caused by rabies virus (RABV) that affects the central nervous system (CNS) characterized by encephalitis with fatal prognosis in almost all cases, in any mammalian species. The aim of this study was to describe pathological findings and immunopathology of different strains of rabies virus in the tissues of the central nervous system, checking cellular and humoral immune response during experimental infection of *Mus musculus* mice. The animals were inoculated with two antigenic variants of RABV (VAg2 and VAg3), by different routes of infection, and a control group. The animals were observed for development of clinical signs and symptoms, collected and euthanized following a kinetic. The tissues were fixed in formaldehyde 10%, embedded in paraffin, stained with hematoxylin-eosin for histopathological analysis and with specific antibodies for immunohistochemical to characterize and quantify in situ distribution of the antigen and the inflammatory response. RABV antigens were found in the CNS in a diffuse way, but mainly in neurons. It was observed suppression of CD4⁺ lymphocytes, with increase of CD8⁺ lymphocytes. It was observed significant apoptosis with glial cell death and an increase of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-1 β and IL-8), anti-inflammatory (TGF- β and IL-4) and iNOS in both antigenic variants of RABV, but without observation of a TH17 profile. The analyses enable the characterization of rabies as meningoencephalitis, since it affects the meningeal, perivascular and intraparenchymal microenvironments. And the inflammatory process was observed even in the presence of inclusion bodies, but with less intensity.

Keywords: *Rabies virus*, Central Nervous System, Immunopathology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág.
Figura 1. Ilustração de Louis Pasteur trabalhando em seu laboratório.	27
Figura 2. Ilustração esquemática da partícula do RABV mostrando glicoproteínas de superfície (GI), proteínas de matriz (M), fosfoproteínas (P), RNA-polimerase (L) e a Nucleoproteína (N) envolvendo o genoma de RNA, formando o complexo RNP (L+P+N+RNA). Genoma do RABV.	30
Figura 3 Esquema do ciclo epidemiológico da raiva.	32
Figura 4. Esquema ilustrativo dos períodos e das manifestações clínicas em casos de Raiva humana.	43
Figura 5. Patogênese da infecção pelo vírus da Raiva	47
Figura 6. Esquema ilustrativo da recepção, entrada, transcrição, tradução, replicação e saída de partículas virais.	49
Figura 7. Espécie animal e fragmento de eleição do SNC a ser coletado para o diagnóstico laboratorial da Raiva.	51
Figura 8. Representação esquemática das barreiras do cérebro. (Acima) Existem três sítios principais de barreira entre o sangue e o cérebro. (a) É criada ao nível das células endoteliais dos capilares cerebrais por formação de junção de oclusão. (b) A barreira sangue-LCE encontra-se nos plexos coróides nos ventrículos laterais, terceiro e quarto do cérebro onde são formadas junções apertadas entre as células epiteliais na superfície que confronta com o LCE. (c) A barreira aracnóide. encontra-se sob a dura máter. A aracnóide é avascular, mas fica perto do seio sagital superior e está separado dela pela dura máter. A aracnóide é um epitélio de múltiplas camadas com junções apertadas entre as células da camada interior que formam uma vedação eficaz	60
Figura 9. Representação esquemática das associações celulares na BHE. Corte transversal de um capilar cerebral. A circunferência do lúmen capilar está completamente rodeada por uma única célula endotelial (CE), as membranas basais estão ligadas por JA. Pericitos (PC) estão ligados à superfície	61

abluminal da CE, e estes dois tipos de células estão rodeados por a lâmina basal (MB), que é contígua com as membranas plasmáticas dos astrócitos (AC) e CE que vedam o caminho paracelular de difusão aquosa entre as células. Tanto as células endoteliais cerebrais e os pericitos são delimitados por, a membrana basal local, que forma uma matriz extracelular perivascular distinta (lâmina basal 1, BL1), diferente da composição a partir da matriz extracelular do pé terminal da glial delimitadora do parênquima cerebral (BL2). Alterações nas relações entre células endoteliais e astrócitos que ocorrem de alterações da permeabilidade e a inflamação no SNC na infecção pelo RABV.

- Figura 10.** Potencial interação entre as células do sistema imune (linfócitos T e B, e macrófagos) e as do SNC (Astrócitos, microglias e oligodendrócitos). 68
- Figura 11.** Alterações histopatológicas da raiva pela coloração de HE, magnitude 200x. 73
- Figura 12.** Desenho esquemático com os procedimentos da técnica de imunohistoquímica, segundo Quaresma, 2003 82
- Figura 13.** Reação de imunohistoquímica para antígenos do RABV, Tecido adjacente corado em azul pela hematoxilina (Magnitude 200x). 91
- Figura 14.** Neurônios e células da glia imunomarcadas para o RABV 91
- Figura 15.** Neurônios e células da glia imunomarcadas para o RABV durante o período pós-infecção. 92
- Figura 16.** Gráfico *Box plot* com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas para RABV nos três microambientes do SNC. 92
- Figura 17.** Gráfico *Box plot* com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas expressando lisozima, nos três microambientes do SNC. 93
- Figura 18.** Gráfico *box plot* com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas secretando iNOS, nos três microambientes do SNC. 94
- Figura 19.** Reação de imunohistoquímica para perfil de atividade de glia, tecido adjacente corado em azul pela hematoxilina 95

(Magnitude 200x).

Figura 20	Gráfico <i>Box plot</i> com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas expressando CD4, nos três microambientes do SNC.	96
Figura 21.	Gráfico <i>Box plot</i> com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas expressando CD3, nos três microambientes do SNC.	97
Figura 22.	Reação de imunohistoquímica para perfil celular, tecido adjacente corado em azul pela hematoxilina (Magnitude 200x).	98
Figura 23.	Gráfico <i>Box plot</i> com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas expressando FoxP3, nos três microambientes do SNC.	99
Figura 24.	Gráfico <i>Box plot</i> com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas expressando caspase 3, nos três microambientes do SNC.	100
Figura 25.	Reação de imunohistoquímica para perfil T regulatório, tecido adjacente corado em azul pela hematoxilina (Magnitude 200x).	101
Figura 26.	Gráfico <i>Box plot</i> com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas secretando TNF- α , nos três microambientes do SNC.	102
Figura 27.	Gráfico <i>Box plot</i> com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas secretando IFN- γ , nos três microambientes do SNC.	103
Figura 28.	Reação de imunohistoquímica para perfil citocínico anti-inflamatório, tecido adjacente corado em azul pela hematoxilina (Magnitude 200x).	104
Figura 29.	Gráfico <i>Box plot</i> com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas secretando IL-6, nos três microambientes do SNC.	105
Figura 30.	Gráfico <i>Box plot</i> com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas secretando IL-1 β , nos três microambientes do SNC.	106
Figura 31.	Gráfico <i>Box plot</i> com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas secretando IL-8,	107

nos três microambientes do SNC.

- Figura 32.** Reação de imunohistoquímica para perfil citocínico anti-inflamatório, tecido adjacente corado em azul pela hematoxilina (Magnitude 200x). 108
- Figura 33.** Gráfico *Box plot* com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas secretando TGF- β , nos três microambientes do SNC. 109
- Figura 34.** Gráfico *Box plot* com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas secretando IL-4, nos três microambientes do SNC. 110
- Figura 35.** Reação de imunohistoquímica para perfil citocínico anti-inflamatório, tecido adjacente corado em azul pela hematoxilina (Magnitude 200x). 111
- Figura 36.** Reação de imunohistoquímica para perfil citocínico anti-inflamatório, tecido adjacente corado em azul pela hematoxilina (Magnitude 200x). 112
- Figura 37.** Reação de imunohistoquímica que demonstraram reação inespecífica de fundo, tecido adjacente corado em azul pela hematoxilina (Magnitude 200x). 113
- Figura 38.** Tecido nervoso de animais infectados com RABV: alterações histopatológicas das meninges pela coloração de HE (Magnitude 200x). 115
- Figura 39.** Tecido nervoso de animais infectados com RABV: alterações histopatológicas pela coloração de HE (Magnitude 200x). 117
- Figura 40.** Desenho esquemático com a potencial interação entre as células do sistema imunológico e as do SNC frente aos resultados encontrados neste estudo. 131

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	08
ABSTRACT	09
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	10
1	
INTRODUÇÃO	18
2	
JUSTIFICATIVA	22
3	
OBJETIVOS	23
3.1	OBJETIVO GERAL 23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS 23
4	
REFERENCIAL TEÓRICO	24
4.1	RAIVA 24
4.1.1	Histórico 24
4.1.2	O vírus da Raiva (<i>Rabies virus</i> -RABV) 28
4.1.3	Epidemiologia 31
4.1.4	Transmissão 37
4.1.5	Aspectos clínicos 41
4.1.5.1	Raiva Furiosa 42
4.1.5.2	Raiva Paralítica 44
4.1.5.3	Raiva Muda ou Atípica 45
4.1.6	Patogênese 46

4.1.7	Diagnóstico	50
4.1.8	Profilaxia e tratamento	53
4.2	SISTEMA NERVOSO	55
4.3	INTERAÇÃO RABV – HOSPEDEIRO	63
4.3.1	Resposta Imunológica Frente à Infecção Rábica	63
4.3.2	Mecanismos de escape do RABV	71
4.3.3	Alterações Patológicas da Raiva no SNC	72
4.4	MODELOS ANIMAIS DE NEUROVIRULÊNCIA	77
5	MATERIAL E MÉTODOS	78
5.1	AMOSTRAS	78
5.1.1	Titulação da dose infectante	78
5.2	INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS JOVENS	78
5.2.2	Análise Histopatológica	80
5.2.2.1	Processamento Histopatológico	80
5.2.2.2	Análise Histopatológica Semi-Quantitativa	81
5.2.3	Imunohistoquímica	81
5.2.3.1	Imunomarcção para Detecção do Antígeno Viral e Caracterização das Células do SNC	86
5.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	87
5.4	ASPECTOS LEGAIS DE BIOÉTICA E BIOSSEGURANÇA	87
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
6.1	INFECÇÃO EXPERIMENTAL	89

6.2	AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA	90
6.2.1	Expressão de antígeno	90
6.2.2	Atividade da glia – marcadores expressos na glia	93
6.2.3	Perfil celular	96
6.2.4	Perfil Citocínico	102
6.2.4.1	Citocinas pró-inflamatórias	102
6.2.4.2	Citocinas anti-inflamatórias	109
6.2.5	Perfil Th17 e outros fatores negativos na IHQ	112
6.3	ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS	114
7	DISCUSSÃO	118
7.1	INFECÇÃO EXPERIMENTAL	118
7.2	AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA	120
7.2.1	Expressão de antígeno	120
7.2.2	Atividade da glia – marcadores expressos na glia	121
7.2.3	Perfil celular	123
7.2.4	Perfil Citocínico	126
7.2.4.1	Citocinas pró-inflamatórias	126
7.2.4.2	Citocinas anti-inflamatórias	127
7.2.5	Perfil Th17 e outros fatores negativos na IHQ	129
7.3	ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS	131
8	CONCLUSÕES	133
9	PERSPECTIVAS FUTURAS	134

10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135
-----------	-----------------------------------	------------

ANEXO

ANEXO A	Parecer aprovando a realização da pesquisa utilizando animais, pela CEUA/IEC.	156
---------	--	-----

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença infecciosa aguda, causada por um vírus, que compromete o sistema nervoso central (SNC) e que se caracteriza por um quadro de encefalite. Pode acometer todas as espécies de mamíferos, incluindo o homem, sendo seu prognóstico fatal em praticamente todos os casos, em qualquer espécie de mamíferos. É uma zoonose por ter como hospedeiros, reservatórios e transmissores, mamíferos silvestres ou domésticos, que podem transmitir a doença aos seres humanos (TAKAOKA, 2003), através de soluções de continuidade produzidas por mordedura ou arranhadura de animais ou pessoas infectadas (NOVA, RENGELL, HINRICHSEN, 2002; HINRICHSEN et al., 2005; TAKAOKA, 2003).

A raiva continua sendo um grave problema de saúde pública em países em desenvolvimento, principalmente a transmitida por cães e gatos, mantendo-se a cadeia de transmissão animal doméstico/homem em áreas urbanas (BRASIL, 2005; SAITO et al., 2013). Tanto para estes países, quanto para países desenvolvidos, a raiva representa uma sobrecarga econômica, face aos onerosos gastos com tratamento pós-exposição, diagnóstico e levantamentos epidemiológicos, imunizações de animais domésticos e controle da população de animais silvestres (REZENDE et al., 1997; TRAVASSOS DA ROSA et al., 2013).

Sem dúvida, um caso de raiva humana representa uma deficiência no sistema de saúde (BRASIL, 1998), demonstrada pela falta de capacidade de ação em nível local, quando se trata de áreas afastadas dos centros de atenção à saúde (PANAFTOSA, 2007).

Segundo Machado (1994), o diagnóstico laboratorial na fase clínica baseia-se no isolamento do vírus através da saliva e, mais raramente do líquido cefalorraquidiano e urina, podendo ainda se demonstrar antígenos do vírus em esfregaço de córnea, utilizando testes de imunofluorescência, sendo que em vida a demonstração é feita com muita dificuldade e os resultados negativos não excluem a raiva como causa da doença se o diagnóstico clínico é indicativo da virose sendo, nesses casos, indicada a pesquisa de vírus em material do SNC obtido após a morte. Porém, o Ministério da Saúde (BRASIL, 2009) recomenda a técnica de reação em cadeia medida pela polimerase precedida de transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR) a partir de amostra de biópsia de paciente vivo para pesquisa do genoma viral durante o tratamento, por apresentar elevada sensibilidade e especificidade.

O vírus da raiva (RABV) pertence à ordem *Mononegavirales* e família *Rhabdoviridae*, sendo o membro protótipo do gênero *Lyssavirus* (DIETZSCHOLD et al., 1996; WAGNER, ROSE 1996; WU et al., 2002; FAUQUET et al., 2005; FINKE, CONZELMANN, 2005), apresentando-se morfológicamente na forma cilíndrica semelhante a um projétil, possui um ribonucleocapsídeo (RNP) helicoidal, onde é encontrado o material genético, e um envelope lipoprotéico, contendo Glicoproteína (G) que forma um trímero (espículas glicoproteicas) na superfície do vírion (TORDO, 1996; WOLDEHIWET, 2002; GUYATT et al., 2003; FAUQUET et al., 2005).

Pesquisas baseadas em biologia molecular têm sido relevantes para complementar os conhecimentos sobre a patogênese e a imunologia da infecção rábica, assim como, para determinar a variabilidade genética do RABV (WUNNER et al., 1988), e vêm sendo realizadas em diversos países da América, como Venezuela (MATTOS et al., 1996), EUA (ROHDE et al., 1997), Chile (YUNG; FAVI;

FERNÁNDEZ, 2002), e México (LOZA-RUBIO et al., 1995; LOZA-RUBIO et al., 1996; VELASCO-VILLA et al., 2002; VELASCO-VILLA et al., 2006), e diversos países da Europa (BOURHY et al., 1992), obtendo-se um perfil da circulação do vírus nesses continentes, com a descrição, algumas vezes de novas variantes antigênicas.

A transmissão ocorre através da penetração do RABV contido na saliva do animal infectado, principalmente pela mordedura e, mais raramente, pela arranhadura e lambadura de mucosas; penetrando no organismo, o RABV atinge o sistema nervoso periférico e, posteriormente, o sistema nervoso central (SNC). Em seguida o vírus dissemina-se para vários órgãos, inclusive as glândulas salivares, quando o hospedeiro torna-se apto a transmitir (BRASIL, 2005a); pode o RABV também ser transmitido por xenotransplantes (BONEVA, FOLKS; CHAPMAN, 2001); há ainda casos de transmissão inter-humana através de transplantes de córnea (BRASIL, 2005a) e de outros órgãos como pulmões, fígado, rins e enxerto vascular (BURTON et al., 2005; HPA, 2005; SRINIVASAN, BURTON, KUEHNERT, 2005) (figura 1).

O mecanismo de patogenicidade do vírus rábico se dá pela inibição da síntese de proteína celular do hospedeiro e pelo tropismo viral por nervos periféricos (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000). O RABV progride, do ponto de infecção ao SNC através dos nervos periféricos, mas outras vias, provavelmente, são responsáveis pela progressão do vírus em animais novos, hospedeiros altamente sensíveis ou em animais sujeitos a traumas ou choques. Atingindo o SNC o vírus se replica e, depois, se espalha centrifugamente aos nervos periféricos, infectando e possivelmente se multiplicando nas glândulas salivares (MAYR, GUERREIRO, 1981).

Durante a infecção do SNC, citocinas e diferentes mediadores são produzidos resultando em migração de várias células do sistema imune, como os linfócitos T, através da barreira hematoencefálica que interagem com as células do SNC (CONSALES, BOLZAN, 2007). Um dos aspectos mais interessantes da imunopatologia da raiva é praticamente a ausência de uma resposta inflamatória (ACHKAR, et al., 2007).

2 JUSTIFICATIVA

A raiva é uma zoonose 100% letal de ocorrência mundial; casos de Raiva humana e canina nas Américas estão aparentemente diminuindo, porém a expansão da doença a partir dos reservatórios selvagens para os animais domésticos, selvagens e humanos vem sendo notificados com maior frequência (WUNNER, 2005), inclusive com a ocorrência de surtos no Estado do Pará causada pela variante antigênica 3 (VAg3) (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2006), para a qual o morcego hematófago (*Desmodus rotundus*) é a espécie mais importante, o que tem sido observado com frequência na América Latina (BELLOTO et al., 2005).

No Brasil, a raiva é considerada uma doença endêmica, com distribuição epidemiológica heterogênea, diretamente relacionada com as condições socioeconômicas e culturais, com incidência em alguns estados da região Sudeste e da região Centro-Oeste, mas com predominância de casos nas regiões Norte e Nordeste, áreas onde a doença ainda não é considerada controlada (LAZARINI, 2003) e ausência de casos na região Sul, considerada área de raiva controlada (REICHMANN et al., 2000).

Tendo em vista esses fatores há necessidade de uma melhor compreensão dos mecanismos imunopatogênicos da infecção pelo RABV e sua interação vírus-hospedeiro, visto que pouco se conhece acerca do fenótipo das células responsáveis pela resposta imunológica e a expressão de citocinas nas diferentes fases da patogênese; sendo assim este trabalho visa contribuir para a melhor compreensão dos aspectos imunopatológicos envolvidos na gênese da lesão nervosa.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Descrever achados histopatológicos e imunopatológicos produzidos por cepas de vírus da raiva de duas diferentes variantes antigênicas VAg2 e VAg3 em tecidos do sistema nervoso central e verificar a resposta imune celular e humoral durante infecção experimental em camundongos *Mus musculus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Correlacionar a proximidade da via de infecção com o SNC e tempo para desenvolvimento de doença com cada uma das variantes antigênicas;
- Descrever o padrão morfológico das alterações histológicas em camundongos infectados pelo RABV, coletados durante a cinética da infecção;
- Avaliar quantitativamente a distribuição de antígenos virais nos tecidos do SNC de camundongos infectados experimentalmente com as variantes antigênicas 2 e 3 do RABV;
- Estudar a expressão de citocinas e a resposta imune inata, celular e humoral nas infecções por essas diferentes variantes antigênicas do RABV;
- Estabelecer possíveis diferenças dos perfis da resposta imunologia e histopatológica para essas diferentes cepas de RABV.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 RAIVA

4.1.1 Histórico

A Raiva é uma doença histórica, temida desde a antiguidade até a atualidade, muitas vezes misturando-se com folclores e crenças religiosas, dando origem a mitos e lendas. É descrita em documentos da Mesopotâmia que datam de 2.300 anos A.C (WILKINSON, 1988; BATISTA et al., 2007). Tais descrições são cercadas de muitos fatos curiosos, principalmente sobre a doença em cães, que permitiram relatos acerca do grande medo que os animais infectados causavam, muito em virtude do desconhecimento sobre proteção e quiçá a respeito da cura (SCHLOGEL,1985).

A etimologia da palavra “Raiva” aponta para o termo *rabhas*, em sânscrito antigo, da qual deriva *rabere*, em latim, que significa delírio ou devaneio. Já Demócrito no ano 500 A.C. propôs o nome de “*Lyssa*” ou “*Lytta*”, que quer dizer “loucura ou demência”. E a transmissão da doença através de mordeduras, onde cães sadios mordidos por um cão raivoso ficavam “loucos”, foi descrita por Aristóteles (322 A.C.), reconhecendo dessa maneira, a natureza infecciosa da Raiva (SCHLOGEL,1985; REZENDE et al., 1997; COSTA, 1998; HINRICHSEN et al., 2005; KOTAIT et al.,2009).

Historicamente a raiva é descrita em documentos que datam do século XXII a.C., há mais de 4.000 anos (WILKINSON, 1988), sendo relatada no código de Eshununna, escrito há mais de 2.500 anos (STEELE, 1975). O primeiro relato de Raiva em humanos atribui-se a Hipócrates. Sendo que diversos fatores foram propostos ao longo do tempo, visando a tentativa de explicar a doença. Proposições que em sua maioria envolviam superstições e credices, embora alguns estudiosos tenham postulado explicações bastante plausíveis e que suportam o atual conhecimento de sua patogenia (BERAN, 1994).

Plínio e Ovídio, escritores romanos, relataram que a possível causa seria um verme que se encontrava na língua do cão, onde para se evitar a raiva nos tempos médicos antigos, se cortava o freio da língua (membrana mucosa) e se extirpava a prega na qual se pensava que estava o verme. Essa ideia persistiu até o século XIX. Porém, Gardano na mesma época, sugeriu que na saliva de cães raivosos havia um material venenoso, cuja palavra em latim é a raiz do atual termo “vírus” (STEELE, 1975; STEELE, FERNANDEZ, 1991).

Galeno (200 A.C.) recomendava a remoção cirúrgica das lesões. Talvez, a primeira descrição precisa da doença, tenha sido citada por Cornélio Celsus (100 A.C.), denominando-a de hidrofobia, literalmente “Medo de água”, que descreveu os acometidos como desafortunados que padeciam com sede e com medo de água simultaneamente (STEELE, FERNANDEZ, 1991). Bem como, relatar vínculos acerca da transmissão entre cães e seres humanos.

Celsus também sugeria como tratamento para humanos mordidos por cães furiosos, a título de prevenção do contágio, o uso de substâncias cáusticas, fogo, aplicação de sal, sangria por meio de ventosas ou mata-borrão, sendo que até o século XVIII não se atribuía ao cão um papel fundamental na disseminação da

Raiva (SCHLOGEL,1985; CORRÊA, CORRÊA, 1992; REZENDE et al., 1997; COSTA, 1998).

O século XIX foi marcado por grandes avanços no conhecimento da Raiva. Em 1804 Zinke foi o primeiro a demonstrar que a doença poderia ser efetivamente transmitida pela saliva. Em 1879, Gaultier observou um período de incubação de 18 dias, ao inocular o vírus em coelhos e observar sua transmissão, embora não tenha exposto com clareza esse método de transmissão, documentou a ocorrência de paralisia e convulsões nos animais infectados (STEELE, FERNANDEZ, 1991; BAER, 2007).

Os mistérios sobrenaturais que envolviam a Raiva só foram dissipados quando o cientista Louis Pasteur voltou suas atenções para a doença. Ele pesquisou a doença justamente porque se tratava da "mais assustadora e mortal das doenças". O método de Pasteur foi aperfeiçoado e é usado até hoje, porém, atualmente bastam quatro vacinas no braço. Diferentemente de quando a vacina foi criada, que consistiam em 21 dolorosas injeções na barriga. Foi essa simples solução que praticamente eliminou a doença (STEELE, FERNANDEZ,1991).

No ano de 1880, Pasteur transcorrendo com seus estudos, informou que muito possivelmente o cérebro abrigava o "vírus", além de que injeções do material infectante sobre ele mesmo invariavelmente causavam a paralisia e morte do animal. A partir de tais questionamentos Louis Pasteur, e seus colaboradores Emile Roux, Charles Chamberland e Louis Thuillier deram início a seus estudos mais aprofundados sobre a Raiva (CORRÊA, CORRÊA, 1992; REZENDE et al., 1997; COSTA, 1998; GONÇALVES et al., 2002; HINRICHSEN *et al.*, 2005).

No ano seguinte, a equipe de Pasteur realizou sucessivas passagens utilizando o material proveniente do SNC de coelhos, obtendo assim o isolamento do

vírus, conseguindo uma cepa viral mais estável e com virulência e período de incubação (p.i.) constantes. A técnica basicamente consistia em conservar a medula em um recipiente com potassa cáustica, para prevenir a putrefação, permitindo a entrada de oxigênio atenuando assim a virulência (CORRÊA; CORRÊA, 1992; COSTA, 1998; KOTAIT et al., 2009).

Com esse estudo, Pasteur desenvolveu o primeiro método de vacinação, que consistia em injeções subcutâneas de suspensão de fragmentos da medula espinhal infectada e seca até perder a virulência. Em 1884, após descreverem para a Academia de Ciências a atenuação da virulência da amostra por passagens sucessivas, utilizaram-na experimentalmente em cães que acabaram sendo imunizados. Desta forma, 50 animais foram protegidos (COSTA, 1998; KOTAIT et al., 2009).



Figura 1- Ilustração de Louis Pasteur trabalhando em seu laboratório. Fonte: <http://museu-pasteur.com/>

Um dos primeiros processos de imunização registrada na história da medicina foi o tratamento preventivo humano contra a raiva, registrado no ano de 1885 e realizado por Pasteur. Ao atender Joseph Meister de apenas 9 anos de idade, agredido por um cão raivoso causando-lhe múltiplas lesões profundas (AZEVEDO, 1981). Com esta primitiva, porém histórica vacina, Louis Pasteur obteve êxito no tratamento e a criança sobreviveu, sendo considerado que a vacina havia induzido a produção dos anticorpos necessários para neutralizar os vírus antes que chegassem ao SNC (REZENDE, 1997; COSTA, 1998).

A partir de então Pasteur foi convidado a criar um centro para produção de vacina antirrábica, denominado de Instituto Pasteur, em Paris. Idealizado para ser um centro de tratamento para a Raiva, bem como para outras doenças infecciosas e para educação. O trabalho de Pasteur não foi somente a soma de seus estudos e descobertas, mas também representou uma revolução na metodologia científica. As principais características que marcaram o seu legado e ficaram de herança para a Ciência foram à liberdade de pensamento na utilização da imaginação e criatividade e a necessidade de uma experimentação rigorosa. Pasteur dizia que “Não prossiga em seus trabalhos se você não pode prová-los com a experimentação” (MATSUMOTO, 1963; KOTAIT et al., 2009).

4.1.2 O vírus da Raiva (*Rabies virus* -RABV)

Na ordem *Mononegavirales* estão grupados os vírus constituídos por RNA de fita simples, não segmentados e com polaridade negativa (3'-5'). Com cinco famílias incluídas, entre elas a família *Rhabdoviridae*, divididas em 12 gêneros, entre eles o gênero *Lyssavirus* dividido em 14 espécies, dentre elas o Vírus da Raiva

(RABV) que constitui o membro protótipo deste gênero (BRASIL, 2009; LAHAYE et al., 2009; ICTV, 2014; EZE et al., 2015).

No gênero *Lyssavirus*, 14 espécies são descritas. E estas se encontram segregadas em filogrupos, como segue: filogrupo I, onde estão incluídos os genótipos 1, 4, 5, 6 e 7; e filogrupo II que contém os genótipos 2 e 3 (WHO, 2005; FINKE, CONZELMANN, 2005), sendo cada uma delas: vírus da raiva clássico (*Rabies virus* - RABV), que constitui o membro protótipo deste gênero (BRASIL, 2009; ICTV, 2014); *Lagos bat virus* (LBV) (BOULGER, PORTERFIELD, 1958); *Mokola virus* (MOKV) (SHOPE et al., 1970); *Duvenhage virus* (DUVV) (MEREDITH et al., 1971); *European bat lyssavirus* tipo 1 (EBLV-1) (KUZMIN et al., 2005); *European bat lyssavirus* tipo 2 (EBLV-2) (LUMIO et al., 1986); e *Australian bat lyssavirus* (ABLV) (GOULD et al., 2002; GUYATT et al., 2003); *Aravan virus* (ARAV); *Khujand virus* (KHUV); *Irkut virus* (IRKV) (BOTVINKIN et al., 2003; KUZMIN et al., 2003; 2005); *West Caucasian bat virus* (WCBV) (KUZMIN et al., 2005; Who, 2005; TORDO et al., 2006); *Shimoni bat virus* (SHIBV) (Who, 2005; TORDO et al., 2006; KUZMIN et al., 2008; 2010; CARSTENS, 2010), e dois outros vírus recentemente descritos *Bokeloh bat lyssavirus* (BBLV) e *Ikoma lyssavirus* (IKOV) (CEBALLOS et al., 2013; ICTV, 2014).

O RABV apresenta morfologia característica em formato de bala de revólver, diâmetro médio de 75 nm e comprimento de 100 a 300 nm. O vírion é composto por um envoltório formado por uma dupla membrana fosfolipídica na qual emergem espículas de aproximadamente 9 nm, de composição glicoproteica. Este envoltório envolve o nucleocapsídeo de conformação helicoidal, composto de um filamento único (RNA negativo e não segmentado). Bioquimicamente, além do RNA é composto estruturalmente por cinco proteínas: uma RNA-polimerase RNA-

dependente (Proteína L de 190 KDa), uma Glicoproteína de superfície (Proteína G de 65 a 80 KDa), uma Nucleoproteína (Proteína N de 57 a 62 KDa), uma Fosfoproteína (Proteína NS ou M1 de 35 a 41 KDa), e uma proteína Matriz (Proteína M ou M2 de 22 a 25 KDa) (TORDO, 1996; BRASIL, 2009; ICTV, 2014).

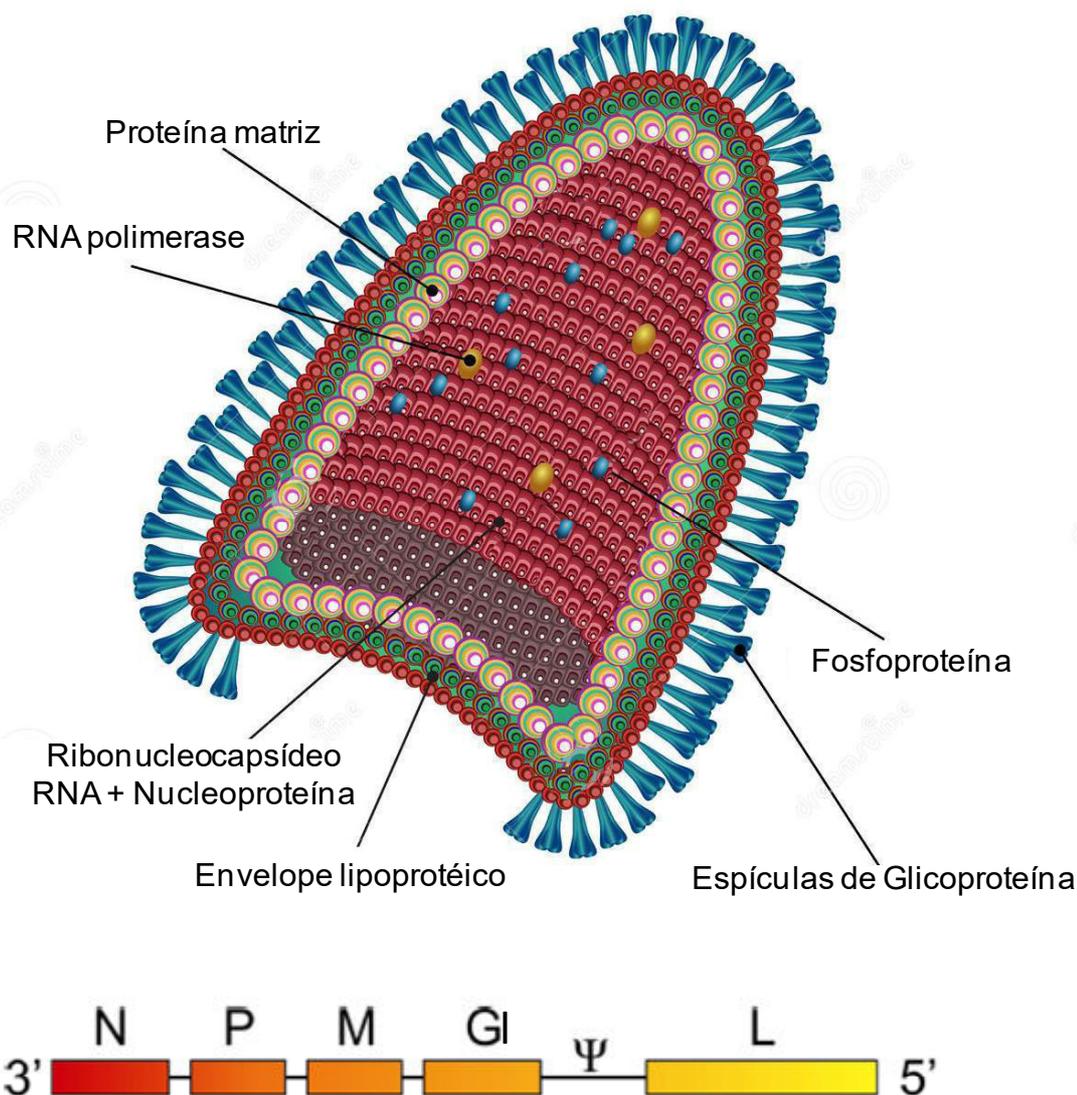


Figura 2: Ilustração esquemática da partícula do RABV mostrando glicoproteínas de superfície (GI), proteínas de matriz (M), fosfoproteínas (P), RNA-polimerase (L) e a Nucleoproteína (N) envolvendo o genoma de RNA, formando o complexo RNP (L+P+N+RNA). Genoma do RABV. Legenda : N: Nucleoproteína, P: Fosfoproteína, M: Proteína Matriz, GI: Glicoproteína, L: RNA-Polimerase, Ψ: Pseudogene

Fonte: Adaptado de <http://www.dreamstime.com/stock-images-diagram-rabies-virus-particle-structure-file-eps-format-image36842874> e Kimura, 2006

Em 1994, especialistas em Raiva propuseram a denominação “genótipos” em substituição aos sorotipos. Sendo assim na atualidade, os vírus do gênero *Lyssaviruse* são compreendidos em sete genótipos (GT 1 a GT 7). Destes, o GT 1 é o que compreende a Raiva clássica sendo o único de distribuição cosmopolita e o de maior importância por sua relação epidemiológica com os casos de Raiva (BRASIL, 2009).

Ainda sobre o GT1, ressalta-se que este possui diversas variantes antigênicas, conforme a espécie animal e a região ou país proveniente, e essas variantes existem em natureza em ciclos independentes sendo que, em cada ciclo um animal hospedeiro exerce papel fundamental na manutenção de cada uma das variantes do RABV, tais como aquelas relacionadas a morcegos hematófagos, frugívoros, insetívoros, canídeos silvestres entre outros (VELASCO-VILLA et al., 2002).

4.1.3 Epidemiologia

A Raiva é definida como uma doença negligenciada, não somente no Brasil, mas também no mundo, e embora exista prevenção preconizada através de esquemas vacinais, a doença ainda está entre as dez principais causas de morte humana dentre as enfermidades infecciosas (FOOKS et al., 2003; DODET, 2006; BRIGGS, HANLON, 2007; WHO, 2000).

É uma zoonose que apresenta um prognóstico fatal, mesmo com todos os subsídios existentes para o seu controle e prevenção, ainda é considerada um grave

problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento, muitas vezes onde os casos são subnotificados ou mesmo não são notificados, dificultando consideravelmente o real conhecimento da incidência da doença (COLEMAN et al., 2004).

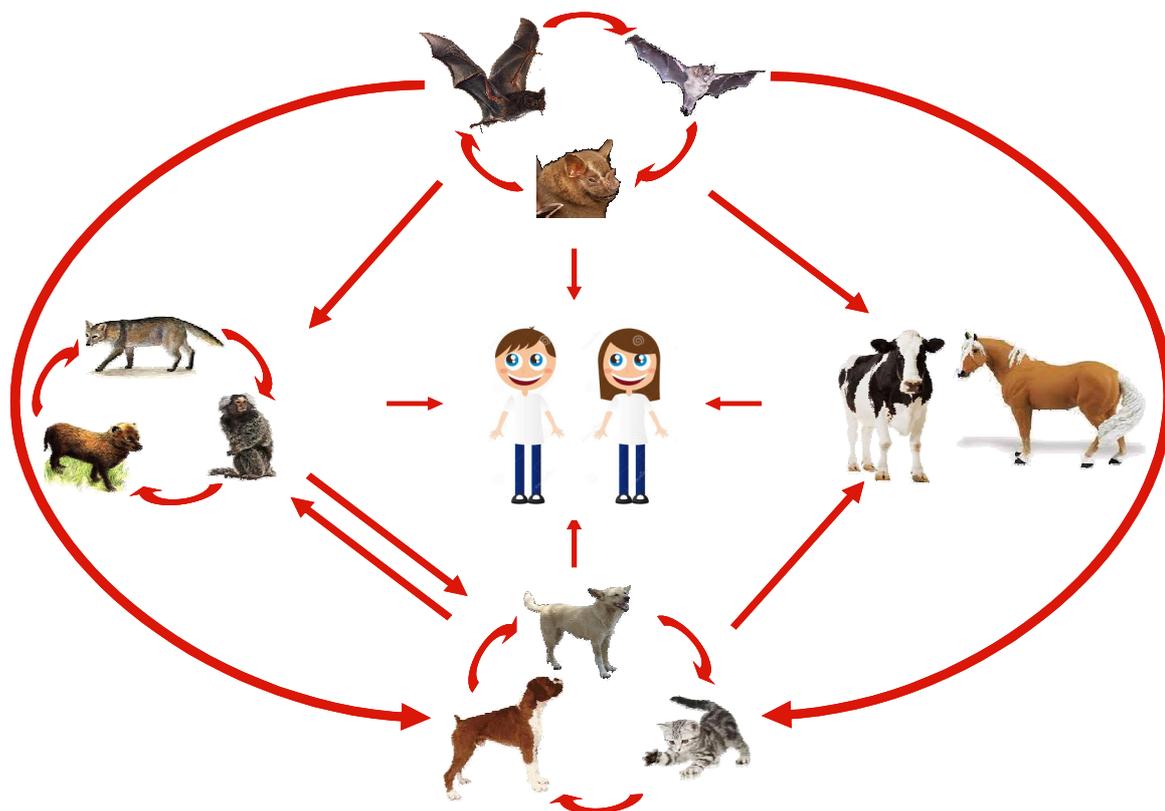


Figura 3 - Esquema do ciclo epidemiológico da raiva.

Fonte: Adaptado de KOTAIT et al.(2009)

As formas epidemiológicas da Raiva obedecem a uma divisão didática, sendo: ciclo urbano, ciclo rural, ciclo silvestre terrestre e ciclo silvestre aéreo (BRASIL, 2008). O ciclo urbano é principalmente caracterizado pela transmissão entre cães, onde o vírus é primariamente mantido na população canina, porém outros animais urbanos podem ser também infectados. Os cães são considerados os mais importantes transmissores da raiva para humanos, constituindo esta forma um

grave problema de saúde pública, devido ao estreito relacionamento entre as pessoas e seus animais de companhia (BRASIL, 2008).

O ciclo rural é mantido no campo pelo morcego hematófago *Desmodus rotundus*, que é o reservatório do RABV no ambiente rural. Desta maneira esta espécie de morcego pode transmitir o vírus para os animais de produção como bovinos, caprinos, suínos, equinos, etc. O número de casos de Raiva em herbívoros, confirmados laboratorialmente, mostrou um considerável acréscimo nos últimos anos, devido principalmente à intensa proliferação desta espécie de morcego hematófago e à crescente dificuldade de controle de suas populações (TAKAOKA et al., 2003; BRASIL, 2008).

O ciclo silvestre terrestre é representado pelas espécies de mamíferos silvestres terrestres, com ênfase nos canídeos silvestres como raposa, lobo, guaxinim, macaco e quati. Em nosso meio, a real importância desse ciclo não é, ainda, bem conhecida, razão pela qual se torna indispensável a implementação de programas de vigilância epidemiológica. Este ciclo é o de maior prevalência nos países desenvolvidos, em especial nas regiões em que a raiva urbana está sob controle (TAKAOKA et al., 2003; BRASIL, 2008).

O ciclo silvestre aéreo da Raiva tem, atualmente, uma grande importância para a manutenção do vírus em uma área geográfica. As diferentes espécies de morcegos, hematófagos ou não, são susceptíveis ao vírus, com possibilidade de transmiti-lo e de apresentar sintomatologia, que sempre evolui para a morte. Representa grande importância na manutenção e disseminação do RABV, fundamentalmente por serem os morcegos os únicos mamíferos que voam, e têm a capacidade de transpor grandes barreiras geográficas (BRASIL, 2008).

A Classe Mammalia possui cerca de 4.650 espécies, sendo todos susceptíveis ao RABV, porém, como reservatórios de importância em saúde pública, são mencionados duas ordens: Carnivora e Chiroptera. Entre as 1.120 espécies de morcegos, o que equivale a 20% do total de espécies conhecidas de toda a classe Mammalia, existem 18 famílias, nas quais se distribuem 168 gêneros e 986 espécies entre insetívoros, frugívoros e hematófagos. Na ordem Carnívora, em destaque estão as famílias Canidae (cães, raposas, “raccoon-dog”, cachorro do mato, etc); Procyonidae (guaxinim); Mustelidae (gambá) e Herpestidae (mangusto) (TADDEI, 1996; UIEDA et al., 1996; GONÇALVES et al, 2002; SODRÉ et al., 2010; LANGONI, SILVA, 2011; PAGLIA et al., 2012).

A epidemiologia da Raiva em morcegos e canídeos merece especial atenção das instituições governamentais e de pesquisadores, no intuito de introduzir estratégias que permitam limitar a dispersão da doença entre os animais silvestres, visando a possibilidade de eliminação da Raiva nestes importantes reservatórios, a partir do estabelecimento de uma vigilância epidemiológica coordenada, e se prevalecendo cada vez mais de procedimentos de diagnóstico laboratorial, seja antigênico e/ou genéticos, que permitam a realização de estudos integrados de genética e ecologia, para o conhecimento da dinâmica da doença no meio silvestre (KOTAIT *et al.*, 2007).

Faz-se importante ressaltar que as ações de controle da Raiva em representantes destas duas ordens possuem diferenças significativas. No que tange aos morcegos (ordem Chiroptera), apenas os morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*, são passíveis de controle, sendo que as demais espécies são protegidas por lei e somente são recomendadas ações de manejo (KOTAIT et al., 2007; JOHNSON et al., 2014).

Em animais da ordem Carnívora não se obtêm controle da Raiva somente utilizando ações que promovam o controle da densidade populacional, mas também com o uso concomitante da vacinação. Sendo este um assunto bastante estudado, principalmente em países onde a raiva urbana está sob controle, com grandes avanços na pesquisa de novas tecnologias de produção de vacinas orais (KOTAIT et al., 2007; JOHNSON et al., 2014).

Existem algumas características do RABV e também dos hospedeiros, que favorecem a perpetuação do vírus, entre elas podemos citar a alta densidade populacional dos animais e as intensas interações sociais que ocorrem entre eles, alta capacidade de deslocamento, principalmente quando trata-se de morcegos, e o longo período de incubação da doença quando comparado a outras viroses (KOTAIT et al., 2007).

Nos anos de 2004 e 2005, os morcegos hematófagos foram os principais transmissores de Raiva para os humanos na América Latina, sendo relatados 46 e 52 casos, respectivamente. Nestes anos deu-se a ocorrência do primeiro surto de Raiva humana transmitida por morcegos hematófagos na região Amazônica (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2006).

Em alguns municípios da região Amazônica, existem o que denomina-se de fatores facilitadores para a ocorrência de casos de raiva humana, entre eles podemos citar: condições de extrema pobreza da população, moradias vulneráveis, interferência do homem no meio ambiente, migrando para áreas antes nunca adentradas que provocou modificações no equilíbrio ecológico, desmatamento, etc. Nestas áreas os morcegos, que necessitam de alimentação diária, e embora tenham preferência por sangue de grandes animais, se alimentavam de sangue humano, especialmente crianças (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2006). Além da transmissão

da doença para os humanos, existem os prejuízos econômicos causados na produção agropecuária, sejam diretos ou indiretos (KOTAIT et al., 2007).

Cada vez mais observa-se a ocorrência de casos de Raiva em morcegos independente de seu hábito alimentar. Tal fato pôde ser comprovado principalmente nos estados do Pará e São Paulo, o que comprova a importância dos morcegos, de diferentes espécies, como reservatórios do RABV (LabRaiva/SAARB/IEC-dados não publicados; KOTAIT et al., 2007).

Na região Nordeste do Brasil, o cachorro do mato (*Cerdocyon thous*) e o guaxinim (*Procyon spp*) são hospedeiros do RABV. Muito provavelmente há a ocorrência de um ciclo especificamente na população de *Cerdocyon thous*, o que caracteriza uma adaptação do vírus a partir de cães domésticos à população de animais silvestres, dado ao sinantropismo dos mesmos na região (FAVORETTO et al., 2006; KOTAIT et al., 2009).

Nesta região também é relatada a descrição de um ciclo particular da Raiva, que tem como hospedeiro um primata popularmente conhecido sagui-do-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) que tem mantido desta forma uma variante antigênica e genética bastante distinta das linhagens anteriormente isoladas no país, fato comprovado através da técnica de tipificação antigênica. Este fato possibilita a perpetuação do vírus e a reintrodução do mesmo em áreas urbanas que estavam com a raiva em animais domésticos sob controle (FAVORETTO et al., 2001).

4.1.4 Transmissão

A transmissão do vírus geralmente ocorre através da saliva de um animal infectado para outro, embora outras vias sejam relatadas (membranas mucosas: olhos, nariz, boca), aerossóis e transplante de córnea e outros órgãos (fígado, rins, pulmão e enxerto vascular) (BURTON et al., 2005; HPA, 2005; SRINIVASAN et al., 2005). Em quirópteros, as transmissões transplacentárias e transmamárias também já foram relatadas (BRASIL, 2008). Há relatos de transmissão da doença em cavernas com grandes populações de morcegos, para humanos e animais, por via aerógena, bem como em laboratórios de produção e vacina (JOHNSON et al., 2014).

A transmissão percutânea do RABV é a mais frequente, visto que com a mordedura ocorre o depósito do vírus contido na saliva do animal infectado. Arranhaduras e lambeduras também são formas de transmissão, por exemplo arranhadura por unha de gato, que tem por hábito se lambe. Assim como a lambedura de mucosas (boca, narinas e olhos), por serem regiões mais finas e friáveis, pode propiciar a introdução do RABV (COSTA et al., 2000; GIBBONS, 2002; GONÇALVES et al., 2002; BURTON et al., 2005; JACKSON, 2008; KOTAIT et al., 2009).

Entretanto, em humanos, são relatados casos raros de ocorrência por transmissão via aerossol, através da penetração do vírus pela mucosa da orofaringe ou das vias aéreas superiores, fato que se deu pela entrada de indivíduos em cavernas densamente povoadas por grandes colônias de morcegos; e acidente de trabalho de dois profissionais que no ambiente laboratorial manipularam amostras contendo RABV, sem a exigência de realização de um dos esquemas de pré ou pós-exposição, além dos mesmos não terem adotado quaisquer medidas de

biossegurança adequadas, seja proteção individual (EPI) e/ou coletiva (EPC) (CONSTANTINE et al., 1968; CONOMY et al., 1977; COSTA et al., 2000; GIBBONS, 2002; GONÇALVES et al., 2002; BURTON et al., 2005; SRINIVASAN et al., 2005; XAVIER, 2005; PARK et al., 2006; JACKSON, 2008; KOTAIT et al., 2009; BRASIL - Diretrizes Gerais para o Trabalho em Contenção com Agentes Biológicos..., 2008; JACKSON, 2010).

A ocorrência de práticas sexuais com animais, conhecida como bestialismo ou zoofilia, também é relatada. A transmissão é devida a penetração do vírus pela pele e mucosa de região genital. No Brasil, há relato de dois casos de Raiva humana por essa forma de transmissão, um no Espírito Santo de um adolescente que mantinha relações sexuais com cabra, na década de 80, e outro em município do estado de São Paulo em que um adulto jovem do sexo masculino, que se deixava morder e lamber, na região genital, por cães no ano de 1997 (KOTAIT et al., 2009).

Transmissões inter-humanas também podem ocorrer. Tal situação ocorre quando se desconhece que a primeira pessoa que morreu de Raiva (caso índice), como consequência não se faz a suspeita do caso secundário. Na literatura dois casos são citados, ambos na Etiópia, um quando a mãe após sofrer mordedura em dedo da mão, do seu filho que estava infectado com RABV; e outra do filho que beijou a boca de sua mãe, inúmeras vezes, quando a mesma já estava infectada (KOTAIT et al. 2009). Ressalta-se que diante de um caso de Raiva humana, os envolvidos devem ser avaliados individualmente a fim de se verificar a necessidade de ser indicada a profilaxia da Raiva humana pós-exposição (KOTAIT et al., 2009).

Vias transplacentária e transmamária, também são descritas como formas de transmissão apenas em animais e não em seres humanos. No Brasil, existe a ocorrência de dois casos, em mulheres grávidas infectadas com o RABV, que

tiveram seus recém-nascidos retirados antes do óbito da mãe, quando então foram submetidos à Profilaxia da Raiva Humana. Um desses casos ocorreu no estado de São Paulo, durante a década de 60, e o outro em Pernambuco, na década de 90. Ambas as crianças não desenvolveram a doença. Por isso, nos casos de grávidas e talvez, puérperas sabidamente infectadas com o RABV, seus filhos devem receber esquemas com todas as doses de vacina contra a Raiva além do soro antirrábico (KOTAIT et al., 2009).

Em teoria, a transmissão por ingestão de carne, leite e seus derivados é mais difícil, pois há a necessidade de uma alta carga viral e/ou ferimento na oro faringe. Isto porque, durante o processamento dos elementos (cozimento, fervura, etc.) e a atuação do suco gástrico, com suas enzimas e por sua natureza ácida, inativam o RABV. Porém no caso de dúvidas sobre a possibilidade de transmissão da doença, deverá ser indicado o esquema de profilaxia pós-exposição de Raiva humana (KOTAIT et al.,2009).

Nguyen e colaboradores (2011) descreveram a transmissão por manipulação de carcaças no ano de 2009 no Vietnã, com registro de dois casos em indivíduos que manipularam carcaças de cão e gato. Neste país, devido o hábito de ingestão de carne desses animais, uma das vítimas manipulou a carcaça de um cão que havia sido atropelado e outro a carcaça de um gato que apresentou a doença durante quatro dias e posteriormente foi a óbito. A investigação epidemiológica chegou a estas conclusões após identificarem casos de Raiva humana furiosa sem relato de mordedura ou outro contato.

Outro importante mecanismo de transmissão pôde ser demonstrado a partir do uso de camundongos, para a realização da prova biológica como tentativa de isolamento do RABV, já que muitas mães podem tornar-se infectadas ao comerem

os filhos mortos pela doença. O que leva a crer que, em natureza, os animais carnívoros possam se infectar ao comerem carcaças de outros animais infectados. Por exemplo, gatos, raposas, etc, podem se infectar ao comerem morcegos doentes. Tal fato pode explicar a ocorrência de casos isolados de variantes antigênica 3 (VAg3) observados em gatos (REZENDE, et al., 1997; BARBOSA, 2007; DIETZSCHOLD et al., 2008).

Foram descritos na literatura oito casos de Raiva humana transmitida através de transplante de córnea. Em um desses casos, o doador sofreu um acidente automobilístico, creditando-se que a morte se deu por esse motivo e não por algum distúrbio neurológico ocasionado pela raiva. Ainda sobre esses casos, ressalta-se um que um dos pacientes teve um período de incubação longo, pois chegou a receber 2 doses de vacina, haja vista que o primeiro receptor da córnea do mesmo doador faleceu pela doença. Além da ocorrência de casos através de transplante de diversos órgãos como pulmão, fígado, rins e enxerto vascular, que foram transplantados em receptores diferentes, a partir de um único doador. Este morreu com um quadro clínico de encefalite sem etiologia definida. Estes casos ocorreram no Texas, EUA (HELMICK et al., 1987; CDC, 1999; BURTON et al., 2005; SRINIVASAN et al., 2005).

Na Alemanha, casos semelhantes também ocorreram. Três pacientes receberam transplante de rim, pulmão e pâncreas, e morreram com sintomas neurológicos progressivos. Relata-se que o doador tenha contraído a Raiva em uma viagem à Índia (HPA, 2005).

Nos últimos anos, os morcegos ganharam destaque quando refere-se a Raiva. Nesses animais a transmissão ocorre por meio de interações com indivíduos da mesma espécie ou diferentes, sabendo-se que os mesmos desenvolvem a

doença e morrem. Em morcegos hematófagos, a doença é identificada apenas quando uma alta porcentagem da população é infectada, sugerindo que apenas uma parte dos animais infectados apresentam sinais clínicos durante o desenvolvimento de uma resposta frente ao RABV. Assim estudos de soroprevalência podem fornecer informações sobre a circulação do RABV, a partir da detecção de anticorpos anti-RABV indicando que animais soropositivos foram expostos ao vírus (KOTAIT et al., 2009; BLACKWOOD et al., 2013; JOHNSON et al., 2014).

4.1.5 Aspectos clínicos

A Raiva é uma encefalite aguda quase invariavelmente fatal, que se manifesta, em média, 60 a 90 dias após a exposição ao vírus, porém pode ter períodos de incubação mais extremos, de uma semana até um ou mais anos. Os estágios clínicos da Raiva são: incubação, pródromo, sinais agudos neurológicos, coma e morte. A variabilidade do período de incubação depende de fatores como capacidade invasiva, patogenicidade, carga viral do inóculo inicial, ponto de inoculação, idade, imunocompetência do animal e/ou humano, entre outros (WARRELL, WARRELL, 2004; BRASIL, 2008; HEMACHUDHA et al., 2013).

Por sua vez, a determinação do período de incubação da Raiva natural especialmente em animais é de difícil comprovação, dada a dificuldade em registrar o momento exato da inoculação do vírus. Entretanto, estudos de infecção experimental realizados em diferentes animais, usando amostras virais de diferentes origens, têm mostrado variações, com períodos extremamente longos ou demasiadamente curtos (BRASIL, 2008).

A doença pode apresentar-se por formas clínicas distintas como: Raiva Furiosa, Raiva Paralítica e Raiva Muda ou Atípica. Ambas as formas clínicas diferem em relação à sintomatologia, ao período de morbidade e a fatores imunológicos. Apresentações atípicas são vistas em casos raros de sobreviventes à infecção pelo RABV (HEMACHUDHA et al., 2002; SMITH et al., 1991; TOLLIS et al., 1991; GERMANO, 1994).

4.1.5.1 Raiva Furiosa

Independente da espécie, a característica principal nesta forma da doença é agressividade, o que origina o termo “Raiva furiosa”. Em humanos o período de incubação médio é de 20 a 60 dias, embora haja relatos de períodos excepcionalmente longos, como o relatado por Boland e colaboradores (2013), quando um paciente oriundo de Rondônia, porém residente nos Estados Unidos, desenvolveu Raiva oito anos após ter sido agredido por um cão no seu Estado de origem. Tal fato teve sua comprovação através de estudos epidemiológicos e filogenéticos (CORRÊA, CORRÊA, 1992; REZENDE et al., 1997; ALBAS et al., 2011; TRAVASSOS DA ROSA et al., 2013).

Durante o pródromo os sinais e sintomas são inespecíficos, já na fase neurológica aguda manifesta-se sob as formas clássicas de apresentação da Raiva seguindo do coma, com evolução fatal em praticamente 100% dos casos (Figura 4). A infecção progride com manifestações de ansiedade e hiperexcitabilidade crescentes. A febre, em geral, está presente, assim como delírios, espasmos musculares involuntários generalizados quando em presença de água (hidrofobia)

ou de fluxo de ar (aerofobia), e/ou convulsões. Sialorreia abundante, disfagia, hiperacusia e fotofobia também são características (HEMACHUDHA et al., 2002; RUPPRECHT et al., 2002).

	↓ Exposição	↓ Sintomas inespecíficos	↓ Sinais neurológicos	↓ Coma	↓ Morte
Estágio clínico	Período de incubação	Fase prodrômica	Fase neurológica aguda	Coma	
Duração usual	20 a 90 dias em geral. Média 25 a 45 dias.	2 a 10 dias. Depende da assistência médica, medicamentosa e/ou hospitalar ao paciente.	2 a 7 dias ou mais. Depende da assistência, medicamentosa e/ou hospitalar ao paciente.	0 a 14 dias ou + Depende da assistência ao paciente.	

Figura 4: Esquema ilustrativo dos períodos e das manifestações clínicas em casos de Raiva humana. Fonte: Brasil, 2008

Nos animais em geral, principalmente cães, gatos e canídeos silvestres os sintomas apresentam-se com muita semelhança, sendo um período prodrômico de um ou dois dias, que mostra o animal intranquilo, com discreta ou nenhuma mudança de hábitos, isolamento e inapetência. Após esse período, o animal mostra agressividade, podendo atacar outros animais e seu próprio dono, no caso de animais domésticos. São observadas também ereção e polaciúria, latido rouco. Alguns animais desenvolvem períodos de paralisia intercalados com os de agressividade. Os gatos raivosos exibem sintomas semelhantes aos de cães, mas têm uma tendência a esconder-se em lugares afastados (BRASIL, 2008; CORRÊA, CORRÊA, 1992; LACKAY et al., 2008).

4.1.5.2 Raiva Paralítica

Em humanos a doença se apresenta, tipicamente com dor, prurido e parestesias no local da mordedura, evoluindo com paralisia muscular flácida precoce. A sensibilidade, em geral, é preservada. Nesta forma, a febre é marcante e a sialorreia é menos pronunciada. O quadro de paralisia leva a alterações cardiorrespiratórias, retenção ou incontinência urinária, obstipação intestinal. A consciência é preservada na maioria dos casos, sendo o diagnóstico da forma paralítica mais difícil, especialmente na ausência de história de agressão, sendo muito confundida com a Síndrome de Guillain-Barré (HEMACHUDHA et al., 2002).

Nos animais o período prodrômico também costuma ser de um ou mais dias. Apresentando anorexia, dificuldade de locomoção com andar cambaleante (CORRÊA; CORRÊA, 1992). Diarreia, obstipação também são observadas. Em herbívoros, ocorre atonia rumenal, timpanismo, pelo eriçado e opistótomo (REZENDE et al., 1997). É a forma de ocorrência mais frequente em bovinos, quando transmitida por morcego, e o período de incubação varia entre 25-150 dias. São raros os acessos de fúria, podendo ocorrer prurido no local de mordida do morcego e a emaciação é notória. Os sinais de paralisia se iniciam 2-3 dias após o início dos sintomas; a enfermidade dura 2-5 dias, podendo estender-se a 8-10 dias (ACHA; SZYFRES, 1986). Em cães, o animal apresenta sialorreia, latido bitonal onde o animal não consegue se alimentar ou beber água devido à paralisia mandibular. É comum o animal ter obstipação intestinal e ocorrer protrusão de ânus, sobrevivendo à morte em 5-10 dias de doença. Em equinos há poliúria, sendo a característica marcante sinais do trato gastrointestinal lembrando quadro de cólicas.

(CORRÊA; CORRÊA, 1992).

A Raiva em morcegos se caracteriza principalmente pela paralisia das asas, o que favorece o encontro desses animais em locais e horários não habituais, principalmente durante o dia. Portanto, morcegos hematófagos ou não, encontrados nestas condições, são considerados potencialmente suspeitos de estarem infectados com o RABV. Nesses casos é recomendado o envio do espécime para o diagnóstico laboratorial (UIEDA et al., 1995; BRASIL, 1998; TAKAOKA et al., 2003; CORRÊA, CORRÊA, 1992; REZENDE et al., 1997; FAVORETTO et al., 2002;).

4.1.5.3 Raiva Muda ou Atípica

Em alguns casos, os animais podem não ocorrer sinais de hiperreatividade, ou estes serem de pouca duração, parecendo os animais estarem num estado de estupor (SWANGO, 1997). Este tipo de manifestação da Raiva é a que menos se apresenta e a mais difícil de diagnosticar, sendo mais observada nos cães (CORRÊA; CORRÊA, 1992).

Além das formas clínicas descritas, a Raiva pode ocorrer em formas mistas e em geral, a forma muda progride para paralítica ou agressiva, ou seja, raramente se mantém muda até o fim. Sugere-se que a variabilidade se deve-se às diferentes cepas virais, sua patogenicidade e diferentes áreas afetadas no SNC (Corrêa e Corrêa, 1992).

4.1.6 Patogênese

Após infecção periférica do vírus da raiva a partir de uma mordedura, meio mais comum de transmissão, há uma sequência de eventos que ocorrem, dentre os quais se inclui replicação em tecidos periféricos, propagação ao longo dos nervos periféricos e da medula espinhal para o cérebro, disseminação no SNC e propagação de forma centrífuga pelos nervos do SNC a vários órgãos (JACKSON, 2007)

Após a infecção é provável que ocorra uma primeira replicação do vírus (BLOOD; HENDERSON; HADOSTITS, 1983; FERNANDES, 2001) que se liga aos receptores da acetilcolina nos miócitos (tecido muscular) na área da mordedura (CORRÊA; CORRÊA, 1992, JUBB; KENNEDY; PALMER, 1993). Após ocorre progressão do vírus, do músculo até o SNC, que pode ser rápida ou demorar meses, dependendo dos fatores que interferem no período de incubação (JUBB; KENNEDY; PALMER, 1993). Há possibilidade que a imunidade contribua para a patogênese da raiva, pois camundongos imunizados inadequadamente podem morrer mais rapidamente de raiva que controles não vacinados (CONSALES, BOLZAN, 2007).

O vírus invade os neurônios motores através dos terminais axonais ou neurônios sensoriais através do fuso neuromuscular ou dos terminais axonais. Na sequência o vírus progride de forma centrípeta seguindo o fuso axonal retrógrado. Os vírus que seguem via neurônios motores chegam aos cornos ventrais da medula espinhal e núcleos motores do tronco encefálico, que compõem o SNC. Já os que progridem via neurônios sensoriais chegam até os gânglios crânio-espinhais e, então atingem o SNC (figura 5) (JUBB, KENNEDY e PALMER, 1993).

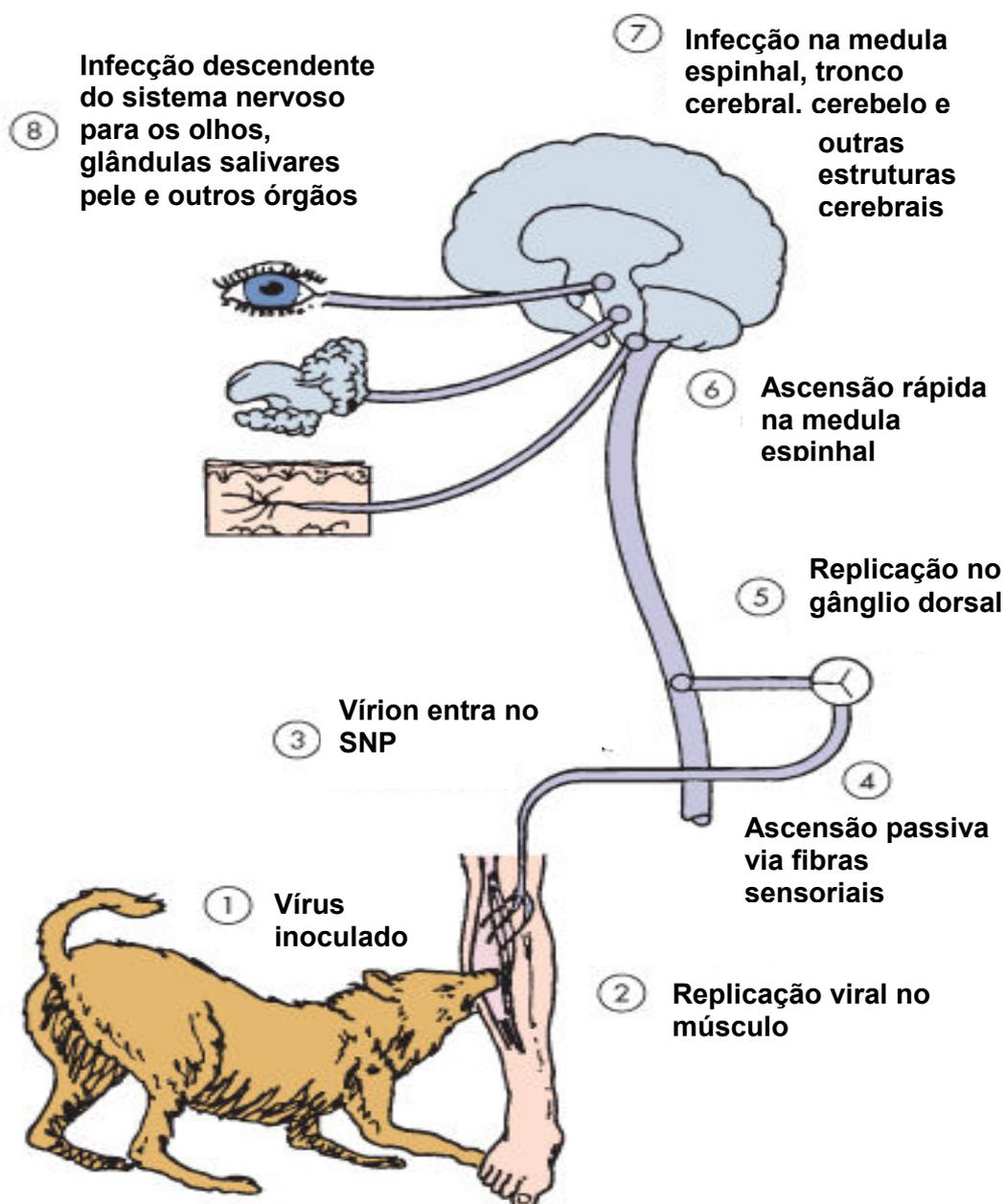


Figura 5: Patogênese da infecção pelo vírus da Raiva
 Fonte: Adaptado de Murray (1992), <http://www.studentconsult.com>.

Para penetração do RABV nas células é necessária a interação com receptores específicos expressos pelo tipo celular ao qual o vírus é específico, ou seja, o tropismo celular (LORENZI, COELHO-CASTELO, 2011). Receptores nicotínicos da Acetilcolina (nAChR), molécula de adesão neuronal (NCAM) e o receptor de baixa afinidade a neurotrofina N75(p75NTR) são identificados pela

glicoproteína do RABV para ligação, mas outros componentes associados a membrana também são implicados na adsorção viral (LAFON, 2005; JACKSON, 2007). Ao ligar-se a um dos seus receptores, RABV entra na célula e ativa sinalização a “downstream” que lhe permite sequestrar e manipular a maquinaria e transporte axonal. Embora p75NTR seja conhecido por estar envolvida no transporte retrógrado de fatores neurotróficos, pouco se sabe a respeito de sua contribuição direta para o transporte viral (GLUSKA et al., 2014)

Uma vez no SNC, a disseminação é rápida, ocorrendo através das sinapses de forma trans-neural, seguindo de disseminação ativa de forma centrífuga para os nervos periféricos e invasão de tecidos com inervação abundante, tais como glândulas salivares, onde o vírus pode replicar no epitélio dos ácinos e ser eliminado junto com a saliva através dos ductos. Desta forma, nos casos fatais o RABV pode ser encontrado no SNC e periférico, nos demais tecidos e em secreções como o leite. Vale ressaltar que nos morcegos o vírus tem maior afinidade pela glândula salivar do que pelo tecido nervoso (JUBB; KENNEDY; PALMER, 1993).

O mecanismo de patogenicidade do vírus rábico se dá pela inibição da síntese de proteína celular do hospedeiro e pelo tropismo viral por nervos periféricos e células do SNC (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000). Após a introdução do vírus ocorre o desencadeamento de eventos ao nível celular tais como: adsorção, penetração, desnudamento, transcrição, tradução, replicação, montagem e brotamento virais (figura 6) (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002).

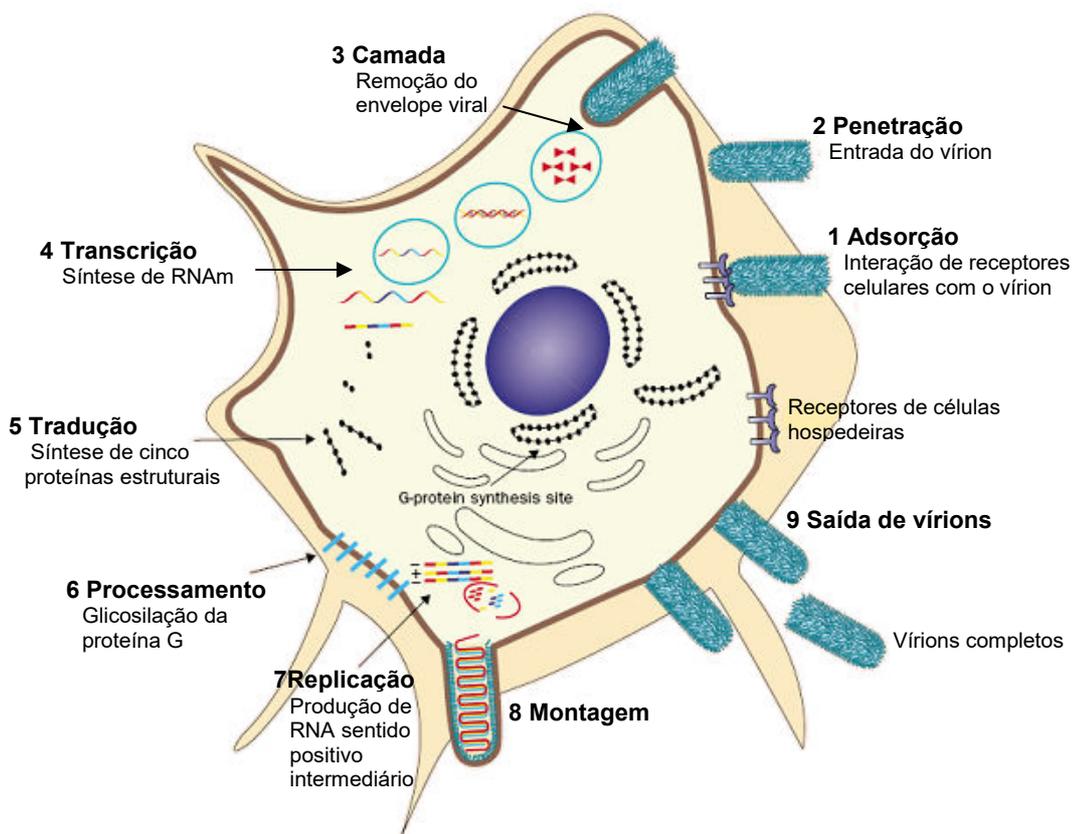


Figura 6 - Esquema ilustrativo da recepção, entrada, transcrição, tradução, replicação e saída de partículas virais.

Fonte: Adaptado de Rupprecht, Hanlon, Hemachudha, 2002.

Após a ligação do vírion à célula hospedeira, o mesmo é envolvido pela célula por endocitose. Segue-se à liberação do genoma viral no citoplasma por fusão mediada pela glicoproteína, o que implica pequenas mudanças conformacionais na mesma. O primeiro evento após a entrada da célula é a transcrição dos seus genes, produzindo cinco RNA mensageiros (RNAm) monocistrônicos, seguido da síntese de seu genoma complementar de fita positiva (5'-3') (BADRANE et al., 2001).

Uma vez no SNC, a disseminação é rápida, ocorrendo através das sinapses de forma trans-neural, seguido de disseminação ativa de forma centrífuga para os nervos periféricos e invasão de tecidos com inervação abundante, tais como glândulas salivares, onde o vírus pode replicar-se no epitélio dos ácinos e ser

eliminado junto com a saliva através dos ductos. Resposta imune inata parece estar modulada de acordo com a patogenicidade do vírus em adição à ausência de resposta imune eficiente do SNC; sugere-se que as cepas virais tem selecionado estratégias imuno-subversivas para escapar da resposta imune do hospedeiro. O decréscimo da resposta imune claramente depende da patogenicidade da amostra (LAFON, 2007).

4.1.7 Diagnóstico

A Raiva está presente em todo o território nacional, sendo confirmada laboratorialmente através da detecção do vírus em animais infectados, podendo ser considerada endêmica em graus diferenciados de acordo com a região geopolítica (KOTAITet al., 2009). Sua forma de apresentação é variável nas diferentes espécies de mamíferos, razão pela qual todo animal suspeito deve ter o sistema nervoso central coletado e enviado, em condições adequadas, ao laboratório de diagnóstico, para a confirmação de uma suspeita clínica. Preferencialmente o laboratório de diagnóstico deverá receber amostras em bom estado de conservação, devidamente identificadas, e com ficha de remessa de material suficientemente explicativa (Brasil, 2008; 2014).

O diagnóstico da Raiva animal é necessário para o conhecimento do risco da doença em uma região e para a adoção de medidas específicas de controle, na dependência da espécie animal, e especialmente em equinos deve ser garantida a remessa de medula e tronco encefálico (Figura 7). Em casos humanos, o diagnóstico deve ser considerado em todo paciente que apresentar encefalopatia de

causa desconhecida. O laboratório de diagnóstico deverá receber amostras em bom estado de conservação, devidamente identificadas e com ficha de remessa de material suficientemente explicativa (Brasil, 2008; Brasil, 2014).

Espécie Animal	Parte(s) do SNC a ser(em) coletada(s) (preferencialmente)
Humana	Cérebro, cerebelo e medula
Canina/felina	Corno de Amon, cérebro e medula
Bovino	Cerebelo, tronco encefálico e medula
Equídeos (cavalo, jumento, burro)	Tronco encefálico e medula
Ovino, caprino e suíno	Cerebelo, tronco encefálico e medula
Animais silvestres	Quando possível, enviar animal inteiro, para identificação da espécie. Se não, cérebro, cerebelo e medula

Figura 7: Espécie animal e fragmento de eleição do SNC a ser coletado para o diagnóstico laboratorial da Raiva.

Fonte: BRASIL, Ministério da Saúde, 2014.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda para o diagnóstico específico o uso das técnicas de Imunofluorescência Direta (IFD), conforme descrita por Dean, Abelseth e Atanasu(1996), e a Prova Biológica (PB) segundo Koprowsky (1996) como os principais métodos para o diagnóstico específico da raiva. São testes com alta sensibilidade e especificidade, que devem ser utilizados simultaneamente, para a detecção de antígenos virais e tentativas de isolamento viral, respectivamente (MESLIN, KAPLAN, 1996).

Em humanos, quando o paciente em vida, o teste de IFD pode ser feito em impressão de córnea, raspado de mucosa lingual (suabe), tecido bulbar de folículo piloso obtidos por biópsia de pele da região cervical, além do soro para pesquisa de anticorpos neutralizantes (AcN) para o RABV que é uma técnica

utilizada para avaliação sorológica de indivíduos previamente imunizados e expostos ao risco de contrair a doença, porém a presença de anticorpos neutralizantes em soro e líquido cefalorraquidiano (LCR) de indivíduos não vacinados é indicativa de raiva, mas esses resultados só ocorrem no estágio terminal da doença. A sensibilidade dessas provas, isoladamente, é limitada e, quando negativas, não se pode excluir a raiva (CHAVES et al., 2007; SMITH; YAGER; BAER, 1996; DEAN; ABELSETH; ATANASU, 1996; KISSLING, 1975; ZAIDMAN; BILLINGSLEY, 1998).

Após a morte, a realização de necropsia é fundamental para a confirmação diagnóstica, sendo a IFD realizada em impressões de tecido nervoso (encéfalo), permanecendo esta técnica de eleição para o diagnóstico de Raiva, por ser um método rápido, sensível e específico para esse diagnóstico (DEAN; ABELSETH; ATANASU, 1996; KISSLING, 1975). A prova biológica é realizada para a tentativa de isolamento do vírus após a inoculação de material suspeito em camundongo albino suíço (KOPROWSKY, 1996); a incubação nesses animais varia de 5 a 20 dias, porém com uma média de 7 dias e a confirmação pode ser feita através da IFD.

Outro método laboratorial utilizado para o diagnóstico da raiva porém menos utilizado é o histopatológico. Nesta técnica, é realizada a busca pelas inclusões citoplasmáticas, patognomônicas para a Raiva, conhecidas como corpúsculos de Negri, ricas em antígenos virais, facilmente identificáveis pelas colorações de Sellers e Hematoxilina-Eosina, porém de baixa sensibilidade (LEPINE; ATANASIU, 1996).

Os avanços tecnológicos das ciências biológicas, notadamente a biologia molecular, permitiram aprofundar os conhecimentos sobre o vírus, a patogenia e a imunoprevenção da infecção, assim como o desenvolvimento de métodos diagnósticos

mais sensíveis e específicos (GERMANO, 1994).

4.1.8 Profilaxia e tratamento

Após a exposição, a profilaxia contra a Raiva deve ser iniciada o mais precocemente possível. Dentre os esquemas preconizados, a eleição do mesmo deve ocorrer de acordo com a situação vivenciada. São adotados dois esquemas de profilaxia para a Raiva são eles: Profilaxia Pré-exposição e Pós-exposição. Casos em que a pré-exposição deve ser indicada são aqueles que as pessoas estão em risco permanente de exposição ao vírus como Médicos Veterinários, Biólogos, profissionais de laboratório, estudantes de medicina veterinária e áreas afins (BRASIL, 2014).

Indivíduos em risco ocasional, como turistas, quando estes viajam para áreas onde a Raiva não é controlada, devem ser avaliados de forma individual, sendo que eles podem receber a profilaxia pré-exposição, dependendo do risco a que serão expostos. O esquema de pré-exposição apresenta algumas vantagens em relação ao esquema de pós-exposição como: simplifica a terapia pós-exposição, a partir da diminuição do número de doses da vacina, além de desencadear uma resposta imune secundária mais rápida, quando iniciado o esquema pós-exposição (BRASIL, 2014).

Até 2004, eram contabilizados 5 casos de cura da Raiva, em que os pacientes sobreviveram após tratamento. Antes deste ano, uma adolescente de 15 anos de idade, residente em Wisconsin, EUA, foi infectada após manipular um morcego insetívoro. O diagnóstico foi realizado pela titulação de anticorpos

antirrâbicos, sem que a mesma tenha recebido vacina ou soro antirrâbico. Por não ter recebido assistência médica no momento da mordedura, a doença se instalou cerca de 1 mês após agressão. Como tratamento foi utilizado o Protocolo de Milwaukee, nome do município onde ocorreu o caso. A paciente sobreviveu praticamente sem sequelas, pois logo no início dos sintomas o tratamento foi iniciado (KOTAIT et al., 2009).

O tratamento é baseado em dois princípios: I) Indução do coma, utilizando agentes anti-excitatórios, no caso a ketamina, que é um anestésico, com efeito hipnótico e com características analgésicas; midazolam, hipnótico, ansiolítico, anticonvulsivante, miorelaxante e fenobarbitúricos, que são drogas antiepiléticas, utilizadas no tratamento de convulsões; II) terapêutica específica com medicamentos como a ribavirina, que é uma droga antiviral de largo espectro contra os vírus de RNA, que atua no início da transcrição viral, e são capazes de prevenir a replicação viral e a amantadina, que é uma droga antiparkinsoniana, estimulante da liberação da dopamina, que age inibindo a liberação do ácido nucléico viral no citoplasma da célula, além da paciente ter sido mantida heparinizada. Não foi utilizado nenhum tipo de interferon, por estes serem neurotóxicos e também não foi aplicada nenhuma dose de vacina ou soro antirrâbico homólogo ou heterólogo. Após este caso, este protocolo foi aplicado em outros pacientes, não se obtendo êxito em nenhum. Porém, ressalta-se que nesses outros o estado clínico do paciente era muito grave ou terminal (KOTAIT et al., 2009).

Em 2008 na Colômbia, foi descrito um caso como sendo de cura da Raiva, porém o paciente em questão veio a óbito após ter se recuperado da infecção. Assim, o Brasil detém o segundo caso de cura da Raiva humana, ocorrido após utilização de um protocolo, baseado no protocolo de Milwaukee, recebendo a

denominação de Protocolo de Recife. Este caso ocorreu em Recife, em um adolescente de 15 anos, residente no sertão de Pernambuco que foi agredido por um morcego hematófago. O paciente chegou a receber quatro doses de vacina antirrábica elaborada em cultura de células VERO, antes de apresentar os sintomas e uma quinta dose foi aplicada quando já se encontrava o quadro clínico instalado. Em nenhum momento foi utilizado soro antirrábico homólogo ou heterólogo (BRASIL, 2009; KOTAIT et al., 2009).

A doença foi diagnosticada laboratorialmente, através da RT-PCR da biópsia de pele da região da nuca, seguida da caracterização genética e dosagens de anticorpos antirrábicos. Após estabelecimento do tratamento, foram realizadas, três novas coletas de amostras de folículo piloso, que resultaram negativas, sendo o caso considerado como curado (BRASIL, 2009; KOTAIT *et al.*, 2009).

O paciente em meados de setembro de 2009 teve alta, com sequelas motoras. Por isso, frente a uma suspeita de Raiva humana, no Brasil, pode-se tentar o tratamento, com a terapêutica utilizada - Protocolo de Recife. A primeira cura de Raiva humana no Brasil, bem como o sucesso terapêutico da paciente dos Estados Unidos, abriram novas perspectivas para o tratamento desta doença, considerada até então letal (BRASIL, 2009; KOTAIT et al., 2009).

4.2 SISTEMA NERVOSO

O sistema nervoso possui características anatômicas e fisiológicas únicas, quando comparado a outros órgãos, tais como o revestimento protetor ósseo do crânio e coluna vertebral, sistema especializado de autorregulação do fluxo

sanguíneo cerebral, necessidade de substratos metabólicos, ausência de sistema linfático convencional, uma circulação especial de líquido cerebrospinal (LCE), supervisão imunológica limitada e respostas distintas à lesão e a cicatrização de ferimentos (FROSCH; ANTHONY; GIROLAMI, 1999).

O sistema nervoso dos vertebrados anatomicamente pode ser dividido em duas partes, com diferenças morfológicas e fisiológicas significativas, são elas, (i) o SNC, composto por encéfalo, medula espinhal e partes neurais do olho; e (ii) o SNP, composto por gânglios periféricos, nervos e terminações nervosas que conectam os gânglios ao SNC e receptores e efetores do corpo (KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

O SNC, no adulto, é constituído por neurônios e células da glia ou células de sustentação, o chamado tecido conjuntivo do SNC. Ao contrário dos neurônios, as células da glia não recebem nem transmitem sinais elétricos, possuem a função de fornecer suporte estrutural e manter condições locais para a função neuronal (KIERSZENBAUM; TRES, 2012; STEVENS; LOWE, 1995), estando envolvidas em atividades fundamentais para o desenvolvimento, defesa, nutrição e homeostase do parênquima cerebral (BRODAL, 2010).

Quando o SNC é danificado, as células gliais são mobilizadas, realizam a “limpeza geral dos resíduos” e fecham a área local, levando posteriormente a uma cicatriz glial (gliose), a qual interfere na regeneração neuronal. As células da glia incluem astrócitos, oligodendrócitos, e micróglia (KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

Astrócitos são divididos em duas categorias, os fibrosos, predominantemente encontrados na substância branca, e os protoplasmáticos, de predominância na substância cinzenta. Formam a glia limitante, que circunda a maioria dos capilares do encéfalo e toda a superfície interna da pia-máter. Possuem um grande número de filamentos gliais denominados de proteína ácida fibrilar glial,

valioso marcador para identificação de astrócitos por imunohistoquímica (KIERSZENBAUM; TRES, 2012; STEVENS; LOWE, 1995)

Oligodendrócitos são células que participam da formação da bainha de mielina que envolve os axônios na substância branca do cérebro (KIERSZENBAUM; TRES, 2012; BRODAL, 2010; STEVENS; LOWE, 1995).

A micróglia é mobilizada normalmente após infecções, lesões ou doenças degenerativas do sistema nervoso, comportando-se como fagócitos (KIERSZENBAUM; TRES, 2012; BRODAL, 2010; STEVENS; LOWE, 1995), seu fenótipo a caracteriza como célula dendrítica apresentadora de antígenos tendo baixo nível de atividade fagocitária.

Quando em estado ativo, em caso de doença, elas aumentam em tamanho e número e geralmente são suplementadas pelos monócitos (STEVENS; LOWE, 1995), assim, as micróglias se caracterizam pela forma ameboide, acompanhada pela regulação positiva de moléculas de superfície celular, como CD14, receptores do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II e os receptores de quimiocinas. Removem as células neurais em apoptose, eliminam debris tóxicos e aumentam a sobrevivência neuronal pela liberação de fatores tróficos e antiinflamatórios, assim como direciona células tronco para o local da inflamação ou lesão. Micróglias podem tornar-se hiperativadas e apresentar efeitos neurotóxicos pela produção excessiva de superóxido, óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) (KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

As células da glia respondem as lesões neuronais com mudanças morfológicas e funcionais, fenômeno conhecido por ativação glial (REISCHKE; KRIEGLSTEIN, 1991; JORGENSEN et al., 1993). Essa reação, particularmente da micróglia, é o mecanismo inicial de defesa do sistema nervoso (DIRNAGL et al.,

1999). Em cultura, a micróglia é estimulada a produzir radicais livres, aminoácidos excitatórios, citocinas inflamatórias, bem como fatores tróficos, sugerindo que a atividade microglial tem duplo papel: defesa do organismo e envolvimento nos processos patológicos (ZHANG, 2003; ROZENFELD et al., 2003).

O epêndima, epitélio simples cúbico, reveste a superfície dos ventrículos encefálicos e o canal central da medula espinhal, consiste em células endimárias e tanicitos. O epêndima limita o espaço ventricular do cérebro dos vertebrados. O plexo coróide é a combinação de células que se diferenciaram em células secretoras, com os vasos sanguíneos das meninges. O epitélio do plexo coróide representa uma barreira entre o sangue e o líquido cerebrospinal (LCE), que é produzido no plexo coróide do terceiro e quarto ventrículos (KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

A unidade funcional do SNC é o neurônio, célula nervosa excitável e altamente especializada. Composto por três regiões principais: corpo celular, os dendritos e o axônio (KIERSZENBAUM; TRES, 2012; BRODAL, 2010; STEVENS; LOWE, 1995). Possuem estrutura e tamanho bastante variável em cada uma das regiões cerebrais, diferem também entre si, em muitas importantes propriedades: seus papéis funcionais, distribuição de suas conexões, neurotransmissores utilizados para transmissão sináptica, necessidades metabólicas e níveis de atividade elétrica. Um grupo de neurônios pode ser selecionado para destruição em dada situação patológica (vulnerabilidade seletiva) por dividir uma ou mais de suas propriedades (FROSCH; ANTHONY; GIROLAMI, 2004).

A sinapse é a junção celular específica que permite a comunicação direta entre células, quando uma substância transmissora é secretada de maneira localizada por uma célula e recebida exclusivamente por outra (STEVENS; LOWE,

1995) para a transmissão da mensagem química em resposta a um potencial de ação o terminal sináptico é especializado, onde terminal pré-sináptico, normalmente um axônio, responsável pela transmissão, e membrana pós-sináptica, normalmente dendrítico ou somático, por vezes axonal, recebem a informação (KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

O transporte axonal é importante na patogênese de doenças infecciosas neurológicas, como a raiva, e podem ocorrer em dois sentidos: transporte axonal anterógrado de neurotransmissores, mediado pela quimesina, é o que ocorre do corpo celular aos terminais axonais; e o transporte axonal retrógrado, mediado pela dineína citoplasmática, de fatores de crescimento e para reciclagem de componentes do terminal axônico, ocorre dos terminais axônicos para o corpo celular (KIERSZENBAUM; TRES, 2012; STEVENS; LOWE, 1995).

O SNC é protegido por três elementos estruturais: a barreira hematoencefálica (BHE) com a interface entre o encéfalo e os vasos sanguíneos; a barreira sangue - líquido cerebroespinal (LCE), formada pelo plexo coróide e a membrana aracnóide com os vasos sanguíneos e o LCE; e a barreira e sangue – aracnóide, que é a interface dos vasos sanguíneos com a camada do epitélio da aracnóide subjacente a dura-máter das meninges. Estas barreiras são estruturas especializadas do SNC que controlam e regulam a homeostase do cérebro, medula espinal, LCE com o resto dos sistemas (BANKS, ERICKSON, 2010, ROJAS; RITTER; PIZZOL, 2011).

A BHE é composta por um endotélio microvascular, astrócitos, membrana basal, e pericitos, assim como neurônios que estão em proximidade física do endotélio. Todos estes elementos fazem parte da unidade funcional neurovascular (PERSIDSKY et al., 2006), além de diferentes complexos multi-

proteicos, como as junções apertadas ou de oclusão e as junções endoteliais aderentes que são os principais reguladores da permeabilidade celular, estas possuem proteínas de membrana chamadas caderinas, que se unem com a actina via proteínas intermediárias, denominadas cateninas (α, β, χ), para formar contatos adesivos intercelular e atuar conjuntamente as junções de oclusão (figuras 8 e 9) (ROJAS; RITTER; PIZZOL, 2011).

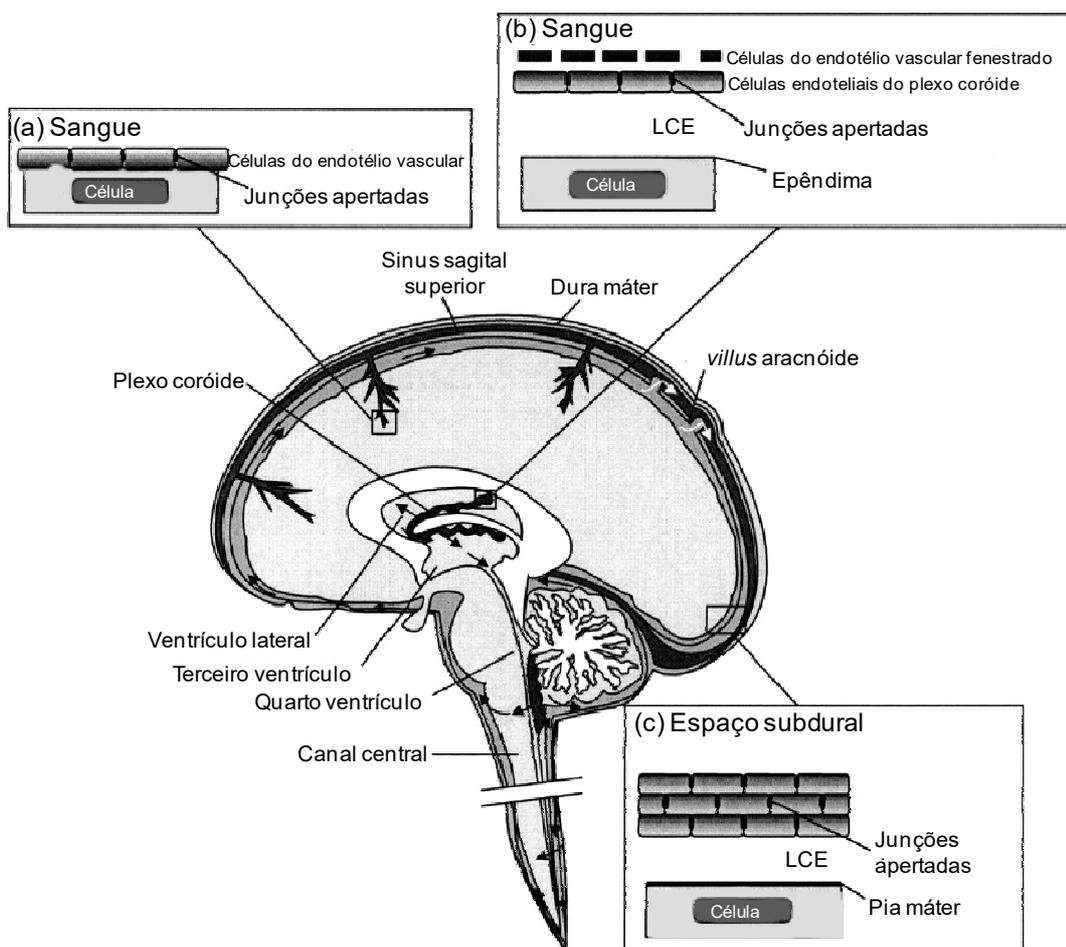


Figura 8 -Representação esquemática das barreiras do cérebro. (Acima) Existem três sítios principais de barreira entre o sangue e o cérebro. (a) É criada ao nível das células endoteliais dos capilares cerebrais por formação de junção de oclusão. (b) A barreira sangue-LCE encontra-se nos plexos coróides nos ventrículos laterais, terceiro e quarto do cérebro onde são formadas junções apertadas entre as células epiteliais na superfície que confronta com o LCE. (c) A barreira aracnóide. encontra-se sob a dura máter. A aracnóide é avascular, mas fica perto do seio sagital superior e está separado dela pela dura máter. A aracnóide é um epitélio de múltiplas camadas com junções apertadas entre as células da camada interior que formam uma vedação eficaz
Fonte: Adaptado de Abbott et al.(2010).

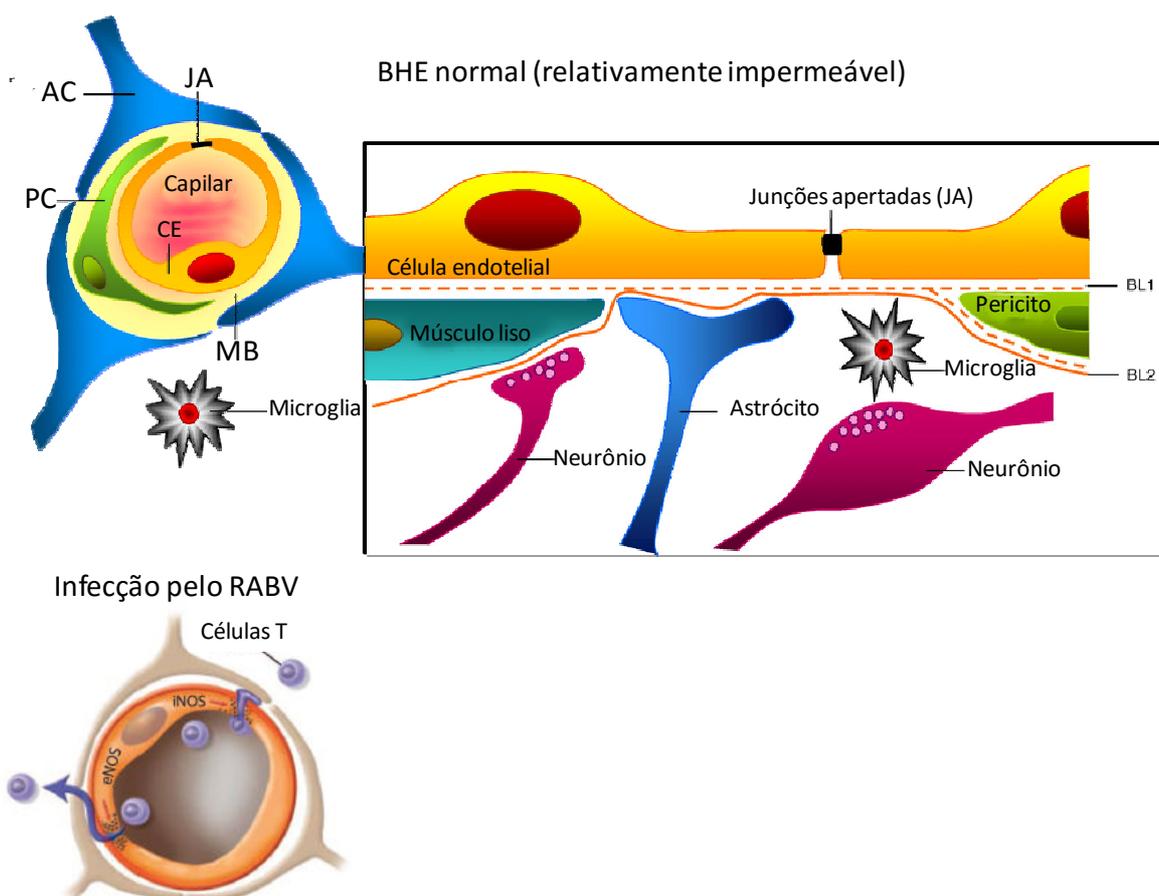


Figura 9 - Representação esquemática das associações celulares na BHE. Corte transversal de um capilar cerebral. A circunferência do lúmen capilar está completamente rodeada por uma única célula endotelial (CE), as membranas basais estão ligadas por JA. Pericitos (PC) estão ligados à superfície abluminal da CE, e estes dois tipos de células estão rodeados por a lâmina basal (MB), que é contígua com as membranas plasmáticas dos astrócitos (AC) e CE que vedam o caminho paracelular de difusão aquosa entre as células. Tanto as células endoteliais cerebrais e os pericitos são delimitados por, a membrana basal local, que forma uma matriz extracelular perivascular distinta (lâmina basal 1, BL1), diferente da composição a partir da matriz extracelular do pé terminal da glial delimitadora do parênquima cerebral (BL2). Alterações nas relações entre células endoteliais e astrócitos que ocorrem de alterações da permeabilidade e a inflamação no SNC na infecção pelo RABV.

Fonte: Adaptado de Ballabh, Braun, Nedergaard, 2004; Hawkins, Davis, 2005; Pardridge, 2007; Fabis et al., 2008; Abbott et al., 2010

As junções de oclusão, por sua vez, são formadas por três proteínas integrais de membrana, denominadas claudinas (asseguram a alta resistência elétrica das monocamadas das células endoteliais e diminuição da permeabilidade paracelular), ocludinas (regulam a seletividade paracelular aos íons pequenos) e moléculas de adesão juncional um grande número de proteínas citoplasmáticas acessórias (zonulaoccludens, cingulina, proteínas guanilatoquinase associadas

amembrana), que conectam as proteínas de membrana à actina para a manutenção da integridade estrutural e funcional do endotélio (ROJAS; RITTER; PIZZOL, 2011).

Sob condições fisiológicas, assegura o fornecimento constante de nutrientes (oxigênio, glicose, e outras substâncias) para as células do cérebro e orienta as células inflamatórias para responder às alterações do ambiente local. As células gliais e neurônios podem regular a função dos vasos sanguíneos em resposta às exigências metabólicas (PERSIDSKY et al., 2006).

O transporte em toda a BHE é estritamente limitado através das junções de oclusão, que são barreiras físicas metabólicas. A permeabilidade restrita é fator limitante para a entrada de agentes terapêuticos para o SNC (PESIDSKY et al. 2006). Além das funções de permeabilidade seletiva a BHE possui aspectos importantes como funções neuroimune, incluindo a secreção de citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico (ROJAS; RITTER; PIZZOL, 2011).

A característica determinante para que uma substância atravesse a BHE é sua lipossolubilidade; sendo uma estrutura dinâmica que, sob determinadas influências pode modificar suas características de permeabilidade, levando a um aumento no aporte de determinados substratos da periferia para o SNC ou em sentido contrário a fim de remover substâncias do SNC (SARMENTO, 1992). BHE com danos físicos ou alterações nos sistemas de transporte desempenham um papel importante na patogênese de muitas doenças do SNC. Substâncias pró-inflamatórias e proteínas associadas a doenças específicas, muitas vezes mediam tal disfunção da BHE. Apesar de aparentemente diversas causas subjacentes a disfunção da BHE, mediante vias intracelulares comuns, emergem para a regulação da integridade estrutural e funcional (PESIDSKY et al. 2006).

As proteínas virais secretadas por células infectadas também afetam diretamente a expressão e função das junções de oclusão. As interações entre os macrófagos ativados e astrócitos cerebrais amplificam ainda mais as respostas inflamatórias, dando origem a alterações da BHE, por ação direta ou pela maior migração de monócitos (PESIDSKY et al. 2006).

4.3 INTERAÇÃO RABV – HOSPEDEIRO

Durante a infecção do SNC, citocinas e diferentes mediadores são produzidos resultando em migração de várias células do sistema imune, como os linfócitos T, através da BHE que interage com as células do SNC (CONSALES, BOLZAN, 2007). Um dos aspectos mais interessantes da imunopatologia da raiva é praticamente a ausência de uma resposta inflamatória (ACHKAR, et al., 2007).

4.3.1 Resposta Imunológica Frente a Infecção Rábica

A principal diferença entre o SNC e outros tecidos é a existência da BHE que separa o SNC do sangue, o qual preserva o SNC como um ambiente a parte, é uma estrutura de permeabilidade altamente seletiva que protege o SNC de substâncias potencialmente neurotóxicas presentes no sangue e sendo essencial para função metabólica normal do cérebro (KIM et al., 2006).

Portanto, a resposta imunológica do SNC não difere substancialmente da resposta de outros tecidos, porém, a BHE, previne a recirculação convencional de

linfócitos. E o SNC tem células especializadas que executam funções imunológicas efetoras e possuem expressão de indução em vez de construção, expressão de moléculas de MHC classe I e classe II (FABRY, RAINE, HART, 1994).

Microvasos cerebrais possuem diferenças morfológicas e enzimáticas quando comparados com microvasos de outros órgãos, sendo a BHE relativamente impermeável a proteínas, íons, pequenos peptídeos e aminoácidos; essa seletividade é estabelecida por uma complexa interação entre as células do endotélio dos microvasos e a base da membrana basal e células associadas, como músculo liso/pericitos e astrócitos (HUBER, EGLETON, DAVIS, 2001). Junções fortes com extrema resistência elétrica estão presentes entre as células endoteliais cerebrais e esse limite de difusão paracelular. Pericitos possuem uma alta capacidade de fagocitose e são consideradas como uma segunda linha de defesa. Vasos semelhantes às vênulas endoteliais altas podem se desenvolver no SNC durante o processo inflamatório facilitando a passagem de linfócitos (FABRY, RAINE, HART, 1994).

Os macrófagos podem ser a verdadeira célula efetora do SNC produzindo sinais através das citocinas para linfócitos ou processando e apresentando antígenos para as células T. Uma habilidade diferente de secretar citocinas pode explicar algumas células, mas não outras, serem capazes de recrutar células efetoras e induzir doença, apesar da habilidade de muitos tipos celulares atravessarem a BHE (FABRY, RAINE, HART, 1994).

Macrófagos perivasculares cerebrais, muitas vezes referidos como células da micróglia, são fagocitárias e contém receptores para anticorpos IgG e Complemento. Podem, também, expressar moléculas de MHC de classe II quando tratadas com INF- γ e apresentarem antígenos para células T auxiliares, sendo

portanto, importantes células apresentadoras de antígenos no SNC, apresentam potencial de secretar citocinas pró-inflamatórias, portanto podem contribuir para patogênese de doenças autoimunes no SNC. Astrócitos ativos podem expressar moléculas de MHC de classe I e II (FABRY, RAINE, HART, 1994).

Após a entrada do RABV entre as células endoteliais, ele invade o SNC e é fagocitado pelas células da micróglia, que funcionam como células apresentadoras de antígenos (ALOISI, RIA, ADORINI, 1998). Células endoteliais dos microvasos cerebrais e músculo liso/pericitos são capazes de produzir interleucina 1 α e 1 β (IL-1 α e IL-1 β), IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, fator estimulador de colônias macrófago (M-CSF), fator estimulador de colônias granulócito-macrófago (GM-CSF). O aumento da permeabilidade da BHE e redução da expressão de proteína das junções fortes são moduladas por citocinas, como TNF- α , mas principalmente, por INF- γ nas infecções pelo RABV (CHAI et al., 2014)

Os astrócitos podem produzir IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN (γ , β , α), GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNF- α , Fator de crescimento transformante (TGF- β) e quimiocinas, e a expressão aumentada de citocinas contribuem tanto para a progressão como resolução de doenças (HENRY et al., 2009). A liberação de citocinas pró-inflamatórias estimula a produção de moléculas de adesão vascular e a expressão de moléculas de adesão no SNC é idêntica a produzida em outros tecidos, porém, é possível que moléculas de adesão que sejam únicas para o SNC sejam eventualmente identificadas (DIRNAGL, PRILLER, 2005). O receptor de molécula de adesão mais importante identificada no SNC que participa no processo inflamatório VLA-4 e VCAM-1, e que VLA-4 é crucial na migração de células T do sangue para o tecido do SNC inflamado. VCAM-1 parece ter importante papel na infiltração de células inflamatórias no SNC. Membros da família das selectinas tem,

também, importância em reações imunológicas do SNC, incluindo CD44 e L-selectina (FABRY, RAINE, HART, 1994).

O SNC, similarmente a maioria de outros tecidos, tem a capacidade de produção de interferon Tipo I, predominantemente interferon β . Micróglia, astrócitos e neurônios são consideradas células que produzem uma resposta imunológica do tipo inata. Após infecção pelo RABV células do SNC, principalmente, células da glia reconhecem e expressam receptores TLR que permitem o reconhecimento e resposta à presença de sinais perigosos e moléculas associadas aos patógenos (FURR et al., 2008).

Células dendríticas que expressam MHC classe II e que funcionam com células apresentadoras de antígenos, podem ser achadas em todos os tecidos, exceto no SNC. Em condições patológicas do SNC, como encefalites virais, moléculas de MHC são expressas no endotélio vascular cerebral, astrócitos, micróglia e pericitos e assim podem servir como células apresentadoras de antígenos (FABRY, RAINE, HART, 1994).

As citocinas que melhor são caracterizadas no SNC são a IL-1 α e IL-1 β , que são produzidas por astrócitos e são capazes de alterar atividade neuroendócrina e induzir febre. TNF- α aumenta a expressão de MHC classe II em astrócitos de roedores, assim como indução de IL-6. A IL-2 é ativa sobre linfócitos, IL-10 parece ter a capacidade de efeito imunossupressivo no SNC, assim como em outros tecidos. INF- γ tem regulação positiva para expressão de MHC II em astrócitos e macrófagos perivascular e ambas as células apresentam antígeno *in vitro* (FABRY, RAINE, HART, 1994).

Após a entrada do RABV no SNC, sua progressão não é interrompida nem pela destruição do neurônio infectado ou pela resposta imunológica, os dois

principais mecanismos de combate às infecções virais. O RABV tem 2 mecanismos relevantes para a invasão do SNC: (i) RABV escapa do sistema imunológico e (ii) protege o neurônio infectado contra apoptose ou destruição prematura de neurites (LAFON, 2011).

Um número de mediadores presentes no SNC, como prostaglandinas, citocinas INF- α , INF- β e INF- γ , e neuropeptídeos endógenos como norepinefrina e peptídeos vaso intestinais, podem suprir essas respostas por inibição da expressão de MHC classe I e classe II e produção de citocinas pelas células da glia (CONSALES, BOLZAN, 2007).

Durante a infecção do SNC, citocinas e diferentes mediadores são produzidos resultando em migração de várias células do sistema imune, como os linfócitos T, através da BHE que interage com células do SNC, conforme demonstrado na figura a seguir (figura 10) (CONSALES, BOLZAN, 2007). Um dos aspectos mais interessantes da imunopatologia da raiva é praticamente a ausência de resposta inflamatória (ACHKAR et al., 2007).

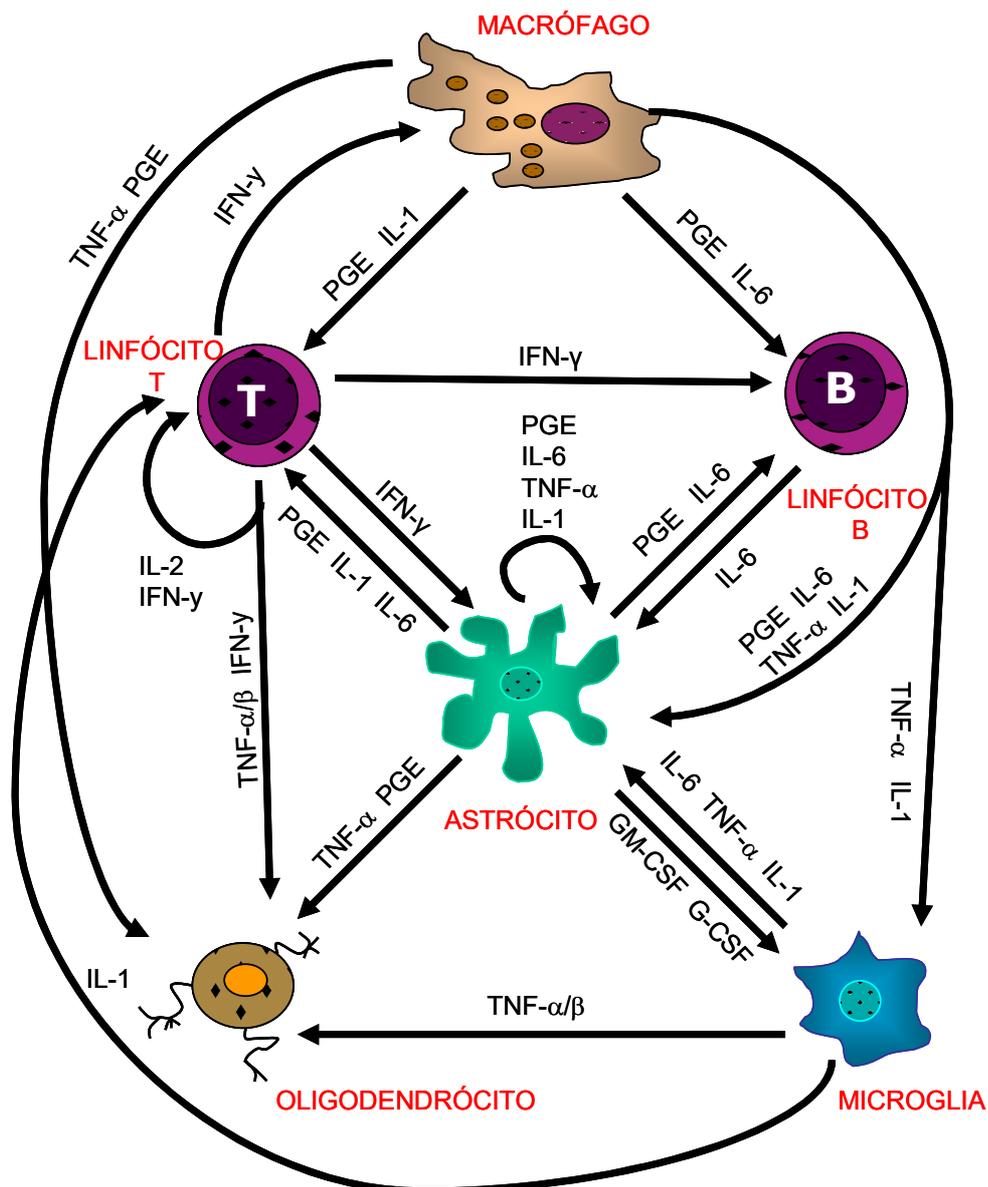


Figura 10: Potencial interação entre as células do sistema imune (linfócitos T e B, e macrófagos) e as do SNC (Astrócitos, micróglia e oligodendrócitos).
 Fonte: Adaptado de Consales, Bolzan(2007).

Células T tem ação protetiva para controlar infecções pelo RABV no SNC, porém, essa capacidade de controlar é impedida pelas amostras encefálicas do RABV. Ativação e entrada não são fatores limitantes para a função protetora por células T, porém, o RABV produz condições desfavoráveis para sobrevivência no sistema nervoso infectado. Na Raiva, eliminação da infecção pelas células T é ineficiente e é especificamente inativada pelo vírus (LAFON, 2008).

Infecções pelo RABV aumentam a expressão de HLA-G na superfície de neurônios humanos, aumentam, também, a expressão de FasL e B7-H1 (LAFON et al., 2008), que leva as células T a realizar apoptose pela maior expressão de moléculas como HLA-G, FasL e B7-H1 no SNC (especialmente nos neurônios); essas moléculas são o gatilho inicial para o caminho de morte na expressão de células T e seus correspondentes ligantes, CD8, Fas e PD-1. Interferon (IFN) deve ser requerido para promover evasão imune mediada por B7-H1, pois a liberação de IFN é estimulador da liberação de B7-H1, que é um membro da família B7 que inibe a ativação de células T, pois IFN, FNT e TLR (receptores *Toll like*) são potentes ativadores da expressão de B7-H1 (LAFON, 2011).

A infecção pelo RABV progride, e então citocinas e diferentes mediadores como o óxido nítrico e outras neurotoxinas endógenas são produzidas, resultando na migração de células T através da BHE, porém, uma fraca reação inflamatória é observada no SNC durante infecção pelo RABV. Porém, esse processo é incapaz de controlar a progressão da doença (BAER, YANGER, 1977).

Secreção de IFN- γ por células T pode inicialmente induzir astrócitos e micróglia para expressar moléculas MHC classe I e Classe II e provocar o funcionamento desses MHC I e MHC II para a subsequente produção de citocinas. A ativação de astrócitos e micróglia podem contribuir para a iniciação e/ou propagação da resposta imune intracerebral e inflamação (FABRY, RAINE, HART, 1994).

Óxido nítrico (NO) é considerado um mediador da morte celular neuronal, e se suspeita que a super-estimulação de receptores de aminoácidos excitatórios provoque um fluxo massivo de íons de Ca^{2+} que conduz a ativação da óxido nítrico sintetase (NOS) seguido por um aumento da NO intracelular (VAN DAM et al., 1995; UBON, SUKWATTANAPAN, MANEERAT, 2001). NO é produzido em diferentes

células e medeia uma grande variedade de funções incluindo vasodilatação, neurotransmissão, citotoxicidade imunológica, produção de plasticidade sináptica no cérebro e neurotoxicidade (JACKSON, 2007). As duas maiores isoformas de NOS são o induzível (iNOS) e o constitutivo (cNOS), iNOS é envolvido na patogênese de doenças neurodegenerativas por estimular neurotoxinas e citocinas inflamatórias, na raiva há regulação positiva de iNOS e regulação negativa de cNOS (UBON, SUKWATTANAPAN, MANEERAT, 2001).

Enormes quantidades de células iNOS positivas são encontrados por todo o cérebro infectado com RABV, preferencialmente nas periferias dos vasos sanguíneos e sem distribuição específica para uma região do cérebro. Estas células iNOS positivas representam micróglia ativadas ou macrófagos infiltrados (VAN DAM et al., 1995; SHIN et al., 2004; JACKSON, 2007). Em estudo experimental em ratos a expressão de iNOS na Raiva foi detectada em três dos sete animais, porém todos apresentaram sintomatologia grave e reação inflamatória mínima, portanto especula-se que NO e outras neurotoxinas endógenas medeiam a disfunção neuronal na raiva (KOPROWSKI et al., 1993; JACKSON, 2007).

A resposta imune humoral tem função protetora essencial no curso da infecção pelo RABV, anticorpos neutralizantes sob controle de células T auxiliares tem papel crítico na imunoproteção (LAFON, 2007). A glicoproteína viral é o local de ação desses anticorpos neutralizantes e, também, é um grande indutor de apoptose das células infectadas evidenciando assim um processo imunogênico. Aspectos patológicos da atividade imune no SNC explicam a contribuição do sistema imune na patogênese da raiva (CONSALES, BOLZAN, 2007). Imunoglobulinas da classe G (IgG), mas não as imunoglobulinas da classe M (IgM), conferem proteção passiva

contra o RABV (LAFON, 2007). A maioria da ação protetiva dos anticorpos ocorre antes do vírus entrar no SNC (LAFON, 2007)

As pesquisas efetuadas com base na biologia molecular têm sido de relevante importância, não só para complementar os conhecimentos sobre a patogênese da infecção rábica e a imunologia, como também, para a determinação da variabilidade genética do RABV, inclusive entre cepas, e para o esclarecimento dos mecanismos de replicação e transmissão viral (WUNNER et al., 1988). O estudo da variabilidade genética representa, portanto, um passo fundamental para a geração de informações para a epidemiologia molecular da raiva, determinando fontes de infecção, origens de surtos e relações genéticas, geográficas e temporais entre os RABV isolados a partir de diferentes espécies animais (KIMURA, 2006).

4.3.2 Mecanismos de escape do RABV

Como resultado da natureza neurotrópica do RABV e a baixa resposta imunológica do SNC, todos animais infectados em experimento realizado tiveram severa manifestação clínica, e mortalidade foi de 100%. Não sendo a reação inflamatória um fator determinante na susceptibilidade para infecção pelo RABV (ACHKAR et al., 2007), que apresenta mecanismos de escape do sistema imune, os quais garantem a sobrevivência da célula hospedeira e asseguram sua disseminação (FERNANDES, 2009).

A ausência de uma resposta imune é fortalecida pela capacidade da amostra patogênica do RABV induzir imunossupressão periférica que como consequência, o vírus escapa da resposta imune e invade o SNC (LAFON, 2007).

Um mecanismo de controle para evasão da resposta imunológica feita pelo RABV é a limitação do mecanismo inflamatório, regulação do fenótipo microglial durante infecção (MEUTH et al., 2008). O controle da inflamação local ocorre pela expressão de receptores neuronais como CD47, CD22, CD200, e por seus ligantes nas células gliais (GRIFFITHS, NEAL, GASQUE, 2007). Quanto mais patogênica a amostra de RABV menos aguda é a resposta inflamatória (HICKS et al., 2009).

A morte neuronal por apoptose limitaria a propagação viral, e pode ocorrer, por ação dos linfócitos T citotóxicos que induzem apoptose pela secreção de TNF- α , liberação de granzimas e perforinas, ativando a via apoptótica Fas dependente (FERNANDES, 2009). Porém, RABV inibe a ativação de caspase e utiliza mecanismos para prevenir a apresentação de antígenos via MHC (ALCAMI, KOSZINOWSKI, 2000), preservando os neurônios e limitando a rede de comunicação pela inibição da apoptose e limitação da inflamação e destruição de células T que invadem o SNC em resposta a infecção, fator crucial para neuroinvasão do RABV e transmissão para outros animais (BALOUL, LAFON, 2003). Outro mecanismo de escape seria a supressão da produção de IFN por ação da fosfoproteína viral (BRZOZKA, FINKE, CONZELMANN, 2005).

4.3.3 Alterações Patológicas da Raiva no SNC

Muitas das características patológicas cardeais da infecção pelo RABV foram descritas pela primeira vez ao longo de um período de 30 anos, que se estende desde o início da década de 1870 para o início de 1900 (ROSSITER; JACKSON, 2007).

Ao exame macroscópico, o cérebro de vítimas da raiva frequentemente apresenta um espectro de mudanças relativamente suaves e não específicas; há edema cerebral geralmente leve, mas com possibilidade de ocorrer edema cerebral grave e hérnia cerebral associada, porém não são características comuns da raiva. Pode haver congestão da leptomeninge e do parênquima dos vasos sanguíneos, às vezes associado à presença de múltiplas petéquias (QUEIROZ, 1999; ROSSITER; JACKSON, 2007).

Estudos sobre lesões causadas pelo RABV fora do SNC têm sido realizados principalmente em seres humanos e em espécies de animais transmissores. Nos quais, se observa inflamação supurativa em vários tecidos, como as glândulas salivares, plexo nervoso do trato gastrointestinal, gânglios nervosos, medula adrenal, fibras musculares e nervosas no coração. Glóbulos hialinos têm sido descritos nos feocromócitos da medula adrenal de casos de raiva humana e bovina (ABREU et al., 2014) (figura 11).

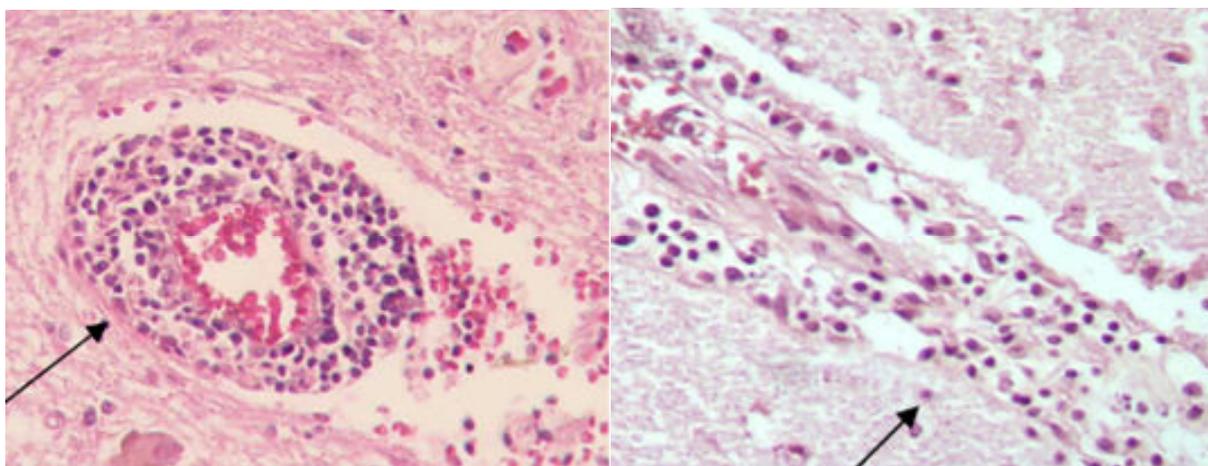


Figura 11: Alterações histopatológicas da raiva pela coloração de HE, magnitude 200x. À esquerda, perivasculite; À direita, Meningite.
Fonte: Fernandes, 2009

Um dos aspectos mais surpreendentes da patologia da raiva é a quase total ausência de uma resposta inflamatória no SNC, que é caracterizada por infiltrados perivasculares com células mononucleares, gliose local e neuronofagia,

que ocorrem na maioria das áreas do SNC, mas são frequentemente mais graves no tronco cerebral (QUEIROZ, 1999; CONSALES, BOLZAN, 2007). O que contrasta com outras doenças virais do SNC, onde a inflamação é a principal característica patológica (CONSALES, BOLZAN, 2007; ROSSITER; JACKSON, 2007), certos autores sugerem que a disfunção neuronal comumente observada microscopicamente (FROSCHE; ANTHONY; GIROLAMI, 2004) é a responsável pelo desfecho fatal da raiva em condições normais, ao invés da morte neuronal (CONSALES; BOLZAN, 2007).

Características microscópicas da raiva no SNC incluem comprometimento dos núcleos da base, medula e gânglios da raiz dorsal. Os achados patognomônicos são as inclusões eosinofílicas intracitoplasmáticas, arredondadas ou ovaladas, que podem ser encontradas em neurônios piramidais do hipocampo e nas células de Purkinje do cerebelo, locais usualmente isentos de inflamação, os corpúsculos de Negri (QUEIROZ, 1999; FROSCHE; ANTHONY; GIROLAMI, 2004; ROSSITER, JACKSON, 2007), que são concentrações de proteínas virais (BRASIL, 2008).

Algum grau de infiltrado celular inflamatório nas leptomeninges é visto em casos de raiva humana, embora extensão e intensidade podem variar muito. Os infiltrados são tipicamente compostos por linfócitos e monócitos, com um número menor de células plasmáticas, mas neutrófilos podem predominar quando a inflamação é intensa, especialmente em casos fulminantes mais em crianças que em outras idades. O curso clínico tende a ser mais fulminante em crianças, que em outros grupos etários, em que há inflamação global esparsa das leptomeninges, e as meninges do tronco cerebral são também frequentemente envolvidas. Em contraponto, nos casos de raiva paralítica a infiltração de células inflamatórias das meninges espinhais normalmente é relativamente escassa, apesar de intensa

inflamação na medula espinhal, em muitos casos confirmados (ROSSITER, JACKSON, 2007).

No infiltrado perivascular de células mononucleares observa-se 50 a 70% de células imunomarcadas para linfócito T CD3, e aproximadamente um terço das células T auxiliares positivas para CD4; ocasionalmente observam-se células B (CD20) e células CD68, positivas para as linhagens monócito/macrófago. Em mais da metade dos casos os linfócitos T são encontrados no parênquima do SNC em torno do espaço perivascular (ROSSITER, JACKSON, 2007).

O perfil inflamatório pode ser influenciado pela cepa do RABV, visto que em cães infectados com vírus de rua (RABV comum em cães da Etiópia) exibiram inflamação difusa, degeneração neuronal e neuronofagia, lesões brandas, quando comparadas às exibidas por animais infectados com uma cepa mexicana do RABV, enquanto um padrão encefalítico especialmente abundante e generalizado foi relatado em paciente que apresentou raiva paralítica por variante canina transmitida por raposa (ROSSITER, JACKSON, 2007).

Podem-se observar nódulos microgliais ou nódulos de Babes, que são compostos predominantemente por micróglia ativadas e são vistos em outras encefalites virais ou desordens infecciosas e estão presentes em mais de 40% dos casos de raiva (ROSSITER, JACKSON, 2007).

Nos casos de raiva é comum observar neuronofagia, a qual se caracterizada microscopicamente por acúmulo de micróglia ativada em processo de fagocitose, degeneração neuronal e/ou morte de neurônios, sendo que a gravidade e extensão anatômica da neuronofagia e perda neuronal resultante, pode variar muito entre os casos. Os neurônios, muitas vezes têm citoplasma condensado e núcleos picnóticos. Cromatólise central é um achado citológico de edema do corpo

celular do neurônio, perturbações e dispersão de grânulos de Nissl a partir da parte central do pericário e deslocamento periférico do núcleo, classicamente observado em resposta à lesão axonal, e que pode também ser visto na raiva. Além de cromatólise, vacuolização neuronal de citoplasma e mudanças degenerativas na cromatina nuclear têm sido também relatados na raiva (ROSSITER, JACKSON, 2007).

O papel da morte celular por apoptose na patogênese da raiva de ocorrência natural não é clara, mas dados sugerem que a apoptose neuronal não desempenha um papel essencial na raiva humana (ROSSITER, JACKSON, 2007), apesar de estudos proporem ser a principal causa de morte neuronal na raiva (FU; JACKSON, 2005). As características morfológicas de apoptose são o encolhimento da célula, pela condensação nuclear e citoplasmática, fragmentação da cromatina nuclear e formação de fragmentos múltiplos de material nuclear condensado e citoplasma, os chamados corpos apoptóticos que são fagocitados por células vizinhas (PEREIRA, 2013).

A preservação da integridade da rede neuronal pela prevenção da apoptose neuronal, conjuntamente com a indução de apoptose de linfócitos T potencialmente protetores, permite a disseminação do vírus, sua excreção na saliva e transmissão por mordedura para outro hospedeiro (ROSSITER, JACKSON, 2007).

4.4 MODELOS ANIMAIS DE NEUROVIRULÊNCIA

A neurovirulência viral pode ser definida como a capacidade do vírus de causar doença do sistema nervoso, especialmente o SNC. Modelos animais de meningites e encefalites têm contribuído sobremaneira para o entendimento do sistema imunológico, sendo da família *Rhabdoviridae* para estudos das encefalites utilizado o vírus da estomatite vesicular como vírus protótipo para a neuroinvasividade. A capacidade de um vírus se espalhar para o SNC a partir de um sítio periférico, ou neuroinvasividade, é um componente importante de neurovirulência após as vias naturais de infecção. A via de inoculação é muitas vezes muito importante na avaliação experimental da neurovirulência (JACKSON, 2007).

Para análise de modelos experimentais utiliza-se a comparação de infecções em hospedeiros com vírus estreitamente relacionados (por exemplo, cepas de vírus de raiva diferentes ou um vírus de raiva ancestral e uma variante) (JACKSON, 2007).

A inoculação intracerebral é comumente utilizada por conveniência, bem como um largo número de sítios periféricos também têm sido utilizados em diferentes modelos, incluindo o coxim plantar ou palmar, inoculação intramuscular, intraperitoneal e intraocular. As espécies, a idade e o estado imunitário do hospedeiro também se revelaram fatores importantes na neurovirulência. As comparações de variantes avirulentas com os seus vírus parentais em modelos de camundongo e rato utilizando diferentes vias de inoculação têm sido uma abordagem útil para compreender as bases biológicas da neurovirulência do RABV (JACKSON, 2007).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. AMOSTRAS

Foram selecionadas duas amostras conhecidas de cepas de RABV, sendo uma VAg-2 procedente de cão, e uma VAg-3, procedente de humano.

5.1.1. Titulação da dose infectante

O estabelecimento da dose infectante, foi calculada segundo o método de Reed-Muench (1938), sendo inoculados para a VAg3 o título de 5,4 $DL_{50}/0,02mL$ e para VAg2 de 4,9 $DL_{50}/0,02mL$.

5.2. INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS JOVENS

Para infecção experimental foram utilizados camundongos albinos suíços jovens (3-4 semanas de idade), nos quais foi realizada administração de 0,03mL suspensão viral a 20%, intracerebral considerada controle, por ser a via utilizada no isolamento viral para diagnóstico, e duas outras diferentes vias de inoculação intramuscular, uma na face posterior da coxa direita e outra na região cervical direita. Um outro grupo de animais não foi infectado, mas inoculado com suspensão de cérebro de camundongo normal em solução de albumina bovina contendo antibióticos (penicilina e estreptomicina) pelas três vias de inoculação, mantidos sob

as mesmas condições dos animais inoculados, servindo como controle negativo. Desta forma, os grupos foram divididos como segue no quadro abaixo (Quadro 1).

Quadro 1: Divisão dos grupos experimentais

Grupo	Subgrupo	Via de inoculação	Nº de camundongos
A (suspensão de CCN)		Todas as vias anteriores	15
B (VAg2)	1	Intracerebral (IC)	35
	2	Intramuscular na coxa (IM posterior)	35
	3	Intramuscular cervical (IM anterior)	35
C (VAg3)	1	Intracerebral (IC)	35
	2	Intramuscular na coxa (IM posterior)	35
	3	Intramuscular cervical (IM anterior)	35
Total			225

O dia da infecção foi considerado o dia zero e foram realizadas coletas seriadas, sendo uma antes do período provável de doença, o 5º dia pós infecção (5º DPI), após o dia oito, foram realizadas coletas a cada 48 horas até o dia 20, onde provavelmente todos os camundongos já estariam doentes e seriam sacrificados; caso isso não ocorresse, seria realizada uma última coleta no dia 30; em cada coleta eram retirados três animais de cada grupo experimental e controle positivo, e um animal do controle negativo.

Os animais infectados foram observados diariamente por um período de 30 dias, sendo selecionados, contudo, de acordo com a cinética estabelecida um camundongo do grupo controle negativo e dois dos demais grupos infectados, para a coleta de sangue por punção cardíaca e retirada do encéfalo e glândulas salivares para processamento histopatológico e imunohistoquímica. (MASSONE, 2003).

Após a seleção dos camundongos, os mesmos foram anestesiados com isoflurano e a eutanásia seguiu por exsanguinação via punção cardíaca, e realizada a retirada do SNC e demais vísceras, para processamento virológico,

armazenados em ultrafreezer (-70°C) e histopatológico, fixadas em formalina tamponada a 10%.

Ao término do procedimento, todas as carcaças dos animais foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas à temperatura de -20° C até serem transportadas para serem autoclavadas e posteriormente incineradas.

5.2.2. Análise Histopatológica

5.2.2.1 Processamento Histopatológico

Os tecidos do SNC, coletados durante a cinética da infecção experimental foram fixados em solução de formalina tamponada a 10% por 12 a 24 horas, em seguida incluídos em blocos de parafina, para obtenção cortes de 5 µm em micrótomo, os quais foram corados pela hematoxilina-eosina e processados para a microscopia de luz, segundo a técnica de rotina de laboratório de anatomia patológica (PROPHET et al., 1992; MICHALANY, 1998; QUARESMA, 2003). Brevemente, fragmentos de encéfalo foram desidratados em soluções crescentes de etanol, iniciando com uma concentração de 70% até etanol absoluto, em seguida passados duas vezes em xilol e imersos em dois banhos em parafina a 60° C, finalizando com a formação dos blocos de parafina que foram seccionados, com auxílio de um micrótomo rotativo, para obtenção de cortes de 5 µm de espessura. Esses cortes foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) e analisados ao microscópio de luz pelo Médico Patologista Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma.

5.2.2.2. Análise Histopatológica Semi-Quantitativa

A análise histopatológica das lesões teciduais foi definida seguindo uma escala de 0-3, estabelecida para quantificar as lesões, sendo: 0=ausência de lesão; 1=lesão mínima; 2=lesão moderada; 3=lesão intensa (XIAO et al., 2001), sendo avaliados a presença e intensidade de congestão, inflamação, neuronofagia, cromatólise, contração neuronal, tumefação neuronal, corpúsculo de Negri e necrose nos microambientes meningeal (M), intraparenquimatoso (IP) e perivascular (PV).

5.2.3. Imunohistoquímica

Para a imunohistoquímica o procedimento utilizado foi o da avidina-biotina-peroxidase modificado, segundo Quaresma (2003). Brevemente, os cortes foram imersos em solução de protease VIII 0,05% (pH 7,2 a37°C por 3 minutos) e lavados em solução salina tamponada (PBS). A recuperação antigênica foi realizada em forno micro-ondas, seguida de digestão enzimática. Bloqueio da atividade da peroxidase endógena utilizando peróxido de hidrogênio em metanol; foram adicionados anticorpos monoclonais e incubados por uma hora em temperatura ambiente (TA), seguido de adição de anticorpo secundário biotilado e o reagente do ABC (complexo avidina-biotina), e lavagens apropriadas em PBS, sendo, posteriormente acrescentado 0,05% de DAB que contém peróxido de hidrogênio. Os cortes foram lavados completamente em água de torneira, colocados em hematoxilina por 2 a 5 minutos, e novamente lavado em água (figura 11).

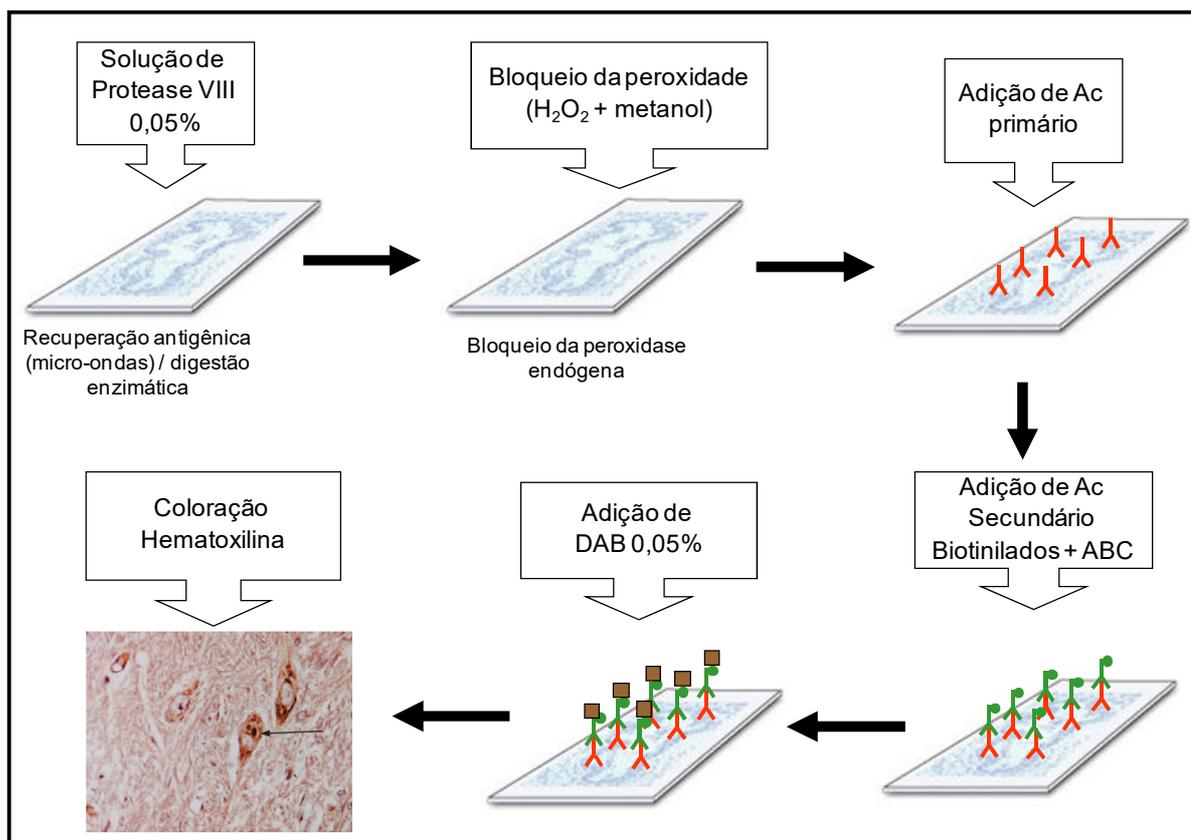


Figura 12: Desenho esquemático com os procedimentos da técnica de imunohistoquímica, segundo Quaresma, 2003.

Foram utilizados marcadores imunológicos para RABV, células e citocinas, de acordo com o demonstrado no quadro a seguir (quadro 2). Os controles negativos foram os encéfalos dos camundongos do grupo A.

Quadro 2: Anticorpos primários utilizados

Anticorpo	Marca/Código	Descrição	Diluição	Situação	Finalidade
Anticorpo policlonal de camundongo para RABV (Anti-RABV)	IEC	Anticorpo produzido <i>in house</i> , a partir de cepa do RABV inoculada intraperitoneal em camundongo	1:100	Funcionou	Detecção do antígeno de RABV;
Rabbit polyclonal to PIWIL4, 200µl	Abcam/ab87939	Anticorpo policlonal de coelho para PIWIL4 (Anti-PIWIL4)	1:100	Funcionou	Análise de células PIWIL4 positivas. PIWIL4 atua através do processo metabólico piRNA;
Rabbit polyclonal to IL6, 200µl	Abcam/ab6672	Anticorpo policlonal de coelho para IL6 (Anti-IL6)	1:100	Funcionou	Avaliar a produção de IL6 após infecção por RABV;
Rabbit polyclonal to IL17, 100µg	Abcam/ab79056	Anticorpo policlonal de coelho para IL17 (Anti-IL17)	1:200	Funcionou	Avaliar a produção de IL17 após infecção por RABV;
Rabbit polyclonal to IL23, 50µg	Abcam/ab115759	Anticorpo policlonal de coelho para IL23 (Anti-IL23)	1:150	Funcionou	Avaliar a produção de IL23 após infecção por RABV;
Mouse monoclonal [KP1] to CD68, 500µl	Abcam/ab955	Anticorpo policlonal de coelho para CD68 (ANTI-CD68)	1:100	Não funcionou	Examinar a presença de células CD68 positivas.
Mouse monoclonal [mAb51312] to CD4, 100µg	Abcam/ab51312	Anticorpo monoclonal de camundongo [mAb51312] para CD4 (Anti-[mAb51312]P/CD4)	1:50	Funcionou	Análise de células CD4 positivas. A proteína CD4 está envolvida na interação MHC classe II – antígeno – células T. Deste modo, esta proteína regula a ativação de células T;
Rabbit polyclonal to CD3, 100µg	Abcam/ab5690	Anticorpo policlonal de coelho para CD3 (Anti-CD3)	1:100	Funcionou	Examinar a presença de células CD3 positivas, também conhecido como marcador pan-T, por marcar tanto CD4 quanto CD8. O complexo CD3 medeia a transdução de sinal;

Anticorpo	Marca/Código	Descrição	Diluição	Situação	Finalidade
Mouse monoclonal [AC-1A1] to Factor XIIIa, 500µl	Abcam/ab1834	Anticorpo monoclonal de camundongo [AC-1A1] para Fator XIIIa (Anti-[AC-1A1] P/ fator XIIIa)	1:50	Não Funcionou	Avaliar a presença de células Fator XIIIa positivas – células envolvidas na indução da resposta imune, marcador de células dendríticas;
Goat polyclonal to TLR8, 100µg	Abcam/ab53630	Anticorpo policlonal de cabra para TLR8 (ANTI-TLR8)	1:150	Funcionou	Avaliar o papel dos TLR3, TLR7 e TLR8 (toll-like receptors) na resposta contra infecção viral por RABV
Mouse monoclonal [40C1285] to TLR3, 50µg	Abcam/ab13915	Anticorpo policlonal de coelho para TLR3 (ANTI-TLR3)	1:100	Não funcionou	
Rabbit monoclonal [EPR2994(2)] to Lysozyme, 100µl	Abcam/ab108508	Anticorpo monoclonal de coelho [EPR2994(2)] para lisozima (Anti-[EPR2994(2)] P/ lisozima)	1:200	Funcionou	Avaliar a presença de células positivas para produção de lisozimas. Que são associados com o sistema monócito-macrófago em tecidos e fluidos corporais. No SNC representado por micróglia ativada.
Rabbit polyclonal to iNOS, 500µl	Abcam/ab15323	Anticorpo policlonal de coelho para iNOS (Anti-iNOS)	1:100	Funcionou	Avaliar a produção de óxido nítrico após infecção por RABV;
Rabbit polyclonal to IFNGR1, 100µg	Abcam/ab61179	Anticorpo policlonal de coelho para IFNGR1 (Anti-IFNGR1)	1:100	Funcionou	Marcar células IFNGR1 positivas. O IFNGR1 é um receptor para interferongamma;
Rabbit polyclonal to TGF beta, 100µl	Abcam/ab66043	Anticorpo policlonal de coelho para TGF beta (Anti-TGFb)	1:100	Funcionou	O TGFβ é um medidor da resposta imune adaptativa;
Rabbit polyclonal to Caspase 3, 500µl	Abcam/ab4051	Anticorpo policlonal de coelho para Caspase 3 (Anti-Caspase 3)	1:100	Funcionou	Análise de células apoptóticas após infecção por RABV;

Anticorpo	Marca/Código	Descrição	Diluição	Situação	Finalidade
Rabbit polyclonal to TNF alpha, 100µg	Abcam/ab9739	Anticorpo policlonal de coelho para TNFα (Anti-TNFα)	1:100	Funcionou	Avaliar a presença de TNFα - citocina principalmente secretada por macrófagos que se liga a TNFRSF1A/TNFR1 e TNFRSF1B/TNFR2, podendo induzir a morte celular;
Rabbit polyclonal to FOXP3, 100µl	Abcam/ab54501	Anticorpo policlonal de coelho para FOXP3 (Anti-FOXP3)	1:200	Funcionou	Análise do fator de transcrição FOXP3 o qual desempenha um papel crucial no controle da resposta imune;
Rabbit polyclonal to IL1 beta (Biotin), 100µg	Abcam/ab106034	Anticorpo policlonal de coelho para IL1 beta (Biotina) (Anti-IL1b)	1:200	Funcionou	Avaliar a produção de IL1β após infecção por RABV;
CD8 alpha Antibody (53-6.7), 500 µg	NovusBiologicals/NBP1-49045	Anticorpo monoclonal de rato para CD8 (Anti-CD8)	1:100	Não funcionou	Examinar a presença de células CD8 positivas.

O padrão de marcação imuno-histoquímica foi analisado através da quantificação das células imunomarcadas para cada fenótipo celular e expressão de citocinas. Para tal utilizou microscópio binocular Nikon, com objetiva PLAN de 40x/0,65 e oculares CFWN 10x/20 (aumento de 400x), dotada de graticulo de contagem com 10 x 10 subdivisões que nesse aumento apresenta 0,25 mm de lado (0,0625 mm² de área). Para a imunomarcaçã celular foram contadas todas as células positivas em 10 campos de 400x em cada microambiente. A análise da expressão de citocinas foi feita pela contagem de imunomarcaçã celular em 10 campos de 400x para microambiente. Foi feita quantificaçã extracelular e intracelular para a imuno-expressã de TNF- α , IFN- γ e TGF- β , nestes casos, foi feita a contagem de pontos de interseçã do gradículo na área imunomarcada em 10 campos de 400x para cada área (FERNANDES, 2009; QUARESMA, 2003).

5.2.3.1 Imunomarcaçã para Detecçã do Antígeno Viral e caracterizaçã de células do SNC

Para a detecçã de antígeno viral e caracterizaçã de células do SNC pela técnica de imunohistoquímica, foi utilizado o sistema de peroxidase de acordo com os procedimentos descritos por Hsu *et al.*, (1981), que brevemente consiste nas seguintes etapas: montagem dos cortes em lâminas tratadas com silano, desparafinizaçã em banhos de xilol, desidrataçã do material em concentraçã decrescentes de alcoóis (95%, 80%, 70%) por 5 minutos em cada álcool; segue-se com incubaçã dos cortes em tampã cítrico; adiçã de anticorpos específicos para o RABV, e aplicaçã do sistema LSAB (Dako, EUA) conjugado à peroxidase;

finalmente procedeu-se a revelação com a imersão das lâminas em DAB (3,3´diaminobenzidina) (Dako, EUA) por três minutos. Os cortes foram então contra corados com hematoxilina (1:1), sendo a montagem feita com o uso de Entelan (Merck). Durante os intervalos entre cada etapa lavagens foram realizadas em diferentes soluções que podem ser PBS, água corrente, água amoniacal e água destilada. O exame da lâmina para detecção e análise qualitativa e/ou quantificação de antígenos foi feita usando microscópio óptico (luz branca).

Não foram encontrados anticorpos primários para GFAP e Proteína β -amilóide específicos para camundongos ou roedores.

5.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados como segue: foram calculadas as médias dos animais experimentais de cada grupo e dia da cinética e desvios padrão, sendo as médias analisadas estatisticamente pelo teste ANOVA dois critérios, seguido pelo teste de Bonferroni, admitindo significância estatística para $p \leq 0,05$. As análises estatísticas foram processadas utilizando os softwares BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2007) e GraphPadPrism 6.0 para Windows (GraphPad software, San Diego, CA, USA).

5.4. ASPECTOS LEGAIS DE BIOÉTICA E BIOSSEGURANÇA

O projeto em pauta utilizou cepas de RABV previamente isoladas a partir de encéfalo de animal e humano pelas técnicas clássicas, os materiais foram

encaminhados pelas Secretarias de Saúde de municípios do Estado do Pará. As mesmas foram utilizadas conforme e após consentimento da Direção do Instituto Evandro Chagas. Todos os procedimentos que envolverem manipulação de agentes virais, produção de imunobiológicos foram realizados em laboratório NB2 seguindo estritamente as normas de Biossegurança estabelecidas pela Instituição.

A infecção experimental, acompanhamento dos animais, eutanásia e necrópsia foram realizadas pelas médicas veterinárias Taciana Fernandes de Souza Barbosa Coelho e Livia Medeiros Neves Casseb, tendo em vista o bem estar animal e a minimização do sofrimento dos mesmos.

Este projeto foi submetido para apreciação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IEC e aprovado (ANEXO A).

6 RESULTADOS

6.1 INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Os animais do grupo A (controle negativo n=15) que receberam apenas inoculação de tecido nervoso de camundongo normal com solução de albumina bovina contendo antibióticos pelas três vias de inoculação se apresentaram saudáveis e sem quaisquer alterações clínicas.

Os animais dos grupos B1 (n=35) e C1 (n=35), os quais receberam administração IC de suspensões de cepas do RABV das variantes VAg2 e VAg3, respectivamente, apresentaram sinais clínicos a partir do 6º dia pós infecção (DPI) em ambas as variantes antigênicas.

Foi possível observar discreta diferença na sintomatologia na fase inicial, mas o reconhecimento dos sintomas foi mais rápido na VAg3 (grupo C1), a partir do 5º DPI, que na VAg2 (grupo B1), a partir do 8º DPI, provavelmente devido ao título superior naquela variante antigênica. Os sinais clínicos observados foram: eriçamento de pelo, anorexia, emaciação e ataxia com arqueamento de dorso, e paralisia de membros antes do óbito.

Animais infectados pelas vias IM posterior (n=35) manifestaram sinais clínicos a partir do 9º DPI no grupo B2, e 12º DPI no grupo C2, demonstrando doença até o 16º DPI; após esse período todos os animais coletados não apresentaram sintomatologia clínica. Fato semelhante ocorreu no grupo 3 (IM anterior, n=35), onde o início de sintomas no grupo B3 e C3 foram reconhecidos ao 10º DPI se estendendo apenas até o 16º DPI.

Inicialmente, foi observado que alguns animais dos Grupos B2 e B3 apresentaram lacerações de pele e cauda, regiões de alopecia, durante as inspeções diárias alguns animais, deste grupo, quando submetidos ao barulho, saltavam ou mesmo começavam a correr no mini-isolador de forma descontrolada ou simplesmente apresentavam tremores por todo o corpo. Em seguida os animais iniciaram uma fase de letargia, e depois paralisia e morte.

Os animais do grupo C2 e C3 apresentaram sinais clínicos semelhantes, porém apresentaram paralisia dos membros posteriores e, em seguida, dos membros anteriores, o que levou os animais a não mais se alimentarem e ingerirem água com dificuldade, seguida de morte.

Vale ressaltar que alguns animais dos grupos 2 e 3 das duas variantes, não apresentavam sinais de doença, no momento da eutanásia.

6.2 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA

6.2.1 Expressão de antígeno

Neste trabalho não foi encontrada imunomarcagem para antígenos do RABV no microambiente meningeal. A presença de material antigênico do RABV foi identificada de maneira inequívoca nas populações de neurônios e de células da glia que expressavam antígenos do RABV (figura 13), constatamos que os neurônios estavam mais imunomarcados que as células da glia ($p=0,0014$). Nos dois tipos celulares observamos maior número de células marcadas entre o 12° e 16° DPI ($p=0,001$) (figuras 14, 15 e 16).

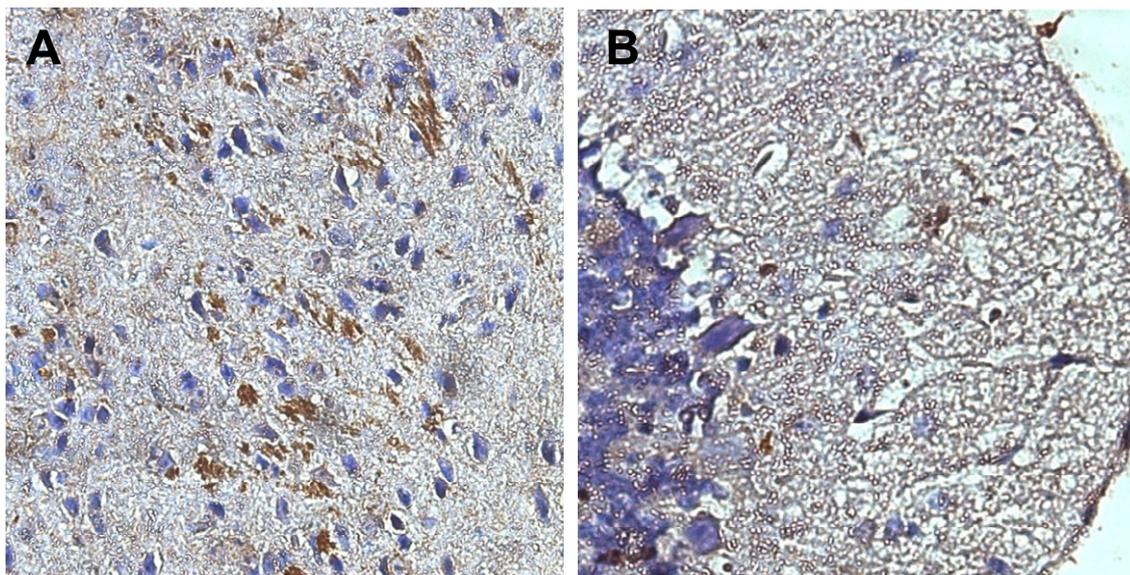


Figura 13: Reação de imunohistoquímica para antígenos do RABV, Tecido adjacente corado em azul pela hematoxilina (Magnitude 200x). **A** - tecido nervoso infectado, mostrando áreas acastanhadas que representam positividade para o antígeno rábico. **B** – tecido nervoso não infectado (controle negativo).

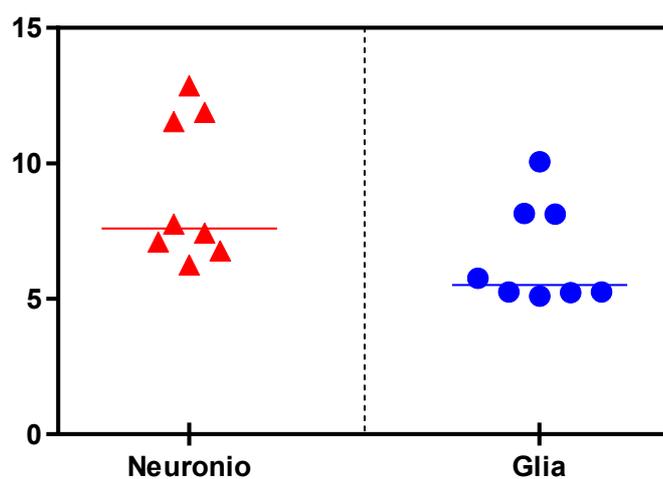


Figura 14: Neurônios e células da glia imunomarcadas para o RABV.

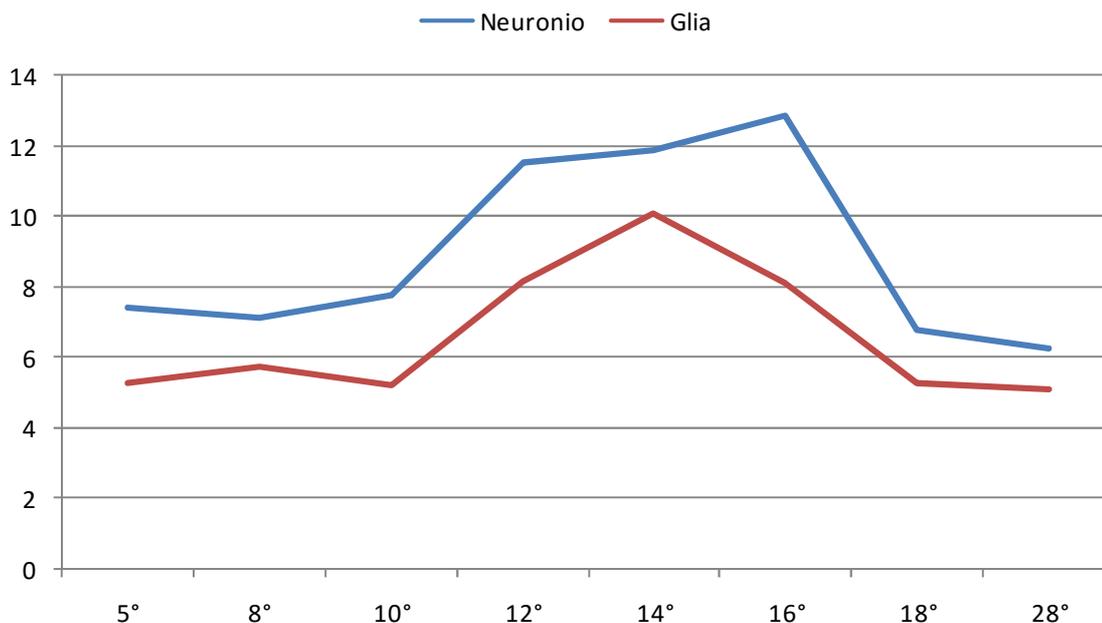


Figura 15: Neurônios e células da glia imunomarcadas para o RABV durante o período pós infecção.

Quando observada a presença de imunomarcagem para antígeno rábico nas meninges, região perivascular e intraparenquimatosa houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre cada estrato.

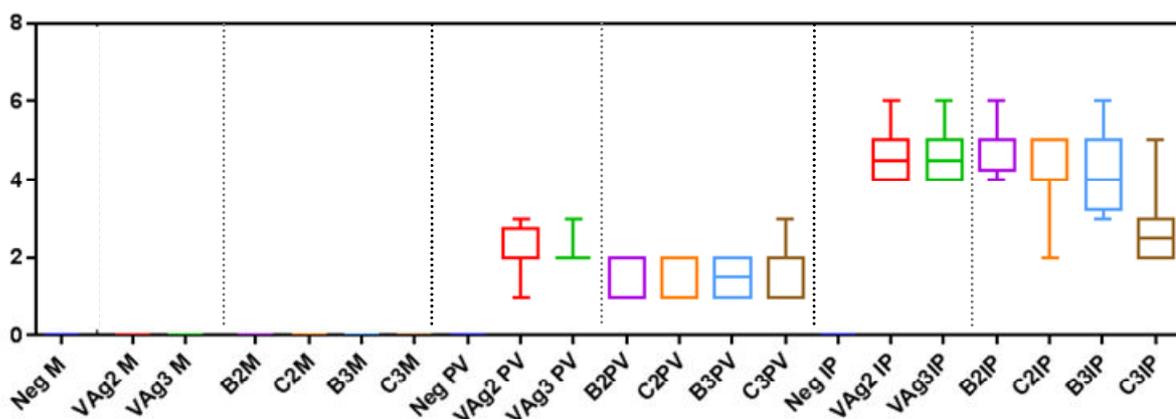


Figura 16: Gráfico *Box plot* com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas para RABV nos três microambientes do SNC.

Legenda: M-meninge; PV-perivascular; IP-intraparenquimatosa; Neg-controle negativo; VAg2-animais infectados com VAg2 pela via IC; VAg3-animais infectados com VAg3 pela via IC; B2- animais infectados com VAg2 pela via IM posterior; C2- animais infectados com VAg3 pela via IM posterior ; B3- animais infectados com VAg2 pela via IM anterior; C3- animais infectados com VAg3 pela via IM anterior.

6.2.2 Atividade da glia – marcadores expressos na glia

Neste trabalho, no ambiente PV se mostrou muito maior nos animais experimentais infectados via IM anterior do que nos controles (positivo e negativo) e demais grupos experimentais, independente da variante antigênica, com diferença altamente significativa, enquanto no microambiente IP o grupo controle negativo apresentou diferença altamente significativa quando comparado com os demais grupos controles e experimentais. As diferenças entre os grupos experimentais são responsáveis por 69,56% da variância total, havendo aumento global na expressão de células expressando lisozima, com uma chance de menos de 0,01% de tal efeito ter sido observado aleatoriamente, sendo o efeito estatístico considerado extremamente significativo ($p < 0,0001$).

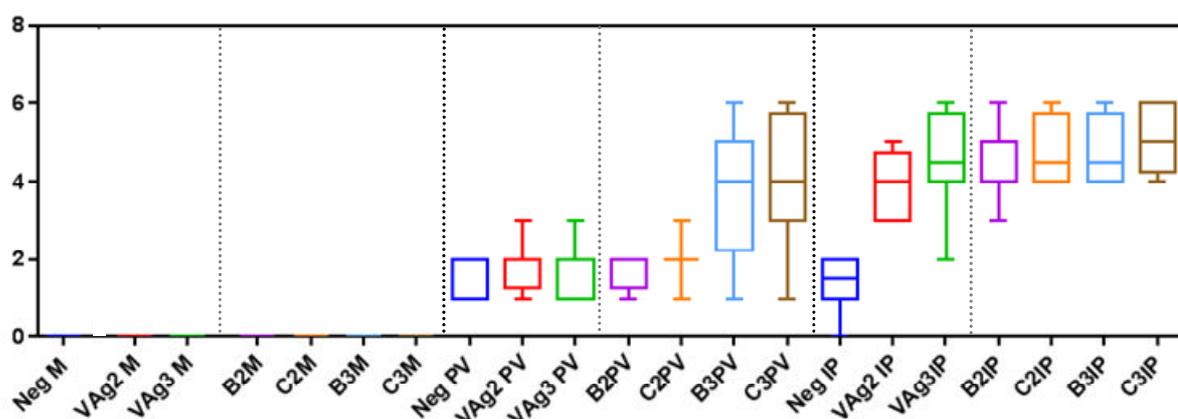


Figura 17: Gráfico *Box plot* com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas expressando lisozima, nos três microambientes do SNC.

Legenda: M-meninge; PV-perivascular; IP-intraparenquimatosa; Neg-controle negativo; VAg2-animais infectados com VAg2 pela via IC; VAg3-animais infectados com VAg3 pela via IC; B2- animais infectados com VAg2 pela via IM posterior; C2- animais infectados com VAg3 pela via IM posterior; B3- animais infectados com VAg2 pela via IM anterior; C3- animais infectados com VAg3 pela via IM anterior.

A expressão de lisozima esteve presente por todo o período pós-infecção, mas demonstrou maior aumento a partir do 8ºDPI e esta diferença foi

estatisticamente significativa, sendo responsável por 11,08% da variância total e também é considerado um evento estatístico extremamente significativo ($p < 0,0001$), mostrando que durante a infecção pelo RABV houve aumento na expressão de lisozima.

Neste estudo a expressão de iNOS no microambiente PV se mostrou maior nos animais infectados do grupo dos controles positivos e B3 do que no controle negativo, com diferença estatisticamente significativa, enquanto no microambiente IP o grupo controle apresentou diferença altamente significativa quando comparado com os demais grupos controles e experimentais. Os grupos experimentais são responsáveis por 79,19% da variância total, havendo aumento global na expressão de células expressando lisozima, com uma chance de menos de 0,01% de tal efeito ter sido observado aleatoriamente, sendo o efeito estatístico considerado extremamente significativo ($p < 0,0001$), exibindo maior secreção de iNOS no microambiente IP.

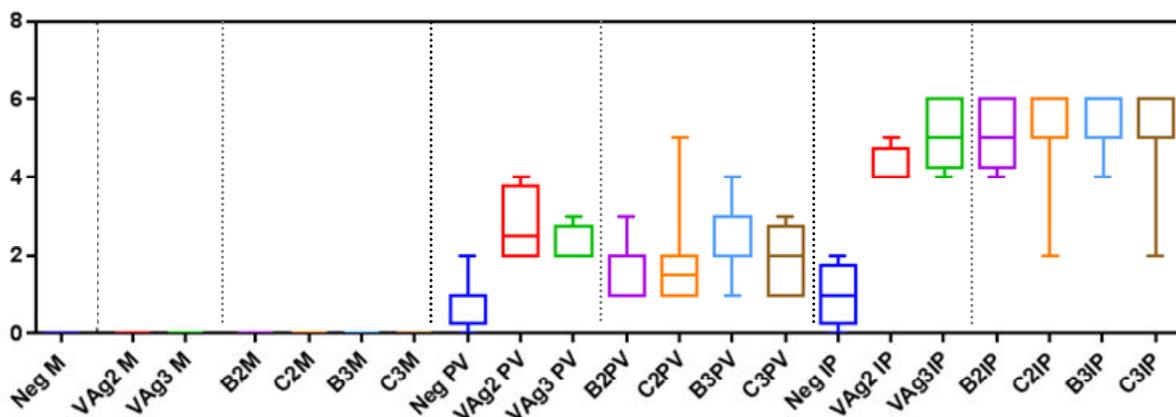


Figura 18: Gráfico *boxplot* com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas secretando iNOS, nos três microambientes do SNC.

Legenda: M-meninge; PV-perivascular; IP-intraparenquimatoso; Neg-controle negativo; VAg2-animal infectado com VAg2 pela via IC; VAg3-animal infectado com VAg3 pela via IC; B2- animal infectado com VAg2 pela via IM posterior; C2- animal infectado com VAg3 pela via IM posterior; B3- animal infectado com VAg2 pela via IM anterior; C3- animal infectado com VAg3 pela via IM anterior.

Na avaliação dos DPI se observa crescimento numérico a partir do 8ºDPI das células expressando iNOS, e esteve aumentada por todo o período pós-infecção até o 18ºDPI, porém as diferenças entre os grupos experimentais são responsáveis por 2,04% da variância total, sendo considerado um evento estatístico não significativo ($p=0,2109$).

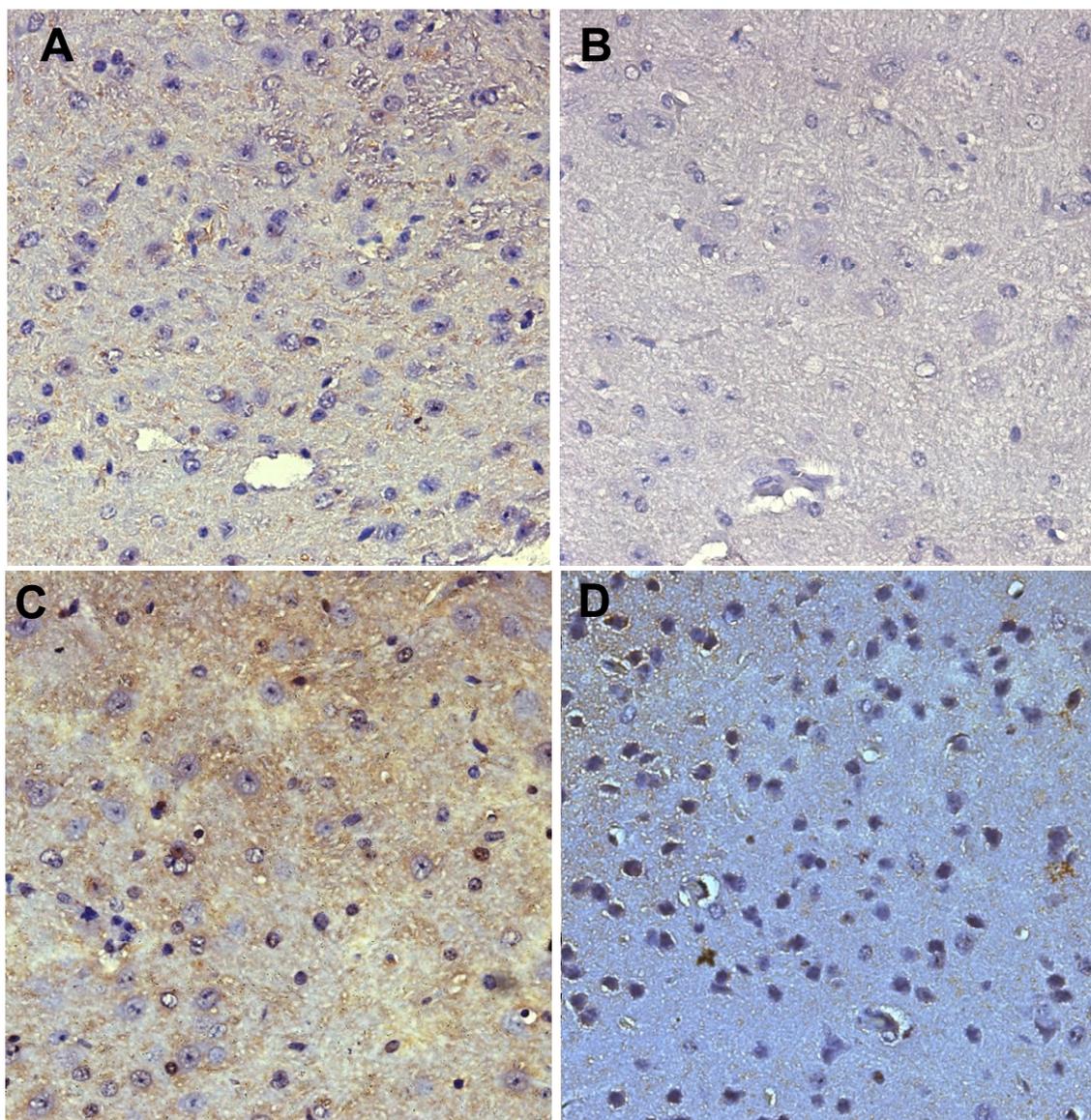


Figura 19: Reação de imunohistoquímica para perfil de atividade de glia, tecido adjacente corado em azul pela hematoxilina (Magnitude 200x). **A** - tecido nervoso infectado, mostrando áreas acastanhadas que representam positividade para lisozima. **B** – Tecido nervoso não infectado, testado para lisozima (controle negativo). **C** - tecido nervoso infectado, mostrando áreas acastanhadas que representam positividade para iNOS. **D** – Tecido nervoso não infectado, testado para iNOS (controle negativo).

6.2.3 Perfil celular

Na avaliação da imunomarcagem para CD4 nota-se redução na expressão quando comparamos o controle negativo com os animais infectados. Na meninge (M) há diferença estatística entre a expressão de CD4 no controle negativo e diminuída nos animais infectados por outras vias que não a IC (controles positivos – não significativos (ns). No espaço perivascular (PV) a diferença estatística ocorre apenas entre o controle negativo e o grupo C, mas há numericamente redução. Não houve diferença estatística entre a expressão do CD4 no ambiente intraparenquimatoso (IP). Os grupos experimentais são responsáveis por 43,94% da variância total, havendo aumento global na expressão de células expressando CD4, com uma chance de menos de 0,01% de tal efeito ter sido observado aleatoriamente, sendo o efeito estatístico considerado extremamente significativo ($p < 0,0001$).

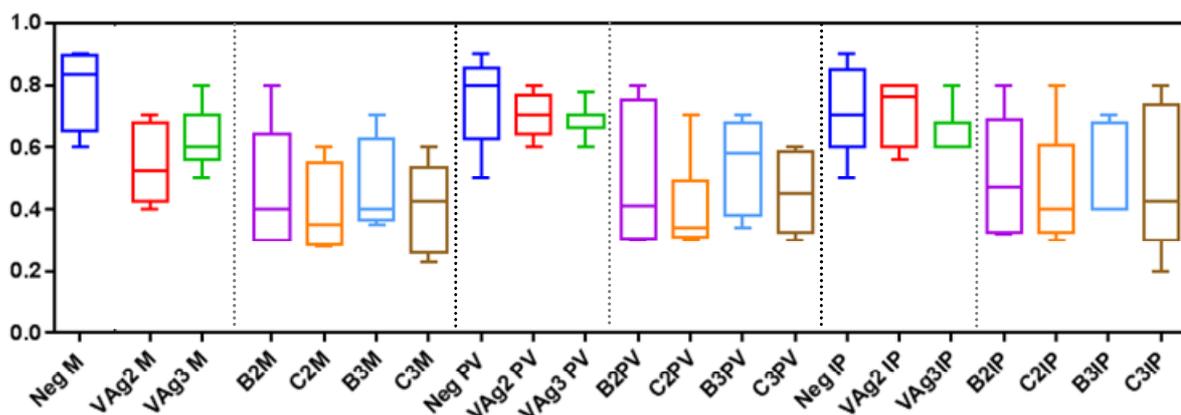


Figura 20: Gráfico *Box plot* com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas expressando CD4, nos três microambientes do SNC.

Legenda: M-meninge; PV-perivascular; IP-intraparenquimatoso; Neg-controle negativo; VAg2-animais infectados com VAg2 pela via IC; VAg3-animais infectados com VAg3 pela via IC; B2- animais infectados com VAg2 pela via IM posterior; C2- animais infectados com VAg3 pela via IM posterior ; B3- animais infectados com VAg2 pela via IM anterior; C3- animais infectados com VAg3 pela via IM anterior.

A expressão de CD4 esteve diminuída por todo o período pós-infecção a partir do 14ºDPI e esta diferença foi estatisticamente significativa, sendo responsável por 11,97% da variância total e também é considerado um evento estatístico extremamente significativo ($p < 0,0001$).

Na avaliação da imunomarcagem para CD3, nota-se grande aumento na expressão quando comparamos o controle negativo com os animais infectados e essa diferença estatisticamente significativa ocorre nos três estratos, meninge, perivascular e intraparenquimatoso.

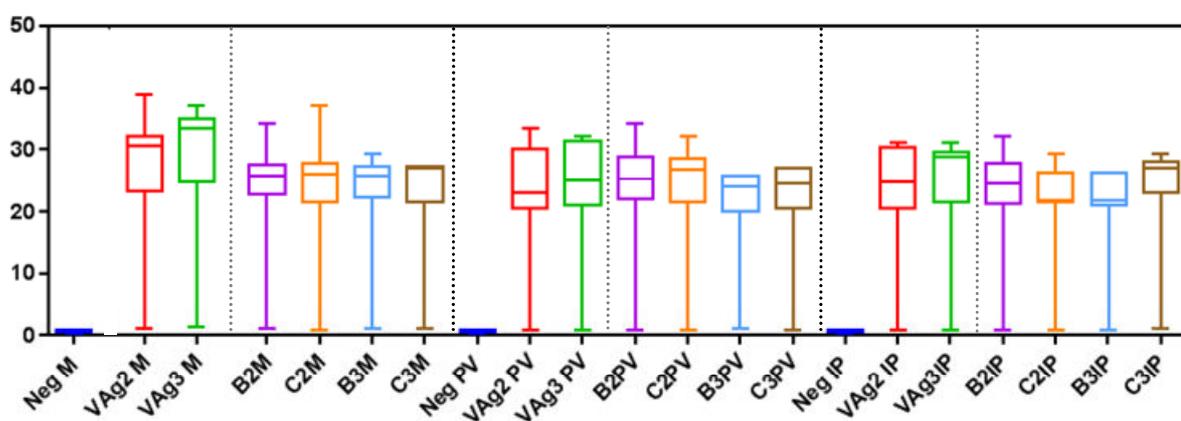


Figura 21: Gráfico *Box plot* com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas expressando CD3, nos três microambientes do SNC.

Legenda: M-meninge; PV-perivascular; IP-intraparenquimatoso; Neg-controle negativo; VAg2-animais infectados com VAg2 pela via IC; VAg3-animais infectados com VAg3 pela via IC; B2- animais infectados com VAg2 pela via IM posterior; C2- animais infectados com VAg3 pela via IM posterior; B3- animais infectados com VAg2 pela via IM anterior; C3- animais infectados com VAg3 pela via IM anterior.

A expressão de CD3 esteve aumentada por todo o período pós-infecção a partir do 8ºDPI e esta diferença foi estatisticamente significativa. Os grupos experimentais são responsáveis por 48,15% da variância total, havendo aumento global na expressão de células expressando CD3, com uma chance de menos de 0,01% de tal efeito ter sido observado aleatoriamente, sendo o efeito considerado extremamente significativo ($p < 0,0001$), assim como as diferenças entre os DPI são

responsáveis por 41,25% da variância total e também é considerado um evento estatístico extremamente significativo ($p < 0,0001$).

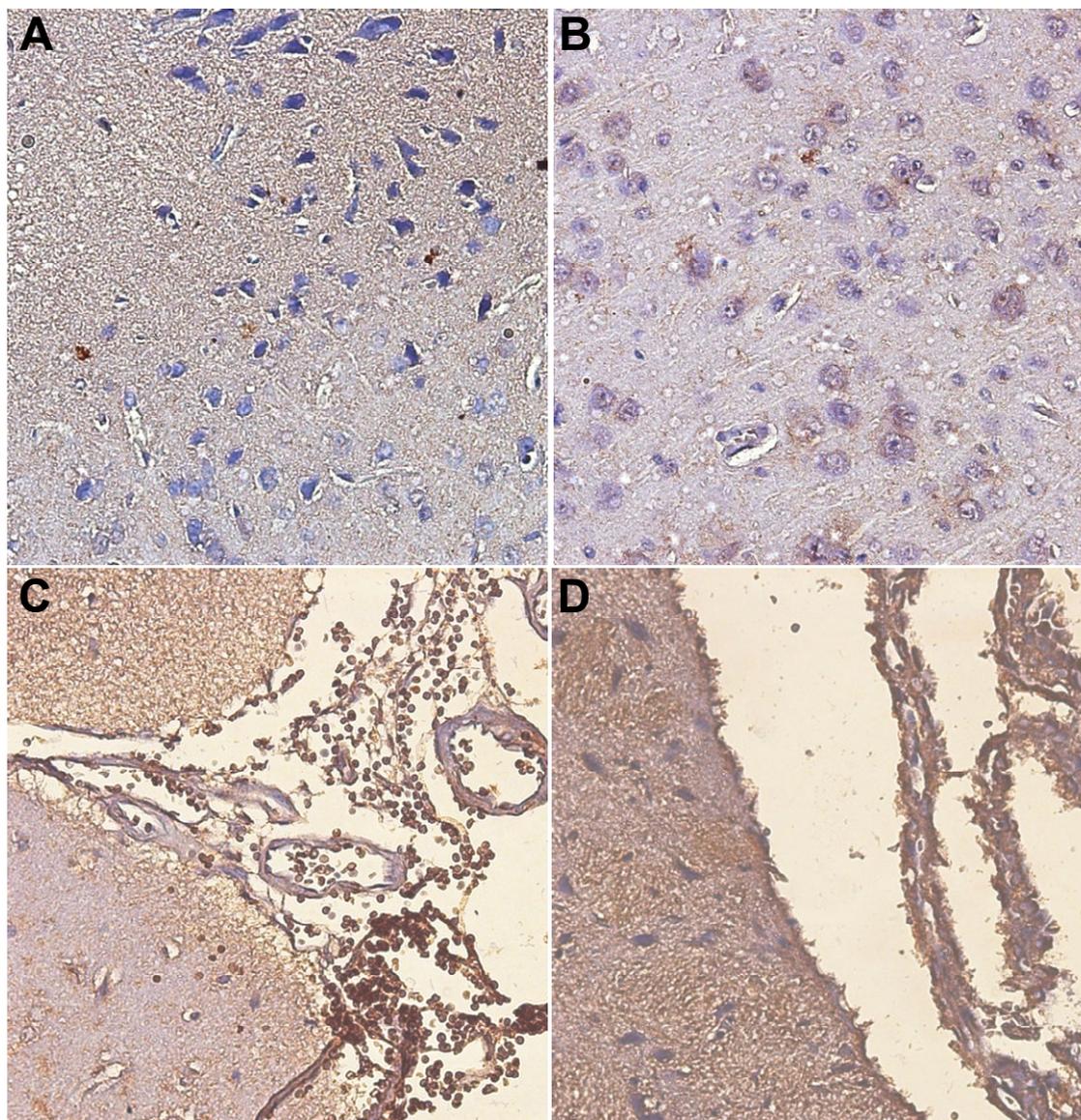


Figura 22: Reação de imunohistoquímica para perfil celular, tecido adjacente corado em azul pela hematoxilina (Magnitude 200x). **A** - tecido nervoso infectado, mostrando áreas acastanhadas que representam positividade para o CD3. **B** – Tecido nervoso não infectado, testado para CD3 (controle negativo). **C** - tecido nervoso infectado, mostrando áreas acastanhadas que representam positividade para o CD4. **D** – Tecido nervoso não infectado, testado para CD4 (controle negativo).

Na avaliação da imunomarcção para FoxP3 nota-se grande aumento na expressão quando comparamos o controle negativo com os animais infectados e

essa diferença estatisticamente significativa ocorre nos três estratos, meninge, perivascular e intraparenquimatoso, excetuando a comparação entre o controle PV com o grupo C2 PV.

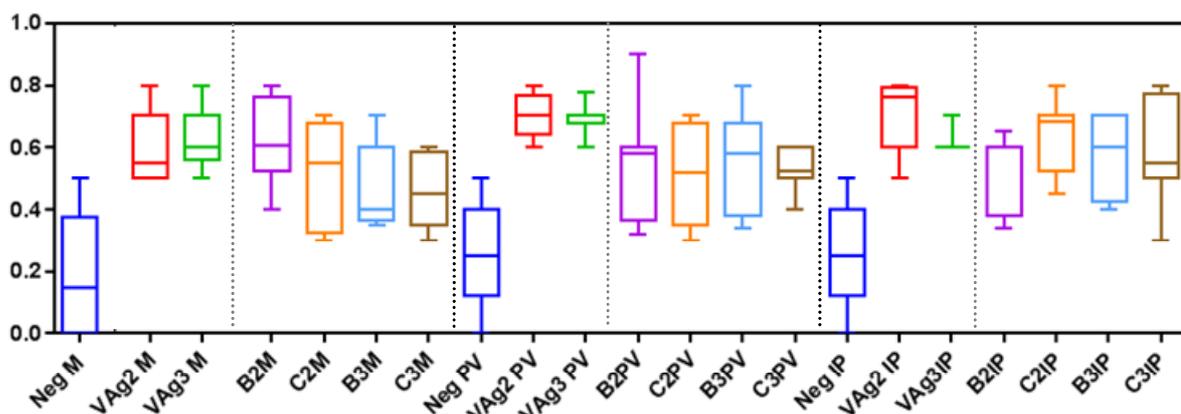


Figura 23: Gráfico *Box plot* com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas expressando FoxP3, nos três microambientes do SNC.

Legenda: M-meninge; PV-perivascular; IP-intraparenquimatoso; Neg-controle negativo; VAg2-animaís infectados com VAg2 pela via IC; VAg3-animaís infectados com VAg3 pela via IC; B2- animais infectados com VAg2 pela via IM posterior; C2- animais infectados com VAg3 pela via IM posterior; B3- animais infectados com VAg2 pela via IM anterior; C3- animais infectados com VAg3 pela via IM anterior.

A expressão de FoxP3 esteve aumentada por todo o período pós-infecção e esta diferença foi estatisticamente significativa. Os grupos experimentais são responsáveis por 11,97% da variância total, havendo aumento global na expressão de células expressando FoxP3, com uma chance de menos de 0,01% de tal efeito ter sido observado aleatoriamente, sendo o efeito considerado extremamente significativo ($p < 0,0001$), assim como as diferenças entre os DPI são responsáveis por 43,94% da variância total e, também, é considerado um evento estatístico extremamente significativo ($p < 0,0001$).

No nosso estudo, na avaliação da imunomarcagem para Caspase 3 nota-se grande aumento na expressão deste imunomarcador em ambiente IP quando comparamos o controle negativo com os animais infectados e essa diferença é estatisticamente significativa. Os grupos experimentais são responsáveis por 91,62%

da variância total, havendo aumento global na expressão de células expressando caspase 3, com uma chance de menos de 0,01% de tal efeito ter sido observado aleatoriamente, sendo o efeito estatístico considerado extremamente significativo ($p < 0,0001$).

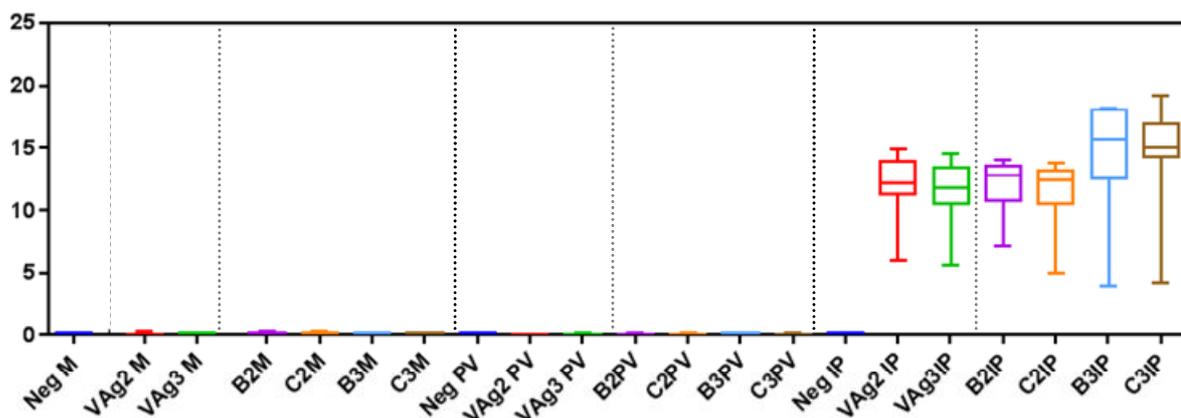


Figura 24: Gráfico *Box plot* com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas expressando caspase 3, nos três microambientes do SNC.

Legenda: M-meninge; PV-perivascular; IP-intraparenquimatoso; Neg-controle negativo; VAg2-animal infectado com VAg2 pela via IC; VAg3-animal infectado com VAg3 pela via IC; B2- animal infectado com VAg2 pela via IM posterior; C2- animal infectado com VAg3 pela via IM posterior; B3- animal infectado com VAg2 pela via IM anterior; C3- animal infectado com VAg3 pela via IM anterior.

A expressão de caspase 3 esteve aumentada no período pós-infecção que compreendeu entre o 12° e 18° DPI e esse aumento foi estatisticamente significativo, sendo responsável por 1,89% da variância total e também é considerado um evento estatístico extremamente significativo ($p < 0,0001$).

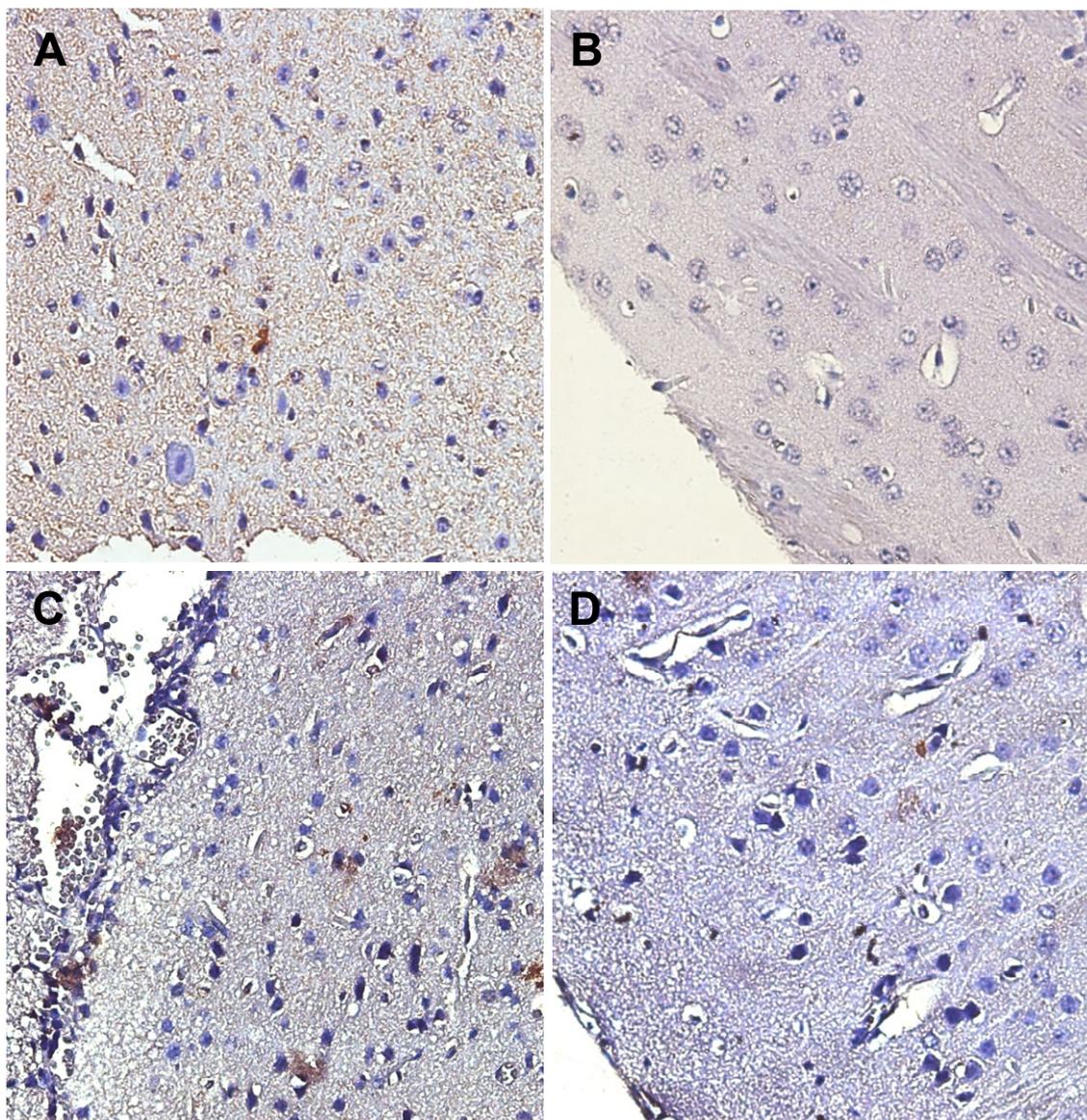


Figura 25: Reação de imunohistoquímica para perfil T regulatório, tecido adjacente corado em azul pela hematoxilina (Magnitude 200x). **A** - tecido nervoso infectado, mostrando áreas acastanhadas que representam positividade para Caspase 3. **B** – Tecido nervoso não infectado, testado para Caspase 3 (controle negativo). **C** - tecido nervoso infectado, mostrando áreas acastanhadas que representam positividade para FoxP3. **D** – Tecido nervoso não infectado, testado para FoxP3 (controle negativo).

6.2.4 Perfil Citocínico

6.2.4.1 Citocinas pró-inflamatórias

Na avaliação da imunomarcação para fator de necrose tumoral α (TNF- α) nota-se aumento estatisticamente significativo na secreção desta citocina quando da infecção pelo RABV nos três microambientes avaliados, excetuando-se o grupo B2 M com o controle negativo de M, e o controle negativo IP com controle positivo de variante antigênica 2 (VAg2 IP). Os grupos experimentais são responsáveis por 46,30% da variância total, havendo aumento global na secreção de TNF- α , com uma chance de menos de 0,01% de tal efeito ter sido observado aleatoriamente, sendo o efeito estatístico considerado extremamente significativo ($p < 0,0001$).

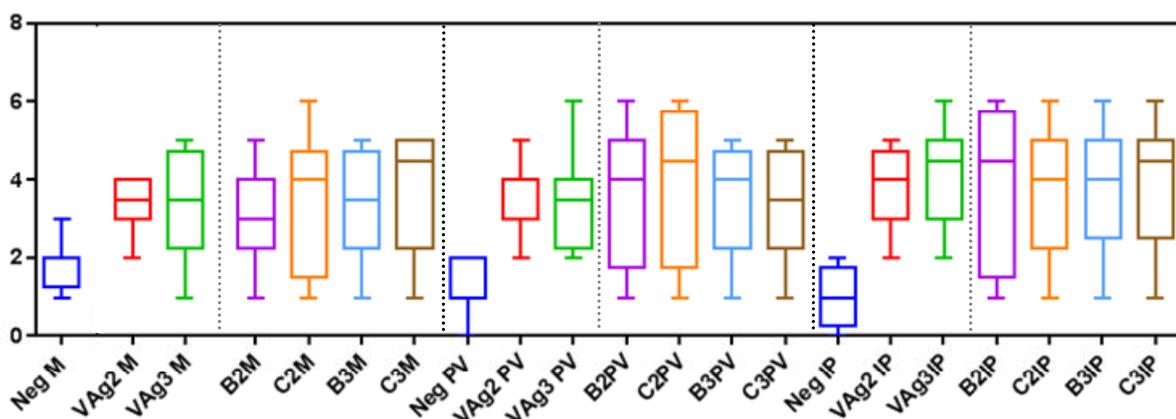


Figura 26: Gráfico *Box plot* com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas secretando TNF- α , nos três microambientes do SNC.

Legenda: M-meninge; PV-perivascular; IP-intraparenquimatoso; Neg-controle negativo; VAg2-animais infectados com VAg2 pela via IC; VAg3-animais infectados com VAg3 pela via IC; B2- animais infectados com VAg2 pela via IM posterior; C2- animais infectados com VAg3 pela via IM posterior; B3- animais infectados com VAg2 pela via IM anterior; C3- animais infectados com VAg3 pela via IM anterior.

A secreção de TNF- α esteve aumentada no período pós-infecção que compreendeu entre o 10° e 16° DPI e esta diferença foi estatisticamente significativa, sendo responsável por 10,38% da variância total e, também, é considerado um evento estatístico extremamente significativo ($p < 0,0001$).

Na avaliação da imunomarcacão para interferon γ (IFN- γ) nota-se aumento estatisticamente significativo na secreção desta citocina quando da infecção pelo RABV nos três microambientes avaliados. Os grupos experimentais são responsáveis por 41,02% da variância total, havendo aumento global na secreção de IFN- γ , com uma chance de menos de 0,01% de tal efeito ter sido observado aleatoriamente, sendo o efeito estatístico considerado extremamente significativo ($p < 0,0001$).

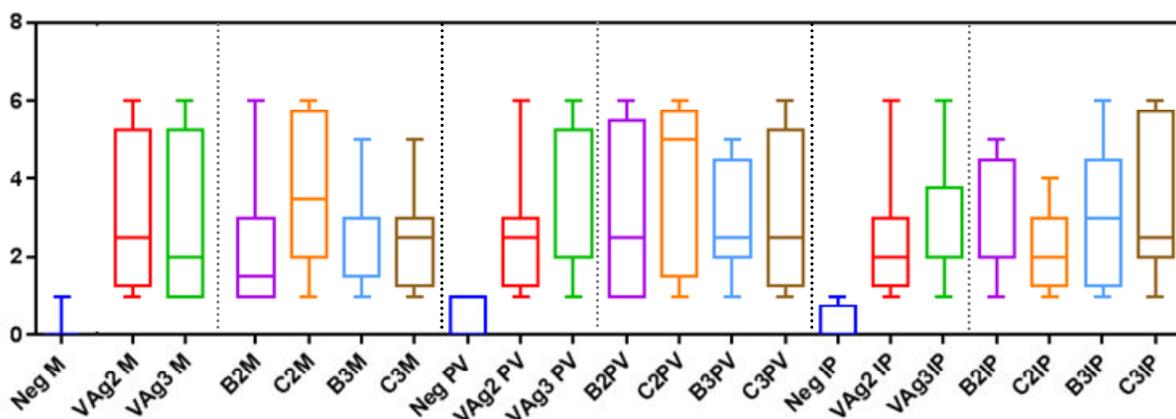


Figura 27: Gráfico *Box plot* com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas secretando IFN- γ , nos três microambientes do SNC.

Legenda: M-meninge; PV-perivascular; IP-intraparenquimatoso; Neg-controle negativo; VAg2-animais infectados com VAg2 pela via IC; VAg3-animais infectados com VAg3 pela via IC; B2- animais infectados com VAg2 pela via IM posterior; C2- animais infectados com VAg3 pela via IM posterior ; B3- animais infectados com VAg2 pela via IM anterior; C3- animais infectados com VAg3 pela via IM anterior.

A secreção de IFN- γ esteve aumentada no período pós-infecção que compreendeu entre o 10° e 16° DPI e esta diferença foi estatisticamente significativa, sendo responsável por 16,22% da variância total e, também, é considerado um evento estatístico extremamente significativo ($p < 0,0001$).

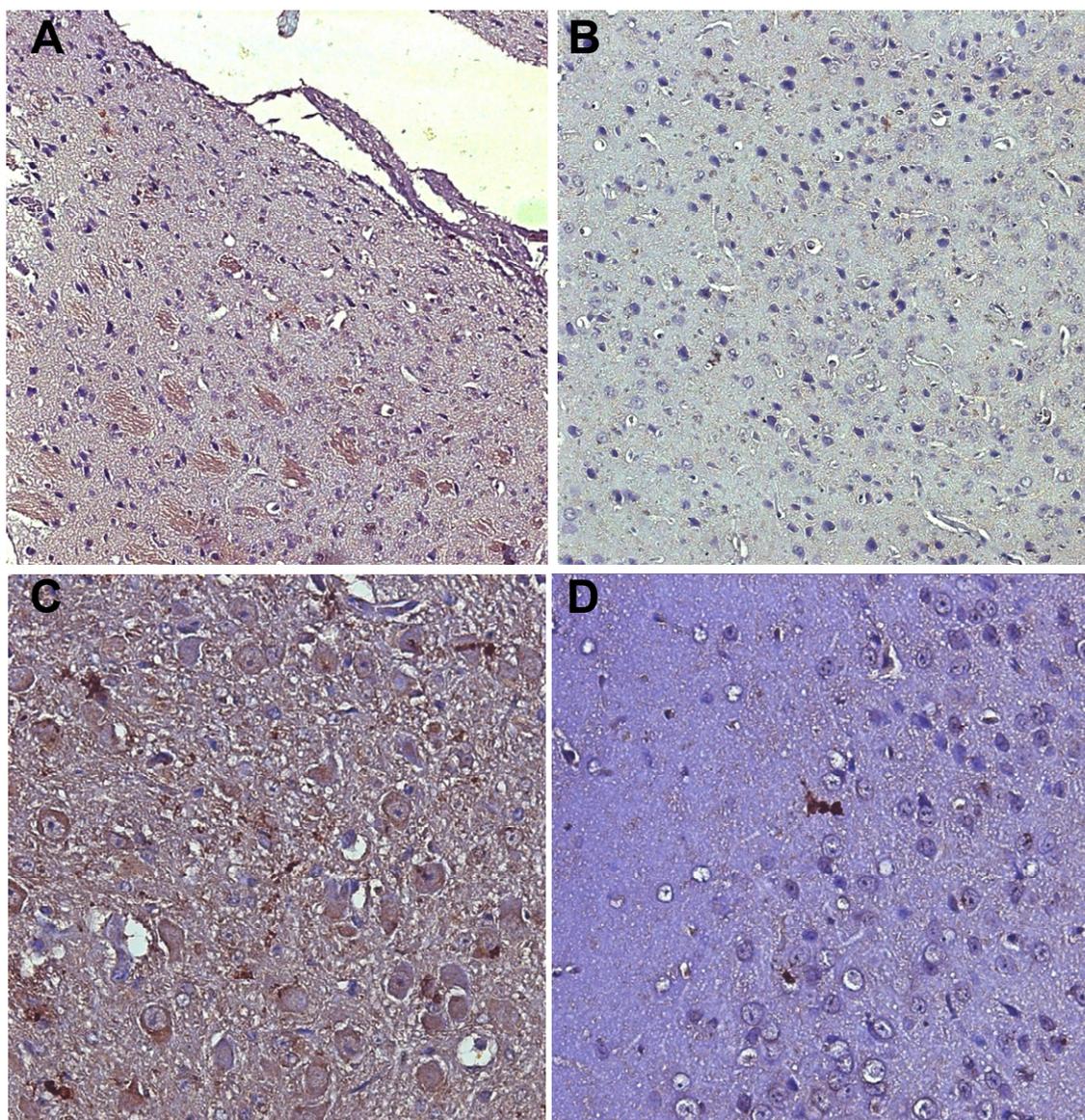


Figura 28: Reação de imunohistoquímica para perfil citocínico anti-inflamatório, tecido adjacente corado em azul pela hematoxilina (Magnitude 200x). **A** - tecido nervoso infectado, mostrando áreas acastanhadas que representam positividade para TNF- α . **B** - Tecido nervoso não infectado, testado para TNF- α (controle negativo). **C** - tecido nervoso infectado, mostrando áreas acastanhadas que representam positividade para INF- γ . **D** - Tecido nervoso não infectado, testado para INF- γ (controle negativo).

Na avaliação da imunomarcação para interleucina 6 (IL-6) nota-se aumento na secreção desta citocina durante a infecção pelo RABV nos três microambientes avaliados, sendo, no microambiente meningeal estatisticamente maior nos quatro grupos experimentais (B2, C2, B3, C3) quando comparados ao controle negativo (Neg M); nos microambientes PV e IP, além da diferença estatística entre controle negativo e grupos experimentais observou-se também

diferença estatística daquele com o controle positivo de VAg3. Os grupos experimentais são responsáveis por 44,21% da variância total, havendo aumento global na secreção de IL-6, com uma chance de menos de 0,01% de tal efeito ter sido observado aleatoriamente, sendo o efeito estatístico considerado extremamente significativo ($p < 0,0001$).

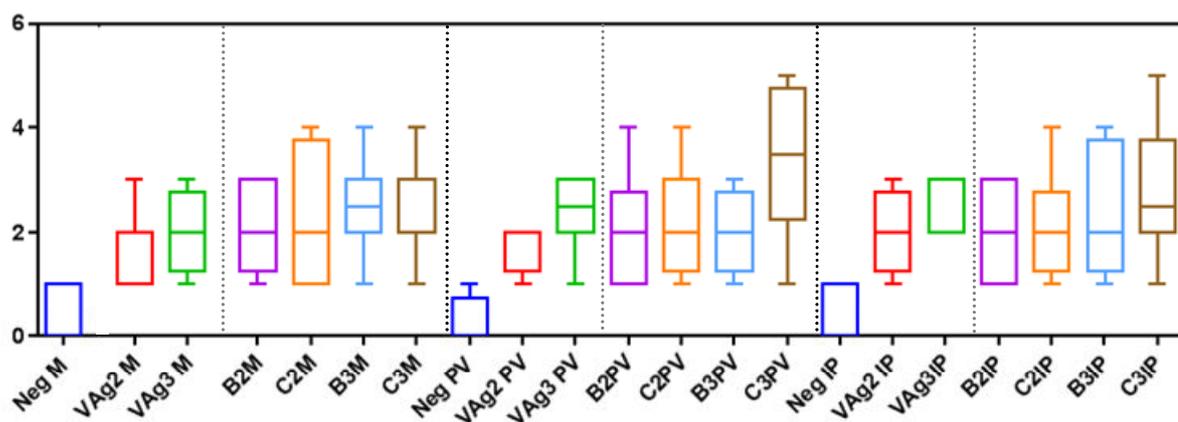


Figura 29: Gráfico *Box plot* com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas secretando IL-6, nos três microambientes do SNC.

Legenda: M-meninge; PV-perivascular; IP-intraparenquimatoso; Neg-controle negativo; VAg2-animais infectados com VAg2 pela via IC; VAg3-animais infectados com VAg3 pela via IC; B2- animais infectados com VAg2 pela via IM posterior; C2- animais infectados com VAg3 pela via IM posterior ; B3- animais infectados com VAg2 pela via IM anterior; C3- animais infectados com VAg3 pela via IM anterior.

A secreção de IL-6 esteve aumentada no período pós-infecção que compreendeu entre o 10° e 16° DPI e esta diferença foi estatisticamente significativa, sendo responsável por 13,07% da variância total e, também, é considerado um evento estatístico extremamente significativo ($p < 0,0001$).

Na avaliação da imunomarcagem para interleucina 1 β (IL-1 β) nota-se aumento na secreção desta citocina quando da infecção pelo RABV nos três microambientes avaliados, sendo, no microambiente meningeal estatisticamente maior nos grupos experimentais C2, B3, C3 quando comparados ao controle negativo (Neg M); no microambiente PV, houve diferença estatística entre controle negativo e grupos experimentais C2, B3 e C3, além de diferença estatística daquele

com o controle positivo de VAg3; no microambiente IP também foi observada a diferença deste em relação ao controle positivo VAg3, assim como do controle negativo com os grupos C2 e B3. Os grupos experimentais são responsáveis por 40,73% da variância total, havendo aumento global na secreção de IL-1 β , com uma chance de menos de 0,01% de tal efeito ter sido observado aleatoriamente, sendo o efeito estatístico considerado extremamente significativo ($p < 0,0001$).

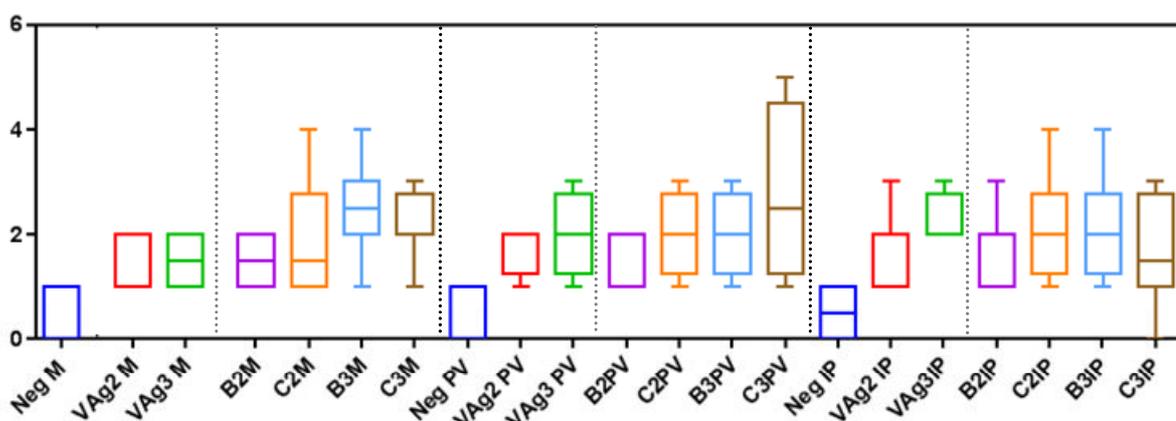


Figura 30: Gráfico *Box plot* com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas secretando IL-1 β , nos três microambientes do SNC.

Legenda: M-meninge; PV-perivascular; IP-intraparenquimatoso; Neg-controle negativo; VAg2-animal infectado com VAg2 pela via IC; VAg3-animal infectado com VAg3 pela via IC; B2- animal infectado com VAg2 pela via IM posterior; C2- animal infectado com VAg3 pela via IM posterior; B3- animal infectado com VAg2 pela via IM anterior; C3- animal infectado com VAg3 pela via IM anterior.

A secreção de IL-1 β esteve aumentada no período pós-infecção que compreendeu entre o 12° e 18° DPI e esta diferença foi estatisticamente significativa, sendo responsável por 10,36% da variância total e, também, é considerado um evento estatístico extremamente significativo ($p = 0,0003$).

Quando avaliada a imunomarcagem de interleucina 8 (IL-8) nota-se aumento na secreção desta citocina quando da infecção pelo RABV nos três microambientes avaliados. Nos microambientes M e PV apesar do aumento numérico, diferença estatística foi observada entre controle negativo comparado aos dois controles positivos e daquele com C2, B3 e C3. No microambiente IP não é

observada significância estatística entre as diferenças apresentadas. Os grupos experimentais são responsáveis por 40,90% da variância total, havendo aumento global na secreção de IL-8, com uma chance de menos de 0,01% de tal efeito ter sido observado aleatoriamente, sendo o efeito estatístico considerado extremamente significativo ($p < 0,0001$).

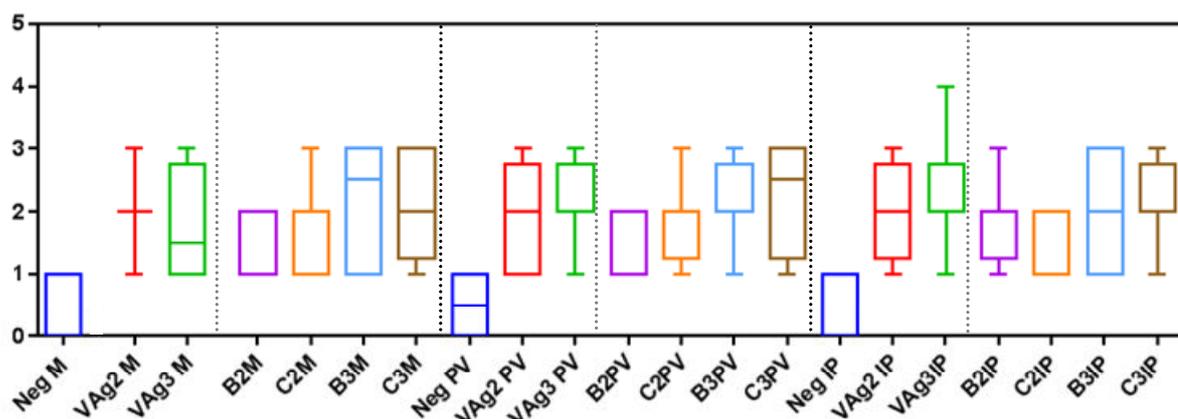


Figura 31: Gráfico *Box plot* com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas secretando IL-8, nos três microambientes do SNC.

Legenda: M-meninge; PV-perivascular; IP-intraparenquimatoso; Neg-controle negativo; VAg2-animais infectados com VAg2 pela via IC; VAg3-animais infectados com VAg3 pela via IC; B2- animais infectados com VAg2 pela via IM posterior; C2- animais infectados com VAg3 pela via IM posterior ; B3- animais infectados com VAg2 pela via IM anterior; C3- animais infectados com VAg3 pela via IM anterior.

A secreção de IL-8 esteve aumentada no período pós-infecção que compreendeu entre o 12° e 18° DPI e esta diferença foi estatisticamente significativa, sendo responsável por 24,17% da variância total e, também, é considerado um evento estatístico extremamente significativo ($p < 0,0001$).

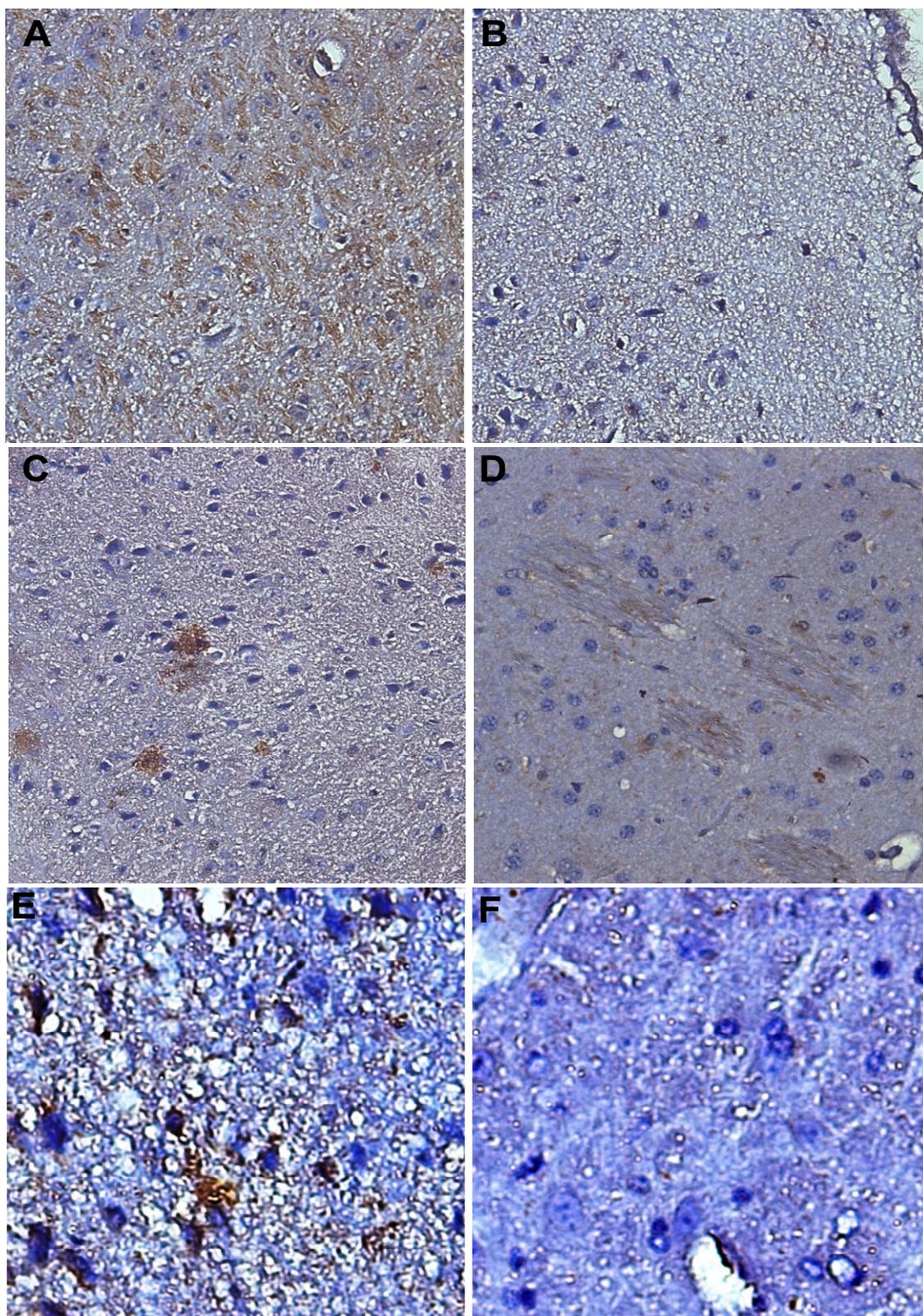


Figura 32: Reação de imunohistoquímica para perfil citocínico anti-inflamatório, tecido adjacente corado em azul pela hematoxilina (Magnitude 200x). **A** - tecido nervoso infectado, mostrando áreas acastanhadas que representam positividade para IL-6. **B** – Tecido nervoso não infectado, testado para IL-6 (controle negativo). **C** - tecido nervoso infectado, mostrando áreas acastanhadas que representam positividade para IL-1 β . **D** – Tecido nervoso não infectado, testado para IL-1 β (controle negativo). **D** - tecido nervoso infectado, mostrando áreas acastanhadas que representam positividade para IL-8. **E** – Tecido nervoso não infectado, testado para IL-8 (controle negativo).

6.2.4.2 Citocinas anti-inflamatórias

Quando avaliada a imunomarcação do fator transformador do crescimento β (TGF- β) nota-se aumento na secreção desta citocina quando da infecção pelo RABV nos três microambientes avaliados. Porém só é observada diferença estatística entre controle negativo PV e C2, assim como no microambiente IP, onde o controle negativo ficou menor de forma significativa em relação aos demais grupos. Os grupos experimentais são responsáveis por 28,66% da variância total, havendo aumento global na secreção de TGF- β , com uma chance de menos de 0,01% de tal efeito ter sido observado aleatoriamente, sendo o efeito estatístico considerado extremamente significativo ($p < 0,0001$).

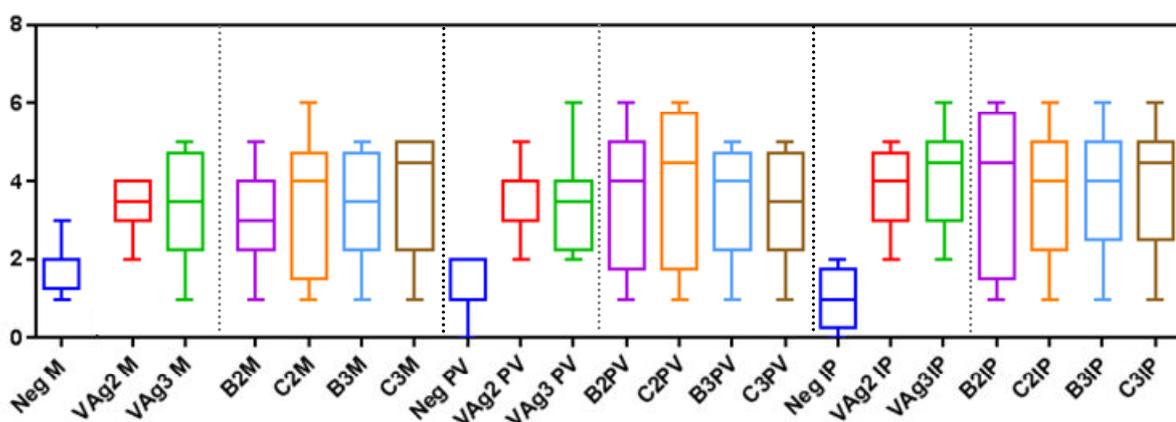


Figura 33: Gráfico *Box plot* com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas secretando TGF- β , nos três microambientes do SNC.

Legenda: M-meninge; PV-perivascular; IP-intraparenquimatosa; Neg-controle negativo; VAg2-animais infectados com VAg2 pela via IC; VAg3-animais infectados com VAg3 pela via IC; B2- animais infectados com VAg2 pela via IM posterior; C2- animais infectados com VAg3 pela via IM posterior ; B3- animais infectados com VAg2 pela via IM anterior; C3- animais infectados com VAg3 pela via IM anterior.

A secreção de TGF- β esteve aumentada no período pós-infecção a partir do 10^o DPI e esta diferença foi estatisticamente significativa, sendo responsável por 35,31% da variância total e, também, é considerado um evento estatístico extremamente significativo ($p < 0,0001$).

Quando avaliada a imunomarcacão da interleucina 4 (IL-4) nota-se aumento na secreo desta citocina quando da infeco pelo RABV nos três microambientes avaliados. Porém, são observada significância estatística entre controle negativo M e C2M, assim como no microambiente PV, onde o controle negativo ficou menor de forma significativa em relao ao C2, e no microambiente IP o controle negativo foi estatisticamente menor que C3. Os grupos experimentais são responsáveis por 39,29% da variância total, havendo aumento global na secreo de IL-4, com uma chance de menos de 0,01% de tal efeito ter sido observado aleatoriamente, sendo o efeito estatístico considerado extremamente significativo ($p < 0,0001$).

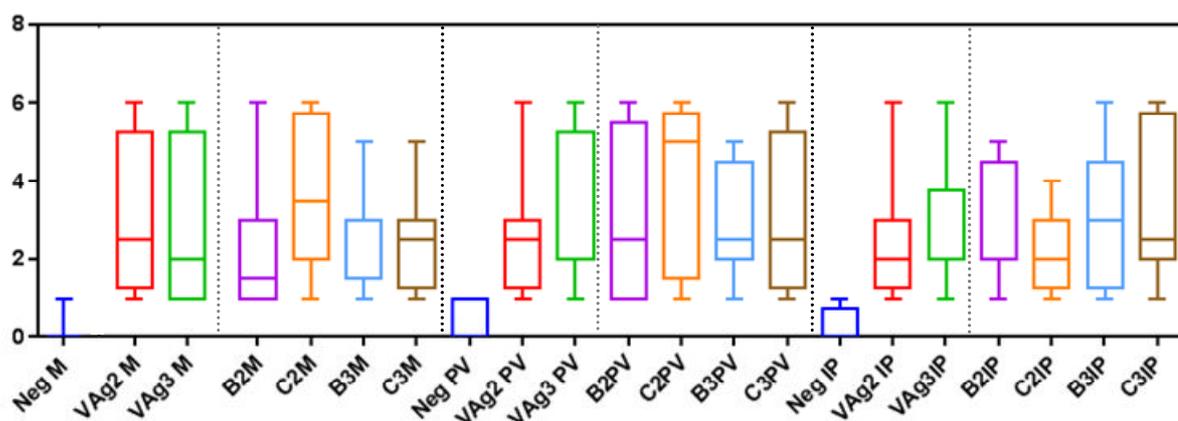


Figura 34: Gráfico *Box plot* com desvio padrão e média dos resultados encontrados para células imunomarcadas secretando IL-4, nos três microambientes do SNC.

Legenda: M-meninge; PV-perivascular; IP-intraparenquimatoso; Neg-controle negativo; VAg2-animais infectados com VAg2 pela via IC; VAg3-animais infectados com VAg3 pela via IC; B2- animais infectados com VAg2 pela via IM posterior; C2- animais infectados com VAg3 pela via IM posterior ; B3- animais infectados com VAg2 pela via IM anterior; C3- animais infectados com VAg3 pela via IM anterior.

A secreo de IL-4 esteve aumentada no período pós-infeco que compreendeu entre o 8^o e 18^o DPI e esta diferença foi estatisticamente significativa, sendo responsável por 18,84% da variância total e, também,  considerado um evento estatístico extremamente significativo ($p < 0,0001$).

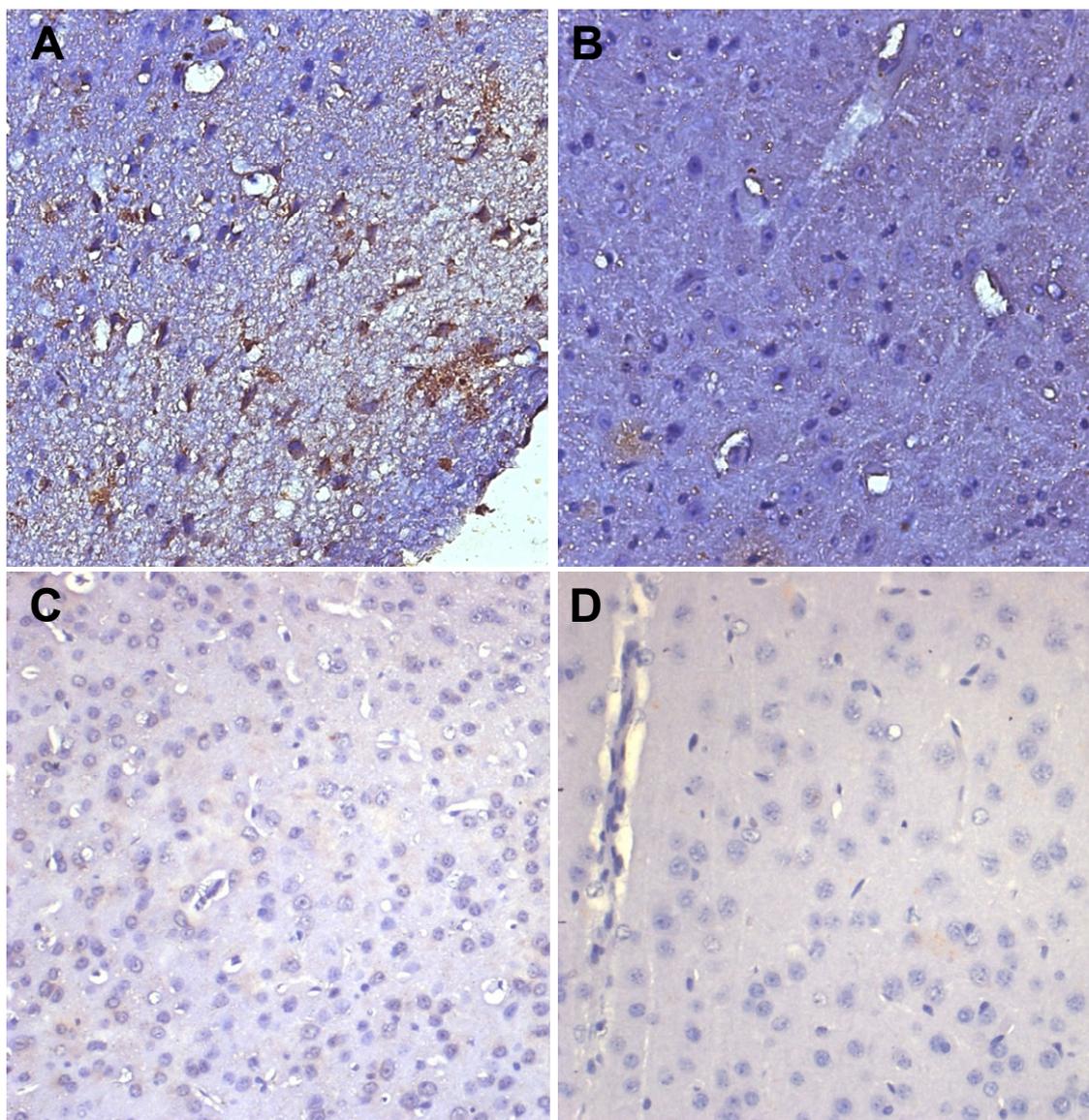


Figura 35: Reação de imunohistoquímica para perfil citocínico anti-inflamatório, tecido adjacente corado em azul pela hematoxilina (Magnitude 200x). **A** - tecido nervoso infectado, mostrando áreas acastanhadas que representam positividade para TGF- β . **B** - Tecido nervoso não infectado, testado para TGF- β (controle negativo). **C** - tecido nervoso infectado, mostrando áreas acastanhadas que representam positividade para IL-4. **D** - Tecido nervoso não infectado, testado para IL-4 (controle negativo).

6.2.5 Perfil Th17 e outros fatores negativos na IHQ

Não houve imunomarcção para IL17, tampouco para IL-23 (figura 36) ou fator XIIIa e não foi possível avaliar TLR-8 (figura 37) devido a marcação inespecífica de fundo.

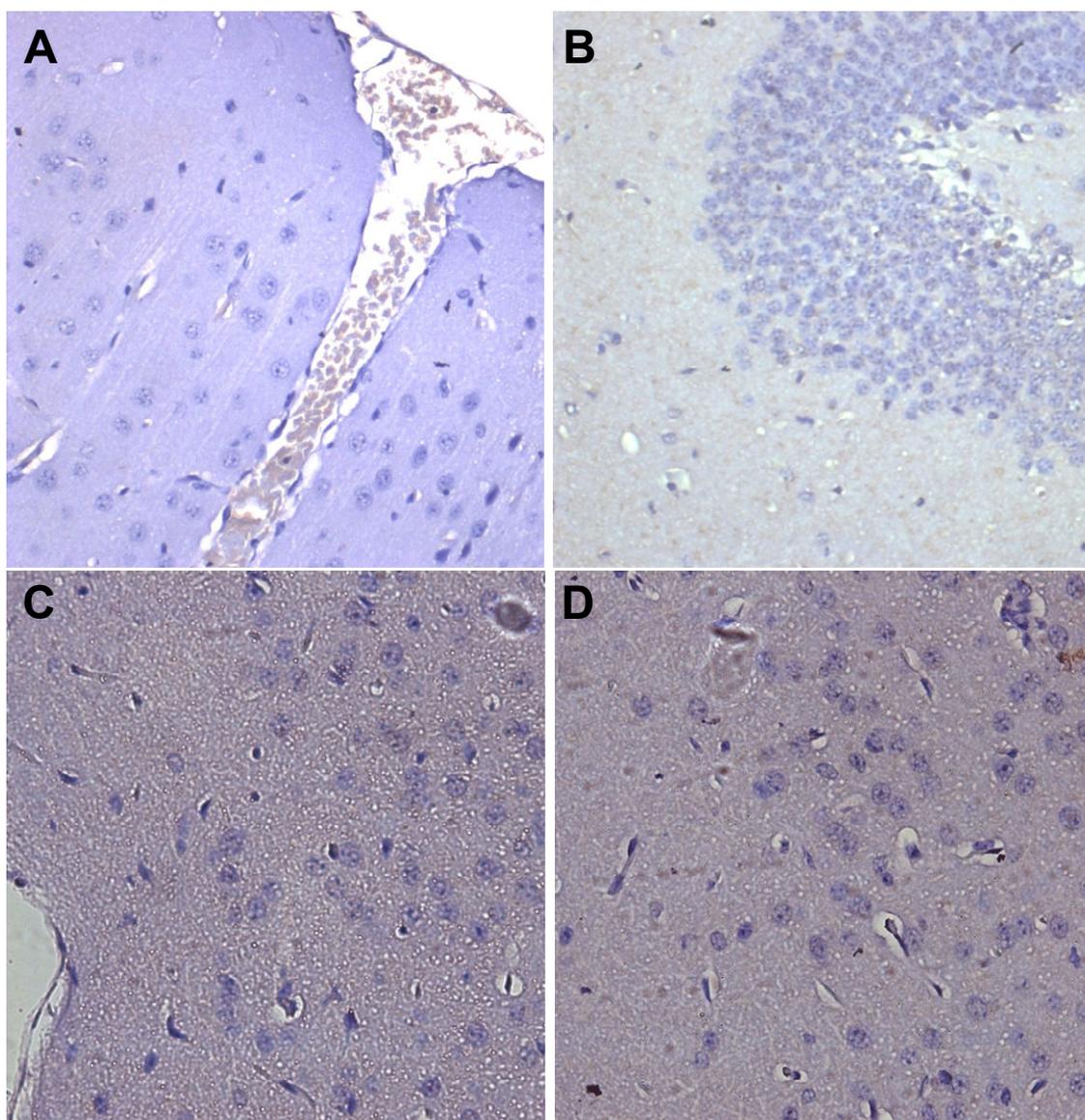


Figura 36: Reação de imunohistoquímica para perfil citocínico anti-inflamatório, tecido adjacente corado em azul pela hematoxilina (Magnitude 200x). **A** - tecido nervoso infectado, ausência de áreas acastanhadas, representa negatividade para IL-17. **B** – Tecido nervoso não infectado, testado para IL-17 (controle negativo). **C** - tecido nervoso infectado, ausência de áreas acastanhadas, representa negatividade para IL-23. **D** – Tecido nervoso não infectado, testado para IL-23 (controle negativo).

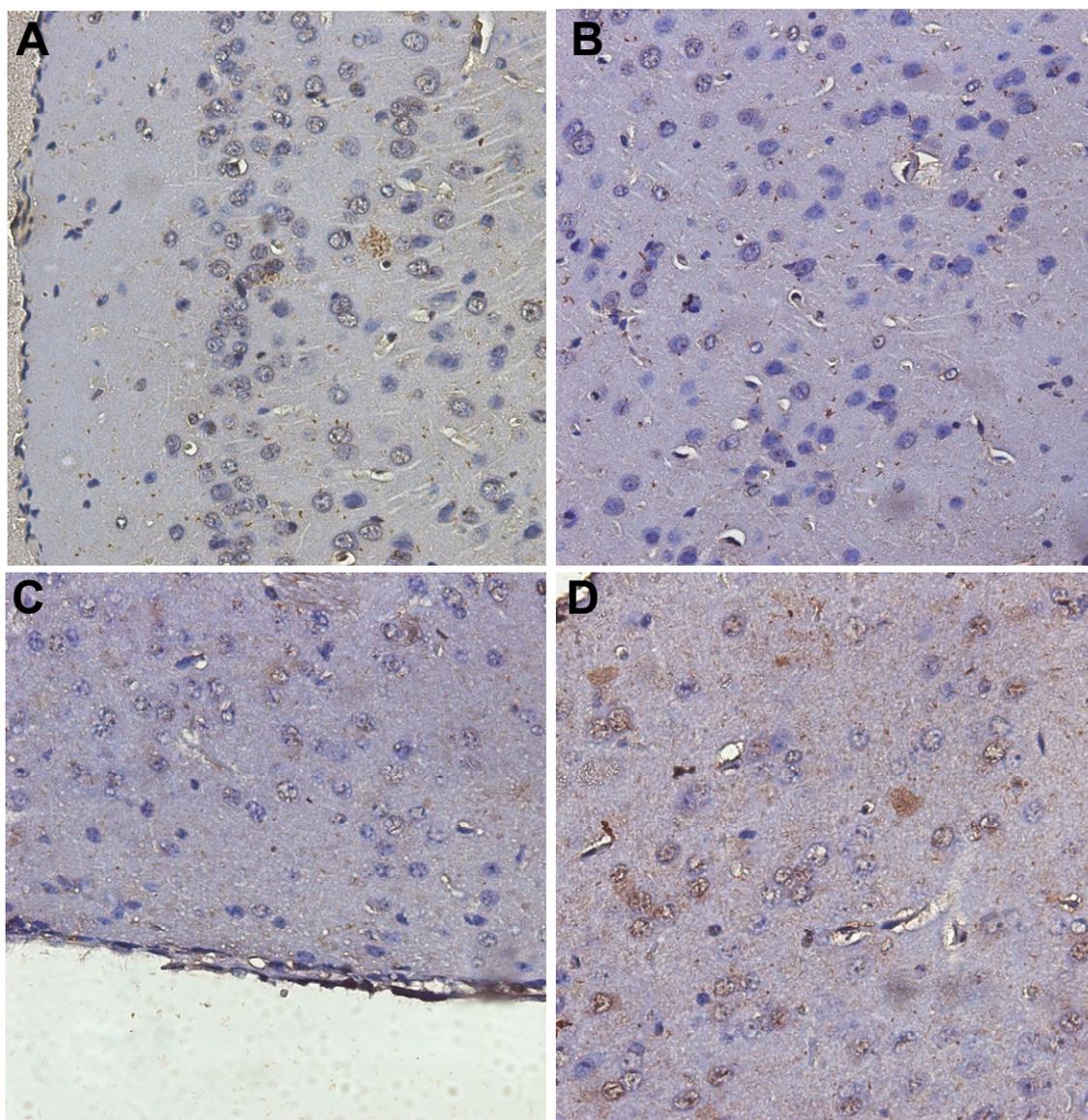


Figura 37: Reação de imunohistoquímica que demonstraram reação inespecífica de fundo, tecido adjacente corado em azul pela hematoxilina (Magnitude 200x). **A** - tecido nervoso infectado, marcação para TLR-8. **B** - Tecido nervoso não infectado, TLR-8 (controle negativo). **C** - tecido nervoso infectado, negativo para Fator XIIIa. **D** - Tecido nervoso não infectado, negativo para Fator XIIIa (controle negativo).

6.3 ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS

As alterações encontradas na raiva experimental são semelhantes às encefalites em geral. Há congestão das leptomeninges e do parênquima nervoso, que se mostra difusamente edemaciado associado à presença de infiltrado linfomonocitário nas leptomeninges e em torno de vasos do tecido nervoso, caracterizando a perivascularite. Neurônios por vezes mostram inclusões virais, necrose e neuronofagia. Há ativação da microglia, com aparecimento de nódulos microgliais.

O infiltrado inflamatório de localização perivascular foi composto por células mononucleares, principalmente linfócitos, preenchendo o espaço de Virchow-Robin, caracterizando perivascularite, além da presença de esparsas inclusões virais, caracterizadas pela visualização do corpúsculo de Negri no citoplasma de neurônios em geral positivos para a IHQ do vírus. Com muita frequência foram encontrados neurônios contraídos denominados hialinos que apresentavam núcleos intensamente basofílicos e picnóticos. Também foi observado no parênquima, processo inflamatório caracterizado por alguns focos de necrose do neurópilo e a pela presença de nódulos microgliais.

Na avaliação histopatológica dos experimentos foi possível observar nos animais controle negativos, apenas sinais de congestão discretos nos microambientes de meninge e perivascular, mas ausente no intraparenquimatoso, enquanto que nos animais controle positivos, se observam sinais de inflamação, neuronofagia, cromatólise, contração neuronal, tumefação neuronal, presença de corpúsculos de Negri e necrose presentes em todos os microambientes.

Nos animais experimentais, observamos que, nas meninges, houve congestão intensa (3) e inflamação de moderada (2) a intensa (3), caracterizando quadro de meningite em 100% dos animais experimentais, estando ausentes sinais de neuronofagia, cromatólise, contração neuronal, tumefação neuronal, corpúsculos de Negri ou necrose. No ambiente perivascular também não foram encontradas lesões além de sinais moderados (2) a intensos (3) de congestão e inflamação intensa (3), infiltrado de células mononucleares (linfócito e plasmócito), caracterizando perivasculite (figura 38).

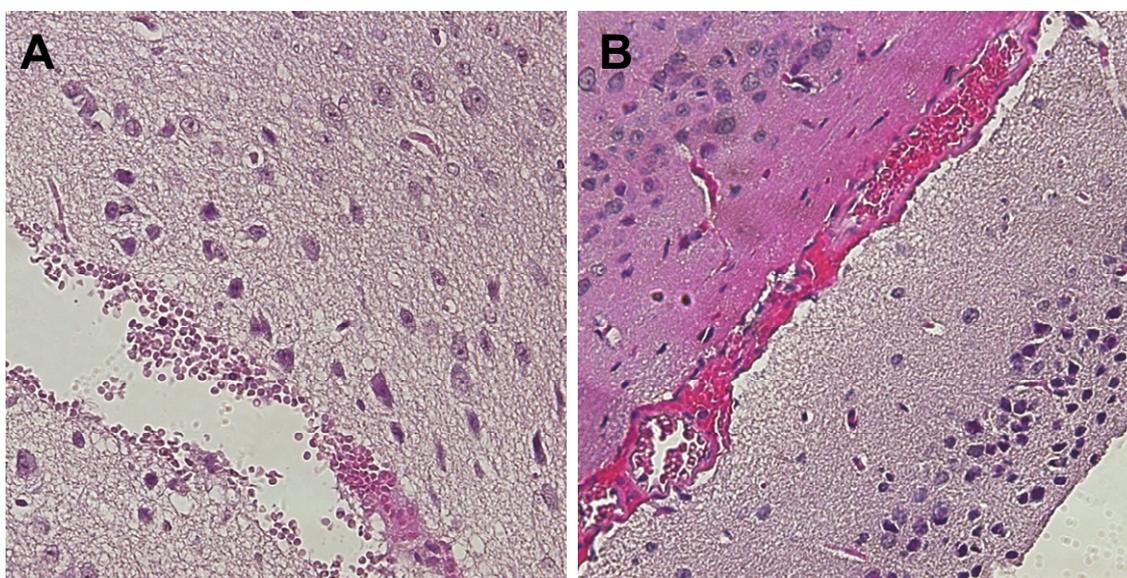


Figura 38: Tecido nervoso de animais infectados com RABV: alterações histopatológicas das meninges pela coloração de HE (Magnitude 200x). **A** – meningite, mostrando infiltrado inflamatório e extravasamento de hemácias. **B** – meningite com congestão de vasos.

No microambiente intraparenquimatoso, foram observados em 100% dos animais experimentais, as seguintes alterações neuronais: neuronofagia moderada (2), exceto nos animais infectados pela via intramuscular posterior com a VAg2, que apresentaram neuronofagia intensa (3); cromatólise e contração neuronal moderadas (2); tumefação neuronal de moderada (2), nos animais infectados intracerebralmente e, a intensa (3); em animais infectados por via intramuscular, e intensa (3) presença

de inclusões intracitoplasmáticas eosinofílicas – Corpúsculos de Negri. Também foi observada necrose discreta (1), e inflamação de discreta (1), nos animais infectados intracerebralmente, a moderada (2), em animais infectados por via intramuscular; e congestão moderada (2) (figura 39).

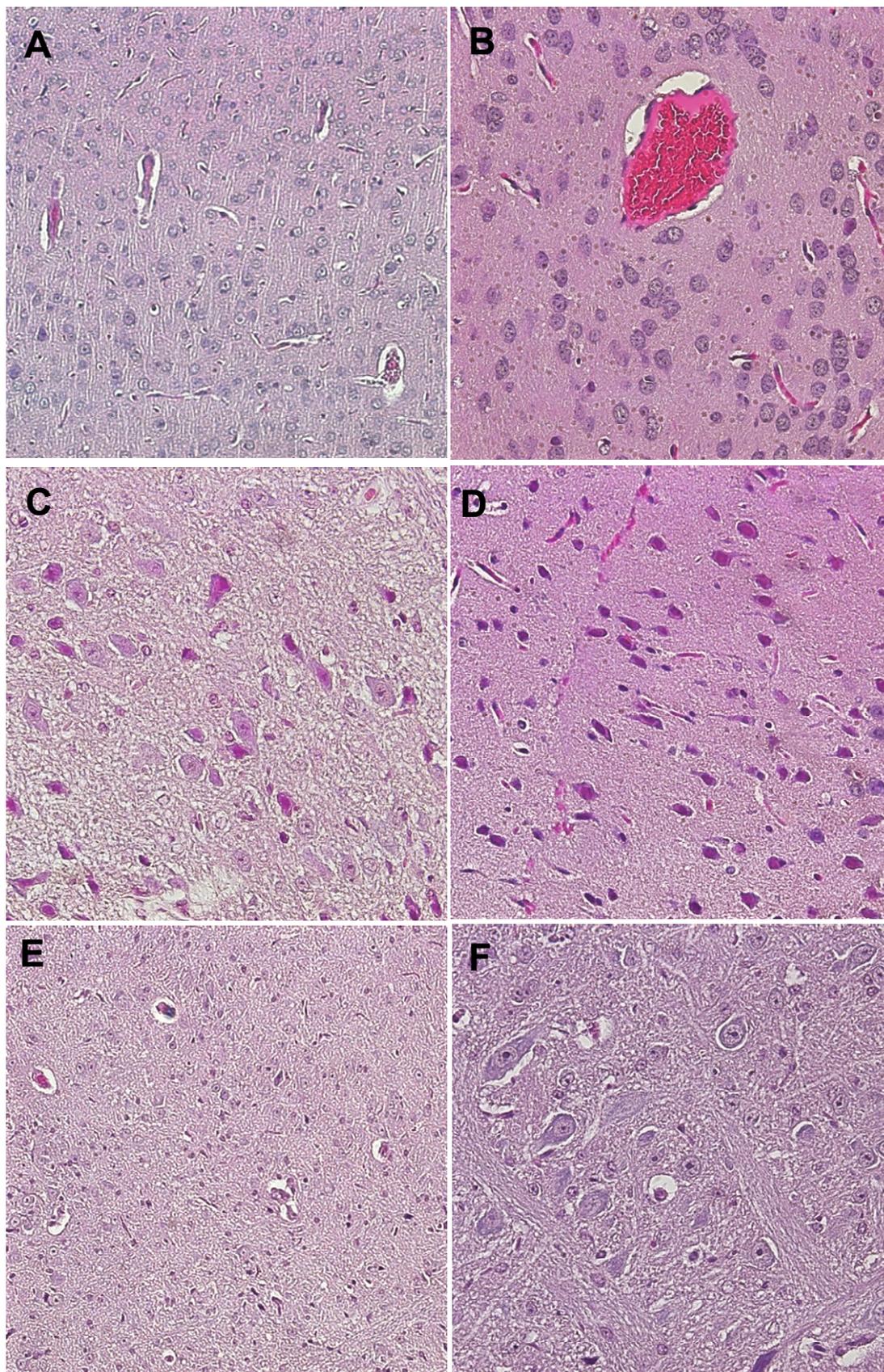


Figura 39: Tecido nervoso de animais infectados com RABV: alterações histopatológicas pela coloração de HE (Magnitude 200x). **A** - perivascularite, infiltrado mononuclear e vasos congestionados. **B** - congestão vascular. **C** - edema intersticial, células vacuolizadas ao redor dos vasos e presença de corpúsculos de Negri . **D** - gliose, neurônio reativos e corpúsculo de Negri. **E** - múltiplos núcleos picnóticos. **F** - tecido nervoso de camundongo não infectado.

7 DISCUSSÃO

7.1 INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Animais inoculados IC com ambas variantes antigênicas desenvolveram sinais clínicos a partir do 6º DPI, tal qual em experimento onde foram inoculados camundongos com cepas de vírus fixo (CVS e RV194-2) no músculo masseter, que causaram infecção severa com manifestação clínica a partir do 6ºDPI e todos os animais foram a óbito (JACKSON, 1991). Porém no grupo B1 foi possível coletar animais até o 16ºDPI enquanto os do grupo C1 apresentaram sinais clínicos mais severos e ao 10ºDPI foi realizada a última coleta.

A apresentação de sintomas apresentados inicialmente na VAg3 a partir do 5ºDPI, três dias antes dos animais da VAg2 apresentarem sintomas, difere do que é apresentado por Travassos da Rosa e colaboradores (2006), onde ressalta que a VAg3 teria um período de incubação maior, mas neste estudo a diferença provavelmente ocorreu devido ao título superior naquela variante antigênica. Os sinais clínicos observados foram semelhantes ao descrito por Kojima e colaboradores (2010).

A apresentação de sintomas em animais inoculados pela via IM antes do 10ºDPI diferem do observado por Yin e colaboradores (2014), onde, os camundongos com idade de 10 dias, 2, 3, e 4 semanas não manifestaram quaisquer sintomas clínicos dentro de 20 dias de observação, quando infectados por via intramuscular. Isso provavelmente se deve ao fato de que o período de incubação da raiva é bastante variável em média de 14 a 60 dias, dependendo da distância da

área infectada com o vírus para o SNC (REZENDE et al., 1997), pois o RABV migra passivamente pelos nervos periféricos em média de 100 (10-400) mm por dia (GREENE, RUPPRECHT, 2006). Neste trabalho, porém, não observamos essa característica, visto que os animais do grupo 2 (infectados pela via IM posterior) demonstraram sinais clínicos um dia antes daqueles infectados pela via IM anterior (grupo 3). Esses resultados não representaram significância estatística. Vale ainda ressaltar que animais coletados após o 16ºDPI não manifestavam sinais clínicos que pudessem ser visualizados.

Inicialmente, foi observado que alguns animais dos Grupos B2 e B3 apresentaram lacerações de pele e cauda, regiões de alopecia, possivelmente por brigas entre eles ou automutilação, semelhante ao descrito por Corrêa e Corrêa (1992), Greene e Rupprecht (2006), Hanlon, Niezgoda e Rupprecht (2007) que descrevem que animais podem desenvolver prurido no local da exposição e arranhar e/ou morder-se na área até ulcerar.

Ademais, a evolução dos sinais clínicos observados não diferiu da já descrita na literatura (CORRÊA, CORRÊA, 1992; GREENE, RUPPRECHT, 2006; HANLON, NIEZGODA, RUPPRECHT, 2007), onde se enfatiza o papel da resposta imunológica no curso e manifestações clínicas da doença (LAFON, 2005b), assim como a presença de determinantes antigênicos na glicoproteína viral estão relacionados à patogenicidade das cepas virais (DIETZSCHOLD et al., 1983; XIAO et al., 2011).

Enfatizamos que alguns animais dos grupos 2 e 3 das duas variantes, não apresentavam sinais de doença, no momento da eutanásia, o que pode se dever ao período de incubação variável ou devido algumas amostras de RABV menos

patogênicas, quando injetadas na periferia não levam ao óbito, mas são capazes de levar a óbito quando infectadas por via IC (CAMELO et al., 2001).

7.2 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA

7.2.1 Expressão de antígeno

A imunohistoquímica (IHQ) para o diagnóstico do RABV demonstra ser um método alternativo, possibilitando diagnosticar casos em que as amostras, inadvertidamente, sejam remetidas fixadas em formol, o que impossibilita a realização da técnica de IFD (PEDROSO et al., 2008; ACHKAR et al., 2010; STEIN et al., 2010; ABREU et al., 2013). A distribuição ampla e difusa do antígeno viral no SNC é um dado de aplicação prática e importante, não havendo necessidade de seleção de regiões específicas do SNC para encontro do antígeno viral (FERNANDES, 2009), por ser uma técnica eficaz, sensível e específica (PEDROSO et al., 2008; ACHKAR et al., 2010; STEIN et al., 2010; ABREU et al., 2013).

Como as maiores dificuldades do diagnóstico da raiva são descritas na espécie equina, em função do fragmento a ser utilizado, pode-se considerar que a IHQ pode ser aplicada em amostras de diferentes espécies animais (PEDROSO et al., 2008; STEIN et al., 2010; ABREU et al., 2013).

Assim como Fernandes (2009), constatamos que os neurônios estavam mais imunomarcados que as células da glia. Em outros estudos também foi observado que as células mais frequentemente infectadas são os neurônios

(PEDROSO et al., 2008; ACHKAR et al., 2010; STEIN et al., 2010; ABREU et al., 2013), corroborando nossos achados, porém diverge no que tange as raras marcações de células gliais (ABREU et al., 2013), e células de Purkinje foram frequentemente infectadas, demonstrando o cerebelo, uma região indicada para o diagnóstico da raiva em bovinos (FERNANDES, 2009).

Apesar de haver promissores resultados demonstrando a possibilidade de diferenciar as diferentes variantes antigênicas através de técnica de IHQ indireta (DYER et al., 2013), não foram observadas diferenças entre as imunomarcações para antígeno rábico nos microambientes.

7.2.2 Atividade da glia – marcadores expressos na glia

Durante o processo inflamatório ocorre recrutamento de monócitos para o parênquima tecidual, que são ativados para exercer sua função fagocítica; há ainda os macrófagos residentes, que no SNC são chamados de micróglia, que possuem papéis fisiológicos importantes e, geralmente, atuam na fase final no processo inflamatório agudo. Os macrófagos são as principais células efetoras da resposta imune e desempenham ainda papel como apresentadores de antígeno e ativação de linfócitos T (LIMA et al., 2007).

A expressão de lisozima é reflexo da ativação microglial e atividade macrofágica e, neste trabalho, no microambiente IP o grupo controle negativo apresentou diferença altamente significativa quando comparado com os demais grupos controles e experimentais, semelhante ao observado nos estudos de Fernandes (2009).

Macrófagos liberam citocinas inflamatórias (como o TNF- α), radicais livres e óxido nítrico, os quais podem mediar a lesão tecidual relacionada à resposta inflamatória, acreditando então que macrófagos e micróglias ativados podem contribuir para a exacerbação da lesão no SNC durante condições patológicas, portanto, embora mecanismos inflamatórios sejam responsáveis por fenômenos de reparação tecidual, são também envolvidos em processos de degeneração secundária em doenças agudas do SNC (LIMA et al, 2007).

Em cepas do RABV em que foi observada uma substituição de leucina para isoleucina na posição 268 da glicoproteína viral, que aparenta ser conservadora e sutil para ter uma influência tão forte sobre patogenicidade, no entanto relatos de que alterações aminoacídicas semelhantes no envelope viral (*Moloney murine leukemia virus* e *Murine leukemia virus*) induzem alteração na patogenicidade viral em camundongos, e também podem ter efeitos sobre as propriedades biológicas de alguns vírus e enzimas, tais como a lisozima (TAKAYAMA-ITO et al., 2006).

Diferente do observado por Fernandes (2009) em casos de raiva humana, onde a expressão de iNOS foi maior no microambiente meningeal, e corroborando os achados de Van Dam *et al.*(1995); Shin *et al.* (2004); e Jackson (2007), no qual grande quantidade de células iNOS positivas são encontrados preferencialmente nas periferias dos vasos sanguíneos, por todo o cérebro infectado com RABV.

7.2.3 Perfil celular

A expressão do CD4 no ambiente intraparenquimatoso (IP), tanto nos controles quanto nos animais experimentais, corrobora os achados de Fernandes (2009) e Lafon (2005).

A imunomarcagem para CD3, os chamados de marcadores Pan T, devido sua característica de ser capaz de marcar tanto células expressando CD4, quanto CD8, nota-se grande aumento na expressão quando comparamos o controle negativo com os animais infectados nos três estratos, meninge, perivascular e intraparenquimatoso. Essa diferença muito provavelmente se dá pelo aumento na expressão de CD8 que, segundo Fernandes (2009) e Lafon (2005), mostram-se aumentados nos três microambientes. Tal quantidade aumentada pode ser responsável por um aumento de IFN- γ , devido atividade citotóxica dos linfócitos TCD8+.

Como pode ser observado, na infecção experimental houve supressão na expressão de linfócitos TCD4+, que por sua vez conferem proteção contra a encefalite fatal. Mas observa-se ainda um aumento na expressão de CD3, o que corrobora o estudo (YIN et al., 2014) que comparou tecidos do SNC de camundongos infectados com cepas de vírus fixo e de rua, do RABV, que mostrou que a infiltração de linfócitos T foi evidente no córtex cerebral, hipocampo, tálamo e hipotálamo. O número de células CD3-positivas foi significativamente maior no grupo infectado com cepa de vírus fixo do que no grupo infectado com vírus de rua. Além da extensão da infiltração no córtex cerebral, hipotálamo e hipocampo nos dois grupos. Isto sugere que a extensão da infiltração de linfócitos T está negativamente correlacionada com a virulência (YIN et al., 2014).

O RABV tem adquirido habilidade de paralisar o sistema imunológico na periferia e no SNC para escapar da vigilância imunológica, a célula T responsiva é inoperante, e a ineficácia da resposta das células T pode ser resultado da indução do vírus para supressão da resposta imunológica (CAMELO et al., 2001).

O fator nuclear de transcrição FOXP3, assim como outros linfócitos T regulatórios (Tregs), induzem a supressão das células T efetoras, bloqueando a ativação e a função destes linfócitos, sendo assim importantes no controle da resposta imunológica a antígenos próprios e não-próprios. Para o controle das respostas imunológicas à infecção, diversos mecanismos são acionados e as Tregs participam ativamente no controle dessas respostas (MELO, CARVALHO, 2009).

Competição por fatores de crescimento é uma forma de atuação das Tregs, que competiriam em especial pela IL-2, com as células-alvo. O que levaria à apoptose de células por privação de citocinas (MELO, CARVALHO, 2009). A apoptose tem papel importante no desenvolvimento, homeostase de populações celulares e patogênese de diversas enfermidades. A ativação das caspases, que são proteases de cisteína, é um evento importante para o desencadeamento do processo apoptótico (SCHMITZ, KIRCHHOFF, KRAMMER, 2000; FERNANDES, 2009), que, na infecção pelo RABV ainda não está bem definido seu papel, visto que autores demonstram ser um fator protetor na disseminação do vírus no SNC, enquanto outros afirmam ser a principal causa de morte neuronal importante na gênese da infecção rábica. Porém, se sabe que na raiva há indução de apoptose pelas vias caspase dependente e independente, com ativação de caspase 3 e 8 (JACKSON, 2007).

Alguns autores afirmam que caspase-3 ativada é amplamente presente nos cérebros infectados com vírus atenuado, mas quase ausente no grupo infectado

com vírus de rua, o que indicaria que a infecção causa apoptose celular mínima, porém presente no cérebro inteiro, cerebelo e tronco cerebral (YIN et al., 2014).

Em camundongos com sete dias de idade, infectados IC, foi observado o aumento da expressão de caspase 3 a partir do 3º DPI e se mantiveram aumentado até o 6º DPI (RASALINGAM, ROSSITER, JACKSON, 2005), enquanto no nosso experimento, animais infectados IC mantiveram-se aumentados por todo o período experimental, muito provavelmente a diferença se dê pela idade dos animais infectados, pois é sabido que camundongos mais jovens possuem sistema imune imaturo.

Em estudo a partir de casos humanos não foi encontrada nenhuma evidência de apoptose neuronal no córtex cerebral, hipocampo ou tronco cerebral. Imunomarcaçã para Caspase 3 esteve ausente nos neurônios, mas observados nas células da glia (JACKSON et al., 2008), tal qual em nosso estudo.

Segundo Yin e colaboradores (2014), a extensão e localização da apoptose varia de acordo com a virulência da cepa viral, sendo a elevação na expressão de glicoproteína viral o fator viral para não indução de apoptose, visto que quando há pouca expressão de glicoproteína viral, há extensa apoptose (MORIMOTO et al., 1999), e é mais observada em múltiplas áreas, mas geralmente é primeiramente observada em neurônios piramidais do hipocampo e em neurônios dispersos no neocórtex (JACKSON, ROSSITER, 1997).

Seria a apoptose mais dependente da ação viral? Segundo Fernandes (2009), o vírus utiliza mecanismos anti-apoptóticos para preservar os neurônios e favorecer a disseminação viral, bem como pró-apoptóticos, destruindo linfócitos e atenuando o processo inflamatório.

7.2.4 Perfil Citocínico

7.2.4.1 Citocinas pró-inflamatórias

O aumento na imunomarcção para TNF- α nos grupos experimentais foram achados semelhantes aos obtidos por Fernandes (2009), porém esse autor demonstra menor contagem de células expressando TNF- α no microambiente perivascular do que nos outros microambientes. Suspeita-se que a grande quantidade de TNF- α no SNC esteja correlacionada com a patogenicidade da cepa viral e decréscimo da resposta imunológica (CAMELO et al., 2001).

TNF- α produzido no cérebro após a infecção pelo RABV está presente em grande quantidade após infecção com amostra de vírus altamente neurotrópico (cepa fixa), a qual induz decréscimo da resposta imunológica, enquanto amostra menos patogênica resulta em redução na expressão dessa citocina. Como a maioria das perturbações do sistema imunológico devem ser devido a desregulação da rede citocínica e, desde que o TNF- α tem sido proposto como candidato em diversos modelos de imunossupressão, como alteração da resposta de células T pela atenuação do sinal de receptor de célula T, indução da produção de moléculas imunossupressivas como as prostaglandinas, e indução de células supressoras, considera-se fundamental o papel do TNF- α na patogenia da raiva no SNC (CAMELO et al., 2001).

O aumento também significativo na expressão de INF- γ se assemelham aos observados em outros estudos, onde a expressão de INF- γ após infecção pelo

RABV está elevada (FERNANDES, 2009; LAFON, 2007). Ressalta-se que para Fernandes (2009) a expressão de IFN- γ foi maior no parênquima e neste, no perivascular.

Aumentos significativos de IL-6 foram obtidos por Fernandes (2009), quando comparou tecido nervoso de pacientes com raiva pela VAg3 e pacientes com óbito por doenças sem comprometimento do sistema nervoso.

Na avaliação da imunomarcação para IL-1 β nota-se aumento na secreção desta citocina quando da infecção pelo RABV nos três microambientes avaliados, sendo, maior no microambiente meningeal, corroborando os estudos de Fernandes (2009) e Lafon (2007).

IL-8 observa-se o aumento na secreção desta citocina nos microambientes, mas sem significância estatística frente aos controles, quando da infecção pelo RABV, corroborando os estudos de Lafon (2007).

As citocinas pró-inflamatórias estiveram aumentadas por todo o período experimental apesar da redução de células TCD4+, provavelmente devido ao aumento de expressão de CD8+ e outras células produtoras das referidas citocinas, tal qual observado nos trabalhos de Camelo e colaboradores (2001), que referiram a produção local de iNOS mais a maior expressão de citocinas pró-inflamatórias, devem favorecer o dano neuronal em casos de raiva (FERNANDES, 2009).

7.2.4.2 Citocinas anti-inflamatórias

Tal qual nos estudos de Fernandes (2009) e Lafon (2007), secreção de TGF- β esteve aumentada na infecção pelo RABV nos três microambientes

avaliados. TGF- β é uma citocina multifuncional cujas funções neurais são cada vez mais reconhecidas, há evidências do seu envolvimento no desenvolvimento e na plasticidade do SNC, bem como as suas funções em órgãos periféricos o que sugere que eles também exibem funções neuroprotetoras. Com efeito, a expressão de TGF- β é induzida a partir de uma variedade de tipos de danos do tecido cerebral. A exemplo de sua ação neuroprotetora, que se segue a partir de infecções cerebrais. Os mecanismos de neuroproteção exercidos por TGF- β incluem ações anti-inflamatórias, anti-apoptótica, bem como a promoção da formação de cicatriz, angiogênese e neuroregeneração (DOBOLYI et al., 2012).

TGF- β exerce importante papel na imunorregulação, através da inibição da proliferação, diferenciação e ativação linfocitária (LETTERIO, ROBERTS, 1998). Mas, o RABV causa uma infecção não lítica de neurônios, pois evita morte neuronal. Em contraste, as células T que migram para o sistema nervoso infectado com RABV morrem por apoptose. Por outro lado, a inflamação do SNC infectado é limitada, e acredita-se haver contribuição efetiva do TGF- β para tal desfecho (BALOUL, LAFON, 2003)

A IL-4 é uma citocina capaz de influenciar a diferenciação de células T, estimula a ativação e recrutamento de mastócitos e produção de anticorpos IgE através da diferenciação de células B, além de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, a atividade citotóxica dos macrófagos e a produção de NO (ABBAS, LICHTMAN, POBER, 2000). Esta citocina esteve aumentada neste estudo, corroborando os estudos de Fernandes (2009) e Lafon (2007), fato este que favoreceria um padrão anti-inflamatório em detrimento do estado antiviral esperado pela resposta pró-inflamatória (FERNANDES, 2009).

O aumento de TGF- β e IL-4 demonstram um aumento na resposta anti-inflamatória, na tentativa de conter a resposta inflamatória, e para isso provavelmente o SNC utiliza outras células, que não os linfócitos TCD4, que estão suprimidos, para secretar citocinas anti-inflamatórias, muito provavelmente os astrócitos, que, podem produzir TGF- β (ALOISI, RIA, ADORINI, 2000) e IL-4 (FERNANDES, 2009) em níveis elevados a fim de conter a resposta imunológica exacerbada.

7.2.5 Perfil Th17 e outros fatores negativos na IHQ

A IL-17 representa uma família de citocinas envolvidas na proliferação, maturação e quimiotaxia de neutrófilos, possui efeitos pleiotrópicos, induzindo a expressão de citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , dentre outras, bem como favorece a maturação de células dendríticas (KOLLS, LINDEN, 2004; NAKAE et al., 2002).

No geral pacientes com esclerose múltipla expressam padrões aumentados de IL-17 e IL-23, que no LCE e têm capacidade de infiltrar o SNC e promover inflamação, porém ambas relacionadas a lesões auto-imunes (VAKNIN-DEMBINSKY, BALASHOV, WEINER, 2006). A IL-17, devido sua regulação diferencial pode ser um evento chave para o aumento da permeabilidade da BHE observada em camundongos infectados com cepa fixa do RABV (CHAI et al., 2014; 2015).

As células dendríticas presentes na derme normal são identificados pela positividade ao fator XIIIa, são consideradas como macrófagos apresentadores de

antígenos e fazem parte do sistema fagocítico-macrofágico. Podem estar aumentadas nas doenças inflamatórias e tumorais (HOYO, KANITAKIS, SCMITT, 1993; NESTLE et al., 1998), e é sabido que o recrutamento e/ou ativação de células dendríticas é importante no aumento da resposta protetora para o RABV (WEN et al., 2011).

Em resumo, identificamos a diminuição de linfócitos TCD4⁺ no parênquima cerebral, atividade citotóxica dos linfócitos TCD8⁺ com proporcional aumento na expressão de IFN- γ . Essa situação deve ser reflexo da ação do vírus rábico sobre a resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro tendo como consequência uma resposta ineficaz para clareamento do vírus.

Não foi possível observar um padrão citocínico predominante no SNC na raiva experimental visto a expressão de IL-4 e TGF- β estarem aumentadas nos casos de raiva, o que favorece um ambiente imunossupressor para manter intacta a rede neuronal, mas que por outro lado, também contribui para permanência local do vírus e a baixa resposta inflamatória, porém com a redução dos linfócitos TCD4⁺ acredita-se que outras células sejam responsáveis pela secreção da IL-4. Também, a expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α foi observada nos animais infectados, o que provavelmente, levaria a dano neuronal, assim como causaria perturbação das funções do SNC, e que podem ser o gatilho de sinalização para a imunossupressão (figura 40).

Patogenicidade e controle da resposta imunológica são fenômenos intrigantes, e é difícil avaliar se os controles de infecção cerebral diminuem a capacidade de resposta imunológica ou se a infecção do cérebro é permitida pela ausência de resposta imunológica (CAMELO et al., 2001).

Conclui-se que o envolvimento do SNC durante a raiva experimental se faz à custa de processo inflamatório com predomínio local de linfócitos TCD8+, sem definição de um padrão de citocinas, acometendo os microambientes meningeal, perivascular e intraparenquimatoso, mas com imunossupressão, pois há redução de células TCD4+. É possível que esse padrão seja também observado na raiva naturalmente adquirida.

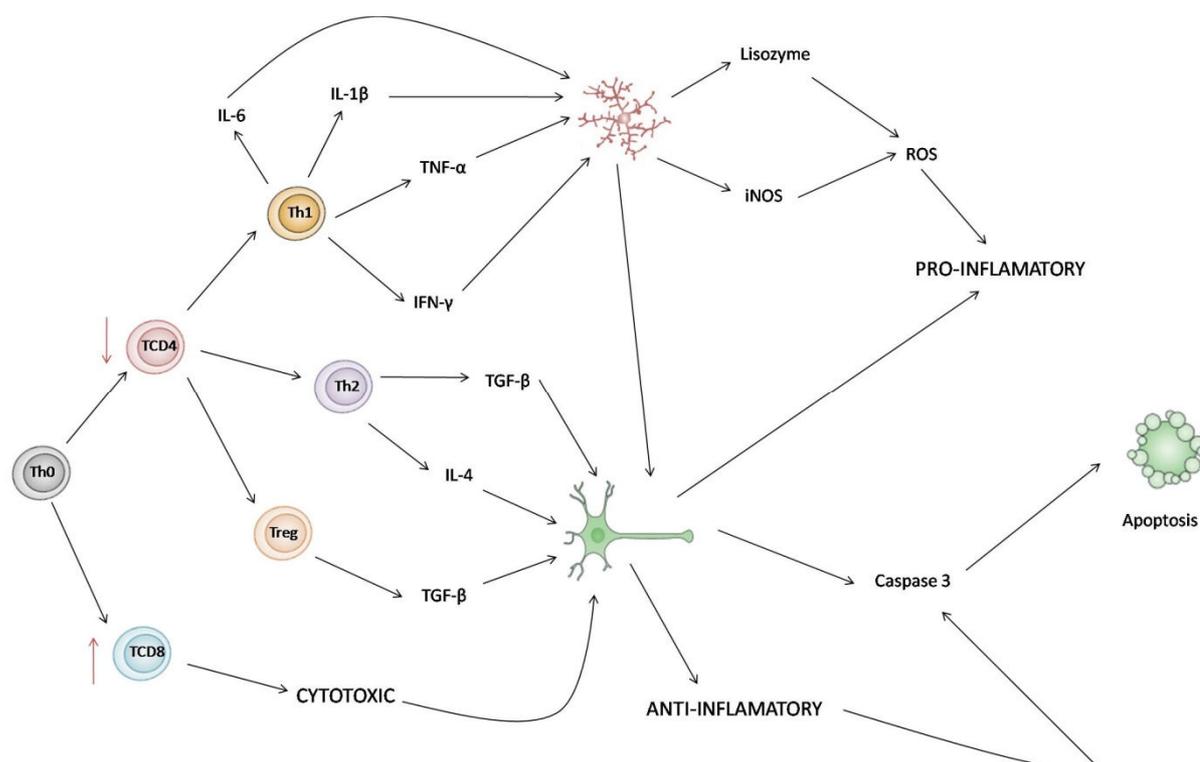


Figura 40: Desenho esquemático com a potencial interação entre as células do sistema imunológico e as do SNC frente aos resultados encontrados neste estudo.

7.3 ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS

A localização das lesões é difusa, com predomínio em certas regiões como hipocampo, tronco cerebral e cerebelo (GREENE, RUPPRECHT, 2006, ROSSITER, JACKSON, 2007; KOJIMA *et al.*, 2010; YIN *et al.*, 2014).

Semelhante ao observado neste estudo, onde 100% dos animais infectados apresentaram alguma alteração histológica em uma ou mais regiões do SNC, também foi observado no parênquima, processo inflamatório caracterizado por alguns focos de necrose do neurópilo e a pela presença de nódulos microgliais, corroborando o encontrado por outros autores (PEDROSO et al., 2008; ACHKAR et al., 2010; STEIN et al., 2010; ABREU et al., 2013; YIN et al., 2014).

Diferentemente do observado por Yin e colaboradores (2014), que observaram experimentalmente camundongos infectados com duas estirpes de vírus da raiva de rua e demonstraram diferentes níveis de virulência que causaram alterações patológicas distintas nos camundongos infectados, podendo concluir existir diferentes mecanismos patogênicos entre as diferentes cepas de RABV.

Na medula espinhal ocorreram achados semelhantes aos descritos no cérebro, onde há marcação de antígenos, neuronofagia, necrose neuronal, infiltrado inflamatório mononuclear em gânglios espinhais, com diferença de intensidade nos diferentes níveis da medula espinhal (KOJIMA et al., 2009; ABREU et al., 2013).

8 CONCLUSÕES

1. Não houve diferença significativa no período de incubação dos animais em relação à distância das vias de infecção para o SNC em camundongos *Mus musculus*.
2. Não houve diferença entre os sinais e curso clínicos quando comparadas as variantes antigênicas 2 e 3 do RABV em camundongos *Mus musculus*.
3. A formação de corpúsculos de Negri ocorreu mais em neurônios que em células da glia, sendo mais presentes no microambiente intraparenquimatoso.
4. O processo inflamatório foi verificado mesmo na presença de corpúsculos de Negri, porém com menor intensidade.
5. Células expressando CD3 foram mais prevalentes que as expressando CD4, e supressão na expressão de linfócitos TCD4+, reduzindo a relação CD4+/CD8+.
6. A apoptose é uma forma importante de morte celular na raiva, porém não de morte neuronal, mas de células da glia.
7. Há aumento de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-1 β e IL-8) e iNOS em ambas as variantes antigênicas do RABV testados.
8. Há aumento das citocinas anti-inflamatórias (TGF- β e IL-4) em ambas as variantes antigênicas do RABV testados no estudo.
9. Não foi observada a expressão de interleucinas do perfil Th17 (IL-23 e IL17).
10. A raiva é uma meningoencefalite, por acometer os microambientes meningeal, perivascular e intraparenquimatoso.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Acreditamos que este não é o término, mas sim um ponto de partida para novos estudos do grupo acerca da patogênese e imunopatogenia da raiva. Percebe-se necessária a caracterização das células apoptóticas, o estabelecimento da relação entre apoptose neuronal e de células imunológicas, e o real papel da apoptose na patogênese da raiva.

Nosso estudo experimental não foi capaz de demonstrar diferenças na patogenia entre as variantes antigênicas do RABV, mas elas existem e tem sido descritas em infecções naturais pelo RABV, talvez a utilização de outro modelo experimental, ou outro método de infecção, ou ainda a prévia análise de sítios patogênicos do genoma da cepa viral sejam necessários para melhor avaliar a existência ou não de tais diferenças.

Fica ainda a curiosidade acerca do caminho tomado por cada uma das variantes antigênicas durante a patogênese da doença, fato que talvez possa ser esclarecido através de novos experimentos em camundongos isogênicos, modificando também a forma de coleta e análise, partindo para a perfusão do animal a fim de preservar as estruturas cerebrais, o que mostrou ser uma falha no nosso desenho experimental, pois fizemos coletas ao mesmo momento, também para estudos virológicos, mas isso se deveu a este trabalho ser parte de um projeto maior, onde outro aluno é responsável por essas análises.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. Immunity to microbes. In:_____. **Cellular and molecular immunology**.4.ed. Estados Unidos da América: Saunders Company, 2000. cap 15, seção V, p. 343-362.
- ABBOTT, N. J.; PATABENDIGE, A. A.; DOLMAN, D. E.; YUSOF, S. R.; BEGLEY, D. J. Structure and function of the blood–brain barrier. **Neurobiology of disease**, 37(1), 13-25, 2010.
- ABREU C.C; NAKAYAMA, P.A.; NOGUEIRA, C.I.; MESQUITA, L.P.; LOPES, P.F.R. WOUTERS, F.; VARASCHIN, M.S.; BEZERRA Jr, P.S. Histopathology and immunohistochemistry of tissues outside central nervous system in bovine rabies. **Journal of NeuroVirology**, 10 de junho de 2014.
- ABREU, C. C.; NAKAYAMA, P. A.; NOGUEIRA, C. I.; MESQUITA, L. P.; LOPES, P. F.; WOUTERS, F.; VARASCHIN, M.S.; BEZERRA JR, P. S. Histopathology and immunohistochemistry of tissues outside central nervous system in bovine rabies. **Journal of neurovirology**, 20(4), 388-397, 2013.
- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Rabia.In:*Zoonosis y enfermedades comunes al hombre y a los animales*. 2. ed. Washington: OPS, 1986, p. 502-526 (Publicación, 503).
- ACHKAR, S.M.; FERNANDES, E. R.; CARRIERI, M.L.; CASTRO, A.B.M. DE; BATISTA, A.M.; DUARTE, M.I.S.; KOTAIT, I. Sensibilidade da técnica de imunohistoquímica em fragmentos de sistema nervoso central de bovinos e equinos naturalmente infectados pelo vírus da raiva. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 30, n. 3, p. 211-218, 2010.
- ACHKAR, S.M.; SINHORINI, I.L.; RIBEIRO, O.G.; CARRIERI, M.L.; CERETTA, R.S.; CONSALES, C.A. Immunopathology of rabies infection in mice selected for high or low acute inflammatory reaction. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.** 13 (1), p.39-55, 2007.
- ALBAS, A., CAMPOS, A. C. A., ARAÚJO, D. B., RODRIGUES, C. S., SODRÉ, M. M., DURIGON, E. L., FAVORETTO, S. R. Molecular Characterization of rabies vírus isolated from non-haematophagous bats in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 44(6): 678-683, 2011.
- ALCAMI, A.;KOSZINOWSKI, U.H. Viral mechanisms of immuneevasion. **Immunol Today**. 21 (9): 447-55, 2000
- ALOISI, F.; RIA, F.; ADORINI, L. Regulation of T-cell responses by CNS antigen presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. **Immunologytoday**. 21(3): 141-7.

AYRES, M., AYRES, J.R.M., AYRES, D.L, SANTOS, A.S. **BioEstat 5.0-Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: sociedade civil mamirauá; Brasília CNPq, 2007. 290p.

AZEVEDO, M. B. Raiva. **Revista Brasileira de Clínica e Terapêutica**, **10(4)**:233-241, 1981.

BADRANE, H.; BAHLOUL, C.; PERRIM, P.; TORDO, N. Evidence of two *Lyssavirus* phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. **Journal of Virology**, **75(7)**, p.3268-76, 2001

BAER, G. M. The History of Rabies. In: **Rabies**. Second Edition. Jackson, A. C.; Wunner, W. H. (eds.). San Diego: Academic Press, 2007. P. 23-68.

BAER, G.M.; YANGER, P.A. A mouse model for post exposure rabies prophylaxis: the comparative efficacy of two vaccines and antiserum administration. **J. Gen. Virol.**36, p. 51-8, 1977.

BALLABH, P.; BRAUN, A.; NEDERGAARD, M.. The blood–brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. **Neurobiology of disease**, v. 16, n. 1, p. 1-13, 2004

BALOUL, L.; LAFON, M. Apoptosis and rabies virus neuroinvasion. **Biochem.**, **85**, p.777-88, 2003.

BANKS, W. A.; ERICKSON, M. A.The blood–brain barrier and immune function and dysfunction. **Neurobiology of disease**, v. 37, n. 1, p. 26-32, 2010.

BARBOSA, T. F. S. Caracterização molecular de cepas de vírus da Raiva isoladas estado do Pará. 2007, 109 p. Dissertação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, Programa de Pós-graduação em biologia de agentes infecciosos e parasitários do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. Belém. 2007.

BATISTA, H.B.C.R.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. **Raiva: uma breve revisão. Rabies: a brief review**. *Acta Scientiae Veterinariae*, **35(2)**, 125-144, 2007.

BELLOTO, A.; LEANES, L. F.; SCHNEIDER, M. C.; TAMAYO, H.; CORRÊA, E. Overview of rabies in the Americas. **Virus Research**. v. 111, n. 1, p. 5-12, 2005.

BERAN, G. W. Rabies and Infections by Rabies-related Viruses. 2 ed. In: BERAN, G. W. (Ed.). **Handbook of Zoonoses**. Section B: Viral. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.307-357.

BLACKWOOD, J. C., STREICKER, D. G., ALTIZER, D., ROHANI, P. Resolving the roles of immunity, pathogenesis, and immigration for rabies persistence in vampire

bats. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **110**: 20837-20842, 2013.

BLOOD, D. C.; HENDERSON, J. A.; HADOSTITS, O. M. Raiva. In: _____. **Clínica veterinária**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. p. 667-671.

BOLAND, T. A., MCGUONE, D., JINDAL, J., ROCHA, M., CUMMING, M., RUPPRECHT, C. E., BARBOSA, T. F., DE NOVAES OLIVEIRA, R., CHU, C. J., COLE, A. J., KOTAIT, I., KUZMINA, N. A., YAGER, P. A., KUZMIN, I. V., HEDLEY-WHYTE, E. T., BROWN, C. M., ROSENTHAL, E. S. Phylogenetic and epidemiologic evidence of multi-year incubation in human rabies. **Annals of Neurology**, **29** (Brief Communication). 2013.

BONEVA, R.S; FOLKS, T.M.; CHAPMAN, L.E. Infectious Disease issues in xeno transplantation. **Clinical Microbiology Reviews**, Jan. 2001, Vol. 14, nº01 p.1-14.

BOTVINKIN, A. D., POLESCHUK, E. M., KUZMIN, I. V., BORISOVA, T. I., GAZARYAN, S.V., YAGER, P., RUPPRECHT, C.E. Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. **Emerging Infectious Diseases**, **9**: 1623–1625, 2003.

BOULGER, I. R., PORTERFIELD, J. S. Isolation of a virus from Nigerian fruit bats. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **52**: 421-424, 1958.

BOURHY, H.; KISSI, B.; LAFON, M.; SACRAMENTO, D.; TORDO, N. Antigenic and molecular characterization of bat rabies virus in Europe. **Journal of Clinical Microbiology**, **30** (9): 2419-2426, 1992

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Controle da Raiva dos Herbívoros– Manual Técnico 2005**. Brasília: MAPA/SDA/DAS, 2005b. 104 p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Raiva. In: _____. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 6. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2005a. p.603-632.

BRASIL, Ministério da Saúde. Raiva. In: _____. **Guia Brasileiro de Vigilância Epidemiológica**. 4.ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde – Centro Nacional de Epidemiologia, 1998. cap.5.26, p.1-15

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de diagnóstico laboratorial da Raiva**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008.108p.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Controle da Raiva dos Herbívoros. Manual Técnico, 2009. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arg_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20d

[os%20herbivoros/manual%20tecnico%20para%20controle%20da%20raiva.pdf](#)

Acesso em 16/04/2015.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Morcegos em áreas urbanas e rurais: **Manual de manejo e controle**. Brasília: FNS, 1998. 117p.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde. **Diretrizes Gerais para o Trabalho em Contenção com Agentes Biológicos, 3ª edição. Série A, Normas e Manuais Técnicos**. Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Protocolo para Tratamento de Raiva Humana no Brasil. Epidemiologia e Serviços de Saúde 18(4):385-394**, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Normas Técnicas de Profilaxia da Raiva Humana**. 1ª Edição Revisada.60 p. Brasília, DF, 2014.

BRIGGS, D., HANLON, C. A. World rabies day 7: focusing attention on a neglected disease. **The Veterinary Record**, 161(9):288-289, 2007.

BRODAL, P. The Central Nervous System.4 ed. Oxford: Oxford, 2010, p. 5-16
Disponível em:
<https://books.google.com.br/books?id=iJl6yDNmr8C&printsec=frontcover&dq=the+central+nervous+system+brodal&hl=pt-BR&sa=X&ei=iMovVebsLMjAggS83oCoDQ&ved=0CCQQ6AEwAA#v=onepage&q=the%20central%20nervous%20system%20brodal&f=false>, Acesso em 16 de abril de 2015.

BRZOZKA, K.; FINKE, S.; CONZELMANN, K. Identification of the rabies virus alpha/beta interferon antagonist: phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3. **J. Virol.** (12): 7673-7681, 2005.

BURTON, E. C., BURNS, D. K., OPATOWSKY, M. J., EL-FEKY, W. H., FISCHBACH, B., MELTON, L., SANCHEZ, E., RANDALL, H., WATKINS, D. L., CHANG, J., KLINTMALM, G. Rabies Encephalomyelitis. Clinical, Neuroradiological, and Pathological Findings in 4 Transplant Recipients. **Archives of Neurologicals**, **62**: 873-882, 2005.

CAMELO, S.; LAFAGE, M.; GALELLÍ, A.; LAFON, M.CAMELO, Selective role for the p55 Kd TNF- α receptor in immune unresponsiveness induced by an acute viral encephalitis. **Journal of neuroimmunology**, 113 (1), p. 95-108, 2001.

CARSTENS, E. B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). **Archives of Virology**, **155 (1)**: 133-146, 2010.

CEBALLOS, N.A.; MORÓN, S.V.; BERCIANO, J.M.; NICOLÁS, O.; LÓPEZ, C.A.; JUSTE, J.; NEVADO, C.R.; SETIÉN, A.G.; ECHEVARRÍA, J.E. Novel *Lyssavirus* in Bat, Spain. **Emerging Infectious Diseases**. 19(5): p.793-795, 2013

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Human rabies prevention**, United States, 1999. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvr/rabies/Professional/acip/ACIP99.htm>>. Acesso em 24/07/2011.

CHAI, Q.; HE, W.Q.; ZHOU, M.; LU, H.; FU, Z.F. Enhancement of blood–brain barrier permeability and reduction of tight junction protein expression are modulated by chemokines/cytokines induced by rabies virus infection. **J. Virol.**, **88**, p. 4698–4710, 2014.

CHAI, Q.; SHE, R.; HUANG, Y.; FU, Z.F. Expression of neuronal CXCL10 induced by rabies virus infection initiates infiltration of inflammatory cells, production of chemokines/cytokines and enhancement of blood–brain barrier permeability. **Journal of Virology**, **89 (1)**, p. 870–76, 2015.

CHAVES, L. B.; SILVA, A.C.R.; CAPORALE, G.M.M.; SCHEFFER, K.C.; WAQUIM NETO, S.J.; CARRIERI, M.L.; KOTAIT, I. Diagnóstico *ante-mortem* da raiva humana: anticorpos neutralizantes em soro e líquido cefaloraquidiano. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, n. 41, p. 8-12, maio 2007. Disponível em http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa41_raivah.htm, acesso em 30/03/2015.

COLEMAN, P. G., FÉVRE, E. M., CLEVELAND, S. Estimating the health impact of rabies. **Emerging Infectious Diseases**, **10(1)**:140-142, 2004.

CONOMY, J. P., LEIBOVITZ, A., McCOMBS, W., STINSON, J. Airborne rabies encephalitis: demonstration of rabies virus in the human central nervous system. **Neurology**, **27**: 67-69, 1977.

CONSALES, C. A.; BOLZAN, V. L. Rabies review: immunopathology, clinical aspects and treatment. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, 2007, **13**, 1, p. 6

CONSTANTINE, D. G., TIERKEL, E. S., KLECKNER, M. D., HAWKINS, D. M. Rabies in New Mexico cavern bats. **Public Health Reports**, **83**: 303-316, 1968.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.M. Raiva. In: _____.(eds). **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. cap. 68, p. 609-628.

COSTA, W. A. Raiva. In: **Infectologia Pediátrica**. FARHAT, C.K.; CARVALHO, E. S.; CARVALHO, L. H. F. R.; SUCCI, R. C. M. (eds). São Paulo: Atheneu, 1998. p.460-473.

COSTA, W. A., ÁVILA, C. A., VALENTINE, E. J. G., REICHMANN, M. L. A. B., CUNHA, R. S., GUIDOLIN, R., PANACHÃO, M. R. I., OMOTO, T. M., BOLZAN, V. L. **Profilaxia da Raiva Humana**. São Paulo: Instituto Pasteur, 2000.

DEAN, D. J.; ABELSETH, M. K.; ATANASU, P. The fluorescence antibody test. In: **Laboratories Techniques in Rabies**. MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (eds.). Geneva, World Health Organization, 1996. p.88-95.

DIETZSCHOLD, B., JIANWEI, L., MILOSZ, F., SCHNELL, M. Concepts in the pathogenesis of rabies. **Future Virology**, **3(5)**: 481-490, 2008.

DIETZSCHOLD, B.; RUPPRECHT, C. E.; FU, Z. F.; KOPROWSKI, H. Rhabdoviruses. In: **Virology**. FIELDS, B. N.; WOLDEHIWET, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. (eds). Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1996. p.1137-1159.

DIETZSCHOLD, B.; WUNNER, W.H.; WIKTOR, T.J.; LOPES, A.W.; LAFON, M.; SMITH, C.; KOPROWSKI, H. Characterization of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **80**, p. 70-74, 1983.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C. & MOSKOWITZ, M. A. Pathology of ischemic stroke: an integrated view. **Trends Neurosci.** v.22, p.391-397, 1999.

DIRNAGL, U.; PRILLER, J. Focal cerebral ischemia: the multifaceted role of glial cells. In: KETTENMANN, H; RANSON, B.R. **Neuroglia**. 2th ed. New York: Oxford University Press, 2005, p. 511-520.

DOBOLYI, A.; VINCZE, C.; PÁL, G.; LOVAS, G. The neuroprotective functions of transforming growth factor Beta proteins. **International journal of molecular sciences**, **13 (7)**, p. 8219-58, 2012.

DODET, B. Preventing the incurable: Asina rabies, experts advocate rabies control. **Vaccine**, **24(6)**: 3045-3049, 2006.

DYER, J.L.; NIEZGODA, M.; ORCIARI, L.A.; YAGER, P.A.; ELLISON, J.A.; RUPPRECHT, C.E. Evaluation of an indirect rapid immunohistochemistry test for the differentiation of rabies virus variants. **Journal of Virological Methods**, **190**, p.29-33, 2013.

EZE, U.U., ANENE, B. M., CHUKWU, C. C., OGUNKOYA, A.B., GEORGE, S. O., EZE, J. I., ANIMOKE, P.C., NWOSUH, C. I. Risk of typical rabies in dog meat-eating human population, in Enugu, Nigeria. **International Journal of Public Health and Epidemiology**, **4 (1)**:107-109, 2015.

FABIS, M.J.; PHARES, T.W.; KEAN, R.B.; KOPROWSKI, H.; HOOPER, D.C.. Blood–brain barrier changes and cell invasion differ between therapeutic immune clearance of neurotrophic virus and CNS autoimmunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 40, p. 15511-15516, 2008.

FABRY, Z.; RAINE, C.S.; HART, M.N. Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS. **Immunology today**. 15(5): p.218-225, 1994.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. The Negative Sense Single Stranded RNA Viruses: Family Rhabdoviridae. In: **Virus Taxonomy**. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Virology Division International Union of Microbiological Societies. Elsevier Academic Press. 2005. p. 623-633.

FAVORETTO, S. R., CARRIERI, M. L., CUNHA, E. M. S., AGUIAR, E. A. C., SILVA, L. H. Q., SODRÉ, M. M., SOUZA, M. C. A. M., KOTAIT, I. Antigenic typing of Brazilian rabies samples isolated from animals and humans, 1989-2000. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **44**: 91-95, 2002.

FAVORETTO, S. R., DE MATTOS, C. C., MORAIS, N. B., ARAÚJO, F. A. A., DE MATTOS, C. A. Rabies in Marmosets (*Calithrix jacchus*), Ceará, Brazil. **Emerging Infectious Disease**, **7**: 1062-1065, 2001.

FAVORETTO, S. R., MATTOS, C. C., MORAIS, N. B., CARRIERI, M. L., ROLIM, B. N., SILVA, L. M., RUPPRECHT, C. E., DURIGON, E. L., MATTOS, C. A. Rabies Virus maintained by dogs in humans and terrestrial wildlife, Ceará State, Brazil. **Emerging Infectious Disease**, **12**:1978-1981, 2006.

FERNANDES, C.G. Raiva. In: RIET-CORRÊA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.del C.; LEMOS, R.A.A. **Doenças de Ruminantes e Equinos**.2.ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 2v. v. 1, p. 149-162.

FERNANDES, Elaine Raniero. O processo inflamatório, a resposta imune “in situ” e a morte neuronal em sistema nervoso central de pacientes com raiva transmitida por morcegos. 247 p. Tese de doutorado em Ciências, Faculdade de Medicina / Universidade de São Paulo. 2009.

FINKE, E.; CONZELMANN, K. Replication strategies of rabies virus. **Virus Research**, **111**: 120-131, 2005.

FOOKS, A. R., BROOKES, S. M., JOHNSON, N., MCELHINNEY, L. M., HUTSON, A. M. European bat lyssaviruses: an emerging zoonosis. **Epidemiology and Infection**, **131**(3):1029-1039, 2003.

FROSCH, M.P.; ANTHONY, D.C.; GIROLAMI, U. O Sistema Nervoso Central. In: KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. (editores) [tradução Maria da Conceição Zacarias...et al.] **Patologia – bases patológicas das doenças**. 7ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004. Cap. 28, 1411-1483

FROSCH, M.P.; ANTHONY, D.C.; GIROLAMI, U. O Sistema Nervoso Central. In: KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. (editores) [tradução Maria da Conceição Zacarias...et al.] **Patologia – bases patológicas das doenças**. 7ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004. Cap. 28, 1411-1483

FU, Z.F.; JACKSON, A. Neuronal dysfunction and death in rabies virus infection. **J. Neurovirol.** 11 (1): 101-6, 2005

FURR, S. R.; CHAUHAN, V. S.; STERKA, D.; JR., GRDZELISHVILI, V.; MARRIOTT, I. Characterization of retinoic acid-inducible gene-1 expression in primary murine glia following exposure to vesicular stomatitis virus. **J. Neurovirol.** 14(6):503–513, 2008.

GERMANO, P. M. L. Avanços na pesquisa da Raiva. **Revista de Saúde Pública**, 28: 86-91, 1994.

GIBBONS, R. V. Cryptogenic rabies, bats, and the question of aerosol transmission. **Annals of Emergency Medicine**, 39: 528-536, 2002.

GLUSKA, S.; ZAHAVI, E.E.; CHEIN, M.; GRADUS, T.; BAUER, A.; FINKE, S.; PERLSON, E. Rabies virus hijacks and accelerates the p75NTR retrograde axonal transport machinery. **Plos Pathogens**. 10 (8): 1-17, 2014.

GONÇALVES, M. A. S., SÁ-NETO, R. J., BRAZIL, T. K. Outbreaks of aggressions and transmission of rabies in human beings by vampire bats in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 35: 461-464, 2002.

GONÇALVES, M. A. S., SÁ-NETO, R. J., BRAZIL, T. K. Outbreaks of aggressions and transmission of rabies in human beings by vampire bats in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 35: 461-464, 2002.

GOULD, A. R., KATTENBELT, J. A., GUMLEY, S. G., LUNT, R. A. Characterization of an Australian bat lyssavirus variant isolated from an insectivorous bat. **Virus Research**, 89: 1-28, 2002.

GREENE, C.E.; RUPPRECHT, C.E. Rabies and other Lyssavirus infections. In: GREENE, Craig E. **Infectious disease of the dog and cat**. 3ed. Canadá: Saunders Elsevier, Cap.22, p. 167-183, 2006

GRIFFITHS, M.; NEAL, J. W.; GASQUE, P. Innate immunity and protective neuroinflammation: New emphasis on the role of neuroimmune regulatory proteins. **Int. Rev. Neurobiol.** 82:29–55, 2007.

GUYATT, J. K.; TWIN, J.; DAVIS, P.; HOLMES, E. C.; SMITH, G. A.; SMITH, I. L.; MACKENZIE, J. S.; YOUNG, P. L. A molecular epidemiological study of Australian bat lyssavirus. **Journal of General Virology**, **84**: 485-496, 2003.

HANLON, C.A.; NIEZGODA, M.; RUPPRECHT, C.E. Rabies in terrestrial animals. In: Jackson, A. C.; Wunner, W. H. (eds.). **Rabies**. Second Edition. San Diego: Academic Press, 2007. P. 23-68.

HAWKINS, B.T.; DAVIS, T.P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. **Pharmacological reviews**, v. 57, n. 2, p. 173-185, 2005.

HEALTH PROTECTION AGENCY (HPA). Rabies in patients who received organ transplants in Germany. The Communicable Disease Report Weekly, Current Issue: news stories. German, 2005. Disponível em: <<http://www.hpa.org.uk/cdr/archives/2005/cdr0905.pdf>>. Acesso em 17/02/2006.

HELMICK, C.G., TAUXE, R.V., VERNON, A.A. Is there a risk to contacts of patients with rabies? **Reviews of Infectious Diseases**, **9**: 511-518, 1987.;

HEMACHUDHA, T., LAOTHAMATAS, J., RUPPRECHT, C. H. Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. **Lancet Neurology**, **1**: 101-109, 2002.

HEMACHUDHA, T., UGOLINI, G., WACHARAPLUESADEE, S., SUNGKARAT, W., SHUANGSHOTI, S., LAOTHAMATAS, J. Human rabies: neuropathogenesis, diagnosis, and management. **The Lancet**, **12**, p. 498-513, 2013.

HENRY, C.J.; HUANG, Y.; WYNNE, A.M.; GODBOUT, J.P. Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1beta and anti-inflammatory IL-10 cytokines. **Brain, Behav Immun**, v.23, p.309-371, 2009.

HICKS, D. J.; NUNEZ, 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**(2-3):113-126, 2009.

HINRICHSEN, S. L.; NOVA, A. V.; RENGELL, F. S. Raiva. In: FOCACCIA, R. (ed). **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu. 2005. p. 633-648.

HOYO, E.; KANITAKIS, J.; SCMITT, D. Le dendrocyte dermique. **Pathologie Biologie**, **41** (7), p.613-8, 1993.

HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J. Histochem. Cytochem**, **29** (4), p. 577-80, 1981.

HUBER, J.D.; EGLETON, R.D.; DAVIS, T.P. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. **Trends Neuroscience**, 24 (12):719-25, 2001

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Acesso em 16/04/2015.

JACKSON, A. C. Biological basis of rabies virus neurovirulence in mice: comparative pathogenesis study using the immunoperoxidase technique. **Journal of Virology**, 65 (1), p. 537-540, 1991.

JACKSON, A. C. Rabies pathogenesis update. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, 1(1): 167-172, 2010.

JACKSON, A. C. Rabies. **Neurologic Clinics**, 26: 717-726, 2008.

JACKSON, A.C. Pathogenesis. In: JACKSON, A.C.; WUNNER, W.H. editors. **Rabies**. 2nd edition. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2007, p. 341-81.

JACKSON, A.C.; RANDLE, E.; LAWRENCE, G.; ROSSITER, J.P. Neuronal apoptosis does not play an important role in human rabies encephalitis. **Journal of Neurovirology**, 14 (5), p. 368-75, 2008

JACKSON, A.C.; ROSSITER, J.P. Apoptosis plays an important role in experimental rabies virus infection. **Journal of Virology**, 71 (7), p. 5603-07, 1997.

JOHNSON, N., ARÉCHIGA-CEBALLOS, N., AGUILAR-SETIEN, A. Vampire Bat Rabies: Ecology, Epidemiology and Control. **Viruses**, 6: 1911-1928, 2014.

JØRGENSEN, M. B., FINSEN, B. R., JENSEN, M. B., CASTELLANO, B., DIEMER, N. H., & ZIMMER, J. Microglial and astroglial reactions to ischemic and kainic acid-induced lesions of the adult rat hippocampus. **Experimental neurology**, 120(1), 70-88, 1993.

JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Patology of Domestic Animals**. 4.ed. São Diego: Academic Press, 1993, 3v. v.3, 653 p.

KIERSZENBAUM, A.L.; TRES, L.L. Tecido Nervoso. In: _____.(editores) [tradução Claudia Coana... et al.] **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012. Cap. 8, 227-58.

KIM, J.H.; PARK, J.A.; LEE, S.W.; KIM, W.J.; YU, Y.S.; KIM, K.W. Blood-neural barriers: intercellular communication at glio-vascular interface. **J Biochem Mol Biol**. 39 (4): 339-45, 2006.

KIMURA, L.M.S. Epidemiologia molecular de vírus da raiva em mamíferos domésticos e silvestres do Brasil. 2006, 79 p. Dissertação em Vigilância Sanitária,

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2006.

KISSLING, R. E. The fluorescent antibody test in rabies. In: BAER, G.M. *The natural history of rabies*. New York: Academic Press, 1975. p. 401-416.

KOJIMA, D. PARK, C.H.; SATOH, Y.; INOUE, S.; NOGUCHI, A.; OYAMADA, T. Pathology of the spinal cord of C57BL/6J mice infected with rabies virus (CVS-11 strain). **J. vet. Med. Sci.**, 71(3), p. 319-24, 2009.

KOJIMA, D. PARK, C.H.; TSUJIKAWA, S.; KOHARA, K.; HATAI, H.; OYAMADA, T.; NOGUCHI, A.; INOUE, S. Lesions of the central nervous system induced by intracerebral inoculation of BALB/c mice with rabies virus (CVS-11). **J. Vet. Med. Sci.**, 72(8), p. 1011-16, 2010.

KOLLS, J.K.; LINDEN, A. Interleukin 17 family members and inflammation. **Immunity**, 21 (4), p. 467-76, 2004.

KOPROWSKI, H.; ZHENG, Y.M.; HEBER-KATZ, E.; FRASER, N.; RORKE, L.; FU, Z.F.; HANLON, C.; DIETZSCHOLD, B. In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic diseases. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 90, p. 3024-3027, 1993.

KOPROWSKY, H. The mouse inoculation test. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H.(eds). **Laboratories Techniques in Rabies**. Geneva, World Health Organization, 1996, p. 80-87.

KOTAIT, I. CARRIERI, M.L.; CARNIELI JÚNIOR, P.; CASTILHO, J.G.; OLIVEIRA, R.N.; MACEDO, C.I.; SCHEFFER FERREIRA, K.C.; ACHKAR, S.M. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. Wildlife reservoirs of rabies vírus: a new challenge to a public health. Publicação mensal sobre agravos à saúde pública. **Boletim Epidemiológico Paulista**, volume 4, nº 40, 2007. Disponível em http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa40_raiva.htm. Acesso em 23/04/2015.

KOTAIT, I., CARRIERI, M. L., TAKAOKA, N. Y. **Raiva – Aspectos Gerais e Clínica. Manual Técnico do Instituto Pasteur.** 8, 2009. Disponível em: <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/extras/manual_08.pdf> Acesso em 24/04/2015.

KUZMIN, I. V., HUGHES, G. J., BOTVINKIN, A. D., ORCIARI, L. A., RUPPRECHT, C. E. Phylogenetic relationships of Irkut and West Caucasian bat viruses within the *Lyssavirus* genus and suggested quantitative criteria based on the N gene sequence for lyssavirus genotype definition. **Virus Research**, 111: 28-43, 2005.

KUZMIN, I. V., MAYER, A. E., NIEZGODA, M., MARKOTTER, W., AGWANDA, B., BREIMAN, R. F., RUPPRECHT, C. E. Shimoni bat virus, a new representative of the *lyssavirus* genus. **Virus Research**, 149: 197-210, 2010.

KUZMIN, I. V., ORCIARI, L. A., ARAI, Y. T., SMITH, J. S., HANLON, C. A., KAMEOKA, Y., RUPPRECHT, C. E. Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia: Phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. **VirusResearch**, **97**:65–79, 2003.

KUZMIN, I. V., WU, X., TORDO, N., RUPPRECHT, C. E. Complete genomes of Aravan, Khujand, Irkut and West Caucasian bat viruses, with special attention to the polymerase gene and non-coding regions. **Virus Research**, 1-2: **81-90**, 2008.

LACKAY, S. N., KUANG, Y., FU, Z. F. Rabies in Small Animals. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, **38**: 851–861, 2008.

LAFON, M. Evasive strategies in rabies virus infection. In: JACKSON, Alan (editor). **Advances in virus research**. vol. 79, Burlington: Academic Press, 2011, p.33-53.

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

LAFON, M. Modulation of the immune response in the nervous system by rabies virus. **Curr. Trop. Microbiol. Immunol.** 289: 239-58, 2005b.

LAFON, M. Rabies virus receptors. **J. Neurovirol.** 11:82–87, 2005a.

LAFON, M.; MEGRET, 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. **J. Immunol.** 180(11):7506–7515, 2008.

LAFON, M. Immunology. In: JACKSON, A.C.; WUNNER, W.H. editors. **Rabies**. 2nd edition. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2007, cap. 12, p. 489-504.

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. **Journal of Virology**, **28(16)**:7948-7958, 2009.

LANGONI, H., SILVA, R. C. Epidemiologia da Raiva em Quirópteros e os avanços em Biologia Molecular. **Revista Veterinária e Zootecnia**, **18(1)**: 19-37, 2011.

LAZARINI, S. R. F. Antigenic and Genetic Study of Rabies Vírus Isolated from Humans in Brazil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA, 2003, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: Instituto Pasteur, 2003. p.16-17.

LEPINE, P.; ATANASIU, P. Histopathological diagnosis. In: MESLIN, F.-X., KAPLAN, M.M., KOPROWSKI, H. (Eds.), **Laboratory Techniques in Rabies**, 4^aed. Geneva: World Health Organization, p. 66 - 79, 1996.

LIMA, R.R.; COSTA, A.M.R.; DE SOUZA, R.D.; GOMES-LEAL, W. Inflamação em doenças neurodegenerativas. **Revista Paraense de Medicina**, 21 (2), p.29-34, 2007.

LORENZI, J.C.C.; COELHO-CASTELO, A.A.M. Resposta immune contra infecções virais. **ScireSalutis, Aquidabã**. 1 (2), p. 35-44, 2011.

LOZA-RUBIO, E.; VARGAS, R.; HERNÁNDEZ, E.; BATALLA, D.; AGUILAR-SETIÉN, A. Evaluación de una serie de anticuerpos monoclonales para tipificar *Lyssavirus* in México. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, 119(5): 391-395, 1995

LOZA-RUBIO, E.; VARGAS, R.; HERNÁNDEZ, E.; BATALLA, D.; AGUILAR-SETIÉN, A. Investigation of rabies virus strains in México With a panel of monoclonal antibodies used to classify *Lyssavirus*. **Bulletin of PAHO**, 30 (1): 31-35, 1996

LUMIO, J., HILLBOM, M., ROINE, R., KETONEN, L., HALTIA, M., VALLE, M., NEUVONEN, E., LAHDEVIKTRA, J. Human rabies of bat origin in Europe. **Lancet**, 15: 378, 1986.

MACHADO, J.M. Raiva. In: MEIRA, D.A. **Terapêutica de doenças infecciosas e parasitárias**. 2.ed. Rio de Janeiro: EPUC, 1994. cap.10. p.103-106.

MASSONE, F. **Anestesiologia veterinária**. Farmacologia e técnicas, 5. 2003.

MATSUMOTO, S. Electron microscope studies of rabies virus in mouse brain. **The Journal of Cell Biology**, 19: 565-591, 1963.

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

MAYR, A.; GUERREIRO, M.G. **Virologia Veterinária**. 2^a ed. Porto Alegre: Sulina; 1981.

MELO, K.M.; CARVALHO, B.T.C. Células T regulatórias: mecanismos de ação e função nas doenças humanas. **Ver. Bras.Alerg.Imunopatol.**,32 (5), p. 184-88, 2009.

MEREDITH, C. D., ROSSOUW, A. R., VAN PRAAG KOCH, H. An unusual case of human rabies thought to be of Chiropteran origin. **South African Medical Journal**, 45: 767-769, 1971.

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

MEUTH, S.G.; SIMON, O.J.; GRIMM, A.; MELZER, N.; HERRMANN, A.M.; SPITZER, P.; LANDGRAF, P.; WIENDL, H. CNS inflammation and neuronal degeneration is aggravated by impaired CD200-CD200R-mediated macrophage silencing. **J. Neuroimmunol.** 194(1-2):62-69, 2008.

MICHALANY, Jorge. Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico. In: **Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico**. Michalany, 1998.

MORIMOTO, K.; HOOPER, D.C.; SPITSIN, S.; KOPROWSKI, H.; DIETZSCHOLD, B. Pathogenicity of Rabies virus variants inversely correlates with apoptosis and rabies virus glycoprotein expression in infected primary neuron cultures. **Journal of Virology**, 73 (1), p.510-518, 1999.

MURRAY, P.R.; PFALLER, M.A.; ROSENTHAL, K.S. **Microbiologia Médica**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier Medicina Brasil. 2006, 992 p. Disponível em <http://www.studentconsult.com>. Acesso em 21 de março de 2008.

NAKAE, S.; KOMIYAMA, Y.; NAMBU, A.; SUDO, K.; IWASE, M.; HOMMA, I.; SEKIKAWA, K.; ASANO, M.; IWAKURA, Y. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. **Immunity**, 17 (3), p. 375-87, 2002

NESTLE, F.O.; FILGUEIRA, L.; NICKOLOFF, B.J.; BURG, G. Human dermal dendritic cells process and present soluble protein antigens. **Journal of Investigative Dermatology**, 110, p. 762-6, 1998.

NGUYEN, A. K. T., NGUYEN, D. V., NGO, G. C., NGUYEN, T. T., INOUE, S., YAMADA, A., DINH, X. K., NGUYEN, D. V., PHAN, T. X., PHAM, B. Q., NGUYEN, H. T., NGUYEN, H. T. H. Molecular Epidemiology of Rabies Virus in Vietnam (2006-2009). **Japanese Journal of Infectious Diseases**, 64: 391-396, 2011.

NOVA, A.V.; RENGELL, F.S.; HINRICHSEN, S.L. Raiva. In: VERONESI, Ricardo e FOCACCIA, Roberto. **Tratado de Infectologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 2v. v.1, cap.33, p.498-510

PAGLIA, A. P., FONSECA, G. A. B., RYLANDS, A. B., HERRMANN, G., AGUIAR, L. M. S., CHIARELLO, A. G., LEITE, Y. L. R., COSTA, L. P., SICILIANO, S., KIERULFF, M. C. M., MENDES, S. L., TAVARES, V. C., MITTERMEIER, R. A., PATTON, J. L. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil 2ª Edição. **Annotated**

Checklist of Brazilian Mammals 2nd Edition. OCCASIONAL PAPERS IN CONSERVATION BIOLOGY, OCCASIONAL PAPER N° 6: 2012.

PANAFTOSA - Centro Panamericano de Febre Aftosa. América contra la rabia. **Plan de accion para la prevencion y el control de la rabia em las Américas: etapa 2005-2009**. Rio de Janeiro: PANAFTOSA - Organização Panamericana de Saúde / Organização Mundial da Saúde, 2007.

PARDRIDGE, William M. Blood–brain barrier delivery. **Drug discovery today**, v. 12, n. 1, p. 54-61, 2007.

PARK, C., KONDO, M., INQUE, S., NOGUCHI, A., OYAMADA, T., YOSHIKAWA, H., YAMADA, A. The Histopathogenesis of Paralytic Rabies in Six-Week-Old.C57BL/6J Mice Following Inoculation of the CVS-11 Strain into the Right Triceps Surae Muscle. **Journal of Veterinary Medical Science**, **68(6)**:589-595, 2006.

PEDROSO, P.M.O.; PESCADOR, C. A.; BANDARRA, P.M.; RAYMUNDO, D.L.; BORBA, M.R.; WOUTERS, F.; BEZERRA JÚNIOR, P.S.; DRIEMEIER, D. Padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva em amostras de tecido do sistema nervoso central de bovinos fixadas em formol e emblocadas em parafina. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 12, p. 627-632, 2008.

PEREIRA, F.E.L. Degenerações e Morte celular. In: BRASILEIRO FILHO, Geraldo (editor). **Bogliolo, patologia geral**. 5ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. cap 5, p. 119-146.

PERSIDSKY, Y.; RAMIREZ, S. H.; HAORAH, J.; KANMOGNE, G.D. Blood–brain Barrier: Structural Components and Function Under Physiologic and Pathologic Conditions. **J Neuroimmune Pharmacol**. 1, p.223–236, 2006.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington, DC: American Registry of Pathology. 1994.

QUARESMA, J.A.S. Arboviroses da Amazônia: estudo do mecanismo de morte celular e da resposta fenotípica do hospedeiro na febre amarela. Tese de doutorado em Patologia, Faculdade de Medicina / Universidade de São Paulo. 2003.

QUEIROZ, L.S. Sistema Nervoso. In: DE FARIA, J.L. **Patologia especial com aplicações clínicas**. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 1999. Capítulo VII, p.535-37.

RASALINGAM, P.; ROSSITER, J.P.; JACKSON, A.C. Recombinant rabies virus vaccine strain SAD-L16 inoculated intracerebrally in young mice a severe encephalitis with extensive neuronal apoptosis. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, 69, p. 100-05, 2005.

REED, L.J., MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Hygiene**, 27: 493-497, 1938.

REICHMANN, M. L. A. B.; PINTO, H.B.F.; ARANTES, M.B.; SANTOS, M.B.; VIARO, O.; NUNES, V.F.P. **Educação e promoção da saúde no Programa de Controle da Raiva**. São Paulo: Pasteur, 2000, Manuais, n.5, 30p. Disponível em http://www.saude.sp.gov.br/resources/instituto-pasteur/pdf/manuais/manual_05.pdf, Acesso em 20/03/2015

REISCHKE, R.; KRIEGLSTEIN, J. Postischemic neuronal damage causes astroglial activation and increase in local cerebral glucose utilization of rat hippocampus. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** v. 11, p.106-113, 1991.

REZENDE, M.B.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S.; VASCONCELOS, P.F.C.; REZENDE JÚNIOR, M.B. Raiva. In: LEÃO, R.N.Q. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**: enfoque amazônico. Belém: Cejup/UEPA/IEC, 1997. cap.24, P.377-395.

ROHDE, R.E.; NEILL, S.U.; CLARCK, K.A.; SMITH, J.S. Molecular epidemiology of rabies epizootics in Texas. **Clinical and Diagnostic Virology**, 8: 209-217, 1997

ROJAS, H.; RITTER, C.; PIZZOL, F.D. Mecanismos de disfunção da barreira hematoencefálica no paciente criticamente enfermo: ênfase no papel das metaloproteinases de matriz. **Rev Bras Ter Intensiva**. 23(2): p.222-227, 2011.

ROSSITER, J.P.; JACKSON, A.C. Pathology. In: JACKSON, A.C.; WUNNER, W.H. editors. **Rabies**. 2nd edition. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2007, p. 383-410.

ROZENFELD, C.; MARTINEZ, R.; FIGUEIREDO, R.T.; BOZZA, M.T.; LIMA, F.R.S.; PIRES, A.L.; SILVA, P.M.; BONOMO, A.; LANNES-VIEIRA, J.; SOUZA, W.; MOURA-NETO, V. Soluble factors released by *Toxoplasma gondii*-infected astrocytes down-modulate nitric oxide production by gamma interferon-activated and prevent neuronal degeneration. **Infection and Immunity**. In Press. 2003.

RUPPRECHT, C. E., HANLON, C. A., HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **Lancet Infectious Disease**, 2: 327-343, 2002.

SAITO, M., OSHITANI, H., ORBINA, J. R. C., TOHMA, K., DE GUZMAN, A. S., KAMIGAKI, T., DEMETRIA, C.S.; MANALO, D.L.; MIRANDA, M.E.G.; NOGUCHI, A. INOUE, S.; QUIAMBAO, B. P. Genetic diversity and geographic distribution of genetically distinct rabies viruses in the Philippines. **PLoS neglected tropical diseases**, 7(4), 2013, e2144.

SARMENTO, António Carlos Megre Eugénio. Modulação da permeabilidade da Barreira Hematoencefálica por mecanismos adrenérgicos centrais. 123p. Tese de

doutorado, Faculdade de Medicina do Porto. Portugal, 1992. Disponível em: http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/10157/3/144_TD_01_P.pdf. Acesso em 16 de abril de 2015.

SCHEFFER, K.C. Pesquisa do vírus da raiva em quirópteros naturalmente infectados no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil. 2005, 111 p. Dissertação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses, Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / Universidade de São Paulo. 2005.

SCHEFFER, K.C.; CARRIERI, M.L.; ALBAS, A.; PIRES DOS SANTOS, H.C.; KOTAIT, I.; ITO, F.H. Vírus da raiva em quirópteros naturalmente infectados no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. 41 (3); 389-95. 2007.

SCHLOGEL, F. **Breve Histórico da Raiva. Brief Review of Rabies**. In: Arquivos de Biologia e Tecnologia, 28(2), 1985, Curitiba-Paraná. Simpósio Aberto em Homenagem a Louis Pasteur, TECPAR.p. 2770295.

SCHMITZ, I.; KIRCHHOFF, S.; KRAMMER, P.H. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathway. **Int. J. Biochem. Cell.Biol**, 32 (11-12), p. 1123-36, 2000.

SHIN, T.; WEINSTOCK, D.; CASTRO, M.D.; HAMIR, A.N.; WAMPLER, T.; WALTER, M.; KIM, H.Y.; ACLAND, H. Immunohistochemical localization of endothelial and inducible nitric oxide synthase within neurons of cattle with rabies. **Journal of Veterinary Medical Science**, 66 (5), p 539-541, 2004.

SHOPE, R. E., MURPHY, F. A., HARRISON, A. K., CAUSEY, O. R., KEMP, G. E.; SIMPSON, D. I. H., MOORE, D. Two African viruses serologically and morphologically related to rabies virus. **Journal Virology**, 6: 690-692, 1970.

SMITH, J. S.; YAGER, P. A.; BAER, G. M. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory Techniques in Rabies**. 4th. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 181-192.

SMITH, J.S., FISHBEIN, D. B., RUPPRECHT, C. E., CLARK, K. Unexplained rabies in three immigrants in the United States. A virologic investigation. **The New England Journal of Medicine**, 324(4): 205-11, 1991.

SODRÉ, M. M., GAMA, A. R., ALMEIDA, M. F. Update list of bat species positive for rabies in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 52(2): 75-81, 2010.

SRINIVASAN, A., BURTON, E. C., KUEHNERT, M. J. Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients. **New England Journal of Medicine**, **352**: 1103-1111, 2005.

STEELE, J. H.; FERNANDEZ, P. J. History of rabies and global aspects. In: BAER, G. M. (Ed.). **The natural history of rabies**. 2nd ed., Florida: CRC Press, Inc., Boca Raton, 1991. p. 1-24.

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

STEIN, L. T.; RECH, R. R.; HARRISON, L.; BROWN, C. C. Immunohistochemical study of rabies virus within the central nervous system of domestic and wildlife species. **Veterinary Pathology Online**, 47(4), p. 630-633, 2010. Disponível em <http://sci-hub.bz/8a7c459f261ec49c2bd89971d28f18c8/stein2010.pdf>, acesso em 07/03/2015

STEVES, A.; LOWE, J.S..Sistema Nervoso. In: _____.[tradução Francisco Javier Hernandez Blazquez e Márcia Lúcia ZaidanDagli] **Histologia**. 1ª Ed. São Paulo: Manole; 1995. Cap. 13, 206-25.

SWANGO, L. J. Moléstias virais caninas. In: ETTINGER, E. J., FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**: moléstias do cão e do gato. 4.ed. São Paulo: Manole, 1997. cap. 69, 2v. v. 1, p.573-588.

TADDEI, V. A. Sistemática de Quirópteros. **Boletim do Instituto Pasteur**, n. 1, v. 2, p. 3-15, 1996.

TAKAOKA, N, Y.; KOTAIT, I.; REICHMANN, M.L M. A. B.; CARRIERI, M. L.; PANACHÃO, M. R. I.; HARMANI, N. M. S.; CUNHA, R. S.; OMOTO, T. M.; BOLZAN, V. L., COSTA, W. A. **Raiva – Controle e Profilaxia Humana**. São Paulo: Instituto Pasteur, 2003. Disponível em: <http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/extras/calendario.pdf>. Acesso em: 02/10/2005.

TAKAOKA, N. Y. Raiva. In: **Pediatria Básica: pediatria clínica geral**. MARCONDES, E., VAZ, F. A. C., RAMOS, J, L. A., OKAI, Y. (eds). São Paulo. Sarvier, 2003. p. 167-177.

TAKAYAMA-ITO, M.; ITO, N.; YAMADA, K.; SUGIYAMA, M.; MINAMOTO, N. Multiple amino acids in the glycoprotein of rabies virus are responsible for pathogenicity in adult mice. **Virus research**, 115(2), p. 169-175, 2006.

TOLLIS, M., DIETZSCHOLD, B., VOLIA, C.B., KOPROWSKI, H. Immunization of monkeys with rabies ribonucleoprotein (RNP) confers protective immunity against rabies. **Vaccine**, **9**:134-136, 1991.

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

TORDO, N., BAHLOUL, C., JACOB, Y., JALLET, C., PERRIN, P., BADRANE, H. Rabies: epidemiological tendencies and control tools. **Developments in Biologicals**, **125**: 3-13, 2006.

TRAVASSOS DA ROSA, E. S., CASSEB, L. M. N., SOUSA, R. C. M., BARBOSA, T. F. S., VASCONCELOS, P. F. C. Raiva. In: **Medicina Tropical e Infectologia na Amazônia**. LEÃO, R. N. Q.; BICHARA, C. B. C., FRAIHA NETO, H., VASCONCELOS, P. F. C. (eds). Belém, Samaúma Editorial, Instituto Evandro Chagas 2013.p. 795-818.

TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; KOTAIT, I.; BARBOSA, T. F. S.; CARRIERI, M. L.; BRANDÃO, P. E.; PINHEIRO, A. S.; BEGOT, A. L.; WADA, M. Y.; OLIVEIRA, R. C.; GRISARD, E. C.; FERREIRA, M.; LIMA, R. J. S.; MONTEBELLO, L.; MEDEIROS, D. B. A.; SOUSA, R. C. M.; BENSABATH, G.; CARMO, E. H.; VASCONCELOS, P. F.C. Bat-transmitted Human Rabies Outbreaks, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, **12(8)**: 1197-1202, 2006.

UBOL, S.; SUKWATTANAPAN, C.; MANEERAT, Y.. Inducible nitric oxide synthase inhibition delays death of rabies virus-infected mice. **Journal of medical microbiology**, v. 50, n. 3, p. 238-242, 2001.

UIEDA, W., HARMANI, N., SILVA, M. Rabies in insectivoros (*Mollosidae*) bats of southeastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, **29**: 393-397, 1995.

UIEDA, W., HAYASHI, M. M., GOMES, L. H., SILVA, M. M. S. Espécies de quirópteros diagnosticados com Raiva no Brasil. **Boletim Instituto Pasteur**, **1**: 17-35, 1996.

VAKNIN-DEMBINSKY, A.; BALASHOV, K.; WEINER, H.L. IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production. **J. Immunol.**, 176 (12), p. 7768-74, 2006

VAN DAM, A-M.; BAUER, J.; MAN-A-HING, W.K.H.; MARQUETTE, C.; TILDERS, F.J.H.; BERKENBOSCH, F. Appearance of Inducible Nitric Oxide Synthase in the Rat Central Nervous System After Rabies Virus Infection and During Experimental Allergic Encephalomyelitis But Not After Peripheral Administration of Endotoxin. **Journal of Neuroscience Research**, 40:251-260, 1995.

VELASCO-VILLA, A., GÓMEZ-SIERRA, M., HERNANDEZ-RODRIGUEZ, G., JUÁREZ-ÍSLAS, V., MELÉNDEZ-FÉLIX, A., VARGAS-PINO, F., VELÁZQUEZ-MONROY, O., FLISSER, A. Antigenic Diversity and Distribution of Rabies Virus in Mexico. **Journal of Clinical Microbiology**, **40**:951-958, 2002.

VELASCO-VILLA, A.; ORCIARI, L. A.; JUÁREZ-ISLAS, V.; GÓMEZ-SIERRA, M.; PADILLA-MEDINA, I.; FLISSER, A.; SOUZA, V.; CASTILLO, A.; FRANKA, R.; ESCALANTE-MAÑE, M.; SAURI-GONZÁLEZ, I.; RUPPRECHT, C. E. **Journal of Clinical Microbiology**, **44** (5): 1697-1710, 2006.

WAGNER, R.; ROSE, J.K. Rhabdoviridae: The viruses and their replication. In: FIELDS, B. M.; KINIPPE, P.M. (eds.) **Virology**. Philadelphia: Lippincott Raven Publishers, 1996. p. 1121-1159.

WARRELL, M.J.; WARRELL, D.A. Rabies and other lyssavirus diseases. **Lancet**, **363** (9413), p. 959-69, 2004.

WEN, Y.; WANG, H.; WU, H.; YANG, F.; TRIPP, R.A.; HOGAN, R.J.; FU, Z.F. Rabies virus expressing dendritic cell-activating molecules enhances the innate and adaptive immune response to vaccination. **Journal of Virology**, **85** (4), p.1634-44, 2011.

WILKISON, L. Understanding the nature of rabies: an historical perspective. In: CAMPBELL, J. B.; CHARLTON, K. M. (ed). **Rabies**. Boston, Kluwer Academic, 1988. P. 1-23.

WOLDEHIWET, Z. Rabies: recent developments. **Research In Veterinary Science**, **73**: 17-25, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Who Expert Consultation on Rabies: First Report**. Geneva, 2005. 123p. (WHO Technical Report Series, n.931).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World survey of rabies N° 34 for the Year **1998**. **Geneva: WHO, 2000**.

WU, X.; GONG, X.; FOLEY, H. D.; SCHELL, M. J.; FU, Z. F. Both Viral Transcription and replication are reduced when the Rabies virus nucleoprotein is not phosphorylated. **Journal of Virology**, **76**: 4153-4161, 2002.

WUNNER, W. H. Rabies in the Americas. **Virus Research**. v. 111, n. 1, p. 1-4, 2005.

WUNNER, W.H.; LARSON, J.K.; DIETZSCHOLD, B.; SMITH, C.L. The molecular biology of rabies viruses. **Reviews of Infectious Diseases**, **10**:S771-84, 1988.

XAVIER, S. de M. Comparação dos métodos de inoculação intracerebral em camundongos (*Mus musculus*) e de inoculação em cultura de células BHK-21 (C13) no diagnóstico da Raiva. Dissertação de Mestrado em Vigilância Sanitária – INCQS/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2005. 84p.

XIAOHU, W.; ZHANG, S.; SUN, C.; YUAN, Z.G.; WU, X.; WANG, D.; DING, Z.; HU, R. Proteomic profiles of mouse neuro N2a cells infected with variant virulence of rabies viruses. **J. Microbiol. Biotechnol**, **21** (4): 366-373, 2011.

YIN, J. F.; DING, Y. L.; HUANG, Y.; TAO, X. Y.; HAO, L. I.; YU, P. C.; SHEN, X.X.; JIAO, W.T.; LIANG, G.D.; QING, T; WANG, F. L.. Comparative Analysis of the Pathogenic Mechanisms of Street Rabies Virus Strains with Different Virulence Levels. **Biomedical and Environmental Sciences**, 27(10), p. 749-762, 2014.

YUNG, V.; FAVI, M.; FERNÁNDEZ, J. Genetic and antigenic typing of rabies virus in Chile: brief report. **Archives of virology**, 147: 2197-2205, 2002.

ZAIDMAN, G. W.; BILLINGSLEY, A. Corneal impression test for the diagnosis of acute rabies encephalitis. **Ophthalmology**, v. 105, n. 2, p. 249-251, february, 1998.

ZHANG, S.; GOETZ, B. D.; DUNCAN, I. D. Suppression of activated microglia promotes survival and function of transplanted oligodendroglial progenitors. **Glia**, v.41, p.191-198, 2003.

ANEXO A - Parecer aprovando a realização da pesquisa utilizando animais, pela
CEUA/IEC.



Parecer de Aprovação N° 020/2009/CEPAN/IEC/SVS/MS
Registro CEPAN - N° 0011/2009

Ananindeua/PA, 05 de junho de 2009.

Projeto: “**Caracterização molecular completa do genoma de cepas dos vírus da raiva isolados no estado do Pará**”.

Pesquisador Responsável: TACIANA FERNANDES SOUZA BARBOSA

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais-CEPAN do Instituto Evandro Chagas, cientificamos que o projeto acima **foi aprovado**.

Recomendamos ao coordenador responsável que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados a este Comitê, anualmente, a partir do início do projeto.

Atenciosamente,


NELSON ANTONIO BAILÃO RIBEIRO
Coordenador do CEPAN/IEC