

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA



CAMILA ZANLUCA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS
MONOCLONAIS CONTRA O VÍRUS RÁBICO**

**FLORIANÓPOLIS
2010**

CAMILA ZANLUCA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS
MONOCLONAIS CONTRA O VÍRUS RÁBICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia. Área de Concentração: Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti

**FLORIANÓPOLIS
2010**

Z31p Zanluca, Camila

Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra o vírus rábico [dissertação] / Camila Zanluca ; orientador, Carlos Roberto Zanetti. - Florianópolis, SC, 2010.

112 p.: il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Inclui referências

1. Biotecnologia. 2. Raiva. 3. Vírus rábico. 4. Anticorpos monoclonais. I. Zanetti, Carlos Roberto. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 577.23

*A meus pais Gilberto Zanluca e
Neuza Maria Boso Zanluca, pelo
privilégio de tê-los como pais, por
todo incentivo, amor e carinho.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Neuza e Gilberto, que, pelo próprio exemplo, me ensinaram os caminhos da bondade e da generosidade. Agradeço pela minha vida, pelo amor incondicional e pelo incentivo que me encoraja a sempre seguir em frente.

Aos meus queridos irmãos, Izabela e Junior, pela convivência diária, pelo seu amor e por estarem sempre torcendo pelo meu sucesso e pela minha felicidade.

Ao meu namorado, Gelson, pelo amor, carinho e cumplicidade, pela compreensão e paciência nos momentos difíceis e, sobretudo, por ser essa pessoa maravilhosa, que está sempre ao meu lado.

Ao professor Carlos R. Zanetti, que, com suas palavras de sabedoria, tem guiado meus passos na carreira científica. Agradeço pela oportunidade, por todos os seus ensinamentos, pela amizade e confiança durante estes cinco anos de convivência.

Ao professor Aguinaldo R. Pinto, pelas sugestões e colaborações no desenvolvimento dos trabalhos realizados e pela convivência durante estes anos.

Aos alunos de iniciação científica Luan R. P. Aires e Yuri Tonello, pelo auxílio, companheirismo e pela parceria.

À amiga Diana F. Trochez, a “Chiquitita”, pelo auxílio e pela agradável companhia durante o período de convívio, com um simples “Bom dia!” ou “Que feliz!” alegrando os momentos em que tudo parecia dar errado no laboratório.

Às queridas amigas Caroline Heidrich Seibert e Silvia R. Lanza, por todas as sugestões e pela companhia mais do que agradável nos muitos momentos em que passamos juntas, sejam eles em festas, congressos, viagens ou num simples dia de trabalho no laboratório.

À amiga e cunhada Gisele Pasetti, pela amizade e pela agradável convivência nos momentos de descontração.

Aos demais amigos que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Imunologia Aplicada durante estes últimos dois anos, Álvaro J. Celmer, Artur Battisti Neto, Douglas Bardini, Elis Amaral Rosa, Fernando M. Freire, Jonatan Ersching, Mariana Borsa e Tiago Gräf, pela amizade e por todos os momentos agradáveis que passamos juntos.

À sempre amiga Mariana N. Souza, pela amizade ímpar, pela agradável companhia e, sobretudo, pela cumplicidade e parceria durante esses anos em que moramos juntas. Agradeço por me ensinar o verdadeiro sentido da amizade.

À amiga Márcia Bronislowski, pela amizade e pela boa companhia durante o tempo em que moramos juntas.

Ao professor Hernán Terenzi e ao pesquisador Javier Vernal, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório durante a realização deste trabalho e também durante a iniciação científica.

Às pesquisadoras Maria Luiza Carrieri e Ivanete Kotait, pela oportunidade de realizar parte dos experimentos no Instituto Pasteur de São Paulo.

A todos do Laboratório de Virologia Aplicada e do Laboratório de Protozoologia, pela disponibilidade e auxílio sempre que necessário, possibilitando a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade.

Ao CNPq e à CAPES pelo financiamento.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, a minha eterna gratidão.

Muito obrigada,
Camila Zanluca

*“A mente que se abre para uma
nova idéia jamais retorna ao
seu tamanho original”*

Albert Einstein

RESUMO

Os primeiros anticorpos monoclonais (AcM) contra o vírus rábico foram produzidos por Wiktor e Koprowski em 1978 e, desde então, diversos outros foram produzidos e descritos. No entanto, apesar do grande número de AcM antirrábicos descritos na literatura, eles nem sempre são facilmente obtidos, principalmente porque a produção de AcM no Brasil é bastante limitada. Ademais, devido à grande diversidade de variantes de vírus rábico existentes no Brasil, torna-se importante produzir novos AcM que possam atender a interesses mais específicos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi a produção e caracterização de AcM contra o vírus rábico. Para tanto, foram realizados cinco protocolos de imunização, nos quais camundongos Balb/c foram imunizados com os seguintes antígenos: (1) vacina antirrábica (VeroRab[®], Aventis-Pasteur) para uso em humanos; (2) suspensão inativada de tecido de sistema nervoso central de camundongos infectados com vírus rábico selvagem isolado de um bovino naturalmente infectado por morcego hematófago em Passos de Torres/SC; (3) fragmento recombinante da glicoproteína do vírus rábico cepa ERA compreendendo os aminoácidos 179 a 281 (denominado rGERA179-281) seguido da inoculação de vírus rábico cepa PV na pata; (4) rGERA179-281 seguida por um reforço com a mesma proteína ou com vírus rábico cepa PV; (5) rGERA179-281 e vacina VeroRab[®]. Esplenócitos dos camundongos imunizados foram fusionados com células de mieloma da linhagem P3X63Ag8.653 utilizando polietilenoglicol 4000 e os hibridomas secretores de anticorpos antirrábicos foram triados por imunofluorescência indireta em células BHK-21 infectadas com vírus rábico. Diluições limitantes foram realizadas e sete clones estáveis foram obtidos, sendo denominados LIA 02 (fusão 1), 6H8 e 7B7 (fusão 2) e 3E6, 8D11, 9C7 e 8B6 (fusão 3). Nos dois últimos protocolos, não foram obtidos hibridomas secretores de anticorpos antirrábicos estáveis. Dentre os AcM, três foram caracterizados como IgG2a (6H8, 8D11 e 8B6), dois como IgM (7B7 e 9C7), um como IgG2b (LIA 02) e um como IgG3 (3E6), todos com cadeia leve *kappa*. Por ensaio de neutralização, foi verificado que o AcM 8D11 foi capaz de neutralizar o vírus rábico cepa PV *in vitro*. Além disso, o 7B7 reconheceu a rGERA179-281 e apenas o 8D11 não reconheceu o vírus presente na vacina VeroRab[®], conforme demonstrado por ELISA. Os AcM também foram testados contra vírus rábico selvagem isolado de diferentes animais (bovinos, equinos,

morcegos, cães e canídeos silvestres) e de humano (uma amostra oriundas de diferentes regiões do Brasil. O AcM 6H8 reconheceu todas as amostras testadas. Os AcM LIA 02, 3E6 e 9C7 juntos também reconheceram todas elas. Assim, a partir dos resultados obtidos neste trabalho, novos estudos utilizando esses AcM como ferramentas biotecnológicas poderão ser desenvolvidos.

Palavras-chave: raiva; vírus rábico; anticorpos monoclonais.

ABSTRACT

The first anti-rabies monoclonal antibodies (MAb) were produced by Wiktor and Koprowski in 1978, and, since then, several other MAb were produced and described. However, in spite of the great number of anti-rabies MAb described in scientific literature, they are not always easily obtained, especially because the production of MAb in Brazil is quite limited. Besides, due to the great diversity of rabies virus variants existent in Brazil, it becomes important to produce new MAb to comprise to more specific interests. So, the objective of the present work was the production and characterization of MAb against rabies virus. Therefore, five immunization protocols were carried out, which Balb/c mice were immunized with the following antigens: (1) anti-rabies vaccine (VeroRab[®], Aventis-Pasteur) for use in humans; (2) an inactivated suspension of central nervous system tissue from mice infected with a wild rabies virus isolates from a bovine naturally infected by a vampire bat in Passos de Torres/SC; (3) a recombinant fragment of glycoprotein from rabies virus ERA strain comprising the amino acids from 179 to 281 (named rGERA179-281), followed by inoculation of rabies virus PV strain in the foot; (4) rGERA179-281 followed by a booster with the same protein or with rabies virus PV strain; (5) rGERA179-281 and vaccine VeroRab[®]. Spleen cells of immunized mice were fused with P3X63Ag8.653 myeloma cells using polyethylene glycol 4000, and hybridomas secreting anti-rabies antibodies were screened by indirect immunofluorescence on rabies infect BHK-21 cells. Limiting dilutions were performed, and seven stables clones were obtained, which were named LIA 02 (fusion 1), 6H8 and 7B7 (fusion 2) and 3E6, 8D11, 9C7 and 8B6 (fusion 3). In the last two protocols, no stable hybridomas secreting anti-rabies antibodies were obtained. Among the MAb, three were characterized as IgG2a (6H8, 8D11 and 8B6), two as IgM (7B7 and 9C7), one as IgG2b (LIA 02) and one as IgG3 (3E6), all of them with kappa light chain. By neutralization assay, it was verified that MAb 8D11 was capable to neutralize rabies virus PV strain *in vitro*. In addition, 7B7 recognized rGERA179-281, and just 8D11 didn't recognize the virus present in the vaccine VeroRab[®], as demonstrated by ELISA. Moreover, MAb were tested against several rabies virus isolates from different animals (bovine, equine, bat, dog and wild dog) and from human (one sample)

originating from different regions of Brazil. The MAb 6H8 recognized all the samples tested. A pool with MAb LIA 02, 3E6 and 9C7 also recognized all of them. Thereby, with the results obtained in this work, new studies using those MAb as biotechnological tools will be able to be developed.

Keywords: rabies; rabies virus; monoclonal antibodies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número de casos de raiva humana por animal agressor no Brasil, no período de 1986 a março de 2009.....	26
Figura 2: Número de casos de raiva animal no Brasil, no período de 2002 a março de 2009	27
Figura 3: Micrografia eletrônica do vírus rábico evidenciando sua estrutura em forma de projétil	30
Figura 4: Representação esquemática evidenciando a organização estrutural do vírus rábico.....	31
Figura 5: Representação esquemática do genoma do vírus rábico, com seus cinco genes (N, P, M, G e L).....	35
Figura 6: Representação esquemática com as principais etapas do ciclo de infecção e replicação do vírus rábico na célula hospedeira	36
Figura 7: Principais etapas para a produção de anticorpos monoclonais por meio da geração de hibridomas	43
Figura 8: Vias para a síntese de nucleotídeos, indicando o bloqueio da via <i>de novo</i> pela aminopterina.....	44
Figura 9: Purificação e caracterização da rGERA179-281	69
Figura 10: Imunofluorescência indireta em células BHK-21 infectadas com vírus rábico cepa PV	75
Figura 11: Padrões de reatividade dos anticorpos monoclonais estabelecidos por imunofluorescência indireta em tecido de sistema nervoso central de camundongos infectados com vírus rábico selvagem	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação do gênero <i>Lyssavirus</i>	29
Tabela 2: Identificação dos isolados de vírus rábico utilizados no ensaio de imunofluorescência indireta para caracterização dos AcM: número de registro do Instituto Pasteur/SP, animal de isolamento e local de origem da amostra.....	65
Tabela 3: Títulos de anticorpos antirrâbicos e antirrâbicos neutralizantes dos camundongos do terceiro protocolo de imunização ¹ determinados por imunofluorescência indireta e soroneutralização.....	70
Tabela 4: Títulos de anticorpos anti-rGERA179-281 e antirrâbicos neutralizantes dos camundongos do quarto protocolo de imunização ¹ determinados por ELISA e soroneutralização.....	71
Tabela 5: Títulos de anticorpos anti-rGERA179-281 e antirrâbicos neutralizantes dos camundongos do quinto protocolo de imunização ¹ determinados por ELISA e soroneutralização.....	72
Tabela 6: Resumo dos resultados obtidos nas fusões realizadas para obtenção de anticorpos monoclonais antirrâbicos	74
Tabela 7: Seleção do meio para criopreservação dos hibridomas secretores de anticorpos antirrâbicos.....	76
Tabela 8: Nome dos hibridomas, protocolo de fusão em que foram gerados e isotipo dos anticorpos monoclonais (cadeias pesada e leve).77	
Tabela 9: Imunoreatividade dos anticorpos monoclonais com isolados de vírus rábico selvagem e com uma cepa de vírus rábico fixo e as variantes antigênicas de cada isolado.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

ψ – pseudogene viral

ABLV – *Australian bat lyssavirus*

ABTS – ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolina-6-sulfônico)

a.C. – antes de Cristo

ACF – adjuvante completo de Freund

AcM – anticorpos monoclonais

AcN – anticorpos neutralizantes

AIF – adjuvante incompleto de Freund

ARAV – *Aravan virus*

ATCC – do inglês *American Type Culture Collection*

BHK-21 – linhagem de células de rim de bebê de hamster (do inglês *baby hamster kidney*)

BSA – soro albumina bovina

CDC – do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CVS – *Challenge Virus Standard*

DAB – 3,3'-diaminobenzidina

DMEM F12 – meio Dulbecco modificado por Eagle/ Nutriente HAM F12

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucléico

D.O. – densidade óptica

DUVV – *Duvenhage virus*

EBLV-1 – *European bat lyssavirus* tipo 1

EBLV-2 – *European bat lyssavirus* tipo 2

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – ensaio enzimático por imunoabsorção (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*)

ERA – Evelyn-Rokitniki-Abelseth

ERIG – imunoglobulina antirrábica equina (do inglês *Equine rabies immunoglobulin*)

g – força centrífuga

G – glicoproteína

HAT – hipoxantina, aminopterina, timidina

HGPRT – hipoxantina-guanina fosforibosil transferase

HRIG – imunoglobulina antirrábica humana (do inglês *Human rabies immunoglobulin*)

HT – hipoxantina, timidina
IFD – imunofluorescência direta
IFI – imunofluorescência indireta
INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
i.p. – via intraperitoneal
IPTG – isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
IRKV – *Irkut virus*
ITCF – isotiocianato de fluoresceína
KHUV – *Khujand virus*
L – RNA polimerase RNA-dependente
LANAGRO – Laboratório Nacional Agropecuário
LB – meio Luria Bertani
LBV – *Lagos bat virus*
Le – sequência líder
M – proteína de matriz
MOKV – *Mokola virus*
N – nucleoproteína
N2A – linhagem de células de neuroblastoma murino
NC – região não codificante
NIH – Instituto Nacional de Saúde (do inglês *National Institutes of Health*)
OIE – Organização Mundial de Saúde Animal (do francês *Office International des Epizooties*)
OMS – Organização Mundial de Saúde
OPD – *o*-fenilenodiamina
ORF – janela aberta de leitura (do inglês *open reading frame*)
P, M1 ou NS – fosfoproteína
PBS – solução salina tamponada (do inglês *phosphate buffered saline*)
PEG – polietilenoglicol
PM – *Pitman-Moore*
PV – *Pasteur virus*
RABV – vírus rábico (do inglês *rabies virus*)
RNA – ácido ribonucléico
RNAm – RNA mensageiro
RNAt – RNA transportador
RNP – ribonucleoproteína
rpm – rotação por minuto
RPMI – meio *Roswell Park Memorial Institute*
RT-PCR – reação em cadeia da polimerase associada à transcrição reversa

SBF – soro bovino fetal

s.c. – via subcutânea

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio (do inglês *sodium dodecyl sulfate* *polyacrylamide gel electrophoresis*)

SNC – sistema nervoso central

TK – timidina quinase

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

UI – unidades internacionais

WCBV – *West Caucasian bat virus*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
1.1	A RAIVA.....	25
1.2	O VÍRUS	27
1.2.1	Classificação	27
1.2.2	Morfologia e Estrutura.....	30
1.2.2.1	<i>Nucleoproteína (N)</i>	31
1.2.2.2	<i>Fosfoproteína (P, M1 ou NS)</i>	32
1.2.2.3	<i>RNA polimerase RNA-dependente (L)</i>	33
1.2.2.4	<i>Proteína de Matriz (M)</i>	33
1.2.2.5	<i>Glicoproteína (G)</i>	33
1.2.3	Organização Genômica e Replicação	34
1.3	PATOGÊNESE.....	37
1.4	DIAGNÓSTICO	38
1.5	PROFILAXIA E TRATAMENTO	40
1.6	ANTICORPOS MONOCLONAIS	41
1.6.1	Produção de Anticorpos Monoclonais por Meio da Geração de Hibridomas	41
1.6.2	Anticorpos Monoclonais Antirrábicos e Suas Aplicações ..	45
2	OBJETIVOS.....	49
2.1	OBJETIVO GERAL	49
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
3	ANIMAL E MÉTODOS.....	50
3.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	50
3.2	ANIMAIS	50
3.3	LINHAGENS CELULARES.....	50
3.4	VÍRUS RÁBICO	51
3.5	OBTENÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE rGERA179-281	52
3.5.1	Clonagem e Expressão da Proteína rGERA179-281.....	52
3.5.2	Purificação da Proteína rGERA179-281.....	53
3.5.3	<i>Immunoblotting</i>.....	55
3.6	IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS	55
3.7	OBTENÇÃO DE HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICORPOS ANTIRRÁBICOS	57
3.7.1	Obtenção dos Esplenócitos	57
3.7.2	Células de Mieloma.....	58
3.7.3	Fusão	58

3.7.4	Seleção dos Híbridomas	59
3.8	TRIAGEM DOS HÍBRIDOMAS PRODUTORES DE ANTICORPOS ANTIRRÁBICOS.....	59
3.9	CLONAGEM DOS HÍBRIDOMAS POR DILUIÇÃO LIMITANTE.....	60
3.10	CRIOPRESERVAÇÃO DOS HÍBRIDOMAS.....	61
3.11	CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS	62
3.11.1	Isotipagem.....	62
3.11.2	Determinação da Capacidade Neutralizante.....	63
3.11.3	Reatividade com a Proteína rGERA179-281.....	63
3.11.4	Reatividade com Diferentes Isolados de Vírus Rábico Selvagem	64
3.11.5	Reatividade com Cepa de Vírus Rábico Vacinal	66
4	RESULTADOS.....	68
4.1	OBTENÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE rGERA179-281	68
4.2	IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS.....	69
4.3	OBTENÇÃO DE HÍBRIDOMAS PRODUTORES DE ANTICORPOS ANTIRRÁBICOS	73
4.4	CRIOPRESERVAÇÃO DOS HÍBRIDOMAS.....	76
4.5	CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS	77
4.5.1	Isotipagem	77
4.5.2	Determinação da Capacidade Neutralizante.....	77
4.5.3	Reatividade com a Proteína rGERA179-281.....	78
4.5.4	Reatividade com Diferentes Isolados de Vírus Rábico Selvagem	78
4.5.5	Reatividade com Cepa de Vírus Rábico Vacinal	81
5	DISCUSSÃO	82
5.1	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA rGERA179-281	82
5.2	PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS	83
5.3	ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTIRRÁBICOS	89
6	SUMÁRIO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS	95
7	CONCLUSÕES.....	96
8	PERSPECTIVAS.....	97
	REFERÊNCIAS.....	98

1 INTRODUÇÃO

1.1 A RAIVA

A raiva é uma antroponose, cujo agente etiológico é o vírus rábico, pertencente à família Rhabdoviridae, gênero *Lyssavirus* (KUZMIN *et al.*, 2009). Trata-se de uma doença que acomete mamíferos, transmitida principalmente pela inoculação de vírus presente na saliva de animais infectados através de mordeduras, ocasionando uma encefalomielite aguda, fatal na maioria dos casos (JACKSON, 2008).

A palavra raiva deriva do latim *rabere*, que significa “fúria”, “delírio” e do sânscrito *rhabas*, que significa “tornar-se violento”. Os primeiros relatos de morte humana relacionada com mordedura de cães “loucos” ou “violentos” datam do século XXIII a.C. (WILKINSON, 2002) e, desde então, a raiva tem sido uma das mais temidas e também uma das mais estudadas doenças que acometem seres humanos (WARREL; WARREL, 2004).

Apesar do progresso que se tem obtido no desenvolvimento de vacinas e no controle da doença, a raiva continua sendo um problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento (WARREL, 2008; SCHNELL *et al.*, 2010). Encontra-se distribuída por todo o mundo, com exceção da Antártica e da Nova Zelândia e, a cada ano, são estimadas mais de 55000 mortes em decorrência desta doença, especialmente em áreas endêmicas da África e da Ásia (WHO, 2008; SCHNELL *et al.*, 2010). No entanto, um estudo realizado na Tailândia indicou que o número de mortes neste país deve ser 100 vezes maior que o número oficialmente divulgado (CLEAVELAND *et al.*, 2002), o que sugere que o número de pessoas que morrem de raiva a cada ano no mundo deve estar subestimado também. Além disso, a cada ano, mais de dez milhões de pessoas, a maioria sem vacinação, suporta longa ansiedade após exposição a um animal com suspeita da doença (WARREL; WARREL, 2004).

Os cães ainda são os principais transmissores de raiva na África e na Ásia e são responsáveis pela maioria dos casos de raiva humana no mundo. Nos países desenvolvidos, a raiva persiste principalmente em animais silvestres, com casos esporádicos de contaminação humana. Na América do Sul, em 2003, pela primeira vez foi observado maior

número de casos de raiva humana transmitida por animais silvestres, particularmente por morcegos, do que por cães (WHO, 2008).

No Brasil, de acordo com dados do Ministério da Saúde, o número de casos de raiva humana vem diminuindo desde 1990 (Figura 1), com exceção dos anos 2004 e 2005, quando houveram surtos de raiva transmitida por morcego nos estados do Pará e Maranhão (BRASIL, 2005; BRASIL, 2009). A raiva silvestre, no entanto, ainda acarreta grandes prejuízos à indústria agropecuária. Anualmente, são registrados mais de 1000 casos de raiva em animais de produção (Figura 2), sobretudo bovinos, o que, considerando-se a taxa de subnotificação calculada para o Brasil, acarreta prejuízos anuais de milhões de dólares (MARQUES, 2000; BRASIL, 2009).

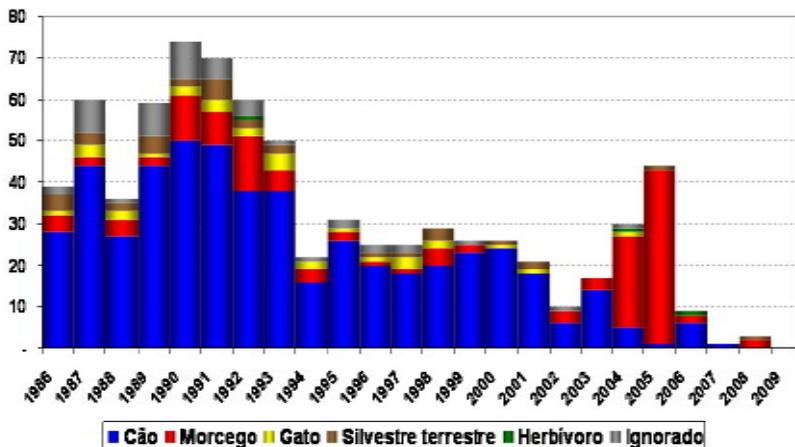


Figura 1: Número de casos de raiva humana por animal agressor no Brasil, no período de 1986 a março de 2009. Fonte: BRASIL, 2009.

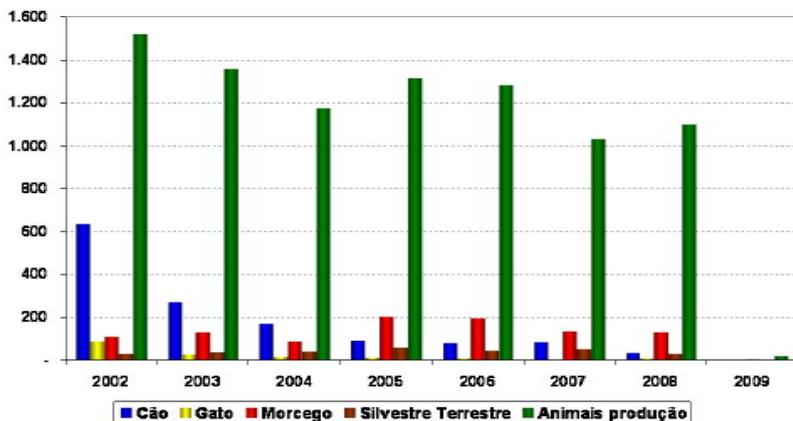


Figura 2: Número de casos de raiva animal no Brasil, no período de 2002 a março de 2009. Fonte: BRASIL, 2009.

1.2 O VÍRUS

1.2.1 Classificação

A família Rhabdoviridae é formada por vírus capazes de infectar vertebrados, invertebrados e plantas, organizados em seis gêneros: *Lyssavirus*, *Vesiculovirus*, *Ephemerovirus*, *Cytorhabdovirus*, *Nucleorhabdovirus* e *Novirhabdovirus* (FAUQUET; MAYO, 2001; KUZMIN *et al.*, 2009). No gênero *Lyssavirus* (do grego, *Lyssa*, que significa raiva), estão agrupados vírus geneticamente adaptados para replicação no sistema nervoso central de mamíferos (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002) e que são compostos principalmente por RNA (2-3%), proteínas (67-74%), lipídios (20-26%) e carboidratos (3%) (WUNNER, 2002).

O gênero *Lyssavirus* atualmente é dividido em sete genótipos (WUNNER, 2002), com base na análise filogenética das sequências nucleotídicas do gene da nucleoproteína (BOURHY; KISSI; TORDO, 1993). Também foram estabelecidos quatro sorotipos por meio do estudo de variação antigênica utilizando um painel de anticorpos monoclonais (BUSSEREAU *et al.*, 1988). O primeiro genótipo identificado como agente etiológico da raiva compreende o vírus rábico

(RABV, genótipo 1, sorotipo 1), que é o mais prevalente e o responsável pela maioria das infecções em animais e humanos (SCHNELL *et al.*, 2010). Posteriormente, foram identificados outros *Lyssavirus* relacionados à raiva, refletindo a diversidade genética existente neste gênero. Esses *Lyssavirus* relacionados à raiva incluem o *Lagos bat virus* (LBV, genótipo 2, sorotipo 2), o *Mokola virus* (MOKV, genótipo 3, sorotipo 3), o *Duvenhage virus* (DUVV, genótipo 4, sorotipo 4), o *European bat lyssavirus* tipo 1 (EBLV-1, genótipo 5), o *European bat lyssavirus* tipo 2 (EBLV-2, genótipo 6) e o *Australian bat lyssavirus* (ABLV, genótipo 7) (WUNNER, 2002). Recentemente foram identificados outros cinco *Lyssavirus*, diferentes antígenica e geneticamente dos demais, mas que ainda precisam ser caracterizados como novos genótipos: o *Aravan virus* (ARAV), o *Khujand virus* (KHUV), o *Irkut virus* (IRKV), o *West Caucasian bat virus* (WCBV) e o *Shimoni bat virus* (SHIBV) (HANLON *et al.*, 2005; KUZMIN *et al.*, 2010) (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação do gênero *Lyssavirus*

Genótipo	Vírus	Fonte	Distribuição
1	RABV	Cachorro, raposa, guaxinim, morcego e outros	Mundial
2	LBV	Morcegos frugívoros. Ainda não detectado em seres humanos	África (raro)
3	MOKV	Cachorro, gato, mussaranho	África
4	DUVV	Morcegos insetívoros	África (raro)
5	EBLV-1	Morcegos insetívoros	Europa
6	EBLV-2	Morcegos insetívoros	Holanda, Inglaterra, Alemanha, Ucrânia, Suíça
7	ABLV	Morcegos frugívoros e insetívoros	Austrália
–	ARAV	Morcegos insetívoros	Ásia central
–	KHUV	Morcegos insetívoros	Ásia central
–	IRKV	Morcegos insetívoros	Sibéria
–	WCBV	Morcegos insetívoros	Região caucasiana
–	SHIBV	Morcegos insetívoros	Kênia

Fonte: Adaptado de WARREL; WARREL, 2004; WHO, 2005; KUZMIN *et al.*, 2010.

O gênero *Lyssavirus* pode ainda ser dividido filogeneticamente em dois grupos, os filogrupos I e II, que diferem entre si por suas propriedades biológicas, como patogenicidade, indução de apoptose e reconhecimento de receptor celular. O filogrupo I inclui os genótipos 1,

4, 5, 6 e 7, enquanto o filogruppo II abrange os genótipos 2 e 3 (WHO, 2005).

Além disso, o vírus rábico (genótipo 1) pode ser classificado em cepas, de acordo com a espécie animal da qual o vírus foi isolado e com as etapas de adaptação as quais as cepas foram submetidas. Assim, vírus isolados diretamente de animais domésticos ou selvagens são caracterizados como cepas “de rua” ou “selvagem”, respectivamente. Diferentemente, algumas cepas de vírus rábico, após isolamento, foram submetidas a diversas passagens em cultura de células ou em animais, obtendo-se as chamadas cepas “fixas”. Estas cepas possuem comportamento reprodutível e características biológicas semelhantes, sendo amplamente empregadas em pesquisas científicas e para a produção de vacinas antirrábicas (KING; TURNER, 1993).

1.2.2 Morfologia e Estrutura

O vírus da raiva possui estrutura em forma de projétil, com uma extremidade plana e a outra arredondada, apresentando diâmetro médio de 75 nm e 100-300 nm de comprimento (TORDO, 1996; TAKAYAMA, 2008) (Figura 3).

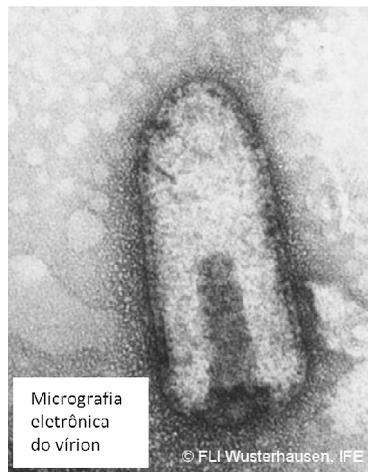


Figura 3: Micrografia eletrônica do vírus rábico evidenciando sua estrutura em forma de projétil. Fonte: Adaptado de FLI (2006).

As partículas virais podem ser divididas em duas unidades estruturais: a ribonucleoproteína (RNP) e o envelope. A RNP ou nucleocapsídeo apresenta-se sob a forma de um complexo helicoidal formado pelo RNA genômico associado à nucleoproteína (N), à fosfoproteína (P) e à RNA polimerase RNA-dependente (L). O envelope é composto pela glicoproteína (G) e por uma bicamada lipídica derivada da célula hospedeira. Entre a RNP e o envelope, encontra-se a proteína de matriz (M) (CDC, 2003; SCHNELL *et al.*, 2010) (Figura 4).

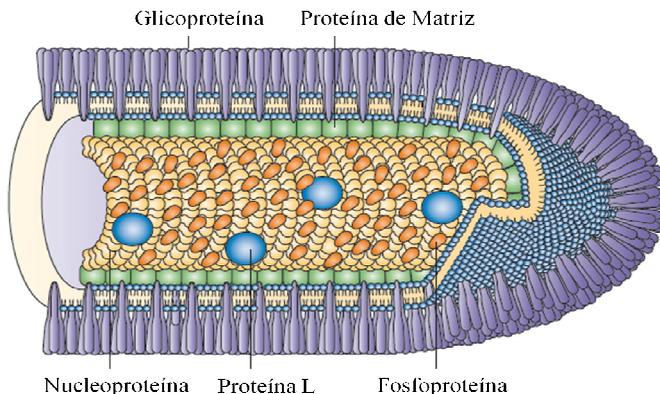


Figura 4: Representação esquemática evidenciando a organização estrutural do vírus rábico. Fonte: Adaptado de SCHNELL *et al.* (2010).

1.2.2.1 Nucleoproteína (N)

A nucleoproteína ou proteína N é constituída por 450 aminoácidos e possui peso molecular de aproximadamente 57 kDa. Está presente em diferentes formas na célula infectada: uma forma que permanece difusa no citoplasma e outra associada formando corpos de inclusão citoplasmáticos. É o mais conservado componente viral, em termos de similaridade da sequência de aminoácidos, dentre os diversos genótipos dos *Lyssavirus* (WUNNER, 2002). Essas regiões conservadas provavelmente são as que interagem diretamente com o RNA genômico, uma vez que uma das funções da nucleoproteína é a encapsidação do RNA genômico e a proteção do RNA molde da atividade de

ribonucleases (KOUZNETZOFF; BUCKLE; TORDO, 1998; WUNNER, 2002). Após se ligar ao RNA viral, a proteína sofre alterações conformacionais, adquirindo novos epítomos, e é fosforilada no resíduo de serina na posição 389 (KAWAI *et al.*, 1999).

Outra propriedade da nucleoproteína está relacionada com a indução de resposta imune. Ela é o principal antígeno alvo para célula T *helper* e é capaz de gerar imunidade protetora contra um desafio periférico com vírus rábico. Além disso, uma imunização prévia com nucleoproteína é capaz de acelerar a produção de anticorpos neutralizantes após um reforço com vírus rábico inativado, provavelmente devido à presença de células T *helper*, que facilitam uma rápida resposta imune contra os antígenos presentes na dose reforço (CELIS *et al.*, 1988; WUNNER, 2002).

1.2.2.2 Fosfoproteína (P, M1 ou NS)

Esta proteína de 297 aminoácidos e peso molecular de 38-41 kDa é uma proteína não estrutural (por isso a denominação NS – *nonstructural protein*), altamente hidrofílica (TORDO, 1996; WUNNER, 2002). Apresenta diferentes estágios de fosforilação e possui diversos resíduos de serina e treonina possíveis de serem fosforilados (TORDO, 1996; GUPTA *et al.*, 2000). As fosforilações e a grande quantidade de resíduos de aminoácidos como aspartato e glutamato conferem uma carga negativa a esta proteína (TORDO, 1996).

É uma proteína multifuncional que, ao interagir com a nucleoproteína, atua como uma chaperona, evitando a agregação da proteína N entre si e a sua ligação não-específica com o RNA celular. Assim, a proteína P se liga à N, direcionando-a para a correta encapsidação do RNA genômico viral (KAWAI *et al.*, 1999; WUNNER, 2002). Quando associada à proteína L, tem um papel fundamental como cofator para a transcrição e replicação do genoma viral (CHENIK *et al.*, 1998). Essencialmente, a P serve para estabilizar a proteína L e para direcionar sua ligação ao RNA molde (WUNNER, 2002).

1.2.2.3 RNA polimerase RNA-dependente (L)

A RNA polimerase RNA-dependente ou proteína L (*Large protein*), possui 2142 aminoácidos e 244 kDa e o seu gene ocupa mais da metade (54%) do genoma viral. É a maior das proteínas do vírus rábico, mas é também a que está presente em menor quantidade no vírion e na célula infectada (TORDO, 1996). É o componente catalítico do complexo da polimerase e é responsável pela maioria das atividades enzimáticas envolvidas na replicação e transcrição do RNA viral, incluindo o *capping*, a metilação e a poliadenilação do RNA mensageiro (WUNNER, 2002).

1.2.2.4 Proteína de Matriz (M)

A proteína de matriz é a menor proteína do vírus rábico, possuindo 202 aminoácidos e peso molecular de 25 kDa (WUNNER, 2002). Interage com a RNP e a condensa, determinando sua forma helicoidal. Simultaneamente, também interage com o domínio citoplasmático da glicoproteína presente no envelope viral, tendo papel não só na entrada do vírus e fusão entre as membranas, mas também na liberação de vírus durante a sua replicação (SCHNELL *et al.*, 2010). A porção central da proteína contém um domínio hidrofóbico (resíduos 89-207), que pode interagir com membranas lipídicas (WUNNER, 2002). A proteína M parece ainda estar envolvida na resposta imune contra o vírus rábico (TORDO, 1996).

1.2.2.5 Glicoproteína (G)

A glicoproteína é uma proteína transmembrana tipo I, que se organiza na forma de trímeros, formando aproximadamente 400 espículas projetadas na superfície da partícula viral (GAUDIN *et al.*, 1999; CDC, 2003). É a proteína mais estudada dentre as proteínas virais (TORDO, 1996).

A proteína G é transcrita inicialmente como um polipeptídeo de 524 aminoácidos, dos quais os primeiros 19 representam um peptídeo

sinal, que é clivado quando a proteína é processada no retículo endoplasmático da célula do hospedeiro. Assim, a proteína madura possui 505 aminoácidos (65 kDa) (WUNNER, 2002) e pode ser subdividida em um ectodomínio com 439 aminoácidos, um domínio transmembrana com 22 aminoácidos (resíduos 440-461) e um endodomínio de 44 aminoácidos (resíduos 462-505) (TORDO, 1996).

O ectodomínio tem papel essencial na resposta imune, pois está envolvido na indução de anticorpos neutralizantes para o vírus promovida por meio da vacinação pré e pós-exposição (COX; DIETZSCHOLD; SCHNEIDER, 1977; WUNNER, 2002), bem como é alvo para células T citotóxicas e células T *helper* específicas contra o vírus (MACFARLAN; DIETZSCHOLD; KOPROWSKI, 1986; CELIS *et al.*, 1988). Embora outras proteínas virais também estejam envolvidas com a indução de resposta imune, a glicoproteína é a única capaz de induzir proteção contra um desafio intracerebral com vírus rábico (TORDO, 1996).

A proteína G é uma proteína de fusão, que media a entrada do vírus nas células hospedeiras. Após ligar aos receptores na célula alvo, o vírus é internalizado e as espículas de G fundem-se com a membrana do endossomo em um processo pH-dependente (GAUDIN *et al.*, 1999).

A glicoproteína tem ainda papel crítico na patogênese e pelo menos em parte do neurotropismo do vírus rábico (TORDO, 1996). A presença do resíduo de arginina ou lisina na posição 333 e a baixa expressão de glicoproteína em células infectadas estão associadas com o aumento da virulência do vírus rábico experimentalmente (WARREL; WARREL, 2004). Em geral, cepas mais patogênicas produzem menor quantidade de glicoproteína, uma vez que pode limitar a apoptose das células hospedeiras e a resposta imune humoral (FABER *et al.*, 2002; NADIN-DAVIS; FEHLNER-GARDINER, 2008).

1.2.3 Organização Genômica e Replicação

O vírus rábico possui um genoma de RNA fita simples, não segmentado, de polaridade negativa (SOKOL *et al.*, 1969). Isto implica que o RNA genômico isolado não é infeccioso e não pode ser diretamente traduzido pela maquinaria da célula. Assim, o primeiro evento na infecção é a transcrição do RNA genômico em moléculas de

RNA mensageiro (RNAm) complementares (de sentido positivo) para cada gene individualmente (TORDO, 1996).

O genoma completo possui 11932 nucleotídeos. Os primeiros 58 nucleotídeos, na extremidade 3', correspondem a uma sequência líder (Le) não codificante. Imediatamente após, estão localizados os cinco genes estruturais – N, P, M, G e L, respectivamente. Os genes são separados por pequenas regiões não codificantes (dinucleotídeos ou pentanucleotídeos), exceto pela região entre os genes G e L, que contém 423 nucleotídeos. Esta região intergênica G-L representa um gene em potencial, mas não possui uma ORF (*open reading frame*) para uma proteína detectável no vírus rábico e, por isso, é considerada um pseudogene viral (ψ) (WUNNER, 2002) (Figura 5).

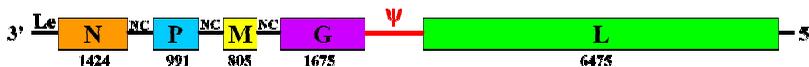


Figura 5: Representação esquemática do genoma do vírus rábico, com seus cinco genes (N, P, M, G e L). Le: sequência líder; NC e ψ : regiões não codificantes. Fonte: Adaptado de CDC (2003).

O ciclo de infecção e replicação do vírus rábico *in vivo* pode ser dividido em três fases. A primeira fase inclui a ligação do vírus a receptores de células hospedeiras susceptíveis, a entrada na célula hospedeira por endocitose seguida por fusão da membrana viral com a endossomal e a liberação do genoma viral no citoplasma celular (conhecido como desnudamento). A segunda fase compreende a produção de componentes virais, por meio da transcrição e replicação do genoma viral e a síntese protéica. A terceira inclui a montagem dos componentes virais, o seu transporte para o local de brotamento e a liberação das partículas virais maduras, que poderão começar um novo ciclo de infecção (WUNNER, 2002; SCHNELL *et al.*, 2010). As principais etapas deste ciclo estão indicadas na Figura 6.

O ciclo de infecção é sujeito a mecanismos de regulação para que os componentes virais sejam produzidos nas quantidades ótimas necessárias para uma eficiente produção viral, mas em quantidade insuficiente para serem reconhecidos pelo sistema imune ou para interferir com as funções vitais da célula hospedeira. Com isto não há indução de citotoxicidade, pois esta provavelmente impediria o

transporte neuronal, e também não há produção de altos níveis de proteína viral, especialmente de glicoproteína, os quais provavelmente induziriam uma maior produção de anticorpos antirrábicos, o que poderia neutralizar o vírus antes deste completar o seu ciclo de vida (SCHNELL *et al.*, 2010).

As proteínas virais são sintetizadas a partir de seus respectivos RNAm nos ribossomos livres no citoplasma celular (proteínas N, P, L e M) ou nos ribossomos aderidos ao retículo endoplasmático rugoso (proteína G) (WUNNER, 2002). Durante a infecção são formados corpos de inclusão citoplasmáticos (chamados de corpúsculos de Negri *in vivo*), os quais são formados por agregados de proteínas N e P juntamente com alguns componentes celulares e consistem em locais de replicação e transcrição viral. Uma vez que os corpúsculos de Negri são típicos de uma infecção por vírus rábico, eles são importantes marcadores no diagnóstico da raiva (LAHAYE *et al.*, 2009).

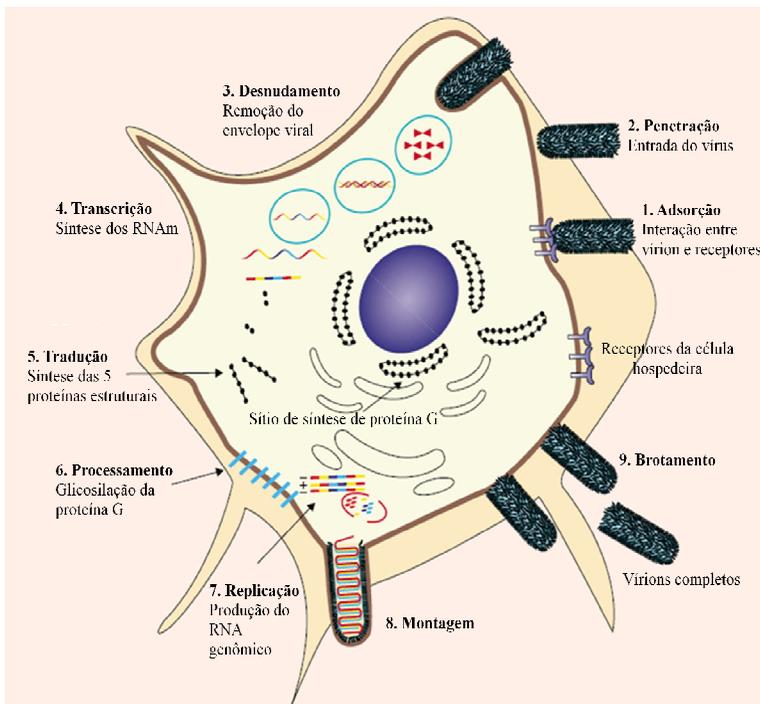


Figura 6: Representação esquemática com as principais etapas do ciclo de infecção e replicação do vírus rábico na célula hospedeira. Fonte: Adaptado de RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA (2002).

1.3 PATOGÊNESE

O vírus rábico normalmente é transmitido pela saliva de um animal infectado, por meio de mordeduras. Outras vias de transmissão, como contato de mucosas com saliva ou secreções contaminadas, inalação de aerossóis, transplante de órgãos ou por via oral, são raras (JACKSON, 2002b; HANKINS; ROSEKRANS, 2004; JACKSON, 2008). A probabilidade de desenvolver a doença após exposição ao vírus depende de uma série de fatores, como a quantidade de vírus inoculado, as propriedades da variante viral e a profundidade e localização da lesão, sendo maior em lesões mais profundas e próximas a regiões enervadas, como cabeça, mãos e pés (JACKSON, 2002a).

Após a mordida de um animal raivoso, saliva contendo vírus rábico infeccioso é depositada em músculos e tecidos subcutâneos (JACKSON, 2008). O vírus permanece próximo do local de exposição durante a maior parte do período de incubação, o qual dura em média 20-90 dias (WARREL; WARREL, 2004), mas que pode durar até seis anos (WHO, 2005). Durante o período de incubação, o vírus pode se replicar localmente nas células musculares ou se ligar diretamente às terminações nervosas. Uma vez estando nos nervos periféricos, o vírus se propaga pelos axônios em um transporte axonal retrógrado, até chegar ao sistema nervoso central (SNC), onde há massiva replicação viral nas células neuronais (WARREL; WARREL, 2004). A velocidade estimada de migração do vírus para o SNC é de aproximadamente 15-100 mm por dia (WHO, 2005).

O vírus infecta neurônios em praticamente todas as regiões cerebrais (FU, 1997), causando disfunção neuronal, mas com alterações neurodegenerativas bastante moderadas (JACKSON, 2008). No início da doença, é verificada pouca ou nenhuma alteração histopatológica no cérebro humano, frequentemente com pouca inflamação e apoptose (WARREL; WARREL, 2004; WARREL, 2008). Isso reforça o conceito de que a disfunção, e não a morte neuronal, é a responsável pela clínica severa da raiva, com desfecho fatal (JACKSON, 2008).

Após replicação no cérebro, o vírus se propaga do SNC através dos neurônios somáticos e autônomos para múltiplos órgãos e tecidos, incluindo nervos nas proximidades dos folículos pilosos, córnea, rins, pâncreas, músculos esqueléticos e cardíacos, entre outros. As glândulas salivares passam a ser um local com predominante replicação viral, havendo, assim, secreção de vírus infeccioso na saliva (WARREL; WARREL, 2004).

1.4 DIAGNÓSTICO

O laboratório de diagnóstico desempenha papel importante no controle da raiva animal e, conseqüentemente, no controle da sua transmissão para humanos. Quando uma pessoa sofre alguma agressão ou acidente em que há risco de infecção pelo vírus rábico, o tratamento deve ser instituído o mais rapidamente possível. A continuidade do tratamento, no entanto, vai depender da observação do animal agressor, quando possível, e do resultado obtido nos testes diagnósticos (HANKINS; ROSEKRANS, 2004; WHO, 2005).

Uma vez que a doença pode ser prevenida pela vacinação pós-exposição, a detecção precoce da raiva em amostras de animais associados com agressões a humanos é fundamental (WOLDEHIWET, 2005). Assim, quando se trata de agressões por animais silvestres, recomenda-se que o animal seja sacrificado e submetido a diagnóstico, desde que autorizado pelas entidades competentes (por exemplo, o Ibama) (HANKINS; ROSEKRANS, 2004). Esse diagnóstico precoce da raiva em animais ajuda a reduzir a propagação da doença, enquanto o diagnóstico em seres humanos pode reduzir o desconforto associado com extensivos testes de diagnóstico neurológico e de tratamentos inapropriados. Além disso, uma demora no diagnóstico da raiva em humanos poderá aumentar o número de pessoas que entrarão em contato com o paciente e, conseqüentemente, necessitarão de tratamento pós-exposição. Relatos de transmissão de pessoa para pessoa são raros, no entanto, o potencial risco da infecção não deve ser subestimado, uma vez que secreções frequentemente contêm vírus viável (WOLDEHIWET, 2005).

O diagnóstico da raiva em humanos, portanto, requer resultados urgentes. Por isso, apesar de amostras de tecido de sistema nervoso central serem a fonte mais confiável para diagnóstico em função da intensa replicação viral que ocorre nestes tecidos, outros espécimes também devem ser considerados (TRIMARCHI; SMITH, 2002; WOLDEHIWET, 2005). Amostras importantes para detecção de vírus rábico incluem biópsias de pele, impressões de córnea, saliva e líquido cefalorraquidiano (líquor), e apresentam a vantagem da realização de um diagnóstico *intra vitam* (WOLDEHIWET, 2005). Nesses casos, no entanto, devido à patogenia peculiar do vírus, um resultado negativo não descarta a possibilidade de ser infecção pelo vírus rábico (WHO, 2005).

O diagnóstico de raiva baseado apenas nos sinais clínicos é muito difícil, uma vez que não há nenhum sinal ou sintoma característico. Alguns sinais clínicos clássicos de envolvimento cerebral, como hidrofobia e aerofobia, podem facilitar o diagnóstico, no entanto, um diagnóstico definitivo para raiva apenas pode ser obtido por testes laboratoriais (WHO, 2005).

A encefalite causada pelo vírus é caracterizada por uma extensa invasão neuronal, porém com dano celular limitado. Apesar disso, análises histopatológicas de tecido de SNC podem ser utilizadas para verificar a presença de corpúsculos de Negri. A detecção destes corpúsculos é de caráter patognomônico para raiva e representa um diagnóstico definitivo. No entanto, em cortes histológicos, estes corpúsculos são detectados em apenas 50-80% dos animais infectados, sendo necessários outros métodos para um resultado mais fidedigno (WOLDEHIWET, 2005).

Hoje, o teste mais amplamente utilizado para diagnóstico de raiva é o de imunofluorescência direta (IFD), que consiste na avaliação microscópica, sob luz ultravioleta, de impressões ou secções de tecido de SNC tratado com anticorpo antirrábico conjugado com um fluorocromo. Esse teste é considerado o padrão ouro pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE – *Office International des Epizooties*). Sua acurácia, no entanto, depende da habilidade do examinador e da qualidade do conjugado antirrábico e do microscópio de fluorescência (WHO, 2005). Por isso, é necessário um rígido controle do conjugado antirrábico, principalmente para reduzir a fluorescência inespecífica, evitando resultados falso-positivos. Estes anticorpos conjugados normalmente são produzidos a partir de soro de animais imunizados, o que significa que podem conter anticorpos não-rábitos (DEAN; ABELSETH; ATANASIU, 1996). O uso de anticorpos monoclonais pode aumentar a especificidade do conjugado e também pode auxiliar na diferenciação de outros *Lyssavirus*, além de possuir menor variação de lote para lote (TRIMARCHI; SMITH, 2002; WOLDEHIWET, 2005).

Recomenda-se que a IFD seja seguida do teste de inoculação intracerebral em camundongos, como teste confirmatório (MESLIN; KAPLAN, 1996).

O teste de inoculação intracerebral em camundongos pode ser substituído pelo isolamento viral em cultura celular (WHO, 2005). A linhagem celular que se mostrou mais susceptível para o isolamento do vírus foi a linhagem de neuroblastoma murino NA C1300, apresentando

resultados com sensibilidade semelhante à do isolamento em camundongos para cepas fixas e selvagens do vírus. Essa substituição do teste de isolamento viral *in vivo* em camundongos pelo isolamento em cultura celular vem ocorrendo em alguns laboratórios em função do menor custo e da redução substancial do tempo requerido para obtenção dos resultados, além de não requerer o uso de animais e possuir sensibilidade semelhante (WEBSTER; CASEY, 1996; WOLDEHIWET, 2005).

Outros métodos utilizados para detecção de proteínas virais incluem testes imunohistoquímicos e ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA. Testes imunohistoquímicos têm a vantagem de serem realizados com tecidos fixados (em formalina, por exemplo), o que reduz o risco de degeneração da amostra, bem como o risco associado com o transporte e a manipulação de amostras contendo vírus infectante (TRIMARCHI; SMITH, 2002). Estes testes, porém, necessitam de um tempo relativamente longo para sua realização e não são amplamente utilizados (WOLDEHIWET, 2005).

Testes do tipo ELISA podem ser realizados com amostras parcialmente decompostas, que são inapropriadas para a IFD (MESLIN; KAPLAN, 1996). Além disso, a leitura pode ser automatizada, não necessitando de microscópio de fluorescência. Porém, esses testes necessitam de equipamentos caros e reagentes frequentemente tóxicos ou carcinogênicos (WOLDEHIWET, 2005).

Com o advento da biologia molecular, técnicas como a RT-PCR puderam ser utilizadas para verificar a presença do RNA viral em amostras suspeitas. Apesar de não ser recomendada para diagnóstico *postmortem*, a RT-PCR tornou possível um diagnóstico definitivo a partir de amostras em decomposição. Além disso, é um teste bastante útil no diagnóstico *antemortem*, uma vez que também pode ser realizado a partir de amostras como saliva, líquido, lágrima, biópsia de pele, folículo piloso e urina (WHO, 2005; WOLDEHIWET, 2005).

1.5 PROFILAXIA E TRATAMENTO

A vacinação é a principal medida profilática contra raiva e pode ser dividida em dois tipos: vacinação pré e pós-exposição. A vacinação pré-exposição é recomendada para grupos com elevado risco de exposição ao vírus, como veterinários, outros profissionais que

trabalham com animais potencialmente infectados, profissionais de laboratório que trabalham com vírus rábico e para viajantes aos locais com epizootia de raiva (HANKINS; ROSEKRANS, 2004). Esta é a forma mais bem sucedida de prevenção contra raiva. Nenhuma morte decorrente da doença foi registrada em indivíduos que receberam este tratamento seguido de um reforço após a exposição (WARREL; WARREL, 2004). No entanto, devem ser realizadas avaliações sorológicas periódicas para assegurar títulos de anticorpos neutralizantes iguais ou superiores a 0,5 UI/ml (WHO, 2005).

O tratamento pós-exposição é recomendado após um agravo (agressão ou acidente) por mamíferos, quando há risco de infecção pelo vírus rábico (KOTAIT; CARRIERI; TAKAOKA, 2009). Deve ser iniciado o mais rapidamente possível, pois visa neutralizar ou inativar o vírus enquanto ele ainda está nas lesões, ou seja, antes que atinja o sistema nervoso, onde estará protegido do sistema imune (WARREL; WARREL, 2004).

No tratamento pós-exposição, além da vacinação, a OMS também recomenda medidas como a observação do animal agressor (somente no caso de cães e gatos) quando possível e a administração de imunoglobulina antirrábica de origem humana (HRIG) ou equina (ERIG) nos casos em que há grande risco de o vírus atingir o SNC de maneira mais rápida (WHO, 2005; KOTAIT; CARRIERI; TAKAOKA, 2009). Medidas como assepsia dos ferimentos com água, sabão e agentes virucidas (iodo e álcool 70%), imediatamente após a exposição, podem minimizar a infecção em até 50% dos casos (WARREL; WARREL, 2004; WHO, 2005).

1.6 ANTICORPOS MONOCLONAIS

1.6.1 Produção de Anticorpos Monoclonais por Meio da Geração de Hibridomas

A produção e caracterização de anticorpos foram radicalmente alteradas em 1975, quando Köhler e Milstein descreveram uma técnica para produção contínua de anticorpos com especificidade predefinida. Estes autores descreveram a geração de células secretoras de anticorpos contra hemácias de carneiro imortalizadas, por meio da fusão de

mielomas murinos com esplenócitos de camundongos imunizados (KÖHLER; MILSTEIN, 1975).

Os linfócitos B são células produtoras de anticorpos, altamente especializadas, mas que não são capazes de sobreviver por longos períodos em cultura celular (ABBAS; LICHTMAN, 2003). As células de mieloma utilizadas na fusão, por sua vez, são plasmocitomas que perderam a capacidade de produzir anticorpos, mas que possuem a característica de serem imortalizadas, com alta capacidade mitótica (WADE, 1982; ABBAS; LICHTMAN, 2003). Assim, da fusão dessas duas linhagens celulares, obtém-se células com alta capacidade de secretar anticorpos e passíveis de serem cultivadas *in vitro* indefinidamente (WADE, 1982).

De forma resumida, o processo atualmente utilizado para a produção de anticorpos monoclonais (AcM) por meio da geração de hibridomas consiste primeiramente na hiperimunização de camundongos com o antígeno de interesse, na fusão dos esplenócitos destes camundongos com células de mieloma, utilizando o agente fusionante polietilenoglicol, na seleção das células híbridas em meio HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina), seguindo com a triagem dos hibridomas secretores dos anticorpos de interesse e a seleção de uma célula única (monoclonal) por diluição limitante (YOKOYAMA *et al.*, 2006) (Figura 7). Em uma fase posterior, são caracterizadas as propriedades dos AcM, como isotipo e especificidade (LAFON, 1996). Por fim, os hibridomas podem ser produzidos como tumores ascíticos em camundongos ou *in vitro* em grandes volumes, utilizando biorreatores, por exemplo, para produção dos AcM em larga escala (FALKENBERG, 1998; ABBAS; LICHTMAN, 2003; JAIN; KUMAR, 2008).

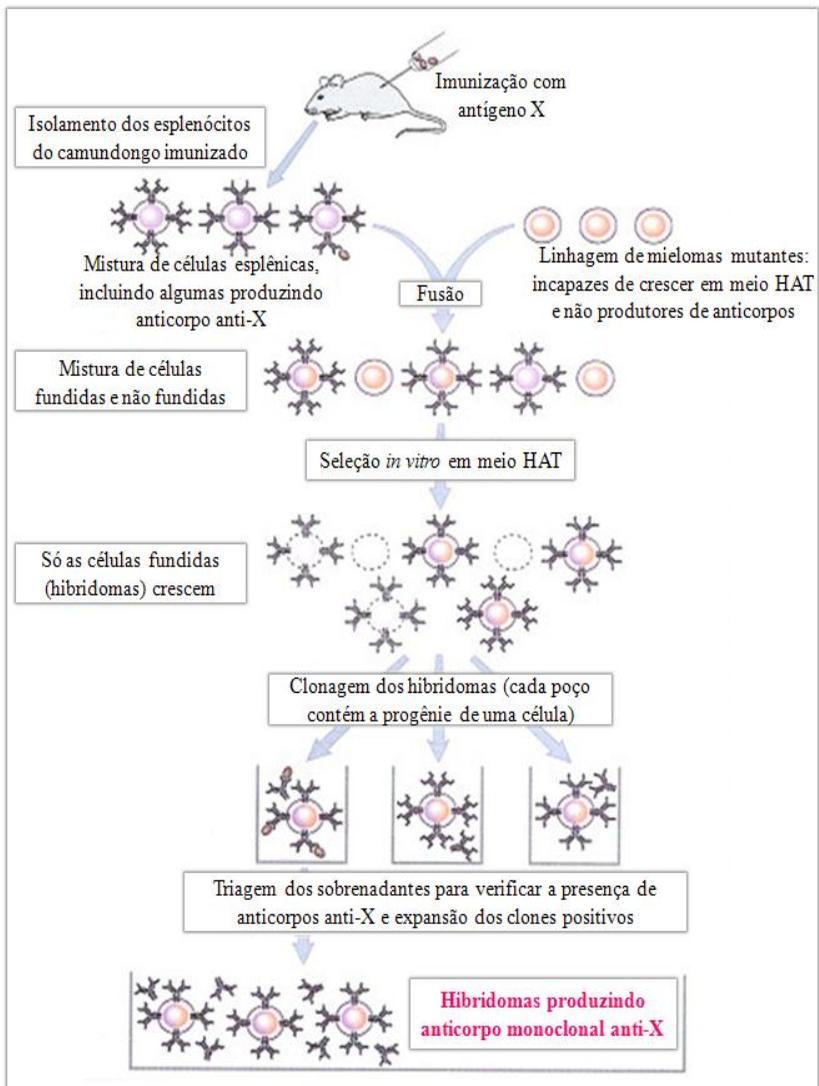


Figura 7: Principais etapas para a produção de anticorpos monoclonais por meio da geração de hibridomas. Fonte: Adaptado de ABBAS; LICHTMAN (2003)

O sucesso dessa técnica depende principalmente da seleção das células híbridas em meio HAT. Células animais normais sintetizam nucleotídeos purínicos e timidilado pela chamada via *de novo* a partir de

fosforibosil pirofosfato e uridilato. Uma das etapas dessa via envolve a transferência de um grupo metil ou formil do tetrahidrofolato ativado. Drogas antifolato, como a aminopterina, bloqueiam a reativação do tetrahidrofolato, inibindo a síntese de purinas e timidilato e, conseqüentemente, a síntese de DNA (ABBAS; LICHTMAN, 2003). As células normais podem usar vias de salvamento, nas quais hipoxantina e timidina exógenas são utilizadas para a síntese de purinas e timidilato, em reações envolvendo as enzimas hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HGPRT) e timidina quinase (TK), respectivamente (Figura 8). As células de mieloma, no entanto, não podem utilizar as vias de salvamento porque são defectivas em HGPRT e/ou em TK. Assim, células de mieloma que não fundiram ou fundiram entre si, morrem quando cultivadas em meio HAT. Já as células de mieloma que fundiram com esplenócitos conseguirão sobreviver neste meio, pois possuem as enzimas HGPRT e TK, provenientes dos esplenócitos. Esplenócitos que não fundiram ou fundiram entre si morrem naturalmente após cerca de duas semanas de cultivo (DAVIE, 1982; ABBAS; LICHTMAN, 2003).

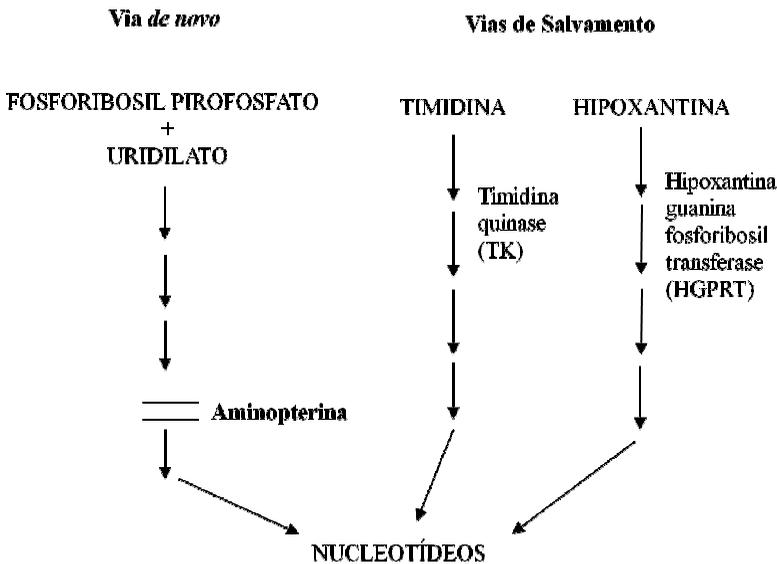


Figura 8: Vias para a síntese de nucleotídeos, indicando o bloqueio da via *de novo* pela aminopterina. Fonte: Adaptado de ABBAS; LICHTMAN (2003).

Esta técnica para produção de AcM por meio da geração de hibridomas revolucionou diversos campos da pesquisa básica e se tornou um componente essencial em laboratórios clínicos, a medida que possibilitou a obtenção de reagentes com alta especificidade e com maior reprodutibilidade que os soros policlonais (DAVIE, 1982; CHIARELLA; FAZIO, 2008). Os AcM tornaram-se uma importante ferramenta para diagnóstico de doenças infecciosas (NOWINSKI *et al.*, 1983), para diagnóstico e prognóstico de câncer (KENNETT, 1981; YELTON; SCHARFF, 1981), imunoterapia (REICHERT *et al.*, 2005; HALE, 2006), entre outras aplicações.

Com os avanços da biologia molecular, envolvendo a manipulação de sequências gênicas *in vitro* e a expressão destas sequências gênicas em bactérias, fungos e células de mamífero, os AcM murinos puderam ser modificados, substituindo-se parcial ou totalmente sequências do anticorpo do camundongo por sequências funcionalmente equivalentes de aminoácidos humanas (LONBERG, 2008). Esses AcM (quiméricos, humanizados ou humanos), desenvolvidos principalmente por meio de *phage display* ou camundongos transgênicos, apresentaram apreciável impacto na terapêutica clínica, uma vez que possuem reduzida imunogenicidade, sem alterar as propriedades de reconhecimento do anticorpo original. (REICHERT *et al.*, 2005; LONBERG, 2008).

1.6.2 Anticorpos Monoclonais Antirrábicos e Suas Aplicações

Os primeiros anticorpos monoclonais contra o vírus rábico foram produzidos por Wiktor e Koprowski (1978) e foram inicialmente empregados para a identificação de variantes antigênicas entre diversas cepas virais. Posteriormente, vários laboratórios criaram seus próprios painéis de AcM e os utilizaram para caracterizar diferentes cepas de vírus rábico e para distingui-lo de vírus relacionados a raiva (FLAMAND; WIKTOR; KOPROWSKI, 1980a;b; BUSSEREAU *et al.*, 1988). Esses painéis de AcM ajudaram na diferenciação dos *Lyssavirus* EBLV-1 e EBLV-2 (BOURHY *et al.*, 1992) e na caracterização do ABLV (GOULD *et al.*, 1998), contribuindo, dessa forma, para a identificação de novas espécies de *Lyssavirus*.

A utilização desses painéis de AcM também permitiu a identificação de variantes comuns do vírus rábico e possibilitou avanços nos estudos epidemiológicos, sendo útil na análise da distribuição geográfica do vírus, bem como na análise das espécies animais que servem como hospedeiras (SMITH *et al.*, 1986; DE MATTOS *et al.*, 1996; CRAWFORD-MIKSZA; WADFORD; SCHNURR, 1999; DE MATTOS *et al.*, 1999; METLIN *et al.*, 2004). Diaz *et al.* (1994), por exemplo, estudaram amostras de vírus rábico isoladas de 17 países da América Latina e Caribe e verificaram que algumas variantes virais estão associadas com doença em cães e morcegos hematófagos e são amplamente distribuídas, ultrapassando as fronteiras internacionais e barreiras geográficas. De forma semelhante, análises antigênicas e filogenéticas de vírus rábico isolado de animais domésticos e de canídeos silvestres no nordeste do Brasil demonstraram que esses isolados virais são região e espécie-específicos (CARNIELI *et al.*, 2006).

A maior parte desses estudos epidemiológicos é realizado com AcM contra a RNP, a proteína N e/ou a G. Variações na proteína P (NADIN-DAVIS *et al.*, 2000) também foram detectadas entre diferentes variantes virais, no entanto, AcM anti-P ainda não são muito utilizados.

Os AcM também demonstraram ser importantes ferramentas em imunodiagnóstico e imunoenaios. Wiktor, Flamand e Koprowski (1980) utilizaram AcM para detecção de vírus rábico em decalques de cérebro de animais infectados, propondo, com isso, a sua utilização no diagnóstico da raiva. O uso de AcM em substituição ao uso de soro policlonal de animais imunizados pode contribuir para aumentar a especificidade dos testes diagnósticos, uma vez que elimina a presença de anticorpos inespecíficos para o vírus rábico (TRIMARCHI; SMITH, 2002; WOLDEHIWET, 2005).

Adaptações nos testes diagnósticos permitiram sua utilização para detecção e titulação de anticorpos neutralizantes em soros de animais ou seres humanos (ELMGREN; WANDELER, 1996; SHIOTA *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009).

A obtenção de AcM antirrábicos, em especial contra a glicoproteína, possibilitou ainda o desenvolvimento de métodos, como o ELISA, por exemplo, para quantificação de antígenos virais no processo de produção de vacinas, permitindo a determinação da potência e o controle de qualidade das vacinas (LAFON *et al.*, 1985; PERRIN; MORGEAUX; SUREAU, 1990; GAMOH *et al.*, 1996; ROOIJAKKERS *et al.*, 1996; FOURNIER-CARUANA *et al.*, 2003;

NAGARAJAN *et al.*, 2006). Atualmente, essa determinação é realizada pelo teste do NIH, que apresenta vários problemas de reprodutibilidade, além da intensa utilização de animais (BARTH; DIDERRICH; WEINMANN, 1988).

Além disso, o mapeamento de epítomos de ligações de AcM contribuiu para a identificação de sítios antigênicos da glicoproteína (BENMANSOUR *et al.*, 1991), da nucleoproteína (LAFON; WIKTOR, 1985; GOTO *et al.*, 2000), da fosfoproteína (LAFON; WIKTOR, 1985; RAUX *et al.*, 1997) e da proteína de matriz (HIRAMATSU *et al.*, 1992).

Ademais, a atividade protetora de AcM está sendo investigada para possível introdução no tratamento pós-exposição. Frequentemente, imunoglobulinas antirrábicas de origem humana (HRIG) ou equina (ERIG) são utilizadas na imunização passiva, após exposição ao vírus. Elas são preparadas, respectivamente, a partir de soros humanos ou de cavalos hiperimunizados, o que apresenta alguns problemas como o alto custo de produção, a disponibilidade em quantidades limitadas e o potencial risco de contaminação com patógenos conhecidos ou não, além dos efeitos adversos, como choque anafilático, decorrentes do uso de ERIG (MÜLLER *et al.*, 2009). Por isso, diversos autores estão investigando a utilização de um coquetel de AcM anti-glicoproteína associados ou não a AcM anti-RNP para substituir o uso da HRIG e da ERIG. Müller *et al.* (2009), por exemplo, selecionaram cinco AcM de origem murina neutralizantes para o vírus rábico e verificaram que a mistura destes AcM é capaz de gerar proteção em hamsters após exposição ao vírus rábico e a outros *Lyssavirus*, semelhante à proteção induzida pela HRIG. Esses AcM de origem murina, no entanto, quando administrados em humanos poderão ocasionar as mesmas reações adversas geradas pela ERIG, por isso, anticorpos humanos ou humanizados são preferíveis. Outros coquetéis com AcM murinos (SCHUMACHER *et al.*, 1989) ou humanos (ENSSLE *et al.*, 1991; PROSNIAK *et al.*, 2003) também demonstraram proteção pós-exposição em camundongos e hamsters. Além disso, um coquetel contendo AcM humanos foi caracterizado *in vitro* e *in vivo* e testado clinicamente em dois estudos de fase I, nos quais foram avaliadas a segurança e a tolerabilidade ao coquetel em adultos saudáveis, além da indução de anticorpos neutralizantes por vacinas após a administração deste coquetel, apresentando resultados promissores (BAKKER *et al.*, 2005; BAKKER *et al.*, 2008).

Embora exista um grande número de AcM antirrâbicos descritos na literatura, eles nem sempre são facilmente obtidos, principalmente porque a produção de AcM no Brasil é bastante limitada. Além disso, Favoretto *et al.* (2002) verificaram que, no Brasil, existem variantes antigênicas que não são compatíveis com o painel de AcM utilizado para estudos de amostras isoladas nas Américas. Devido a essa grande diversidade de variantes virais existentes no país, torna-se importante produzir novos AcM que possam atender a interesses mais específicos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir e caracterizar anticorpos monoclonais contra o vírus rábico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressar em *Escherichia coli* e purificar por cromatografia de afinidade um fragmento recombinante da proteína G do vírus rábico correspondente aos aminoácidos 179 a 281 (denominado rGERA179-281);
- Gerar e selecionar hibridomas produtores de anticorpos que reajam contra o vírus rábico;
- Clonar estes hibridomas por diluição limitante;
- Caracterizar os isotipos e subtipos dos AcM produzidos;
- Determinar se os AcM são neutralizantes para o vírus rábico;
- Verificar a reatividade dos AcM com a rGERA179-281, com diferentes isolados de vírus rábico selvagem e com vírus vacinal.

3 ANIMAL E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Devido à utilização de camundongos nos experimentos, este projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sendo aprovado em 8 de agosto de 2007 (Protocolo PP00124).

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* machos, da linhagem isogênica Balb/c, com 30 a 45 dias de idade e peso maior que 25 g. Esses animais foram criados e mantidos no biotério setorial do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSC, com água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos que provocavam dor foram realizados sob efeito de anestésicos e os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

3.3 LINHAGENS CELULARES

Células de mieloma murino da linhagem P3X63Ag8.653 (ATCC[®] CRL-1580) e hibridomas foram mantidos em meio RPMI-1640 (Cultilab) suplementado com 20% (v/v) de soro bovino fetal (SBF – Cultilab), 23,8 mM de bicarbonato de sódio, 0,2 mM de L-glutamina, 1,0 mM de piruvato de sódio, 9,6 mM de HEPES e antibióticos (100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomomicina e 0,25 µg/ml de anfotericina B – Sigma-Aldrich), a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. As células P3X63Ag8.653 foram utilizadas para a geração dos hibridomas, por meio da fusão com linfócitos B de camundongo. Esta linhagem foi selecionada por se tratar de um tumor de linfócito B não secretor de imunoglobulinas e deficiente na enzima HGPRT (YOO *et al.*, 2002).

Para as reações de imunofluorescência indireta, ensaios de neutralização viral e produção de vírus rábico *in vitro* foram utilizadas células N2A (células de neuroblastoma murino – ATCC[®] CCL-131) e células BHK-21 (*baby hamster kidney* – ATCC[®] CCL-10), devido à susceptibilidade destas células à infecção pelo vírus rábico (KING, 1996; WEBSTER; CASEY, 1996). As células foram cultivadas em meio DMEM F12 (meio Dulbecco modificado por Eagle/ Nutriente HAM F12 – Cultilab) contendo 14,0 mM de bicarbonato de sódio, 20% (v/v) de SBF para a N2A, 10% (v/v) de SBF para a BHK-21 e antibióticos, sendo mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

3.4 VÍRUS RÁBICO

No desenvolver do trabalho foi utilizado vírus rábico fixo das cepas PM (*Pitman-Moore*), PV (*Pasteur virus*) e CVS (*Challenge Virus Standard*). A cepa PM foi utilizada apenas na forma inativada presente em vacinas antirrábicas humanas, para imunização de camundongos e para caracterização dos anticorpos monoclonais produzidos. A cepa PV foi utilizada para imunização de camundongos, bem como para seleção de hibridomas produtores de anticorpos antirrábicos e ensaios de neutralização. A cepa CVS foi utilizada para caracterização dos AcM. Também foram utilizados isolados de vírus rábico selvagem para imunização de camundongos e para caracterização dos AcM. Para imunização, foi utilizado vírus isolado de um bovino naturalmente infectado por morcego hematófago em Passos de Torres, Santa Catarina, identificada pelo número 7432, a qual foi gentilmente cedida pela CIDASC (Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina). Para caracterização dos AcM foram utilizados vírus isolados de diferentes animais (bovino, equino, morcego, cão e canídeo silvestre) e um isolado de humano, as quais foram identificadas e caracterizadas no Instituto Pasteur de São Paulo e serão descritas com mais detalhes no item 3.11.5.

Para produção de vírus rábico fixo *in vitro*, foram utilizadas células BHK-21. Estas células foram mantidas em cultura, em garrafa de cultura celular de 25 cm², até formarem uma monocamada celular confluenta. As células foram então dissociadas por ação de tripsina e, à suspensão celular, foram adicionados 5 ml de meio DMEM F12 contendo 2% de SBF e o vírus rábico. A mistura foi mantida por 15 min

a 37°C, com homogeneização a cada 5 min, para permitir a infecção celular. Por fim, foram adicionados aproximadamente 15 ml de meio DMEM F12 contendo 10% de SBF e 1% de PSA e o conteúdo foi dividido em duas garrafas de cultura celular de 25 cm². As células foram mantidas em estufa a 37°C, 5% de CO₂, com o pH do meio sendo ajustado diariamente para manter um pH próximo ao neutro, evitando-se assim a inativação viral devido a pH extremos. Quando as células não formavam mais uma monocamada celular confluyente, o meio de cultura foi centrifugado por 10 min a 700 g para remoção dos restos celulares e o sobrenadante, contendo as partículas virais, foi armazenado a -80°C.

3.5 OBTENÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE rGERA179-281

3.5.1 Clonagem e Expressão da Proteína rGERA179-281

A clonagem e a subsequente expressão e purificação de um fragmento recombinante da proteína G do vírus rábico cepa ERA correspondente aos resíduos de aminoácidos 179 a 281, denominado rGERA179-281, foram descritas por Bassi *et al.* (2008). No presente trabalho, esta proteína foi clonada e expressa em *Escherichia coli* cepa BL-21 Códon Plus (Stratagene) e purificada por cromatografia de afinidade e foi utilizada para imunização de camundongos e para caracterização dos anticorpos monoclonais.

Inicialmente, bactérias *E. coli* BL-21 Códon Plus foram transformadas com o vetor plasmídico pET14-b contendo a sequência codificante para os aminoácidos 179 a 281 da glicoproteína do vírus rábico cepa ERA (BASSI *et al.*, 2008). Para tanto, 2 µl do plasmídeo recombinante foram adicionados a uma alíquota de 150 µl contendo bactérias competentes em glicerol 20% (v/v) e CaCl₂ 0,1M. As bactérias foram então mantidas por 30 min em banho de gelo, seguidos por 2 min em banho-maria a 42°C e 2 min em banho de gelo.

Após este procedimento de transformação, foram adicionados 600 µl de meio Luria-Bertani líquido (LB líquido, Sigma-Aldrich) e foi realizada uma incubação por 1 h a 37°C para crescimento bacteriano. As bactérias transformadas foram selecionadas por meio de um cultivo em meio sólido (LB ágar – Sigma-Aldrich) contendo 100 µg/ml de

ampicilina (Sigma-Aldrich) e 30 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol (Sigma-Aldrich) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Com o objetivo de expressar a proteína rGERA179-281, foram feitos quatro pré-cultivos de 10 ml de meio LB líquido contendo ampicilina e cloranfenicol, a partir de colônias isoladas da placa de meio LB ágar. Os pré-cultivos foram realizados a 37°C por 15 h, em uma incubadora com plataforma de agitação orbital (SHAKER modelo 430, Nova Ética) a 140 rpm. Foram então transferidos aproximadamente 5 ml de cada pré-cultivo para quatro garrafas contendo 250 ml do mesmo meio (totalizando um litro de cultivo), as quais foram mantidas a 37°C, 140 rpm, até que o crescimento bacteriano atingisse densidade óptica (D.O.) de 0,6-0,8 no comprimento de onda de 600 nm. Os cultivos foram mantidos em banho de gelo por 10 min, seguindo pela adição de etanol P.A. a uma concentração final de 2% (v/v). Para expressão protéica, foi adicionado IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo – Sigma-Aldrich) na concentração final de 0,5 mM às culturas em fase logarítmica de crescimento ($D.O._{600\text{nm}} = 0,6-0,8$). Os cultivos foram então incubados a 140 rpm, por 15 h a 25°C. Ao final, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 6000 g por 25 min a 4°C e o precipitado celular foi submetido ao processo de purificação.

3.5.2 Purificação da Proteína rGERA179-281

A proteína foi purificada a partir da fração insolúvel por cromatografia de afinidade utilizando resina com íons metálicos imobilizados, seguindo o protocolo descrito por Bassi *et al.* (2008). Dessa forma, ao precipitado (fração insolúvel) obtido após a expressão protéica, foram adicionados 50 ml de tampão de lise desnaturante (10 mM de Tris, 100 mM de NaH_2PO_4 , 6M de cloreto de guanidina, 10 mM de imidazol; pH 8,0) contendo um coquetel de inibidores de protease (Complete, Mini, Boehringer-Mannheim). A seguir, a amostra foi incubada por 30 min em banho-maria a 65°C, homogeneizando-se periodicamente, para dissolução dos corpos de inclusão.

A amostra foi então sonicada (10 ciclos de 60 s) e, em seguida, centrifugada a 10000 g por 60 min a 4°C, para remover os restos celulares. O sobrenadante foi incubado por 45 min a 4°C com 4 ml de resina de sepharose (*Chelating Sepharose Fast Flow*, GE Healthcare) previamente carregada com sulfato de cobre 0,1 M e equilibrada com

tampão de lise desnaturante. A resina foi centrifugada a 500 g por 5 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado.

A seguir, foram realizadas as lavagens da resina da seguinte maneira:

- 3 vezes com 10 ml de tampão de lavagem desnaturante (8M de uréia, 100 mM de NaH_2PO_4 , 150 mM de NaCl, 20 mM de imidazol; pH 8,0);
- 3 vezes com 10 ml de tampão fosfato de sódio (50 mM de NaH_2PO_4 , 500 mM de NaCl, 20 mM imidazol; pH 8,0);
- 3 vezes com 10 ml de tampão fosfato de sódio contendo 40 mM de imidazol;
- 3 vezes com 2 ml de tampão fosfato de sódio contendo 100 mM de imidazol.

A eluição da proteína foi realizada por meio da adição de tampão fosfato de sódio contendo 250 mM de imidazol (8 vezes de 2 ml).

Após a adição de cada tampão, foi procedida uma incubação de 5 min sob homogeneização, seguindo por uma centrifugação a 500 g por 5 min a 4°C.

Os sobrenadantes das eluições foram submetidos à análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) sob condições desnaturantes (LAEMMLI, 1970), utilizando o sistema mini-*PROTEAN[®] Tetra Cell* (Bio-Rad). As amostras foram misturadas com tampão de amostra (*Laemmli sample buffer*), aquecidas por 5 min a 100°C, aplicadas em um gel de poliacrilamida a 16% e submetidas à eletroforese com corrente elétrica de 20 mA por gel, durante aproximadamente 3 h. As bandas protéicas foram reveladas incubando-se o gel com solução corante contendo *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Serva) a 0,1% (m/v), metanol a 50% (v/v) e ácido acético a 10% (v/v) em água ultrapura. Para descorar o gel, foi utilizada uma solução contendo 45% de metanol e 10% de ácido acético em água ultrapura.

A massa molecular aparente da proteína foi estimada utilizando-se padrões de massa molecular conhecidos (WEBER; OSBORN, 1969), na faixa de 10 a 220 kDa (*BenchMarkTM Protein Ladder*, Invitrogen).

As eluições resultantes da purificação foram misturadas e a concentração de proteínas presente na amostra foi determinada utilizando-se o método descrito por Bradford (1976). A concentração protéica da amostra foi estimada por comparação da leitura da sua absorbância em espectrofotômetro (Tecan, modelo Sunrise basic) a 595 nm com a leitura de uma curva padrão de soro albumina bovina (BSA – Sigma-Aldrich), por meio de análise por regressão linear da equação da reta.

3.5.3 Immunoblotting

Para verificar o reconhecimento da proteína por anticorpos antirrábicos, a proteína purificada foi aplicada diretamente sobre uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences). Esta membrana foi incubada com PBS (140 mM de NaCl, 7,4 mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2,6 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pH 7,2) contendo 0,1% (v/v) de Tween 20 e 5% (m/v) de leite desnatado (Molico[®], Nestlé) durante 1 h, para bloqueio dos sítios inespecíficos. Após três lavagens (5 min cada) com PBS contendo 0,1% de Tween 20 e 1% de leite desnatado, foi adicionada imunoglobulina antirrábica humana (HRIG) diluída 1:500 no mesmo tampão, com incubação por 1 h. Procedeu-se nova lavagem (3 vezes, 5 min cada lavagem) e, a seguir, foi adicionado o anticorpo secundário, anti-imunoglobulina polivalente humana conjugada com peroxidase (Sigma-Aldrich), diluído 1:1000 em PBS contendo Tween 20 a 0,1% e leite desnatado a 1%. Passada 1 h de incubação, foi realizada a última etapa de lavagem com PBS contendo 0,1% de Tween 20, sendo realizadas três lavagens de 5 min cada. Todas essas incubações foram realizadas a temperatura ambiente, sob agitação.

A reação foi revelada com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) em presença de 0,1% de H_2O_2 , sendo a revelação interrompida por lavagem da membrana com água destilada.

3.6 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS

Para a obtenção de linfócitos B secretores de anticorpos antirrábicos foram realizados cinco protocolos de imunização. No primeiro protocolo, quatro camundongos foram imunizados por via intraperitoneal (i.p.) com vacina antirrábica humana (VeroRab[®] – Aventis Pasteur), preparada a partir de vírus rábico cepa PM inativado pela β -propiolactona. Cada camundongo recebeu doses de 500 μl da vacina diluída 1:10 em PBS nos dias 0, 7, 14 e 28.

No segundo protocolo, três camundongos foram imunizados com o isolado de vírus rábico selvagem 7432. Para tanto, uma suspensão a 10% de tecido de sistema nervoso central de camundongos infectados com este isolado foi preparada em solução salina (145 mM de NaCl em água) e inativada por exposição à luz ultravioleta durante 30 min. Os

camundongos receberam um total de quatro doses de 500 µl deste antígeno por via subcutânea (s.c. – doses 1 e 2) e i.p. (doses 3 e 4) com intervalo de uma semana entre cada dose, seguidas de uma quinta dose por via i.p. após 33 dias. Na primeira dose foi utilizado adjuvante completo de Freund (ACF), na segunda dose, adjuvante incompleto de Freund (AIF) e nas demais, não foi utilizado adjuvante.

No terceiro protocolo, três camundongos receberam quatro doses da proteína recombinante rGERA179-281 (BASSI *et al.*, 2008). As doses contendo 40 µg da proteína foram administradas por via s.c. nos dias 0 (com ACF) e 7 (com AIF) e por via i.p. nos dias 14 e 28 (sem adjuvante). Seis dias após a última dose, os camundongos receberam um desafio com vírus rábico cepa PV na pata (“*foot pad*”).

No protocolo quatro, seis camundongos foram imunizados com 41,7 µg de rGERA179-281 nos dias 0, 6, 12, 18 e 54. As doses 1 (com ACF) e 3 (com AIF) foram administradas por via s.c.; as demais doses, por via i.p. sem adjuvante, em volume final de 500 µl. No 67º dia, três camundongos receberam um reforço com 33,4 µg de rGERA179-281 (volume de 200 µl) por via endovenosa e os outros três receberam um desafio com vírus rábico cepa PV na pata.

No quinto protocolo, cinco camundongos receberam três doses de 41,7 µg de rGERA179-281 seguidas por duas doses de vacina antirrábica humana (VeroRab[®]) diluída 1:10 em PBS, em volume de 500 µl/dose, com intervalo de uma semana entre cada dose. A primeira dose foi administrada por via s.c. (com ACF) e as demais, por via i.p., sem adjuvante. Oito dias após a última dose, os camundongos receberam uma sexta dose de 41,7 µg de rGERA179-281 por via i.p.

Para titulação dos anticorpos de interesse no soro dos camundongos, após as imunizações foram realizadas coletas de sangue por punção retro-orbital precedida de anestesia com 1,16 mg de cloridrato de cetamina (Dopalen, Vetbrands) e 0,05 mg de cloridrato de xilazina (Rompum, Bayer), em volume de 50 µl administrados por via i.p. Paralelamente, foram coletadas amostras de sangue de camundongos sadios não imunizados para utilização como controle negativo.

Para titulação dos anticorpos antirrábicos os soros foram analisados por IFI em células BHK-21 infectadas com vírus rábico cepa PV. Para verificar a presença de anticorpos neutralizantes, os soros foram testados por soroneutralização, por meio do microteste de inibição de fluorescência simplificado (FAVORETTO *et al.*, 1993), sendo os títulos estabelecidos por comparação com uma preparação comercial de imunoglobulina antirrábica humana (HRIG – BayRab[®],

Bayer), que possui título neutralizante de 150 UI/ml. Além disso, a presença de anticorpos anti-rGERA179-281 foi verificada por ELISA (protocolo adaptado de PIZA et al., 1999), com os soros sendo testados em diluições entre 1:500 e 1:121500. Os títulos obtidos por IFI e por ELISA foram estabelecidos como sendo a recíproca da maior diluição que apresentava resultado positivo.

3.7 OBTENÇÃO DE HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICORPOS ANTIRRÁBICOS

Todos os procedimentos para obtenção dos hibridomas, descritos nos subitens a seguir, foram realizados utilizando meio RPMI-1640 suplementado com 23,8 mM de bicarbonato de sódio, 0,2 mM de L-glutamina, 1,0 mM de piruvato de sódio e antibióticos. Não foram utilizados HEPES, nem SBF, porque o HEPES poderia ser tóxico para as células durante a fusão e as proteínas presentes no SBF poderiam precipitar o polietilenoglicol (YOKOYAMA *et al.*, 2006).

3.7.1 Obtenção dos Esplenócitos

Três dias após a dose reforço (ou oito dias após, no protocolo três), os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical, embebidos em álcool 70% e levados a uma cabine de segurança biológica, para obtenção dos esplenócitos de forma estéril (YOKOYAMA *et al.*, 2006). Assim, os baços dos camundongos foram removidos assepticamente e picotados e macerados entre lâminas (utilizando a parte fosca) para isolamento das células e remoção da cápsula desse órgão. A suspensão celular foi filtrada com filtro de *nylon* e transferida para um tubo cônico contendo 10 ml de meio RPMI-1640, no qual foi centrifugada por 10 min a 400 g. Ao precipitado celular foram adicionados 5 ml de solução de lise de hemácias (168,08 mM de cloreto de amônio, 9,98 mM de bicarbonato de potássio, 0,09 mM de EDTA, pH 7,4, 4°C) com incubação por 5 min, seguindo com a adição de 45 ml de meio RPMI-1640. As células foram centrifugadas por 10 min a 400 g e ao precipitado celular foram adicionados 45 ml de RPMI-1640. Esta etapa de centrifugação foi repetida duas vezes, sendo

adicionados 10 ml de RPMI-1640 após a última centrifugação. As células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer utilizando corante azul de Tripán 0,02% na proporção suspensão celular:corante de 1:1.

3.7.2 Células de Mieloma

As células de mieloma da linhagem P3X63Ag8.653 foram cultivadas em garrafas de cultura celular de 25 cm², nas condições descritas no item 3.3. No dia anterior à fusão, as células foram transferidas para garrafas de cultura celular de 75 cm², para atingirem a fase logarítmica do crescimento, pois as células em expansão logarítmica são as satisfatórias para a fusão (LAFON, 1996).

No dia da fusão, as células foram transferidas para um tubo cônico de 50 ml e centrifugadas por 10 min a 400 g. Sobre o precipitado celular, foram adicionados 45 ml de meio RPMI-1640. Este procedimento foi realizado três vezes, sendo que, na última vez, foram adicionados 10 ml de meio sobre o precipitado celular. As células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer, utilizando corante azul de Tripán 0,02%.

3.7.3 Fusão

Para obtenção dos hibridomas, foram utilizados os esplenócitos dos camundongos imunizados e as células de mieloma descritos acima. A fusão destas células foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Yokoyama *et al.* (2006), utilizando uma solução de polietilenoglicol 4000 (PEG – Sigma-Aldrich) como agente fusionante.

Para tanto, as células de mieloma e os esplenócitos foram misturados na proporção 1:5 respectivamente, em um tubo cônico de 50 ml, e centrifugados por 10 min a 400 g. Sobre o precipitado celular, foi adicionado 1 ml de PEG 50% (em meio RPMI-1640) previamente aquecido a 37°C, gota a gota, durante 2 min, homogeneizando-se constantemente com movimentos rotativos suaves. A seguir, foi adicionado 1 ml de meio RPMI-1640 durante 1 min, mais 1 ml de RPMI-1640 durante 1 min e, por fim, 7 ml durante 2 min, sempre

homogeneizando com movimentos rotativos. A suspensão celular foi centrifugada por 5 min a 400 g e ao precipitado celular foram adicionados 10 ml de meio RPMI-1640 com HEPES e SBF, para ser feita a contagem das células viáveis. As células foram então distribuídas em placas de cultura de 96 poços, numa concentração de $2,5 \times 10^5$ células/100 μ l/poço, e mantidas a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂.

3.7.4 Seleção dos Hibridomas

A seleção das células híbridas foi realizada por meio do cultivo em meio HAT (meio RPMI-1640 com os suplementos descritos no item 3.3 mais 0,1 mM de hipoxantina, 0,0004 mM de aminopterina e 0,016 mM de timidina – Sigma-Aldrich) durante 14 dias. Do 15° ao 19° dia após a fusão, as células foram cultivadas em meio HT (meio HAT sem aminopterina – Sigma-Aldrich) e, a partir do 20° dia, em meio RPMI-1640 com 20% de SBF, conforme descrito no item 3.3 (YOKOYAMA *et al.*, 2006).

As células que apresentaram crescimento durante ou após o cultivo com meio HAT foram submetidas ao teste de triagem para verificar se eram produtoras de anticorpos antirrábicos.

3.8 TRIAGEM DOS HIBRIDOMAS PRODUTORES DE ANTICORPOS ANTIRRÁBICOS

A triagem dos hibridomas produtores de anticorpos antirrábicos foi iniciada no momento em que os poços contendo células em crescimento apresentaram 10-25% de confluência quando observados em microscópio invertido ou quando as células tornavam o meio acidificado dois dias após a troca (YOKOYAMA *et al.*, 2006). Para esta triagem, foi utilizada a técnica de imunofluorescência indireta (IFI) em células BHK-21 infectadas com vírus rábico cepa PV.

Células BHK-21 foram previamente mantidas em cultura até formarem uma monocamada celular confluenta. O meio de cultura foi removido e as células lavadas duas vezes com PBS estéril (pH 7,2). As células foram então dissociadas por ação de tripsina e diluídas para a

concentração de 5×10^4 células/100 μl . Alíquotas de 100 μl dessa suspensão celular foram adicionadas a poços de placas de cultura celular de 96 cavidades juntamente com 50 μl de vírus rábico cepa PV em diluição previamente estabelecida. As placas foram incubadas por 18-24 h a 37°C em atmosfera com 5% de CO_2 . O sobrenadante dessa cultura foi descartado em hipoclorito 1% e as células aderidas foram fixadas com paraformaldeído 4% (em água – 80 μl /cavidade), durante 20 min a temperatura ambiente. O paraformaldeído foi descartado e as células, lavadas 3 vezes com PBS, 200 μl /poço, por 5 min cada lavagem. Foram então adicionados 100 μl /poço de PBS contendo 0,25% de Triton X-100 para permeabilização da membrana celular. Após 20 min a temperatura ambiente, as células foram incubadas com os sobrenadantes de cultura dos hibridomas em teste (100 μl /poço, sendo que cada poço correspondia a um sobrenadante diferente) durante 30 min a 37°C. Seguiu-se com lavagem das células com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T – 3 vezes, 5 min cada lavagem) e adição de anti-imunoglobulina polivalente de camundongo conjugada com ITCF (Sigma-Aldrich) diluída 1:200 em PBS contendo 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de azul de Evans, 50 μl /poço. Após 1 h a 37°C no escuro, procedeu-se nova etapa de lavagem com PBS-T. Finalmente, os poços foram secados, foi adicionada uma gota de glicerina tamponada com tampão carbonato/bicarbonato e os focos fluorescentes foram observados em microscópio de fluorescência (Olympus BX40).

Os hibridomas positivos neste teste foram submetidos a uma segunda IFI para verificar se os anticorpos produzidos ligavam-se especificamente no vírus rábico ou se reagem com componentes da célula BHK-21. Para tanto, ao invés de vírus rábico, foram adicionados 50 μl de meio DMEM F12 juntamente com 5×10^4 células BHK-21/100 μl /poço em placas de 96 cavidades. Após 18-24 h de incubação a 37°C, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e submetidas à IFI.

3.9 CLONAGEM DOS HIBRIDOMAS POR DILUIÇÃO LIMITANTE

Considerando-se o fato de que cada linfócito B (e, portanto, cada hibridoma) produz anticorpos contra um único epítipo e que toda sua progênie sintetiza anticorpos idênticos, ao final do processo de clonagem por diluição limitante, anticorpos monoclonais são obtidos

(WADE, 1982; YOKOYAMA *et al.*, 2006). Assim, a clonagem é requerida para evitar problemas de poli-especificidade e também para minimizar o risco de células não-secretoras crescerem demais, em detrimento dos hibridomas secretores de anticorpos (YOKOYAMA *et al.*, 2006). Por isso, os hibridomas secretores de anticorpos antirrábicos foram submetidos a duas clonagens por diluição limitante.

Os hibridomas foram, então, inicialmente expandidos para uma placa de 24 cavidades e testados por IFI para verificar se continuavam produzindo anticorpos antirrábicos e, em caso positivo, submetidos à clonagem por diluição limitante. Para tanto, 20-50 células híbridas foram adicionadas na primeira coluna de uma placa de 96 cavidades. Foram realizadas diluições seriadas (diluição 1:2) dos hibridomas em meio RPMI-1640, em um volume final de 100 μ l/poço, até a última coluna da placa.

As placas foram observadas em microscópio invertido (Olympus IX51) e os poços com apenas uma célula foram identificados. Após sete a dez dias de cultivo, a produção de anticorpos antirrábicos pelos hibridomas presentes nos poços identificados foi novamente verificada por imunofluorescência indireta.

Uma segunda diluição limitante foi realizada para garantir a monoclonalidade dos anticorpos presentes no sobrenadante de cultura dos hibridomas.

3.10 CRIOPRESERVAÇÃO DOS HIBRIDOMAS

A criopreservação dos hibridomas foi realizada conforme descrito por Lafon (1996), com alteração do meio de congelamento. Para tanto, hibridomas cultivados em garrafas de cultura de 25 cm² foram centrifugados por 10 min a 400 g e, ao precipitado celular, foi adicionado meio de congelamento (90% SBF, 10% DMSO) em volume suficiente para obter-se uma concentração de $2-5 \times 10^6$ células/criotubo. As células foram distribuídas em criotubos (1,5 ml por criotubo), mantidas por 24 h a -80°C e, após, transferidas para nitrogênio líquido.

Cada hibridoma foi congelado em múltiplos criotubos, em diferentes dias e com diferentes alíquotas do meio de congelamento, conforme recomendado por Yokoyama *et al.* (2006).

Para estabelecer a composição do meio de criopreservação, um hibridoma foi previamente congelado utilizando-se meios com

diferentes concentrações de RPMI-1640, SBF e DMSO (dimetilsulfóxido – Sigma-Aldrich) e descongelado 24 h após a transferência para o nitrogênio líquido. O meio selecionado foi o que resultou em um maior percentual de células viáveis após o descongelamento.

Para descongelamento dos hibridomas, os criotubos foram retirados do nitrogênio líquido e imediatamente aquecidos a 37°C até que a suspensão celular descongelasse. As células foram então diluídas em 10 ml de meio de cultura e centrifugadas por 10 min a 400 g. Ao precipitado celular, foram adicionados 10 ml de meio de cultura. Por fim, as células foram transferidas para uma garrafa de 25 cm² e mantidas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ (LAFON, 1996).

3.11 CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS

3.11.1 Isotipagem

A caracterização das classes e subclasses dos AcM foi realizada por meio de um ensaio imunoenzimático do tipo ELISA, utilizando o *kit SBA ClonotypingTM System/HRP* (Southern Biotech), procedendo-se conforme as instruções do fabricante. Para tanto, placas de ELISA (Greiner) foram, primeiramente, sensibilizadas com 100 µl/poço de uma solução contendo 1 µg de anticorpo de captura, o qual consiste em uma mistura de anticorpos contra as cadeias pesadas *mu* (µ), *gamma* 1 (γ1), *gamma* 2a (γ2a), *gamma* 2b (γ2b), *gamma* 3 (γ3) e *alpha* (α) e contra as cadeias leves *kappa* (κ) e *lambda* (λ). Após uma incubação de no mínimo 12 h a 4°C em câmara úmida, procedeu-se uma etapa de bloqueio dos sítios inespecíficos com 300 µl/poço de PBS contendo 1% de BSA, durante 1 h a temperatura ambiente. Os poços foram lavados três vezes com PBS-T (300 µl/poço) e então se seguiu com a adição do sobrenadante de cultura dos hibridomas (100 µl/poço) com incubação por 1 h a temperatura ambiente, sob agitação. Após nova lavagem com PBS-T, foram adicionados 100 µl por cavidade dos anticorpos secundários (anti-IgM, anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG3, anti-IgA, anti-κ e anti-λ) conjugados com peroxidase diluídos 1:500 em PBS contendo 1% de BSA (1 h a temperatura ambiente). Por fim, os poços foram lavados cinco vezes com PBS-T e a reação foi revelada

com uma solução de ácido cítrico (50 mM, pH 4,0) contendo 0,03% (m/v) de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico) e 0,03% (v/v) de H₂O₂. A leitura foi realizada após 10 min em espectrofotômetro (Tecan, modelo Sunrise basic) a 405 nm.

3.11.2 Determinação da Capacidade Neutralizante

A capacidade dos anticorpos monoclonais de impedir que o vírus rábico infecte as células-alvo foi verificada por meio do microteste de inibição de fluorescência simplificado (FAVORETTO *et al.*, 1993). Primeiramente, foram feitas diluições seriadas dos sobrenadantes de cultura dos hibridomas (diluições 1:1 até 1:128, volume final de 50 µl) em uma placa de 96 cavidades. A cada uma destas diluições foi adicionada uma quantidade previamente estabelecida de vírus rábico cepa PV suficiente para infectar 90-100% das células (50 µl/cavidade). Após 1 h de incubação a 37°C, foram adicionadas 5 x 10⁴ células BHK-21/100 µl/poço, procedendo-se nova incubação por 24 h a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Após este período, foi realizado um ensaio de imunofluorescência indireta, conforme descrito no item 3.8.

O título neutralizante de cada sobrenadante foi expresso como sendo a diluição capaz de impedir a infecção de aproximadamente 50% das células. Paralelamente aos sobrenadantes dos hibridomas, o teste foi realizado com uma preparação comercial de imunoglobulina antirrábica humana (HRIG – BayRab[®], Bayer) com título neutralizante conhecido (150 UI/ml). Assim, o título neutralizante de cada anticorpo monoclonal foi estabelecido por comparação entre o resultado das diluições dos sobrenadantes testados com a diluição obtida para a HRIG.

3.11.3 Reatividade com a Proteína rGERA179-281

Para detectar os AcM que reagem com a proteína recombinante rGERA179-281, foi realizado um ELISA, usando um protocolo adaptado de Piza *et al.* (1999). Placas de ELISA (Greiner) foram sensibilizadas com 200 ng/poço de rGERA179-281 diluída em tampão carbonato/bicarbonato (pH 9,6, volume final de 200 µl) durante 4 h a 37°C. A seguir, foi realizado um bloqueio dos sítios inespecíficos por

meio da adição de 300 µl/poço de tampão Tris-NaCl (50 mM de Tris, 150 mM de NaCl, pH 9,6) contendo 0,5% de gelatina. Após 30 min de incubação a 37°C, foram adicionados 100 µl do sobrenadante de cultura dos hibridomas (1 h a 37°C), seguindo da adição de 100 µl de anticorpo anti-imunoglobulina polivalente de camundongo conjugada com peroxidase (Sigma-Aldrich) diluída 1:2500 em PBS-T contendo 1% de BSA (1 h a 37°C). Entre cada etapa, foram realizadas cinco lavagens com 200 µl/poço de PBS-T. Por fim, a reação foi detectada com 0,4% (m/v) de *o*-fenilenodiamina (OPD) em presença de 0,03% (v/v) de H₂O₂ em tampão citrato (40 mM de citrato tri-sódico, 10 mM de ácido cítrico, pH 5,6). A reação foi interrompida pela adição de 50 µl de ácido sulfúrico 4 N após 10 min a temperatura ambiente no escuro e a leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro (Tecan, modelo Sunrise basic) a 490 nm.

3.11.4 Reatividade com Diferentes Isolados de Vírus Rábico Selvagem

Os AcM foram testados por imunofluorescência indireta (DIAZ *et al.*, 1994) para verificar sua reatividade com vírus rábico selvagem isolado de diferentes animais (bovino, equino, morcego, cão e canídeo silvestre) e de humano (um isolado) oriundas de diferentes regiões do Brasil (Tabela 2). Primeiramente, foram feitos decalques em lâminas com tecido de sistema nervoso central de camundongos infectados com os isolados de vírus selvagem. As lâminas foram mantidas à temperatura ambiente por 30 min e, a seguir, os tecidos foram fixados em acetona P.A. a -20°C por 15 h. Sobre os tecidos fixados e secos, foram então adicionados 15 µl dos sobrenadantes de cultura dos hibridomas (30 min, a 37°C). As lâminas foram lavadas cuidadosamente com PBS, cada decalque lavado duas vezes individualmente, seguindo pela imersão da lâmina em PBS durante 10 min. Após secagem das lâminas a 37°C, sobre os tecidos, foram adicionados 25 µl de anticorpo anti-imunoglobulina polivalente de camundongo conjugado com ITCF (Sigma-Aldrich) diluído 1:20 em PBS. Passados 30 min de incubação a 37°C, os decalques foram lavados duas vezes com PBS, imersos em PBS durante 10 min e então lavados uma vez com água destilada e mantidos a 37°C até secarem. Por fim, foi adicionada uma gota de

glicerina tamponada e colocada uma lamínula sobre cada decalque e a reação foi visualizada em microscópio de fluorescência.

Neste ensaio também foi utilizado, paralelamente, o painel com oito AcM anti-nucleoproteína, rotineiramente empregado para caracterização antigênica das variantes do vírus rábico presentes nas amostras isoladas na América Latina e no Caribe. Este painel foi estabelecido por Diaz *et al.* (1994), sendo os AcM produzidos e fornecidos pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention* – Atlanta, GA, USA).

Tabela 2: Identificação dos isolados de vírus rábico utilizados no ensaio de imunofluorescência indireta para caracterização dos AcM: número de registro do Instituto Pasteur/SP, animal de isolamento e local de origem da amostra

Número de registro da amostra	Animal de isolamento	Procedência da amostra
CVS	---	Cepa fixa
1023	Bovino	Aracaju, SE
1024	Bovino	Aracaju, SE
1026	Bovino	Sergipe
1027	Bovino	Laranjeiras, SE
1032	Bovino	Tobias Barreto, SE
2429	Bovino	Divinolândia, SP
6292	Bovino	Socorro, SP
6462	Bovino	Socorro, SP
6879	Bovino	São João da Boa Vista, SP
7062	Bovino	Narandiba, SP
7063	Bovino	Pirapozinho, SP
1016	Cão	João Pessoa, PB
4194	Cão	Salvador, BA
5635	Cão	Rio Grande do Norte
6634	Cão	Itaguaçu da Bahia, BA
1028	Equino	Sergipe
6746	Equino	Belo Horizonte, MG
7488	Humano	Maranhão
3176	Morcego	Santo André, SP

Tabela 2: Identificação dos isolados de vírus rábico utilizados no ensaio de imunofluorescência indireta para caracterização dos AcM: número de registro do Instituto Pasteur/SP, animal de isolamento e local de origem da amostra (Continuação)

Número de registro da amostra	Animal de isolamento	Procedência da amostra
4607	Morcego	Ribeirão Preto, SP
4616	Morcego	Piracaia, SP
4697	Morcego	Várzea Paulista, SP
5610	Morcego	Sales, SP
5787	Morcego	Itapevi, SP
5861	Morcego	Espírito Santo do Pinhal, SP
6207	Morcego	Ribeirão Preto, SP
6375	Morcego	Guarapuava, PR
6429	Morcego	Paulínia, SP
6945	Morcego	Ribeirão Preto, SP
7279	Morcego	Belo Horizonte, MG
7952	Morcego	Paraná
1017	Canídeo Silvestre	Tenório, PB
1043	Canídeo Silvestre	Muribeca, SE
5634	Canídeo Silvestre	Rio Grande do Norte
5636	Canídeo Silvestre	Paraíba

3.11.5 Reatividade com Cepa de Vírus Rábico Vacinal

Para verificar se os AcM reconheciam o vírus inativado presente em preparações de vacinas antirrábicas, foi realizado um ELISA de acordo com o protocolo descrito por Piza *et al.* (1999), com adaptações. Para tanto, vacina antirrábica humana (VeroRab[®] – Aventis Pasteur) foi primeiramente diluída em 0,5 ml de diluente (68 mM de NaCl em água) e, depois, diluída 30 vezes em PBS (pH 7,2). Placas de ELISA (Costar) foram sensibilizadas com 200 µl/poço desta solução durante 15 h a 4°C. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado pela adição de tampão Tris/NaCl (pH 7,2) contendo 0,5% de gelatina, 300 µl/poço, por 30 min a 37°C. Sobrenadantes de cultura dos hibridomas (100 µl/poço) foram

utilizados como anticorpo primário e anti-imunoglobulina polivalente de camundongo conjugada com peroxidase (100 µl/poço, diluída 1:1000 em PBS-T contendo 1% de BSA) como anticorpo secundário, ambos incubados por 1 h a 37°C. Cinco lavagens com 200 µl/poço de PBS-T foram realizadas entre cada etapa. A reação foi detectada com 0,4% (m/v) de OPD em presença de 0,03% (v/v) de H₂O₂ em tampão citrato (pH 5,6) e a reação foi interrompida pela adição de 50 µl de ácido sulfúrico 4 N após 10 min a temperatura ambiente, no escuro. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro (Tecan, modelo Sunrise basic) a 490 nm.

4 RESULTADOS

4.1 OBTENÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE rGERA179-281

A proteína rGERA179-281 foi expressa em *E. coli* cepa BL-21 Códon Plus e purificada da fração insolúvel, a partir dos corpos de inclusão, por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados. Ao final do processo, foi obtida uma proteína de massa molecular aparente de 14 kDa (Figura 9 A), com um rendimento protéico de aproximadamente 3,44 mg de proteína por litro de cultivo celular. Na Figura 9 A, também pode ser verificada uma banda protéica de cerca de 28 kDa, que provavelmente corresponde a um dímero da rGERA179-281.

Além disso, a proteína produzida foi reconhecida por imunoglobulinas antirrábicas humanas (HRIG) (Figura 9 B), sugerindo que realmente se trata do fragmento protéico de interesse.

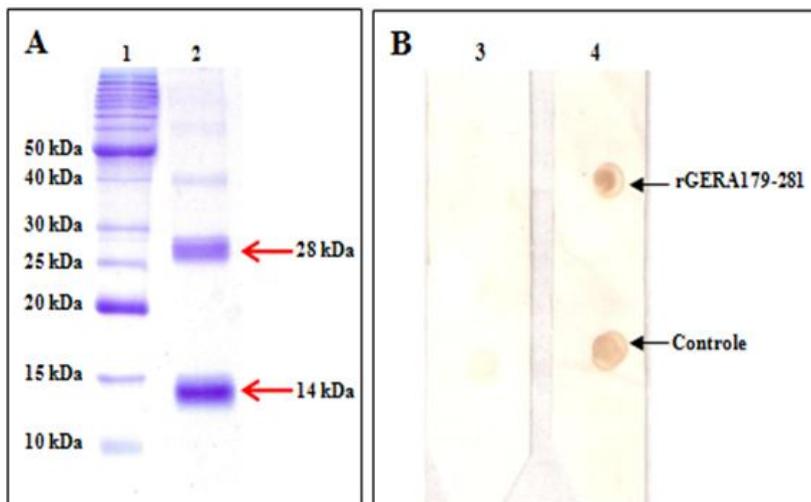


Figura 9: Purificação e caracterização da rGERA179-281. (A) Análise da proteína recombinante rGERA179-281 por SDS-PAGE, realizada sob condições desnaturantes em gel de poliacrilamida a 16%. As proteínas foram visualizadas por meio da coloração com *Coomassie brilliant blue* (1= Padrão de massa molecular; 2 = rGERA179-281 purificada). (B) Caracterização da rGERA179-281 por *immunoblotting*. Imunoglobulina antirrábica humana (4) e soro controle negativo (3) foram utilizados como anticorpo primário e anti-imunoglobulinas humanas conjugadas com peroxidase, como anticorpo secundário. Como controle da reação, foi utilizada uma alíquota de rGERA179-281 produzida por Bassi *et al.* (2008).

4.2 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS

Para a obtenção de anticorpos monoclonais antirrábicos, foram realizados cinco protocolos de imunização, descritos no item 3.6.

Nos dois primeiros protocolos, alíquotas de soro dos camundongos foram coletadas três dias após a última dose e analisadas por imunofluorescência indireta em células BHK-21 infectadas com vírus rábico cepa PV (primeiro protocolo) ou em células N2A infectadas com o vírus 7432 (segundo protocolo). Todos os camundongos apresentaram anticorpos antirrábicos (dados não mostrados).

No terceiro protocolo de imunização, alíquotas de soro dos camundongos foram analisadas por IFI e por soroneutralização e os

resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3. Os camundongos 4 e 5 (soros G e H) não foram imunizados com a rGERA179-281, recebendo apenas o desafio com vírus. Os camundongos 6 e 7 (soros I e J) foram os controles negativos, não sendo imunizados, nem desafiados.

Tabela 3: Títulos de anticorpos antirrâbicos e antirrâbicos neutralizantes dos camundongos do terceiro protocolo de imunização¹ determinados por imunofluorescência indireta e soroneutralização

Soro	Animal imunizado	Coleta do soro	Título por IFI	AcN ² (UI/ml)
A	Camundongo 1	6 dias após 4 ^a dose de rGERA179-281	160	0,08
B	Camundongo 2	6 dias após 4 ^a dose de rGERA179-281	≥ 640	0,12
C	Camundongo 3	6 dias após 4 ^a dose de rGERA179-281	320	0,08
D	Camundongo 1	7 dias após desafio com vírus rábico cepa PV	≥ 640	> 10
E	Camundongo 2	7 dias após desafio com vírus rábico cepa PV	≥ 640	7,5
F	Camundongo 3	7 dias após desafio com vírus rábico cepa PV	≥ 640	> 10
G	Camundongo 4 não imunizado	7 dias após desafio com vírus rábico cepa PV	≥ 640	> 10
H	Camundongo 5 não imunizado	7 dias após desafio com vírus rábico cepa PV	80	> 10
I	Camundongo 6 – não imunizado, nem desafiado	–	< 5	< 0,08
J	Camundongo 7 – não imunizado, nem desafiado	–	< 5	< 0,08

¹Três camundongos Balb/c foram imunizados com quatro doses de 40 µg da proteína rGERA179-281 (dias 0, 7, 14 e 28), seguidas por um desafio com vírus rábico cepa PV na pata após seis dias. Alíquotas de soro foram coletadas seis dias após a quarta dose de rGERA179-281 e sete dias após o desafio com vírus rábico.

²AcN: anticorpos neutralizantes

Nos dois últimos protocolos, alíquotas de soro dos animais foram coletadas e analisadas por soroneutralização e por ELISA. Os resultados obtidos na titulação dos soros dos camundongos do quarto protocolo

estão apresentados na Tabela 4 (soros A-L). O camundongo 7 (Tabela 4, soro M) corresponde ao controle negativo, não sendo imunizado.

Tabela 4: Títulos de anticorpos anti-rGERA179-281 e antirrábicos neutralizantes dos camundongos do quarto protocolo de imunização¹ determinados por ELISA e soroneutralização

Soro	Animal imunizado	Coleta do soro	Título por ELISA	AcN ² (UI/ml)
A	Camundongo 1	7 dias após 5ª dose de rGERA179-281	≥ 121500	< 0,08
B	Camundongo 2	7 dias após 5ª dose de rGERA179-281	40500	< 0,08
C	Camundongo 3	7 dias após 5ª dose de rGERA179-281	≥ 121500	< 0,08
D	Camundongo 4	7 dias após 5ª dose de rGERA179-281	≥ 121500	< 0,08
E	Camundongo 5	7 dias após 5ª dose de rGERA179-281	≥ 121500	< 0,08
F	Camundongo 6	7 dias após 5ª dose de rGERA179-281	≥ 121500	< 0,08
G	Camundongo 1	3 dias após desafio com vírus rábico cepa PV	≥ 121500	0,47
H	Camundongo 2	3 dias após desafio com rGERA179-281	≥ 121500	3,75
I	Camundongo 3	3 dias após desafio com rGERA179-281	≥ 121500	1,87
J	Camundongo 4	3 dias após desafio com vírus rábico cepa PV	≥ 121500	0,94
K	Camundongo 5	3 dias após desafio com vírus rábico cepa PV	≥ 121500	1,87
L	Camundongo 6	3 dias após desafio com rGERA179-281	≥ 121500	1,87
M	Camundongo 7 – não imunizado, nem desafiado	–	< 500	< 0,08

¹Seis camundongos Balb/c foram imunizados com cinco doses de 41,7 µg de rGERA179-281 (dias 0, 6, 12, 18 e 54). No dia 67, três camundongos receberam um reforço com 33,4 µg de rGERA179-281 e três foram desafiados com vírus rábico cepa PV na pata. Alíquotas de soro foram coletadas sete dias após a quinta dose de rGERA179-281 e três dias após o desafio com rGERA179-281 ou vírus rábico.

²AcN: anticorpos neutralizantes.

Os resultados obtidos na titulação dos soros dos camundongos do quinto protocolo estão apresentados na Tabela 5 (soros A-J). O camundongo 6 (soro K) corresponde ao controle negativo, não sendo imunizado.

Tabela 5: Títulos de anticorpos anti-rGERA179-281 e antirrábicos neutralizantes dos camundongos do quinto protocolo de imunização¹ determinados por ELISA e soroneutralização

Soro	Animal imunizado	Coleta do soro	Título por ELISA	AcN ² (UI/ml)
A	Camundongo 1	7 dias após 5 ^a dose da imunização	13500	5,0
B	Camundongo 2	7 dias após 5 ^a dose da imunização	13500	5,0
C	Camundongo 3	7 dias após 5 ^a dose da imunização	4500	1,25
D	Camundongo 4	7 dias após 5 ^a dose da imunização	13500	5,0
E	Camundongo 5	7 dia após 5 ^a dose da imunização	13500	5,0
F	Camundongo 1	6 dias após reforço com rGERA179-281	≥ 121500	5,0
G	Camundongo 2	6 dias após reforço com rGERA179-281	40500	≥ 20
H	Camundongo 3	6 dias após reforço com rGERA179-281	40500	≥ 20
I	Camundongo 4	6 dias após reforço com rGERA179-281	≥ 121500	5,0
J	Camundongo 5	6 dias após reforço com rGERA179-281	≥ 121500 ³	≥ 20
K	Camundongo 6 – não imunizado, nem desafiado	–	< 500	< 0,08

¹Cinco camundongos Balb/c receberam três doses de 41,7 µg de rGERA179-281 seguidas por duas doses de 500 µl de vacina antirrábica humana (VeroRab® – Aventis Pasteur) diluída 1:10 em PBS, com intervalo de uma semana entre cada dose. Oito dias após a última dose, foi administrada uma dose reforço de 41,7 µg de rGERA179-281. Alíquotas de soro foram coletadas uma semana após a quinta dose da imunização e seis dias após a sexta dose.

²AcN: anticorpos neutralizantes.

³Título muito maior que 121500.

4.3 OBTENÇÃO DE HIBRIDOMAS PRODUTORES DE ANTICORPOS ANTIRRÁBICOS

Para obtenção de hibridomas secretores de AcM antirrábicos, a partir de cada protocolo de imunização, foi realizada uma fusão. Na primeira fusão, foram obtidos 12 hibridomas positivos no ensaio de triagem, dentre os quais um se manteve estável, ou seja, secretando anticorpos, sendo denominado LIA 02 (Figura 10, A).

Na segunda fusão, foram gerados 1056 poços, dos quais 431 (40,8% do total de poços) apresentaram crescimento de hibridomas após a seleção em meio HAT e foram submetidos à triagem por IFI. Dentre os hibridomas testados, 58 apresentaram resultado positivo na IFI (5,49% do total de poços), dos quais 39 perderam a estabilidade durante a fase de expansão. Dos 19 hibridomas restantes, 17 secretavam anticorpos contra componentes celulares e, portanto, foram descartados. Ao final, portanto, foram obtidos dois hibridomas estáveis secretando anticorpos antirrábicos, denominados 6H8 e 7B7 (Figura 10, B-C).

No terceiro protocolo de fusão, dos 1040 poços obtidos, 923 foram submetidos à triagem, o que representa 88,7% do total. Dentre os 1040 poços, 39 (3,75%) apresentaram resultado positivo na IFI, sendo que 19 perderam a capacidade de produzir anticorpos. Dentre os 20 hibridomas que se mantiveram estáveis, 16 secretavam anticorpos contra componentes da célula. Esta fusão, portanto, resultou na obtenção de quatro hibridomas secretores de anticorpos antirrábicos, os quais foram denominados 3E6, 8D11, 9C7 e 8B6 (Figura 10, D-G).

Na quarta fusão, foram obtidos 2112 poços, com 1425 (67,5%) apresentando crescimento de hibridomas. Neste protocolo de fusão, como se desejava obter anticorpos que reagissem com o vírus rábico e também com a rGERA179-281, os hibridomas foram submetidos a dois testes de triagem: IFI (para detectar anticorpos antirrábicos) e ELISA (para detectar anticorpos anti-rGERA179-281). Com a triagem, foram selecionados 22 hibridomas positivos nos dois testes, no entanto, 11 deles perderam a estabilidade e os 11 restantes produziam anticorpos contra componentes celulares. Além disso, 21 hibridomas apresentaram resultado positivo apenas na IFI, mas todos perderam a estabilidade durante a fase de expansão. Já por ELISA, foram obtidos 230 hibridomas positivos, porém, dentre os que não perderam a estabilidade, nenhum reconheceu o vírus rábico. Alguns dos hibridomas produziam anticorpos que reagem contra componentes da bactéria *E. coli*,

indicando que nem todas as proteínas bacterianas são eliminadas durante a purificação da rGERA179-281.

Na quinta fusão, foram obtidos 1613 poços, dentre os quais apenas 303 (18,8%) apresentaram crescimento de hibridomas. Dentre os poços triados, oito apresentaram resultado positivo na IFI (um deles contra componentes celulares) e sete foram positivos no ELISA, porém perderam a estabilidade. Além disso, dois hibridomas apresentaram resultado positivo em ambos os testes, porém um deles reconheceu componentes celulares e o outro perdeu a estabilidade.

A Tabela 6 apresenta um resumo dos resultados obtidos em cada fusão, sendo descritos o número de poços obtidos após a fusão, o número de poços com crescimento de hibridomas e o número de hibridomas positivos na IFI, bem como o percentual que estes números representaram do total de poços obtidos, além do número de hibridomas secretores de anticorpos antirrábicos que se mantiveram estáveis.

Tabela 6: Resumo dos resultados obtidos nas fusões realizadas para obtenção de anticorpos monoclonais antirrábicos. Os percentuais indicados são relativos ao número total de poços obtidos.

Protocolo de fusão	Número de poços obtidos	Poços com crescimento de hibridomas	Hibridomas positivos na IFI	Hibridomas secretores de anticorpos antirrábicos
1	1440	N.D.	12 (0,8%)	1
2	1056	431 (40,8%)	58 (5,5%)	2
3	1040	923 (88,7%)	39 (3,7%)	4
4	2112	1425 (67,5%)	43 (2,0%)	0
5	1613	303 (18,8%)	10 (0,6%)	0

IFI: imunofluorescência indireta; ND: não disponível.

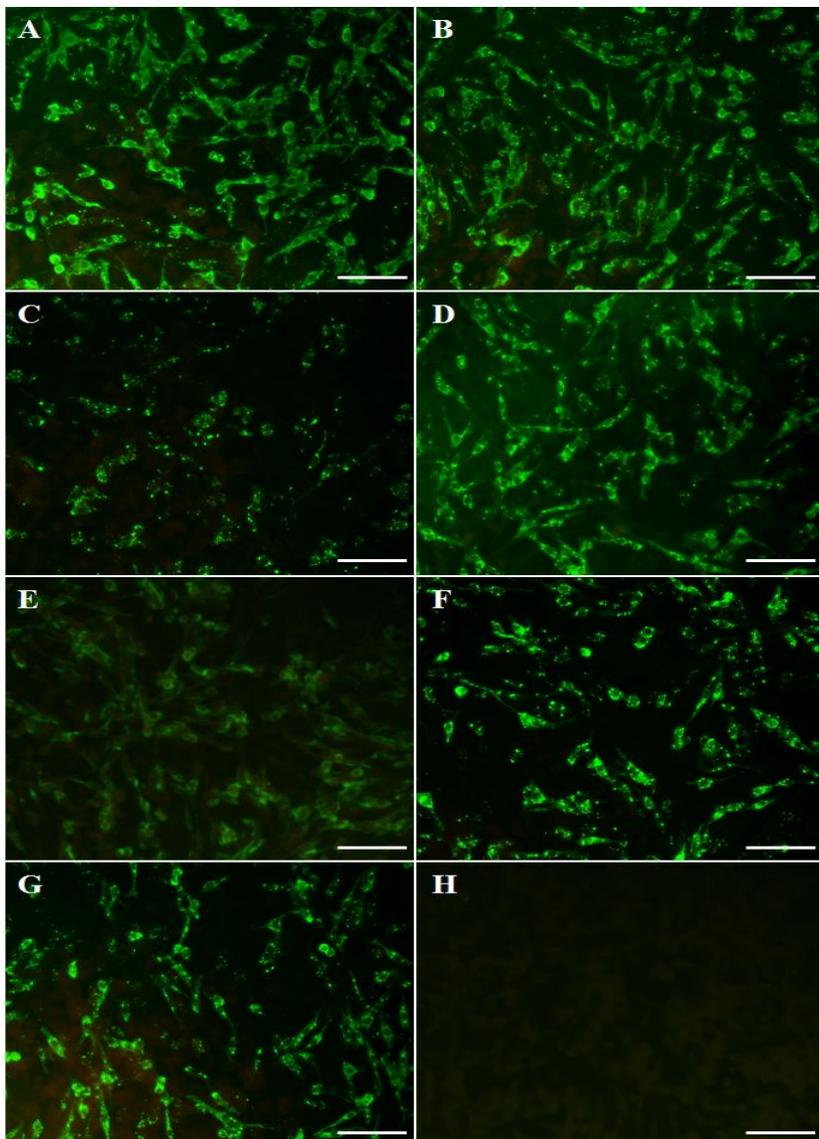


Figura 10: Imunofluorescência indireta em células BHK-21 infectadas com vírus rábico cepa PV. (A) LIA 02; (B) 6H8; (C) 7B7; (D) 3E6; (E) 8D11; (F) 9C7; (G) 8B6; (H) Controle negativo: AcM anti-IMNV (AcM não-relacionado, que liga ao IMNV, um vírus que infecta invertebrados marinhos). Barras de escala: 50 μ m.

4.4 CRIOPRESERVAÇÃO DOS HIBRIDOMAS

Inicialmente os hibridomas foram congelados com o mesmo meio de congelamento do mieloma que os originou (75% RPMI-1640, 20% SBF, 5% DMSO). Quando estes hibridomas foram descongelados, no entanto, havia poucas células viáveis (menos de 30%). Por isso, foram testados meios de congelamento com diferentes concentrações de RPMI-1640, SBF e DMSO (Tabela 7), para verificar com qual deles haveria uma maior viabilidade celular após o descongelamento.

Tabela 7: Seleção do meio para criopreservação dos hibridomas secretores de anticorpos antirrábicos

Composição do meio de congelamento	% de células viáveis após o descongelamento
80% RPMI-1640, 15% SBF, 5% DMSO	16,1
70% RPMI-1640, 25% SBF, 5% DMSO	24,0
60% RPMI-1640, 35% SBF, 5% DMSO	39,7
40% RPMI-1640, 55% SBF, 5% DMSO	32,1
20% RPMI-1640, 75% SBF, 5% DMSO	36,4
95% SBF, 5% DMSO	51,4
80% RPMI-1640, 10% SBF, 10% DMSO	77,6
70% RPMI-1640, 20% SBF, 10% DMSO	75,6
60% RPMI-1640, 30% SBF, 10% DMSO	74,0
40% RPMI-1640, 50% SBF, 10% DMSO	70,5
20% RPMI-1640, 70% SBF, 10% DMSO	77,1
90% SBF, 10% DMSO	80,6

SBF: soro bovino fetal; DMSO: dimetilsulfóxido

Como pode ser verificado na Tabela 7, o meio contendo 90% de SBF e 10% de DMSO foi o que resultou em uma maior viabilidade celular (80,6%) após o descongelamento. Este meio, portanto, foi o

utilizado para criopreservação dos hibridomas secretores de anticorpos antirrábicos.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS

4.5.1 Isotipagem

A determinação dos isotipos dos anticorpos monoclonais foi realizada por meio de um ensaio imunoenzimático do tipo ELISA, utilizando o *kit SBA ClonotypingTM System/HRP* (Southern Biotech). Este ensaio demonstrou que, dentre os sete AcM obtidos, três produzem anticorpos caracterizados como IgG2a, dois como IgM, um como IgG2b e um como IgG3, todos com cadeia leve do tipo *kappa* (κ) (Tabela 8).

Tabela 8: Nome dos hibridomas, protocolo de fusão em que foram gerados e isotipo dos anticorpos monoclonais (cadeias pesada e leve)

Nome do hibridoma	Protocolo de fusão	Isotipo: cadeia pesada	Isotipo: cadeia leve
LIA02	1	IgG2b	κ
6H8	2	IgG2a	κ
7B7	2	IgM	κ
3E6	3	IgG3	κ
8D11	3	IgG2a	κ
9C7	3	IgM	κ
8B6	3	IgG2a	κ

4.5.2 Determinação da Capacidade Neutralizante

Para avaliar a capacidade dos AcM de neutralizar o vírus rábico, foi realizado o microteste de inibição de fluorescência simplificado (FAVORETTO *et al.*, 1993). O título neutralizante dos AcM foi estabelecido por comparação com uma preparação comercial de imunoglobulina antirrábica humana (HRIG – BayRab[®], Bayer).

Por este teste, dentre os sete AcM antirrábicos, foi verificado que o 8D11 foi capaz de se ligar ao vírus impedindo que este infectasse as células BHK-21 *in vitro*, possuindo um título neutralizante de 2,25 UI/ml no sobrenadante testado. Este título, no entanto, é dependente da concentração de anticorpos no sobrenadante, o que significa que, caso se deseje uma maior atividade neutralizante, pode-se utilizar técnicas para concentração de AcM, como a precipitação com sulfato de amônio (PERRIN, 1996), por exemplo.

4.5.3 Reatividade com a Proteína rGERA179-281

Para avaliar a reatividade dos AcM com a rGERA179-281, foi realizado um ELISA (protocolo adaptado de PIZA *et al.*, 1999). Para padronização do ensaio, inicialmente, foram testadas diferentes concentrações de rGERA179-281 para sensibilização das placas. Assim, foram testadas as concentrações de 5000 ng, 1000 ng, 200 ng e 40 ng por poço, em um volume final de 200 μ l, sendo estabelecida a concentração de 200 ng como a concentração para uso. Como anticorpo primário, foram utilizados os sobrenadantes de cultura dos hibridomas sem diluição e, para o anticorpo secundário, foi estabelecida a diluição de 1:2500.

Quando testados por este ensaio, o AcM 7B7 reagiu com a rGERA179-281 e os demais AcM apresentaram resultado negativo.

4.5.4 Reatividade com Diferentes Isolados de Vírus Rábico Selvagem

Os AcM foram testados por imunofluorescência indireta frente a vírus rábico selvagem isolado de diferentes animais e proveniente de diferentes regiões do Brasil. Por meio da observação dos focos fluorescentes, os resultados foram estabelecidos como negativo, positivo ou fracamente positivo (Figura 11). Os resultados para cada AcM estão indicados na Tabela 9.

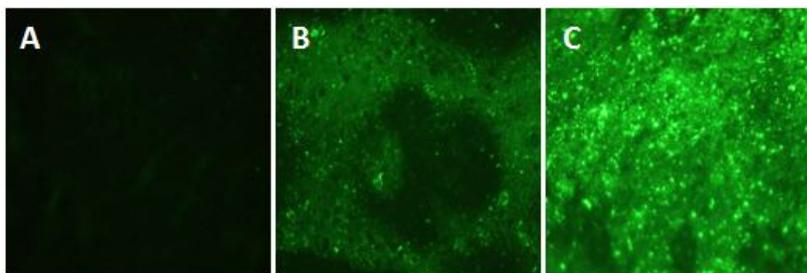


Figura 11: Padrões de reatividade dos anticorpos monoclonais estabelecidos por imunofluorescência indireta em tecido de sistema nervoso central de camundongos infectados com vírus rábico selvagem. Os tecidos foram fixados com acetona a -20°C e marcados com AcM antirrábicos seguidos por anti-imunoglobulinas de camundongo conjugada com ITCF. (A) Reação negativa; (B) Reação fracamente positiva; (C) Reação positiva.

Tabela 9: Imunoreatividade dos anticorpos monoclonais com isolados de vírus rábico selvagem e com uma cepa de vírus rábico fixo e as variantes antigênicas de cada isolado

Identificação das amostras	LIA 02	6H8	7B7	3E6	8D11	9C7	8B6	Variante do vírus rábico
CVS	++	++	-	++	-	++	++	Cepa fixa
1023	++	++	-	++	+	++	-	3*
1024	++	++	-	++	++	++	-	3*
1026	++	++	-	++	+	++	-	3*
1027	++	++	-	++	++	++	-	3*
1032	++	++	-	++	++	++	-	3*
2429	++	++	-	++	++	++	-	3
6292	++	++	++	++	-	++	-	3
6462	++	++	-	++	-	++	-	3
6879	++	++	+	++	++	++	+	3
7062	++	++	+	++	-	++	-	3
7063	++	++	+	++	-	++	-	3
1016	++	++	-	++	-	++	++	2
4194	++	++	-	++	-	++	++	NC
5635	++	++	-	++	-	++	++	2

Tabela 9: Imunoreatividade dos anticorpos monoclonais com isolados de vírus rábico selvagem e com uma cepa de vírus rábico fixo e as variantes antigênicas de cada isolado (Continuação)

Identificação das amostras	LIA 02	6H8	7B7	3E6	8D11	9C7	8B6	Variante do vírus rábico
6634	++	++	-	++	-	++	-	3*
1028	++	++	-	++	-	++	-	3*
6746	++	++	-	++	-	++	-	3
7488	++	++	-	-	-	+	++	2
3176	++	++	-	++	-	++	-	4
4607	++	++	-	++	+	++	+	3
4616	++	++	-	++	-	++	++	4
4697	++	++	-	++	-	++	++	NC
5610	++	++	++	++	++	++	++	3
5787	++	++	-	++	-	++	+	4 ou 6
5861	++	++	+	++	+	++	++	3
6207	++	++	-	++	+	++	-	3
6375	++	++	-	++	-	++	+	4
6429	++	++	-	+	+	-	-	4
6945	++	++	-	++	-	++	++	NC
7279	++	++	-	++	-	++	+	3
7952	-	++	-	-	-	+	-	NC
1017	++	++	-	++	-	++	++	2
1043	++	++	-	++	-	++	++	2
5634	++	++	-	++	-	++	++	2
5636	++	++	-	+	-	+	++	2

- Negativo; + fracamente positivo; ++ positivo; NC: variante não compatível com as estabelecidas pelo painel de referência fornecido pelo CDC; 3*: isolados que se caracterizam como variante 3, exceto por um dos anticorpos do painel de referência.

Todos os AcM também foram testados por imunofluorescência indireta em células BHK-21 infectadas com o vírus CVS e apresentaram resultado positivo. Isso significa que houve uma diferença entre os resultados obtidos por IFI em células BHK-21 e em tecido de SNC de

camundongos, ambos infectados com o vírus rábico cepa CVS, para os AcM produzidos pelos hibridomas 7B7 e 8D11.

4.5.5 Reatividade com Cepa de Vírus Rábico Vacinal

Para verificar quais AcM reconheciam o vírus inativado presente em preparações de vacinas para uso humano, foi realizado um ensaio imunoenzimático do tipo ELISA.

Para padronização da reação, foram testadas algumas condições, partindo-se do protocolo descrito por Piza *et al.* (1999). Assim, foram testados os tampões carbonato/bicarbonato (pH 9,6) e fosfato (PBS, pH 7,2) para diluição da vacina, bem como tampão Tris/NaCl em pH 9,6 e em pH 7,2 para bloqueio dos sítios inespecíficos, sendo verificado um melhor resultado na reação desenvolvida em pH 7,2. Além disso, foi estabelecido que os sobrenadantes de cultura dos hibridomas não deveriam ser diluídos e que o anticorpo secundário seria utilizado na diluição de 1:1000.

Por este ensaio, pode ser verificado que todos os AcM, com exceção do 8D11, reconheceram o vírus presente na vacina testada (VeroRab[®]) (dados não mostrados).

5 DISCUSSÃO

5.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA rGERA179-281

A glicoproteína rábica é a mediadora da ligação do vírus aos receptores celulares e da sua entrada na célula hospedeira, sendo a responsável pela indução de anticorpos neutralizantes para o vírus (COX; DIETZSCHOLD; SCHNEIDER, 1977; WUNNER, 2002). Assim sendo, a imunização de camundongos com a proteína G (ou com um fragmento dela) pode ser uma estratégia interessante para se obter anticorpos monoclonais neutralizantes para o vírus rábico.

No trabalho desenvolvido por Bassi *et al.* (2008), foi expresso em *E. coli* um fragmento (aminoácidos 179 a 281) da proteína G do vírus rábico cepa ERA, denominado rGERA179-281, compreendendo uma região que contém epítomos lineares. Na sequência de nucleotídeos codificante para este fragmento, no entanto, existem alguns códons cujos RNA transportadores (RNAt) são raros em *E. coli*. A existência destes códons raros pode dificultar ou impedir a tradução de proteínas heterólogas, como a rGERA179-281, em bactérias (KANE, 1995).

Existem algumas linhagens de *E. coli*, porém, que possuem RNAt correspondentes para alguns códons raros, podendo ser utilizadas para contornar esta limitação, como é o caso da linhagem BL21 Códon Plus (Stratagene), utilizada no presente trabalho.

Além disso, no trabalho realizado por Bassi *et al.* (2008), para a geração do plasmídeo recombinante pGERA179-281, o fragmento gênico de interesse foi inserido no vetor de expressão pET14-b após uma sequência codificante para os seguintes aminoácidos: MGSS**HHHHHH**SSGLVPRGSH (em negrito e sublinhado, estão indicadas seis histidinas, localizadas na região N-terminal da proteína). A presença destas seis histidinas foi essencial para a purificação da proteína, a qual foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando resina com íons metálicos (Cu⁺²) imobilizados.

Para eluição da proteína de interesse, foi utilizado um gradiente de concentração de imidazol. O imidazol é um análogo da histidina e, portanto, competidor pela ligação aos íons metálicos. Dessa forma, uma elevada concentração de imidazol (250 mM) promove a dissociação da proteína de interesse dos íons metálicos, ou seja, o seu desligamento da resina.

5.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

Anticorpos altamente específicos contra um determinado antígeno podem ser obtidos por meio da fusão de linfócitos B de animais imunizados contra este antígeno com células tumorais (mielomas), gerando, desta forma, os chamados hibridomas. A partir do momento em que se obtém uma linhagem de hibridoma bem estabelecida, o AcM obtido pode ser um reagente extremamente valioso, que estará disponível para produção em grandes quantidades.

Uma linhagem celular, no entanto, não estará estabelecida antes da sua clonagem (para obtenção de anticorpos monoclonais) e do seu congelamento e descongelamento bem sucedidos. Em função disso, para a obtenção de AcM por meio da geração de hibridomas, são requeridos, desde a imunização até o final da clonagem, dois a três meses de trabalho, isto se o AcM for produzido e identificado na primeira fusão. Uma vez que um hibridoma é selecionado na triagem, ele deve ser cultivado com o máximo de cuidados, pois pode ser a única fonte disponível do anticorpo desejado (YOKOYAMA *et al.*, 2006).

A produção de AcM, portanto, é um processo demorado e trabalhoso. O sucesso requer a otimização de diversas etapas, dentre elas a preparação do antígeno e o protocolo de imunização, que podem ser verificados pela titulação dos soros dos animais após a imunização. Geralmente, quanto maior o intervalo de tempo entre as doses, maior a afinidade do anticorpo produzido, pois menos antígenos estarão presentes por um longo tempo após a imunização. Consequentemente, apenas as células com maior afinidade para o antígeno ainda estarão em circulação (YOKOYAMA *et al.*, 2006). O tempo preciso para retirada do baço após a última dose da imunização também tem sido associado como fator determinante da eficiência da fusão e geração de hibridomas secretores do anticorpo de interesse (CIANFRIGLIA *et al.*, 1987). Se o baço for coletado muito cedo ou muito tarde após a dose reforço ou se as doses da imunização não forem suficientes, a frequência de células B antígeno-específico ativadas pode ser muito baixa, diminuindo a chance de gerar ou detectar hibridomas produzindo o anticorpo de interesse (YOKOYAMA *et al.*, 2006).

Neste trabalho, foram realizados cinco protocolos de fusão, com o objetivo de se obter anticorpos monoclonais antirrábicos. No primeiro protocolo, camundongos foram imunizados com vacina antirrábica

humana e, no segundo, com vírus rábico selvagem isolado de um bovino naturalmente infectado, inativado por exposição à luz ultravioleta.

A imunização de camundongos com vacina antirrábica também foi realizada por Wiktor e Koprowski (1978) para geração de AcM que reagissem com o vírus rábico. No estudo desenvolvido por estes autores, camundongos Balb/c fêmeas com 10-12 semanas de idade foram imunizados com 0,1 ml de vacina por via intraperitoneal, seguida por um reforço com a mesma vacina diluída 1:5 por via intravenosa após 3-4 meses, sendo obtidos AcM de diferentes especificidades, inclusive anticorpos neutralizantes para o vírus rábico (WIKTOR; KOPROWSKI, 1978). De maneira semelhante, outros AcM (inclusive neutralizantes) foram obtidos, por exemplo, a partir da fusão de células de mieloma com esplenócitos de camundongos imunizados com vírus rábico cepa CVS inativado pela β -propiolactona (BENMANSOUR *et al.*, 1991). Já Akacem *et al.* (1992) imunizaram camundongos contra uma cepa selvagem de vírus rábico e obtiveram sete AcM, dentre eles um específico contra a glicoproteína viral.

Com as duas primeiras fusões descritas no presente trabalho, foram obtidos três hibridomas secretores de anticorpos antirrábicos, no entanto, diferentemente dos AcM produzidos nos trabalhos citados acima, nenhum foi capaz de neutralizar o vírus rábico.

Motoi *et al.* (2005) descreveram a expressão de um fragmento da proteína G do vírus rábico cepa CVS-11 (resíduos 201 a 300) em *E. coli*, o qual foi capaz de induzir a produção de anticorpos antirrábicos em ovos de galinha. Estes anticorpos apresentaram atividade neutralizante para o vírus e promoveram proteção em camundongos quando administrados imediatamente após o desafio viral.

Embora estes autores não tenham imunizado camundongos com a proteína recombinante, nem produzido AcM contra ela, eles demonstraram que a imunização de animais (neste caso, de galinhas) com um fragmento recombinante da glicoproteína rábica era capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes para o vírus rábico. Por isso, com o intuito de obter anticorpos neutralizantes para o vírus, optou-se por uma nova estratégia de imunização, na qual os camundongos foram imunizados com a proteína rGERA179-281, que, assim como a proteína expressa por Motoi *et al.* (2005), compreende uma região da glicoproteína do vírus rábico.

Já havia sido demonstrado por *Western blotting* que anticorpos presentes no soro de humanos imunizados contra raiva ligavam-se à rGERA179-281 e, por meio de um ensaio de competição, que a

incubação prévia com rGERA179-281 reduzia o título neutralizante destes anticorpos antirrâbicos humanos, ou seja, que parte desses anticorpos que se ligavam à proteína eram neutralizantes (BASSI *et al.*, 2008). Além disso, a rGERA179-281 foi capaz de induzir a formação de anticorpos antirrâbicos em camundongos imunizados (BASSI, 2008).

Assim sendo, no terceiro protocolo de fusão, os camundongos inicialmente foram imunizados com quatro doses de 40 µg dessa proteína recombinante. A escolha da concentração protéica baseou-se no protocolo de imunização descrito por Yokoyama *et al.* (2006), que recomenda a utilização de 1 a 50 µg de proteína ou peptídeo por animal. Após essas doses, os soros dos camundongos apresentaram positividade por IFI (Tabela 3), indicando que a rGERA179-281 realmente foi capaz de induzir a formação de anticorpos antirrâbicos, porém os títulos de anticorpos neutralizantes foram bastante baixos. Como se desejava obter anticorpos monoclonais neutralizantes, após a última dose de rGERA179-281, os camundongos foram desafiados com vírus rábico cepa PV. Pôde-se verificar que, após o desafio, os animais apresentaram um grande aumento dos títulos de anticorpos neutralizantes. Esses títulos elevados, no entanto, também foram verificados em animais que não haviam sido imunizados com a rGERA179-281, mas que receberam o desafio de vírus (Tabela 3).

Neste terceiro protocolo, foram obtidos quatro hibridomas produtores de anticorpos antirrâbicos, dentre eles, um secretor de anticorpos neutralizantes. Entretanto, apesar de os camundongos terem sido imunizados com a rGERA179-281, esses anticorpos não se ligaram à proteína recombinante, provavelmente devido à grande quantidade de anticorpos produzida contra outros epítomos virais, uma vez que camundongos não imunizados que receberam apenas o desafio com vírus rábico cepa PV também apresentaram resposta imune antirrâbica.

Os dois últimos protocolos, portanto, foram realizados com o intuito de se obter AcM capazes de reconhecer a proteína recombinante e o vírus rábico. Assim, no quarto protocolo, optou-se por utilizar apenas a proteína recombinante para imunização. Para tanto, seis camundongos receberam cinco doses de rGERA179-281. Após a quinta dose, alíquotas de soro dos animais foram coletadas e analisadas por soroneutralização e por ELISA, verificando-se que, apesar de todos os camundongos apresentarem altos títulos de anticorpos anti-rGERA179-281, nenhum apresentou anticorpos antirrâbicos neutralizantes (Tabela 4). Por isso, optou-se por dar uma dose reforço de vírus nos camundongos com maiores títulos de anticorpos no ELISA e um reforço

com rGERA179-281 nos demais. Como, com exceção do soro de um camundongo, os demais soros apresentaram títulos superiores ou iguais a 121500, foram selecionados os três camundongos com maiores valores de D.O. para receber o desafio com vírus.

O desafio com vírus foi administrado na tentativa de aumentar os títulos de anticorpos que reconheciam simultaneamente a rGERA179-281 e o vírus rábico. Para evitar que os camundongos apresentassem uma forte resposta imune contra o vírus, como ocorreu no terceiro protocolo de imunização, a fusão foi realizada três dias após esse reforço.

Pela análise dos soros, pôde-se verificar que, independente do antígeno utilizado na dose reforço, os títulos de anticorpos neutralizantes para o vírus rábico aumentaram (Tabela 4), sugerindo que haviam sido produzidos anticorpos capazes de reconhecer a rGERA179-281 e anticorpos capazes de reconhecer o vírus. Apesar disso, neste quarto protocolo, não foi obtido nenhum hibridoma produtor de anticorpos antirrábicos e, conseqüentemente, também nenhum hibridoma secretando anticorpos que reconhecessem tanto a rGERA179-281, quanto o vírus rábico.

Por isso, no quinto protocolo decidiu-se imunizar os camundongos com rGERA179-281 e com vacina antirrábica. Dessa forma, os soros dos camundongos foram analisados após três doses de rGERA179-281 e duas doses de vacina por meio de soroneutralização e ELISA. Após estas doses, os camundongos apresentaram anticorpos neutralizantes, porém com títulos de anticorpos anti-rGERA179-281 inferiores aos do protocolo quatro (Tabela 5). Por isso, optou-se por administrar uma dose reforço com a proteína recombinante. A administração deste reforço resultou em um aumento dos títulos de anticorpos anti-rGERA179-281, além de aumentar os títulos de anticorpos antirrábicos neutralizantes no soro de três camundongos (Tabela 5). Após a fusão, entretanto, houve uma baixa taxa de formação de hibridomas, quando comparados aos demais protocolos, não sendo obtido nenhum hibridoma estável.

Outra etapa determinante na produção de anticorpos monoclonais é a de triagem. Dentre os poços obtidos após a fusão, normalmente, mais de 50% contêm hibridomas, no entanto, a grande maioria não contém o anticorpo desejado. O principal obstáculo está justamente na identificação do anticorpo com a especificidade desejada. Assim sendo, a finalidade da triagem é descobrir quais poços (<1% a 5%) contêm

hibridomas secretores destes anticorpos de interesse (YOKOYAMA *et al.*, 2006).

Após as fusões realizadas neste trabalho, foi verificado crescimento de hibridomas em 40,8%, 88,7%, 67,5% e 18,8% dos poços, nos protocolos 2 a 5, respectivamente. Na primeira fusão não foi possível determinar o número total de poços com crescimento de hibridomas. Já o percentual de poços positivos por imunofluorescência indireta relativo ao número total de poços nas cinco fusões realizadas foi de 0,8%, 5,5%, 3,7%, 2,0% e 0,6%, respectivamente (Tabela 6). Dentre estes poços positivos, no entanto, muitos hibridomas deixaram de produzir anticorpos, enquanto outros produziam anticorpos que reconheciam componentes da célula BHK-21, ao invés de antígenos do vírus rábico. Assim, ao final do processo, foi obtido um hibridoma secretor de AcM antirrábico na primeira fusão, dois na segunda e quatro na terceira. Nas duas últimas fusões, não foram obtidos AcM contra o vírus rábico.

Sabe-se que, nos primeiros dias após a fusão, o genoma da célula híbrida é instável e que alguns cromossomos são perdidos (KÖHLER; MILSTEIN, 1975; ZOLA, 1987). Esta perda pode incluir cromossomos envolvidos na síntese e secreção de imunoglobulinas, o que resultará em híbridos não secretores (ZOLA, 1987). Também podem ser perdidos os cromossomos relacionados à produção da enzima HGPRT, tornando os hibridomas inaptos a sobreviverem ao cultivo em meio HAT (TAGGART; SAMLOFF, 1983).

Alguns fatores como pH do meio, tensão de oxigênio e o grau de estresse físico e movimento também podem influenciar no sucesso da fusão. O meio de cultura deve ser capaz de prover todos os fatores necessários para a estabilização do hibridoma, recuperação do evento da fusão e eventual adaptação para o crescimento *in vitro* (McCULLOUGH; SPIER, 1990).

Além disso, um problema frequentemente encontrado é que alguns hibridomas podem crescer demais em detrimento de outros. Frequentemente, estas células com crescimento mais rápido não sintetizam anticorpos, resultando na perda do hibridoma desejado (ZOLA, 1987).

Nos três últimos protocolos descritos, camundongos foram imunizados com um fragmento recombinante da glicoproteína do vírus rábico cepa ERA, porém a titulação dos seus soros, bem como os testes de triagem dos hibridomas, foi realizada utilizando vírus rábico cepa PV. Com isso, surge a possibilidade de não serem detectados anticorpos

que reconheçam apenas o vírus rábico cepa ERA. Esta possibilidade, no entanto, foi bastante reduzida, uma vez que em praticamente todos os protocolos, os camundongos receberam doses reforço com vírus cepa PV ou com vacina antirrábica (vírus cepa PM). Além disso, Bassi *et al.* (2008) relataram uma alta similaridade (98%) entre a sequência de aminoácidos da proteína recombinante (rGERA179-281) e a sequência de aminoácidos correspondente do vírus cepa PV.

A grande quantidade de anticorpos contra outros antígenos, que não o de interesse, é a principal desvantagem de se imunizar animais com antígenos não purificados ou com múltiplos antígenos. Nesses casos, mesmo que não sejam encontrados anticorpos com a especificidade desejada, como no caso da quarta fusão descrita neste trabalho, AcM foram produzidos. Infelizmente, este é um resultado típico e é a principal fonte de comprometimento em tempo e trabalho que a produção de AcM requer. Uma solução para este problema é a realização de mais fusões e triagens. Também podem ser consideradas alternativas para a imunização, para a escolha dos animais e para os processos de triagem. Ademais, se o teste de triagem demonstrar muitos poços positivos, provavelmente eles são falso-positivos. Esse percentual de falso-positivos pode diminuir quando os sobrenadantes são testados duas vezes (YOKOYAMA *et al.*, 2006).

No quarto protocolo de fusão, 230 hibridomas (10,9% do total de poços) apresentaram resultado positivo por ELISA (para detecção de anticorpos anti-rGERA179-281), muitos deles com resultado negativo quando testados pela segunda vez (dados não mostrados). Isso sugere que, além da possível perda de estabilidade de parte dos hibridomas, dentre os que apresentaram resultado negativo no segundo teste, parte pode, na realidade, ter apresentado resultado falso-positivo quando testados pela primeira vez.

No quinto protocolo, um percentual bastante reduzido (18,8%) de hibridomas apresentou crescimento após a seleção em meio HAT. Yokoyama *et al.* (2006) relataram que, se hibridomas são gerados em taxas reduzidas, pode ser em função de problemas no crescimento de mielomas, pois isto resulta numa redução do número de mielomas viáveis disponíveis para a fusão. A remoção ineficiente do soro destas células antes da fusão, bem como uma baixa concentração de PEG, também podem afetar a eficiência da fusão (YOKOYAMA *et al.*, 2006). Ademais, as células podem morrer se o tempo de exposição ao PEG for maior que o recomendado (BARTAL; HIRSHAUT, 1987). Embora, aparentemente, nenhum desses problemas tenha ocorrido nesse quinto

protocolo de fusão, essas são algumas possíveis causas para a baixa taxa de crescimento de hibridomas.

A formação e o crescimento de hibridomas podem ainda ser inadequados se as células (esplenócitos ou mielomas) estiverem contaminadas com micoplasma, pois estes organismos degradam a timidina rapidamente, o que pode causar a morte dos hibridomas durante a seleção em meio HAT (YOKOYAMA *et al.*, 2006). Esta é outra possível causa para o reduzido crescimento de hibridomas no quinto protocolo de fusão, pois, no presente trabalho, as células não foram testadas para verificar se havia contaminação por micoplasma.

Por fim, o cultivo dos hibridomas *in vitro* por tempo prolongado pode resultar na perda da produção de AcM (BARNES; BENTLEY; DICKSON, 2003). Para minimizar este problema, alíquotas de células sabidamente produtoras de AcM devem ser congeladas, servindo como fonte de células viáveis sempre que necessário (YOKOYAMA *et al.*, 2006). No presente estudo, a produção de AcM pelos hibridomas não foi quantificada após longos períodos de tempo em cultivo para verificar se havia redução. Já a perda total da produção de AcM não foi verificada para nenhum hibridoma. Apesar disso, alíquotas de células sabidamente positivas encontram-se armazenadas em nitrogênio líquido, para serem utilizadas quando necessário.

5.3 ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTIRRÁBICOS

Desde 1978, quando Wiktor e Koprowski (1978) produziram os primeiros hibridomas originados da fusão de mielomas com esplenócitos de camundongos imunizados contra raiva, anticorpos monoclonais antirrâbicos vêm sendo utilizados para as mais diversas finalidades.

No presente trabalho foram descritas a produção e a caracterização de sete anticorpos monoclonais antirrâbicos. Estes anticorpos foram testados por imunofluorescência indireta sobre decalques de tecido de SNC de camundongos infectados com 35 isolados de vírus rábico selvagem, oriundos de diferentes espécies de animais e provenientes de diferentes regiões do Brasil.

Por este teste, verificou-se que o AcM 6H8 reconheceu todos os isolados de vírus rábico selvagem testados. Além disso, os AcM LIA 02, 3E6 e 9C7 juntos também foram capazes de reconhecer todas as

amostras testadas. O 8B6 reconheceu cerca de metade das amostras, enquanto o 7B7 e o 8D11 reconheceram poucas amostras, apresentando resultado negativo inclusive para o vírus fixo da cepa CVS.

Todos os AcM foram testados por imunofluorescência indireta em células BHK-21 infectadas com o vírus CVS e apresentaram resultado positivo. Este teste apresentou, portanto, resultado diferente do obtido na IFI sobre decalque de tecido de SNC de camundongos infectados com o mesmo vírus CVS. O teste com os AcM 7B7 e 8D11, no entanto, apresentaram resultado fracamente positivo na IFI em células BHK-21, o que significa que o resultado negativo para o vírus CVS, assim como para alguns dos isolados de vírus selvagem, na IFI sobre decalque de tecido de SNC de camundongo pode ter ocorrido por haver uma baixa concentração de AcM no sobrenadante testado. Outra explicação para esta divergência é um possível erro técnico em uma das imunofluorescências realizadas, uma vez que os ensaios não foram repetidos para confirmação dos resultados.

Desde 1978, AcM vêm sendo testados frente a diferentes isolados de vírus rábico, permitindo avanços nos estudos epidemiológicos da raiva. Dessa forma, painéis de AcM vêm contribuindo para a análise da distribuição geográfica do vírus e identificação de espécies animais que servem como hospedeiras e reservatórios (WIKTOR; KOPROWSKI, 1978; SMITH *et al.*, 1986; DIAZ *et al.*, 1994; DE MATTOS *et al.*, 1996; CRAWFORD-MIKSZA; WADFORD; SCHNURR, 1999; DE MATTOS *et al.*, 1999; METLIN *et al.*, 2004). Estudos sobre a antigenicidade de cepas de vírus rábico isoladas no Brasil, utilizando painéis de AcM, foram realizados, por exemplo, por Germano *et al.* (1990), Favoretto *et al.* (2002), Bernard *et al.* (2005) e Schaefer *et al.* (2005). Favoretto *et al.* (2002) observaram que, no Brasil, existem variantes antigênicas que não são compatíveis com o painel de oito AcM utilizado para caracterização antigênica das variantes do vírus rábico presentes nas amostras isoladas na América Latina e no Caribe. Assim, surge a necessidade de incorporar novos anticorpos ao painel de AcM utilizado no Brasil, que sejam capazes de diferenciar estas variantes não compatíveis.

Dentre os AcM produzidos no presente trabalho, os resultados obtidos para o 8B6, em especial, se mostraram promissores para esta finalidade, uma vez que este AcM apresentou resultado positivo para 18 das 35 amostras de vírus rábico selvagem testadas. Os AcM que reconheceram praticamente todas as amostras são mais promissores para ensaios de diagnóstico, por exemplo, que serão discutidos a seguir. Já os

AcM 7B7 e 8D11, que também reconheceram apenas algumas amostras, não foram considerados nesta discussão pois há suspeita de resultados falso-negativos, possivelmente devido a uma baixa concentração de anticorpos nos sobrenadantes testados.

Quando os resultados obtidos para o AcM 8B6 foram comparados com os obtidos utilizando o painel de AcM fornecido pelo CDC, verificou-se que houve certa correlação entre eles, com o AcM 8B6 apresentando resultado positivo para os sete isolados caracterizados como variante 2 e resultado negativo para a maioria dos doze isolados da variante 3 e para os sete da variante não compatível 3*. Resultado mais divergente foi obtido para os isolados da variante 4, com o 8B6 apresentando resultado negativo para dois isolados, fracamente positivo para um isolado e positivo para outro isolado. Neste trabalho, no entanto, foi testado apenas um pequeno número de isolados virais, quando comparado com todos os existentes no Brasil. Assim, estudos mais aprofundados com o 8B6, utilizando um maior número de isolados de vírus rábico selvagem, devem ser realizados para verificar se os resultados obtidos com esse AcM são compatíveis com a caracterização genética das diferentes variantes virais.

Outra aplicação para os AcM é a sua utilização no diagnóstico da raiva. Wiktor, Flamand e Koprowski (1980) utilizaram AcM anti-nucleocapsídeo na identificação do vírus rábico e de alguns vírus relacionados à raiva (*Lagos bat virus*, *Mokola virus* e *Duvenhage virus*) em decalques de tecido cerebral de animais infectados. O uso de AcM pode aumentar a especificidade do teste de imunofluorescência direta (IFD) (WOLDEHIWET, 2005), no entanto, pode reduzir a estabilidade da reação, ou seja, diminuir a intensidade da fluorescência, quando comparado com soros policlonais. Essa redução é verificada apenas quando a leitura das lâminas não é realizada logo depois de terminada a reação e ocorre principalmente porque a homogeneidade de ligação dos AcM ao antígeno pode resultar em uma menor afinidade que os soros policlonais. Além disso, a estabilidade pode ser aumentada por meio de um controle do pH da glicerina tamponada utilizada no preparo das lâminas, o qual deve ser mantido entre 8,5 e 9,0, e o armazenamento das lâminas a 4°C quando a leitura não for realizada logo após o término da reação (DURHAM *et al.*, 1986).

Os resultados obtidos para os AcM LIA 02, 6H8, 3E6 e 9C7, positivos para todos ou quase todos os isolados de vírus selvagem testados, permitem vislumbrar a utilização destes AcM em testes diagnósticos. Assim, um coquetel contendo estes quatro AcM poderia

ser utilizado para a produção de anticorpos conjugados com ITCF, por exemplo, para utilização na IFD. A mistura dos AcM aumenta as chances de reconhecimento de todas as variantes antigênicas do vírus rábico, uma vez que no presente trabalho não foram testadas todas as variantes existentes. Além disso, os AcM também podem ser conjugados com biotina e serem utilizados para diagnóstico por métodos imunohistoquímicos (LEMBO *et al.*, 2006).

Outro método para detecção do vírus rábico consiste no teste de aglutinação em látex. Kasempimolporn *et al.* (2000) sensibilizaram partículas de látex com IgG antirrábica e utilizaram para diagnóstico a partir de saliva de cães. O teste apresentou sensibilidade de 95% e especificidade de 99%, quando comparado com IFD realizada em decalques de tecido cerebral. Apesar de o teste descrito ter sido desenvolvido utilizando IgG purificada a partir de soro equino hiperimune, também é possível a utilização de AcM.

Recentemente, ainda foram desenvolvidos testes imunocromatográficos para diagnóstico da raiva, utilizando AcM anti-nucleoproteína rábica (KANG *et al.*, 2007; NISHIZONO *et al.*, 2008). Estes testes imunocromatográficos são simples e rápidos, podendo ser realizados a partir de amostras de suspensão cerebral ou saliva de animais suspeitos. Testes com outras secreções e fluidos biológicos, como líquido e lágrima, ainda não foram relatados.

Um teste imunocromatográfico para semiquantificar anticorpos neutralizantes presentes no soro de animais imunizados também foi desenvolvido (SHIOTA *et al.*, 2009). Neste teste, o soro do animal é previamente incubado com vírus rábico inativado e, depois, submetido ao teste imunocromatográfico. A ausência de banda na linha teste corresponde à presença de anticorpos neutralizantes em concentração igual ou superior a 0,5 UI/ml, que é a concentração recomendada pela OMS como adequada para prevenção da raiva. No caso deste teste, quaisquer dois AcM que se liguem ao vírus rábico inativado podem ser utilizados, ou seja, todos os AcM descritos nesse trabalho poderiam ser testados para a padronização de um teste imunocromatográfico para quantificar anticorpos neutralizantes. Ensaio imunoenzimático do tipo ELISA competitivo para semiquantificar anticorpos neutralizantes também podem ser padronizados utilizando AcM (ELMGREN; WANDELER, 1996; ZHANG *et al.*, 2009).

Anticorpos monoclonais ainda podem ser utilizados na padronização de ensaios imunoenzimáticos para determinar a potência de vacinas antirrábicas. Estes testes se baseiam na determinação do

conteúdo antigênico das preparações vacinais, por meio da mensuração do conteúdo de glicoproteína (G) e/ou RNP. A maioria dos trabalhos se baseia na quantificação de G, pois é esta proteína a responsável pela indução de anticorpos neutralizantes para o vírus. Lafon *et al.* (1985), por exemplo, utilizaram um AcM anti-G para sensibilizar as placas nas quais seriam testadas as vacinas. Para evitar a quantificação de monômeros de G, que são pouco antigênicos, o mesmo AcM foi conjugado com peroxidase e utilizado para detectar a ligação antígeno-anticorpo. Com isso, apenas antígenos com mais de dois epítomos reconhecidos pelo AcM puderam ser detectados.

Adaptações deste ELISA foram testadas (PERRIN; MORGEAUX; SUREAU, 1990; GAMOH *et al.*, 1996; ROOIJAKKERS *et al.*, 1996; FOURNIER-CARUANA *et al.*, 2003; NAGARAJAN *et al.*, 2006), apresentando boa correlação com o teste do NIH, preconizado pela OMS para esta finalidade (SIZARET, 1996). Rooijackers *et al.* (1996) também desenvolveram um ELISA competitivo, no qual a vacina testada foi primeiramente incubada com um AcM anti-G ou anti-N conjugado com biotina e, a seguir, adicionada a uma placa sensibilizada com vírus rábico inativado. Nesse caso, a quantidade de antígeno na vacina foi determinada por meio da redução de AcM ligados ao vírus presente na placa.

Os AcM produzidos nesse trabalho foram testados por ELISA para verificar quais reconheciam o vírus inativado presente em uma preparação vacinal para uso humano. Neste teste, todos os AcM, com exceção do 8D11, apresentaram resultado positivo. Correlacionando este resultado com aqueles obtidos no teste com diferentes isolados de vírus rábico selvagem, os AcM mais promissores para serem utilizados são o LIA 02, o 6H8, o 3E6 e o 9C7, pois, dessa forma, o antígeno viral será quantificado a partir de epítomos capazes de gerar resposta imune, se não contra todas, pelo menos contra a maioria das cepas de vírus selvagem existentes e não apenas contra a cepa utilizada na preparação da vacina (normalmente a cepa PV ou a PM). Antes destes AcM serem utilizados na padronização de um ELISA para determinar a potência de vacinas antirrábicas, no entanto, eles devem ser testados para verificar se também reconhecem diferentes vírus vacinais para uso veterinário e humano. Recentemente foi estabelecido um acordo entre o LIA (Laboratório de Imunologia Aplicada/UFSC) e o LANAGRO (Laboratório Nacional Agropecuário) e o INCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde) para que estes forneçam diferentes lotes de vacinas cujos valores de potência obtidos pelo teste do NIH já

tenham sido determinados. Assim, uma vez disponibilizadas essas vacinas, poderá ser iniciada a padronização de um ensaio imunoenzimático para determinar a potência de vacinas antirrábicas.

A utilização no tratamento pós-exposição também é uma possível aplicação para AcM. A atividade protetora de alguns coquetéis de AcM vem sendo investigada (SCHUMACHER *et al.*, 1989; ENSSLE *et al.*, 1991; CHAMPION *et al.*, 2000; BAKKER *et al.*, 2008; MÜLLER *et al.*, 2009), porém ainda não foi desenvolvido nenhum coquetel de AcM para substituir o uso da HRIG e da ERIG. Dentre os AcM descritos neste trabalho, o 8D11 apresentou atividade neutralizante e, dessa forma, poderiam ter sua atividade protetora investigada.

Müller *et al.* (2009) descreveram algumas características para potenciais candidatos a utilização no tratamento pós-exposição, dentre elas, possuir um título neutralizante de no mínimo 100 UI/ml e possuir certa estabilidade, de maneira que a perda na secreção de AcM não exceda 10% após mais de 30 passagens. Além disso, o AcM deve se ligar a um amplo espectro de cepas de vírus rábico (genotipo 1) e ser preferencialmente do isotipo IgG1, IgG2a ou IgG3. O sobrenadante de cultura do hibridoma 8D11 testado apresentou um título neutralizante de 2,25 UI/ml, ou seja, algum método para concentração de AcM precisaria ser utilizado caso este AcM apresentasse atividade protetora contra o vírus. O AcM é do isotipo IgG2a, porém, ele não reconheceu a maioria dos isolados de vírus rábico testados neste trabalho por IFI realizada sobre decalques de tecido de SNC de animais infectados, o que, conforme mencionado anteriormente, pode ser decorrente da baixa concentração de anticorpos. Ademais, estudos sobre a estabilidade do AcM devem ser realizados.

6 SUMÁRIO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

- A proteína recombinante rGERA179-281 foi expressa em *Escherichia coli* cepa BL-21 Códon Plus, sendo obtido um rendimento de aproximadamente 3,44 mg de proteína por litro de cultivo celular;
- Foram gerados sete hibridomas produtores de anticorpos antirrábicos, que, após duas clonagens por diluição limitante, foram denominados LIA 02, 6H8, 7B7, 3E6, 8D11, 9C7 e 8B6;
- Os AcM 6H8, 8D11 e 8B6 foram caracterizados como sendo do isotipo IgG2a; o 7B7 e o 9C7, como IgM; o LIA 02 como IgG2b; e o 3E6 como IgG3;
- O AcM 8D11 foi capaz de neutralizar o vírus rábico cepa PV *in vitro*;
- O AcM 7B7 foi o único que reconheceu a rGERA179-281;
- O AcM 6H8 reconheceu os 35 isolados de vírus rábico selvagem testados neste trabalho;
- Os AcM LIA 02, 3E6 e 9C7 juntos também foram capazes de reconhecer os 35 isolados virais;
- O AcM 8B6 reconheceu cerca de metade dos isolados virais, enquanto o 7B7 e o 8D11 reconheceram poucos isolados;
- Com exceção do 8D11, os demais AcM se ligaram à cepa de vírus presente na vacina VeroRab[®].

7 CONCLUSÕES

O presente trabalho de dissertação de mestrado resultou na obtenção de sete hibridomas secretores de anticorpos monoclonais antirrâbicos, que foram denominados LIA 02 (IgG2b), 6H8 (IgG2a), 7B7 (IgM), 3E6 (IgG3), 8D11 (IgG2a), 9C7 (IgM) e 8B6 (IgG2a). Dentre eles, o 8D11 foi capaz de neutralizar o vírus rábico cepa PV *in vitro* e o 7B7 reconheceu a proteína recombinante rGERA179-281, sugerindo que se tratam de AcM específicos contra a glicoproteína rábica. Além disso, o 6H8 reconheceu os 35 isolados de vírus rábico selvagem testados neste trabalho, da mesma forma que os AcM LIA 02, 3E6 e 9C7 juntos e, com exceção do 8D11, os demais AcM reconheceram o vírus rábico presente na vacina VeroRab[®]. Estes resultados permitem vislumbrar a utilização desses AcM no diagnóstico da raiva e na padronização de imunoenaios, como, por exemplo, um ensaio imunoenzimático para determinar a potência de vacinas antirrâbicas.

8 PERSPECTIVAS

- Caracterizar as especificidades dos anticorpos monoclonais por *Western blotting*;

Alíquotas dos AcM foram enviadas ao Instituto Pasteur de Paris para realização destas análises.

- Realizar estudos da reatividade dos AcM com um maior número de isolados de vírus rábico selvagem, para verificar se algum deles pode ser utilizado na caracterização de variantes virais, auxiliando assim em estudos epidemiológicos da raiva;

- Concentrar e purificar os AcM e conjugá-los com ITCF para utilização no diagnóstico da raiva;

- Padronizar ensaios (ELISA, imunocromatografia, aglutinação em látex) para detecção de antígenos do vírus rábico em amostras suspeitas;

- Padronizar ensaios (ELISA, imunocromatografia) para quantificação de anticorpos neutralizantes no soro de animais e seres humanos vacinados;

- Padronizar ensaios (ELISA) para determinar a potência de vacinas antirrábicas para uso humano e veterinário;

- Investigar a atividade protetora do AcM 8D11 contra o vírus rábico, para uma possível utilização na profilaxia da raiva.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and molecular immunology**. 5. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2003.
- AKACEM, O.; BENMANSOUR, A.; COULON, P.; BRAHIMI, M.; BENHASSINE, M. Production of monoclonal antibodies against a wild strain of rabies virus. **Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie**, v. 58, p. 283-290, 1992.
- BAKKER, A. B. H.; MARISSSEN, W. E.; KRAMER, R. A.; RICE, A. B.; WELDON, W. C.; NIEZGODA, M.; HANLON, C. A.; THUISSE, S.; BACKUS, H. H.; KRUIF, J.; DIETZSCHOLD, B.; RUPPRECHT, C. E.; GOUDSMIT, J. Novel human monoclonal antibody combination effectively neutralizing natural rabies virus variants and individual in vitro escape mutants. **Journal of virology**, v. 79, n. 14, p. 9062-9068, 2005.
- BAKKER, A. B. H.; PYTHON, C.; KISSLING, C. J.; PANDYA, P.; MARISSSEN, W. E.; BRINK, M. F.; LAGERWERF, F.; WORST, S.; VAN CORVEN, E.; KOSTENSE, S.; HARTMANN, K.; WEVERLING, G. J.; UYTDEHAAG, F.; HERZOG, C.; BRIGGS, D. J.; RUPPRECHT, C. E.; GRIMALDI, R.; GOUDSMIT, J. First administration to humans of a monoclonal antibody cocktail against rabies virus: Safety, tolerability, and neutralizing activity. **Vaccine**, v. 26, p. 5922-5927, 2008.
- BARNES, L. M.; BENTLEY, C. M.; DICKSON, A. J. Stability of protein production from recombinant mammalian cells. **Biotechnology and bioengineering**, v. 81, n. 6, p. 631-639, 2003.
- BARTAL, A. H.; HIRSHAUT, Y. Current methodologies in hybridoma formation. In: BARTAL, A. H.; HIRSHAUT, Y. (Ed.). **Methods of hybridoma formation**. Clifton: The human press inc., 1987. p. 1-40.
- BARTH, R.; DIDERRICH, G.; WEINMANN, E. NIH test, a problematic method for testing potency of inactivated rabies virus vaccine. **Vaccine**, v. 6, p. 369-377, 1988.

BASSI, E. J. **Expressão, purificação e caracterização imunológica de um fragmento recombinante (resíduos 179-281) da proteína G do vírus rábico**. 2008. 120 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

BASSI, E. J.; VERNAL, J.; ZANLUCA, C.; TERENCEZI, H.; ZANETTI, C. R. Expression, purification and immunodetection of a recombinant fragment (residues 179-281) of the G protein from rabies virus ERA strain. **Protein expression and purification**, v. 59, p. 309-313, 2008.

BENMANSOUR, A.; LEBLOIS, H.; COULON, P.; TUFFEREAU, C.; GAUDIN, Y.; FLAMAND, A.; LAFAY, F. Antigenicity of rabies virus glycoprotein. **Journal of virology**, v. 65, n. 8, p. 4198-4203, 1991.

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

BOURHY, H.; KISSI, B.; LAFON, M.; SACRAMENTO, D.; TORDO, N. Antigenic and molecular characterization of bat rabies virus in Europe. **Journal of clinical microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2419-2426, 1992.

BOURHY, H.; KISSI, B.; TORDO, N. Molecular diversity of the *Lyssavirus* genus. **Virology**, v. 194, p. 70-81, 1993.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Raiva humana transmitida por morcegos no Estado do Pará e Maranhão**, 2005. Nota técnica. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_raiva.pdf>. Acesso em: 23 dez. 2009.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.
Programa nacional de vigilância, controle e profilaxia da raiva,
Apresentação de seminário, atualizada em mar. 2009.

BUSSEREAU, F.; VINCENT, J.; COUDRIER, D.; SUREAU, P.
Monoclonal antibodies to Mokola virus for identification of rabies and
rabies-related viruses. **Journal of clinical microbiology**, v. 26, n. 12, p.
2489-2494, 1988.

CARNIELI, P. J.; BRANDÃO, P. E.; CARRIERI, M. L.; CASTILHO,
J. G.; MACEDO, C. I.; MACHADO, L. M.; RANGEL, N.;
CARVALHO, R. C.; CARVALHO, V. A.; MONTEBELLO, L.;
WADA, M.; KOTAIT, I. Molecular epidemiology of rabies virus strains
isolated from wild canids in Northeastern Brazil. **Virus research**, v.
120, n. 1-2, p. 113-120, 2006.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **The rabies virus**,
2003. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/rabies/virus.html>>. Acesso
em: 22 dez. 2009.

CELIS, E.; OU, D.; DIETZSCHOLD, B.; KOPROWSKI, H.
Recognition of rabies and rabies-related viruses by T cells derived from
human vaccine recipients. **Journal of virology**, v. 62, n. 9, p. 3128-
3134, 1988.

CHAMPION, J. M.; KEAN, R. B.; RUPPRECHT, C. E.; NOTKINS, A.
L.; KOPROWSKI, H.; DIETZSCHOLD, B.; HOOPER, D. C. The
development of monoclonal human rabies virus-neutralizing antibodies
as a substitute for pooled human immune globulin in the prophylactic
treatment of rabies virus exposure. **Journal of immunological
methods**, v. 235, p. 81-90, 2000.

CHENIK, M.; SCHNELL, M.; CONZELMANN, K. K.; BLONDEL, D.
Mapping the interacting domains between the rabies virus polymerase
and phosphoprotein. **Journal of virology**, v. 72, n. 3, p. 1925-1930,
1998.

CHIARELLA, P.; FAZIO, V. M. Mouse monoclonal antibodies in
biological research: strategies for high-throughput production.
Biotechnology letters, v. 30, p. 1303-1310, 2008.

CIANFRIGLIA, M.; NUTI, M.; TURCHI, V.; BARCA, S.; TOMBESI, M.; MORRONE, S.; CENCIARELLI, C.; NATALI, P. G. High frequency production of hybridomas secreting antibodies to cell antigens. **Hybridoma**, v. 6, n. 6, p. 673-677, 1987.

CLEAVELAND, S.; FÈVRE, E. M.; KAARE, M.; COLEMAN, P. G. Estimating human rabies mortality in the United Republic of Tanzania from dog bite injuries. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 80, p. 304-310, 2002.

COX, J. H.; DIETZSCHOLD, B.; SCHNEIDER, L. G. Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. **Infection and immunity**, v. 16, n. 3, p. 754-759, 1977.

CRAWFORD-MIKSZA, L. K.; WADFORD, D. A.; SCHNURR, D. P. Molecular epidemiology of enzootic rabies in California. **Journal of clinical virology**, v. 14, p. 207-219, 1999.

DAVIE, J. M. Hybridomas: a revolution in reagent production. **Pharmacological reviews**, v. 34, n. 1, p. 115-118, 1982.

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

DE MATTOS, C. C.; DE MATTOS, C. A.; LOZA-RUBIO, E.; AGUILAR-SETIÉN, A.; ORCIARI, L. A.; SMITH, J. S. Molecular characterization of rabies virus isolates from Mexico: implications for transmission dynamics and human risk. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 61, n. 4, p. 587-597, 1999.

DEAN, D. J.; ABELSETH, M. K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. *In*: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Ed.). **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 88-95.

DIAZ, A. M.; PAPO, S.; RODRIGUEZ, A.; SMITH, J. S. Antigenic analysis of rabies-virus isolates from Latin America and the Caribbean. **Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B**, v. 41, p. 153-160, 1994.

DURHAM, T. A.; SMITH, J. S.; REID, F. L.; HALE-SMITH, C. T.; FEARS, M. B. Stability of immunofluorescence reactions produced by polyclonal and monoclonal antibody conjugates for rabies virus. **Journal of clinical microbiology**, v. 24, n. 2, p. 301-303, 1986.

ELMGREN, L. D.; WANDELER, A. I. Competitive ELISA for the detection of rabies virus-neutralizing antibodies. *In*: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Ed.). **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 200-208.

ENSSLE, K.; KURRLE, R.; KÖHLER, R.; MÜLLER, H.; KANZY, E. J.; HILFENHAUS, J.; SEILER, F. R. A rabies-specific human monoclonal antibody that protects mice against a lethal rabies. **Hybridoma**, v. 10, n. 5, p. 547-556, 1991.

FABER, M.; PULMANAUSAHAKUL, R.; HODAWADEKAR, S. S.; SPITSIN, S.; MCGETTIGAN, J. P.; SCHNELL, M. J.; DIETZSCHOLD, B. Overexpression of the rabies virus glycoprotein results in enhancement of apoptosis and antiviral immune response. **Journal of virology**, v. 76, n. 7, p. 3374-3381, 2002.

FALKENBERG, F. W. Production of monoclonal antibodies in the miniPERM™ bioreactor: comparison with other hybridoma culture methods. **Research in immunology**, v. 149, n. 6, p. 560-570, 1998.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A. The 7th ICVT Report. **Archives of virology**, v. 146, n. 1, p. 189-194, 2001.

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 virus samples isolated from animals and human, 1989-2000. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 2, p. 91-95, 2002.

FAVORETTO, S. R.; CARRIERI, M. L.; TINO, M. S.; ZANETTI, C. R.; PEREIRA, O. A. Simplified fluorescent inhibition microtest for the titration of rabies neutralizing antibodies. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, n. 2, p. 171-175, 1993.

FLAMAND, A.; WIKTOR, T. J.; KOPROWSKI, H. Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies-related virus proteins. I: the nucleocapsid protein. **Journal of general virology**, v. 48, p. 97-104, 1980a.

_____. Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies-related virus proteins. II: the glycoprotein. **Journal of general virology**, v. 48, n. 105-109, 1980b.

FLI. Friedrich-Loeffler-Institut. Rabies-Bulletin-Europe. Rabies Information System of the WHO Collaboration Centre for Rabies Surveillance and Research. **Virus Structure**, 2006. Disponível em: <http://www.who-rabies-bulletin.org/About_Rabies/Virus_Structure.aspx>. Acesso em: 22 dez. 2009.

FOURNIER-CARUANA, J.; POIRIER, B.; HAOND, G.; JALLET, C.; FUCHS, F.; TORDO, N.; PERRIN, P. Inactivated rabies vaccine control and release: use of an ELISA method. **Biologicals**, v. 31, p. 9-16, 2003.

FU, Z. F. Rabies and rabies research: past, present and future. **Vaccine**, v. 15, p. S20-S24, 1997.

GAMOH, K.; SENDA, M.; ITOH, O.; MURAMATSU, M.; HIRAYAMA, N.; KOIKE, R.; ENDOH, Y. S.; MINAMOTO, N. Use of ELISA for *in vitro* potency test of rabies vaccines for animal use. **Biologicals**, v. 24, p. 95-101, 1996.

GAUDIN, Y.; MOREIRA, S.; BÉNÉJEAN, J.; BLONDEL, D.; FLAMAND, A.; TUFFEREAU, C. Soluble ectodomain of rabies virus glycoprotein expressed in eukariotic cells folds in a monomeric conformation that is antigenically distinct from the native state of the complete, membrane-anchored glycoprotein. **Journal of general virology**, v. 80, p. 1647-1656, 1999.

GERMANO, P. M.; SILVA, E. V.; MIGUEL, O.; SUREAU, P. Antigenic variants of rabies virus isolated in the northeast and southeast of Brazil. Preliminary study. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 108, n. 1, p. 39-45, 1990.

GOTO, H.; MINAMOTO, N.; ITO, H.; ITO, N.; SUGIYAMA, M.; KINJO, T.; KAWAI, A. Mapping of epitopes and structural analysis of antigenic sites in the nucleoprotein of rabies virus. **Journal of general virology**, v. 81, p. 119-127, 2000.

GOULD, A. R.; HYATT, A. D.; LUNT, R.; KATTENBELT, J. A.; HENGSTBERGER, S.; BLACKSELL, S. D. Characterisation of a novel lyssavirus isolated from *Pteropid* bats in Australia. **Virus research**, v. 54, p. 165-187, 1998.

GUPTA, A. K.; BLONDEL, D.; CHOUDHARY, S.; BANERJEE, A. K. The phosphoprotein of rabies virus is phosphorylated by a unique cellular protein kinase and specific isomers of protein kinase C. **Journal of virology**, v. 74, n. 1, p. 91-98, 2000.

HALE, G. Therapeutic antibodies - delivering the promise? **Advanced drug delivery reviews**, v. 58, p. 633-639, 2006.

HANKINS, D. G.; ROSEKRANS, J. A. Overview, prevention, and treatment of rabies. **Mayo clinic proceedings**, v. 79, p. 671-676, 2004.

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

HIRAMATSU, K.; MIFUNE, K.; MANNEN, K.; NISHIZONO, A.; KAWANO, H.; ITO, Y.; KAWAI, A. Mapping of the antigenic determinants recognized by monoclonal antibodies against the M2 protein of rabies virus. **Virology**, v. 187, p. 472-479, 1992.

JACKSON, A. C. Human disease. *In*: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. (Ed.). **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2002a. p. 219-244.

_____. Pathogenesis. *In*: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. (Ed.). **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2002b. p. 245-282.

_____. Rabies. **Neurologic clinics**, v. 26, p. 717-726, 2008.

JAIN, E.; KUMAR, A. Upstream processes in antibody production: evaluation of critical parameters. **Biotechnology advances**, v. 26, p. 46-72, 2008.

KANE, J. F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Current opinion in biotechnology**, v. 6, p. 494-500, 1995.

KANG, B. K.; OH, J. S.; LEE, C. S.; PARK, B. K.; PARK, Y. N.; HONG, K. S.; LEE, K. G.; CHO, B. K.; SONG, D. S. Evaluation of a rapid immunodiagnostic test kit for rabies virus. **Journal of virological methods**, v. 145, p. 30-36, 2007.

KASEMPIMOLPORN, S.; SAENGSEESOM, W.; LUMLERTDACHA, B.; SITPRIJA, V. Detection of rabies virus antigen in dog saliva using a latex agglutination test. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 8, p. 3098-3099, 2000.

KAWAI, A.; TORIUMI, H.; TOCHIKURA, T. S.; TAKAHASHI, T.; HONDA, Y.; MORIMOTO, K. Nucleocapsid formation and/or subsequent conformational change of rabies virus nucleoprotein (N) is a prerequisite step for acquiring the phosphatase-sensitive epitope of monoclonal antibody 5-2-26. **Virology**, v. 263, p. 395-407, 1999.

KENNETT, R. H. Hybridomas: a new dimension in biological analyses. **In vitro**, v. 17, n. 12, p. 1036-1050, 1981.

KING, A. A. Cell culture of rabies virus. *In*: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Ed.). **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 114-130.

KING, A. A.; TURNER, G. S. Rabies: a review. **Journal of comparative pathology**, v. 108, p. 1-39, 1993.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p. 495-497, 1975.

KOTAIT, I.; CARRIERI, M. L.; TAKAOKA, N. Y. **Raiva - aspectos gerais e clínicos**. São Paulo: Instituto Pasteur, 2009.

- KOUZNETZOFF, A.; BUCKLE, M.; TORDO, N. Identification of a region of the rabies virus N protein involved in direct binding to the viral RNA. **Journal of general virology**, v. 79, p. 1005-1013, 1998.
- 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**, v. 149, p. 197-210, 2010.
- KUZMIN, I. V.; NOVELLA, I. S.; DIETZGEN, R. G.; PADHI, A.; RUPPRECHT, C. E. The rhabdoviruses: Biodiversity, phylogenetics, and evolution. **Infection, genetics and evolution**, v. 9, p. 541-553, 2009.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAFON, M. Techniques for the production, screening and characterization of monoclonal antibodies. *In*: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Ed.). **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 133-144.
- LAFON, M.; PERRIN, P.; VERSMISSE, P.; SUREAU, P. Use of a monoclonal antibody for quantitation of rabies vaccine glycoprotein by enzyme immunoassay. **Journal of biological standardization**, v. 13, n. 4, p. 295-301, 1985.
- LAFON, M.; WIKTOR, T. J. Antigenic sites on the ERA rabies virus nucleoprotein and non-structural protein. **Journal of general virology**, v. 66, p. 2125-2133, 1985.
- LAHAYE, X.; VIDY, A.; POMIER, C.; OBIANG, L.; HARPER, F.; GAUDIN, Y.; BLONDEL, D. Functional characterization of nuclear bodies (NBs) in rabies virus-infected cells: evidence that NBs are sites of viral transcription and replication. **Journal of virology**, v. 83, n. 16, p. 7948-7958, 2009.
- LEMBO, T.; NIEZGODA, M.; VELASCO-VILLA, A.; CLEVELAND, S.; ERNEST, E.; RUPPRECHT, C. E. Evaluation of a

direct, rapid immunohistochemical test for rabies diagnosis. **Emerging infectious diseases**, v. 12, n. 2, p. 310-313, 2006.

LONBERG, N. Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms. **Current opinion in immunology**, v. 20, p. 450-459, 2008.

MACFARLAN, R. I.; DIETZSCHOLD, B.; KOPROWSKI, H. Stimulation of cytotoxic T-lymphocytes responses by rabies virus glycoprotein and identification of an immunodominant domain. **Molecular immunology**, v. 23, n. 7, p. 733-741, 1986.

MARQUES, J. M. B. **Epidemiologia e importância sócio-econômica da raiva dos herbívoros no litoral norte catarinense**. 2000. 62 f. Monografia (Especialização em Saúde Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, 2000.

MCCULLOUGH, K. C.; SPIER, R. E. Factors affecting successful hybridoma production. In: MCCULLOUGH, K. C.; SPIER, R. E. (Ed.). **Monoclonal antibodies in biotechnology: Theoretical and practical aspects**. Cambridge: Great Britain at the University Press, 1990. p. 138-184.

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. (Ed.). **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 9-27.

METLIN, A. E.; COX, J.; RYBAKOV, S. S.; HUOVILAINEN, A.; GROUZDEV, K. N.; NEUVONEN, E. Monoclonal antibody characterization of rabies virus isolates from Russia, Finland and Estonia. **Journal of veterinary medicine B**, v. 51, p. 94-96, 2004.

MOTOI, Y.; SATO, K.; HATTA, H.; MORIMOTO, K.; INOUE, S.; YAMADA, A. Production of rabies neutralizing antibody in hen's eggs using a part of the G protein expressed in *Escherichia coli*. **Vaccine**, v. 23, p. 3026-3032, 2005.

MÜLLER, T.; DIETZSHOLD, B.; ERTL, H.; FOOKS, A. R.; FREULING, C.; FEHLNER-GARDINER, C.; KLIEMT, J.; MESLIN, F. X.; RUPPRECHT, C. E.; TORDO, N.; WANDERLER, A. I.; KIENY, M. P. Development of a mouse monoclonal antibody cocktail for post-exposure rabies prophylaxis in humans. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 11, p. e542, 2009.

NADIN-DAVIS, S. A.; FEHLNER-GARDINER, C. Lyssaviruses - Current Trends. **Advances in virus research**, v. 71, p. 207-250, 2008.

NADIN-DAVIS, S. A.; SHEEN, M.; ABDEL-MALIK, M.; ELMGREN, L.; ARMSTRONG, J.; WANDELER, A. I. A panel of monoclonal antibodies targeting the rabies virus phosphoprotein identifies a highly variable epitope of value for sensitive strain discrimination. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 4, p. 1397-1403, 2000.

NAGARAJAN, T.; REDDY, G. S.; SUBRAMANIAN, B. M.; RAJALAKSHMI, S.; THIAGARAJAN, D.; TORDO, N.; JALLET, C.; SRINIVASAN, V. A. A simple immuno-capture ELISA to estimate rabies viral glycoprotein antigen in vaccine manufacture. **Biologicals**, v. 34, p. 21-27, 2006.

NISHIZONO, A.; KHAWPLOD, P.; AHMED, K.; GOTO, K.; SHIOTA, S.; MIFUNE, K.; YASUI, T.; TAKAYAMA, K.; KOBAYASHI, Y.; MANNEN, K.; TEPSUMETHANON, V.; MITMOONPITAK, C.; INOUE, S.; MORIMOTO, K. A simple and rapid immunochromatographic test kit for rabies diagnosis. **Microbiology and immunology**, v. 52, p. 243-249, 2008.

NOWINSKI, R. C.; TAM, M. R.; GOLDSTEIN, L. C.; STONG, L.; KUO, C. C.; COREY, L.; STAMM, W. E.; HANDSFIELD, H. H.; KNAPP, J. S.; HOLMES, K. K. Monoclonal antibodies for diagnosis of infectious diseases in humans. **Science**, v. 219, n. 4585, p. 637-644, 1983.

PERRIN, P. Techniques for the preparation of rabies conjugates. *In*: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Ed.). **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 433-444.

PERRIN, P.; MORGEAUX, S.; SUREAU, P. *In vitro* rabies vaccine potency appraisal by ELISA: advantages of the immunocapture method with a neutralizing anti-glycoprotein monoclonal antibody. **Biologicals**, v. 18, n. 4, p. 321-330, 1990.

PIZA, A. S. T.; SANTOS, J. L.; CHAVES, L. B.; ZANETTI, C. R. An ELISA suitable for the detection of rabies virus antibodies in serum samples from human vaccinated with either cell-culture vaccine or suckling-mouse-brain vaccine. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, n. 1, p. 39-43, 1999.

PROSNIAK, M.; FABER, M.; HANLON, C. A.; RUPPRECHT, C. E.; HOOPER, D. C.; DIETZSHOLD, B. Development of a cocktail of recombinant-expressed human rabies virus-neutralizing monoclonal antibodies for postexposure prophylaxis of rabies. **The journal of infectious diseases**, v. 188, p. 53-56, 2003.

RAUX, H.; ISENI, F.; LAFAY, F.; BLONDEL, D. Mapping of monoclonal antibody epitopes of the rabies virus P protein. **Journal of general virology**, v. 78, p. 119-124, 1997.

REICHERT, J. M.; ROSENSWEIG, C. J.; FADEN, L. B.; DEWITZ, M. C. Monoclonal antibody successes in the clinic. **Nature biotechnology**, v. 23, n. 9, p. 1073-1078, 2005.

ROOIJAKKERS, E. J. M.; UITTENBOGAARD, J. P.; GROEN, J.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Rabies vaccine potency control: comparison of ELISA systems for antigenicity testing. **Journal of virological methods**, v. 58, p. 111-119, 1996.

RUPPRECHT, C. E.; HANLON, C. A.; HEMACHUDHA, T. Rabies: re-examined. **The lancet infectious diseases**, v. 2, p. 327-343, 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHNELL, M. J.; MCGETTIGAN, J. P.; WIRBLICH, C.; PAPANERI, A. The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. **Nature reviews microbiology**, v. 8, n. 1, p. 51-61, 2010.

SCHUMACHER, C. L.; DIETZSCHOLD, B.; ERTL, H. C. J.; NIU, H.-S.; RUPPRECHT, C. E.; KOPROWSKI, H. Use of mouse anti-rabies monoclonal antibodies in postexposure treatment of rabies. **The journal of clinical investigation**, v. 84, p. 971-975, 1989.

SHIOTA, S.; MANNEN, K.; MATSUMOTO, T.; YAMADA, K.; YASUI, T.; TAKAYAMA, K.; KOBAYASHI, Y.; HKHAWPLOD, P.; GOTOH, K.; AHMED, K.; IHA, H.; NISHIZONO, A. Development and evaluation of a rapid neutralizing antibody test for rabies. **Journal of virological methods**, v. 161, p. 58-62, 2009.

SIZARET, P. General considerations in testing the safety and potency of rabies vaccines. *In*: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Ed.). **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 355-359.

SMITH, J. S.; REID-SANDEN, F. L.; ROUMILLAT, L. F.; TRIMARCHI, C.; CLARK, K.; BAER, G. M.; WINKLER, W. G. Demonstration of antigenic variation among rabies virus isolates by using monoclonal antibodies to nucleocapsid proteins. **Journal of clinical microbiology**, v. 24, n. 4, p. 573-580, 1986.

SOKOL, F.; SCHLUMBERGER, H. D.; WIKTOR, T. J.; KOPROWSKI, H.; HUMMELER, K. Biochemical and biophysical studies on the nucleocapsid and on the RNA of rabies virus. **Virology**, v. 38, p. 651-665, 1969.

TAGGART, R. T.; SAMLOFF, I. M. Stable antibody-producing murine hybridomas. **Science**, v. 219, n. 4589, p. 1228-1230, 1983.

TAKAYAMA, N. Rabies: a preventable but incurable disease. **Journal of infection and chemotherapy**, v. 14, p. 8-14, 2008.

TORDO, N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. *In*: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Ed.). **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 28-51.

TRIMARCHI, C. V.; SMITH, J. S. Diagnostic evaluation. *In*: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. (Ed.). **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2002. p. 307-349.

WADE, N. Hybridomas: the making of a revolution. **Science**, v. 215, n. 4536, p. 1073-1075, 1982.

WARREL, M. J. Emerging aspects of rabies infection: with a special emphasis on children. **Current opinion in infectious disease**, v. 21, n. 3, p. 251-257, 2008.

WARREL, M. J.; WARREL, D. A. Rabies and other lyssavirus diseases. **The lancet**, v. 363, p. 959-969, 2004.

WEBER, K.; OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **The journal of biological chemistry**, v. 244, n. 16, p. 4406-4412, 1969.

WEBSTER, W. A.; CASEY, G. A. Virus isolation in neuroblastoma cell culture. *In*: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKY, H. (Ed.). **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 96-104.

WHO. World Health Organization. **Rabies**, 2008. Disponível em: <<http://who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/print.html>>. Acesso em: 14 dez. 2009.

_____. World Health Organization. WHO Technical Report Series 931. **WHO Expert Consultation on Rabies: First Report**, World Health Organization: Geneva, 2005.

WIKTOR, T. J.; FLAMAND, A.; KOPROWSKI, H. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of rabies virus infections and differentiation of rabies and rabies-related viruses. **Journal of virological methods**, v. 1, p. 33-46, 1980.

WIKTOR, T. J.; KOPROWSKI, H. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization: detection of antigenic variants. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 75, n. 8, p. 3938-3942, 1978.

WILKINSON, L. History. *In*: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. (Ed.). **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2002. p. 1-22.

WOLDEHIWET, Z. Clinical laboratory advances in the detection of rabies virus. **Clinica chimica acta**, v. 351, p. 49-63, 2005.

WUNNER, W. H. Rabies virus. *In*: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. (Ed.). **Rabies**. San Diego: Academic Press, 2002. p. 23-77.

YELTON, D. E.; SCHARFF, M. D. Monoclonal antibodies: a powerful new tool in biology and medicine. **Annual review of biochemistry**, v. 50, p. 657-680, 1981.

YOKOYAMA, W. M.; CHRISTENSEN, M.; SANTOS, G.; MILLER, D. Production of monoclonal antibodies. *In*: COLIGAN, J. E.; BIERE, B. E.; MARGULIES, D. H.; SHEVACH, E. M.; STROBER, W.; COICO, R. (Ed.). **Current protocols in immunology**: John Wiley & Sons, 2006. p. 2.5.1-2.5.25.

YOO, E. M.; CHINTALACHARUVU, K. R.; PENICHERET, M. L.; MORRISON, S. L. Myeloma expression systems. **Journal of immunological methods**, v. 261, p. 1-20, 2002.

ZHANG, S.; LIU, Y.; ZHANG, F.; HU, R. Competitive ELISA using a rabies glycoprotein-transformed cell line to semi-quantify rabies neutralizing-related antibodies in dogs. **Vaccine**, v. 27, p. 2108-2113, 2009.

ZOLA, H. Making hybridomas. *In*: ZOLA, H. (Ed.). **Monoclonal antibodies: A manual of techniques**. Boca Raton: CRC Press, 1987. p. 23-62.