

Pedro Carnieli Junior

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE VÍRUS DA RAIVA ISOLADOS DE
BOVINOS E EQÜÍNOS NO PERÍODO DE 1997-2002 EM ÁREA
EPIDÊMICA DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria do Controle de Doenças da Secretaria de Estado de Saúde, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Profa. Dra. Maria do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky

São Paulo

2009

Pedro Carnieli Junior

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE VÍRUS DA RAIVA ISOLADOS DE
BOVINOS E EQÜÍNOS NO PERÍODO DE 1997-2002 EM ÁREA
EPIDÊMICA DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Coordenadoria do Controle de Doenças da
Secretaria de Estado de Saúde, para a obtenção do Título
de Doutor em Ciências

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Profa. Dra. Maria do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky

São Paulo

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Carnieli Junior, Pedro

Caracterização genética do vírus da raiva isolados de bovinos e eqüinos no período de 1997 a 2002, em área epidêmica do Estado de São Paulo, Brasil / Pedro Carnieli Junior - São Paulo, 2009.

Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública
Orientadora: Maria do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky

1. Lyssavirus 2. Vírus da raiva 3. Quirópteros 4. Bovinos 5. Epidemiologia molecular 6. Filogenia

SES/CCD/CD-219/09

Folha de Avaliação

Nome do autor: Carnieli Jr, Pedro

Título: Caracterização genética do vírus da raiva isolados de bovinos e eqüinos no período de 1997-2002 em uma área epidêmica do Estado de São Paulo, Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Coordenadoria do Controle de Doenças da Secretaria de Estado de Saúde,
para a obtenção do Título de Doutor em Ciências

Data: 19 de dezembro de 2009

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky (Orientador)

Prof. Dr. Luis Fernando de Macedo Brígido – PPG – CCD (Memória)

Prof. Dr. Edson Durigon – USP

Prof^a. Dr^a. Silvana Regina Favoretto – IP – USP

rof. Dr. Fumio Homa Ito – USP (Memória)



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CEPIAL

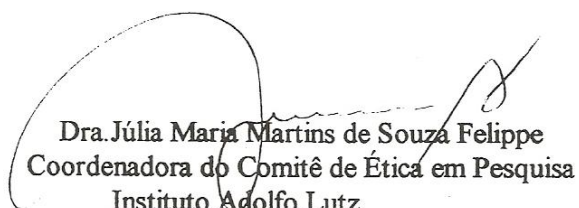
São Paulo, 23 de outubro de 2006.

Ilmo. (a) Sr.(a): **MARIA DO CARMO SAMPAIO TAVARES TIMENETSY**
PEDRO CARNIELI JR.

Coordenador (a) do Projeto de Pesquisa: **CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE VÍRUS DA RAIVA ISOLADOS DE BOVINOS NO PERÍODO DE 1999 – 2001 EM ÁREA EPIZOÓTICA DO ESTADO DE SÃO PAULO.**

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL), em reunião ordinária do mês **OUTUBRO**, apresentou o **PARECER**, enquadrando o referido projeto na categoria **APROVADO**, de acordo com a Resolução 196/96 sobre Pesquisas Envolvendo Seres Humanos / CNS / MS, Brasília, 1996.

Atenciosamente


Dra. Júlia Maria Martins de Souza Felipe
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Instituto Adolfo Lutz
CEPIAL

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Pedro e Leontina (*in memoriam*)

**Às minhas filhas Candida e Carolina e às minhas netas Sofia
e Alice**

**À minha orientadora Profa. Dra. Maria do Carmo Sampaio Tavares
Timenetsky**

Agradecimentos

Agradeço ao Instituto Pasteur, em nome da sua Diretora Neide Yumie Takaoka, por oferecer todas as condições necessárias para o desenvolvimento desta Tese.

Aos colegas Prof^a. Dr^a. Juliana Galera Castilho, Willian de Oliveira Fahl e Nazle Mendonça Collaço Vêras pela participação no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas Pesquisadores da Biologia Molecular Carla Isabel Macedo, Rafael de Novaes Oliveira, Ekaterina Durymanova Ono e Keila Iamamoto Nogi.

Agradeço ao Prof. Dr. Murilo Gomes por ceder diversas imagens utilizadas neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Wilson Uieda e ao Dr. João José de Freitas Ferrari por cederem imagens fotográficas relacionadas ao *Desmodus rotundus*.

Ao Dr. Nilton Fidalgo Perez por permitir utilizar dados epidemiológicos gerados durante sua Dissertação de Mestrado.

À Pesquisadora Científica Karin Corrêa Scheffer Ferreira pela orientação na dissertação referente ao *Desmodus rotundus*.

À Pesquisadora Graciane Maria Medeiros Caporale por disponibilizar a imagem do peso molecular da Nucleoproteína.

A todos os funcionários do Instituto Pasteur, que de forma direta ou indireta me auxiliaram.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação que participaram da minha formação científica.

Resumo

A história biogeográfica da raiva pode ser reconstruída utilizando dados moleculares. Este trabalho descreve a caracterização do Vírus da Raiva (RABV) que circula na população do morcego hematófago *Desmodus rotundus* em uma área epidêmica do Estado de São Paulo e que é transmitido para herbívoros de interesse econômico como, por exemplo, os bovinos e eqüinos. Os genes N e G dos vírus foram seqüenciados e as árvores filogenéticas geradas são topologicamente concordantes. Três agrupamentos filogenéticos (*clusters*) foram identificados na área epidêmica e foram designados como RD1, RD2 e RD3. Os resultados mostram que a origem dos *clusters* RD1 e RD2 são diferentes e que a epidemia da área RD3 é o resultado da expansão da área RD2. As seqüências genéticas dos dois genes analisados neste estudo foram comparadas entre si e com seqüências obtidas no GenBank apresentando alta identidade (> 98%), mantidas no tempo e espaço. Os resultados sugerem que as linhagens do RABV que circulam em *D. rotundus* na costa atlântica da América do Sul são altamente conservadas.

Palavras-chave: *Lyssavirus*; Vírus da raiva; Quirópteros; Bovinos; Epidemiologia molecular; Filogenia.

Abstract

The biogeographical history of rabies can be reconstructed using molecular data. This work describes the genetic characterization of the *Rabies virus* lineages that circulates in the *Desmodus rotundus* (vampire bat) population in an epidemic area and is transmitted to herbivorous livestock. The N and G genes of this virus were sequenced, and the phylogenetic trees generated were topologically concordant. Three genetic clusters were identified in the epidemic area and were designated RD1, RD2 and RD3. The results show that the origins of the epidemic in areas RD1 and RD2 were different and that the epizootic in area RD3 was the result of expansion of that in area RD2. The two genes analyzed are conserved, and their identities, which are greater than 98%, were maintained over time and space. The genetic sequences in this study were compared with others retrieved from GenBank, and the high identity of the N and G genes was also shown to be maintained over time and space. The results suggest that the *D. rotundus* lineages of the *Rabies virus* from the Atlantic coast of South America are highly conserved.

Key words: *Lyssavirus*; Rabies Virus; Chiropters; Bovines; Molecular epidemiology; Phylogeny.

Abreviaturas e Símbolos

A= adenina

aa= amino ácido

AcN= anticorpo neutralizante

AgV= variante antigênica

CD44= glicoproteína de superfície celular, envolvida com a interação entre as células e sua migração

CD99= glicoproteína de superfície celular, envolvida com a migração de leucócitos, transporte de proteínas através de membranas, interação com o citoesqueleto, entre outros

CG= Complexo de Golgi

C-terminal= região carboxi-terminal das proteínas

Da= Dalton

ERA= amostras fixa *Evelyn-Rokitnicki-Albelseth*

ECTO= ectodominio extra-celular de G

ED= endodominio intra-celular de G

G= glicoproteína G

G= guanosina

Gs= forma solúvel de G

HEP-Flury= amostras fixa *High Egg Passage-Flury*

ICTV= International Committee on Taxonomy of Viruses

kDa= quilo Dalton

L= proteína RNA polimerase RNA dependente L

Le= promotor líder ("*leader*")

M= proteína matriz M

MAB= anticorpo monoclonal

mRNA= RNA mensageiro

N= nucleoproteína N

nAChR= receptor nicotínico de acetilcolina

NCAM= molécula de adesão de neurônios

nm= nanômetro

nt= nucleotídeo(s)

N-terminal= região amino-terminal das proteínas
OPAS/OMS= Organização Panamericana de Saúde/Organização Mundial de Saúde
ORF= "*open reading frame*"
P= fosfoproteína P
p75NTR= receptor de neurotrofina de baixa afinidade
pH= potencial hidrogeniônico
poli (U)= códon de parada (sítio de poliadenilação)
PV= Pasteur Virus
RABV= Vírus da Raiva
RE= retículo endoplasmático
RNA-Le= RNA líder
RNP= ribonucleocapsídeo
SNC= Sistema Nervoso Central
SP= peptídeo sinal de G
SVS/MS= Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde do Brasil
Tc= Linfócitos T citotóxicos CD8+
Th= Linfócitos T auxiliares CD4+
TM= domínio trans-membrana de G
Tr= promotor "*trailer*"
U= uracila
VSV= Vírus da Estomatite Vesicular
WHO= World Health Organization

Lista de Tabelas

01	Espécies reconhecidas e espécies propostas do Gênero <i>Lyssavirus</i> , Família <i>Rhabdoviridae</i> . (Childs e Real, 2007).....	31
02	Número de casos de raiva, por espécie animal na Europa no período 1990-2008. O número de casos de raiva em raposas e raccoon-dog são mostrados separadamente, mas pertencem ao grupo de silvestres Fonte: Rabies Bulletin Europe.....	62
03	Número de casos de raiva em cães e gatos na Europa. 1990-2003. Fonte: Rabies Bulletin Europe.....	63
04	Número de casos de raiva em alguns países europeus com diferentes “ <i>status</i> ” de vigilância epidemiológica (1977-2008). Fonte: Rabies Bulletin Europe.....	63
05	Histórico dos últimos 10 anos mostrando o número de casos de raiva humana por país da América Latina. Fonte: http://sirvera.panaftosa.org.br	69
06	Histórico dos últimos 10 anos mostrando os casos de raiva em animais e sua distribuição. Fonte: http://sirvera.panaftosa.org.br	69
07	Histórico dos últimos 10 anos mostrando os casos de raiva em bovinos. Fonte: http://sirvera.panaftosa.org.br	70
08	Número de casos de raiva por espécie no Brasil no ano de 2009. Dados parciais até 23 de julho. Fonte: SVS/MS.....	81
09	Ocorrência de raiva em herbívoros, confirmação pela rede de laboratórios de diagnóstico do Estado de São Paulo. Fonte: Peres, 2009.....	97
10	Número de morcegos <i>Desmodus rotundus</i> capturados e tratados com Warfarina e refúgios trabalhados no Estado de São Paulo, 1997–2007. Fonte: Peres, 2009.....	99
11	Número de herbívoros existentes e herbívoros vacinados, na área de vacinação obrigatória da raiva, no Estado de São Paulo, 2001–2006. Fonte: Peres, 2009.....	100
12	Números de casos de raiva no Estado de São Paulo em relação aos mapas Kernel da Figuras 29 e 30, no período 1997-2003. Fonte: Gomes, 2008.....	106

13	Amostras de RABV AgVG3 utilizadas para o estudo do gene N. A Tabela mostra o número de acesso do GenBank das amostras, ano e cidade do isolamento, o número de registro do Instituto Pasteur, as espécies nas quais o vírus foi isolado e os Subclados ou Grupos a que pertencem.....	110
14	Amostras de RABV AgVG3 utilizadas para o estudo do gene G. A Tabela mostra o número de acesso do GenBank das amostras, ano e cidade do isolamento, o número de registro do Instituto Pasteur, as espécies nas quais o vírus foi isolado e os Subclados ou Grupos a que pertencem.....	113
15	Número de herbívoros positivos para a raiva nas áreas RD1, RD2 e RD3 e o total de herbívoros positivos no Estado de São Paulo no período de 1996-2003; B- Distribuição cronológica de bovinos e eqüinos positivos para a raiva das áreas RD1, RD2 e RD3 que tiveram o gene N tipificado no estudo; C- Distribuição cronológica de bovinos e eqüinos positivos para a raiva das áreas RD1, RD2 e RD3 que tiveram o gene G tipificado no estudo. Fonte: Comissão Estadual de Controle da Raiva (www.pasteur.saude.sp.gov.br/coordenacao/coordenacao).....	117
16	Números de acesso do GenBank de seqüências utilizadas para gerar a seqüência consenso do gene N RABV AgV3 (A) e para o gene G (B) e, também, utilizadas nas análises filogenéticas. A Tabela mostra as espécies das quais o RABV foi isolado, o Estado de origem, o ano de isolamento e as referências bibliográficas relacionadas às seqüências.....	118
17	Nomenclatura, abreviatura, símbolos e polaridade dos 20 aminoácidos traduzidos a partir do código genético. Fonte: Lodish et al. (2005).....	135

Lista de Figuras

- 01 Esquema da composição estrutural do Vírus da Raiva. Fonte: www.sciencephoto.com.br..... 33
- 02 Micrografias do RABV corados negativamente. A- x70000, B- x40000 e C- x200000, respectivamente e aproximadamente..... 34
- 03 Representação esquemática da organização genômica das amostras fixas PV e ERA do RABV proposto por Tordo et al. (1986) (acima) e a representação esquemática da organização genômica da amostras fixa HEP-Flury (abaixo) do RABV proposto por Morimoto, Ohkubo, Kawai, (1989), mostrando a integração da região não-codificante G-L dentro do gene que codifica para a glicoproteína do vírus. Fonte: Morimoto, Ohkubo, Kawai, (1989)..... 37
- 04 Reação de imunofluorescência positiva para a pesquisa do antígeno rábico em impressões de tecido nervoso de animal infectado. Observar Corpúsculos de Negri (estruturas circulares) Fonte: Instituto Pasteur (www.pasteur.saude.sp.gov.br)..... 45
- 05 Micrografia eletrônica corada negativamente de Corpúsculo de Negri (estrutura central circular). Observar partículas do RABV ao redor do Corpúsculo de Negri. X64000. Fonte: www.news.bbc/diseases/img/rabies..... 46
- 06 Representação esquemática do ciclo de replicação do vírus da raiva, evidenciando-se os processos de ligação, entrada, replicação, maturação e saída de novas partículas virais infectantes. Fonte: Piere (2003)..... 48
- 07 Eletroforese em gel de poliacrilamida mostrando o peso molecular da nucleoproteína N do RABV. PM= peso molecular, MC= meio de cultura, LC= lisado celular e RNPs= nucleoproteína N com 57KDa. Imagem cedida por Caporale, GMM..... 49
- 08 Mapa da Europa mostrando os 703 casos de raiva em bovinos nos diferentes países no ano de 2008. Os casos de raiva são indicados por pontos vermelhos. Fonte: Rabies Bulletin Europe..... 64

09	Mapa da Europa mostrando os 5106 casos de raiva em raposas (<i>Vulpes vulpes</i>) nos diferentes países no ano de 2008. Os casos de raiva são indicados por pontos vermelhos. Fonte: Rabies Bulletin Europe.....	64
10	Distribuição de casos de raiva nas Américas, 2006. Fonte: http://sirvera.panaftosa.org.br	70
11	Casos de raiva em cães no Brasil no ano de 2008. Fonte: SVS/MS.....	74
12	Casos de raiva em bovinos no Brasil no ano de 2008. Fonte: SVS/MS.....	75
13	Casos de raiva em equinos no Brasil no ano de 2008. Fonte: SVS/MS.....	75
14	Casos em animais e humanos no Brasil, 2008. Fonte: SVS/MS..	77
15	Série histórica de casos de raiva em humanos por Estados do Brasil, 1986-2008. Fonte: SVS/MS	78
16	Série histórica de animais transmissores de casos de raiva humana no Brasil, 1986-2007. Fonte: SVS/MS.....	79
17	Imagens de diferentes fenótipos de <i>Desmodus rotundus</i> . As duas imagens superiores mostram a pelagem castanha, comum e, abaixo, alaranjada e albina, raras. Fotos: W. Uieda.....	86
18	Imagens de abrigos artificiais de <i>Desmodus rotundus</i> . Fotos: J.J. Ferrari.....	89
19	Imagens de abrigo artificial (mina abandonada) de <i>Desmodus rotundus</i> e outros morcegos. Foto: J.J. Ferrari.....	90
20	Imagem de cavalo sendo atacado pelo <i>Desmodus rotundus</i> . Observar morcego e ferimento causado pela espoliação no pescoço do cavalo. Foto: J.J. Ferrari.....	91
21	Detalhe da Figura 20 (cavalo sendo atacado pelo <i>Desmodus rotundus</i>). Observar morcego e ferimento causado pela espoliação no pescoço do cavalo. Foto: J.J. Ferrari.....	92
22	Mapa mostrando os Departamentos de Saúde do Estado de São Paulo. Fonte: www.saude.sp.gov.br/content/geral	97

- 23 Mapa do Estado de São Paulo (SP), Sudeste, Brasil, e as áreas epidêmicas RD1, RD2 e RD3. A localização da capital do Estado, cidade de São Paulo, e a região endêmica estão indicadas no mapa. A localização do Estado de São Paulo é mostrada em cinza no mapa do Brasil no canto direito da Figura. Os Estados brasileiros Mato Grosso (MT) e Mato Grosso do Sul (MS), da região Centro-Oeste, Estado de Tocantins (TO), na região Norte, além de Minas Gerais (MG) e Rio de Janeiro (RJ), os quais como São Paulo, situam-se na região Sudeste, são também mostrados na Figura. Abaixo, o mapa do Brasil mostrando o relevo do país e ao lado, o Estado de São Paulo mostrando seu relevo em maiores detalhes. Fonte: Miranda (2009)..... 98
- 24 Gráficos e tabelas com os números de bovinos e eqüinos positivos para a raiva no Estado de São Paulo (imagem superior), como também nas áreas RD1, RD2 e RD3 (imagem inferior) Fonte: (www.pasteur.saude.sp.gov.br/coordenacao/coordenacao)..... 100
- 25 Aspectos do relevo do Estado de São Paulo (imagem superior) e divisão geomorfológica paulista (imagem inferior). Imagens geradas a partir de dados provenientes do SRTM (*“Shuttle Radar Topography Mission”*). Fonte: Gomes, 2008..... 102
- 26 Pluviosidade média anual do Estado de São Paulo (imagem superior) e temperatura média anual do Estado de São Paulo (imagem inferior). Imagens geradas a partir de dados provenientes do SRTM (*“Shuttle Radar Topography Mission”*). Fonte: Gomes, 2008..... 103
- 27 Mapa parcial da América do Sul mostrando seu relevo. Observar a área destacada com um retângulo em preto que delimita, aproximadamente, a área da epidemia 1997-2002 estudada. Fonte: www.geografiaparatodos.com.br..... 104
- 28 Posicionamento dos principais rios e represas existentes nas áreas RD1, RD2 e RD3. Fonte: Gomes, 2008..... 104
- 29 Mapas Kernel para cada ano da série histórica 1992-2003 sobrepostos à divisão geomorfológica paulista. Os “valores baixos e altos” são relativos ao número de casos de raiva diagnosticados no ano analisado. Fonte: Gomes, 2008..... 105

30	Função Kernel elaborado com a somatória dos diagnósticos laboratorialmente positivos de raiva bovina (1992-2003) nas áreas RD1, RD2 e RD3. O epicentro da Figura, em vermelho, se refere à área RD2 analisada neste trabalho. Os valores relativos “baixos e altos” referem-se ao número de casos de raiva diagnosticados no período 1992-2003. Fonte: Gomes, 2008.....	106
31	Função Kernel da cobertura vegetal das áreas RD1, RD2 e RD3 no ano de 1997. Observar os dois focos de raiva (círculos brancos e pretos) na área RD1. Comparar com a Figura 29, ano de 1997 Fonte: Gomes, 2008.....	107
32	Transições (x s) e transversões (Δv) versus gráfico de divergência das seqüências genéticas do Gene G da glicoproteína (A) e do Gene N da nucleoproteína (B).....	121
33	Árvore filogenética do gene N do RABV, gerada pelo método de Distância Neighbor-joining (NJ), incluindo seqüências de referência AgV3 RABV e linhagens do gene N AgV3 RABV isoladas de bovinos do Estado de São Paulo, Brasil. A seqüência de referência <i>Duvenhage</i> foi utilizada como <i>outgroup</i> . Os números próximos aos nós dos ramos da árvore filogenética representam os valores de <i>bootstrap</i> . As linhagens numeradas são descritas na Tabela 13.....	123
34	Árvore filogenética do gene N do RABV AgV3 gerada pelo método de Distância Neighbor-joining (NJ), incluindo seqüências do Estado do Rio de Janeiro, Vale do Paraíba (SP) e linhagens representativas da epidemia 1997-2002. Os números próximos aos nós dos ramos da árvore filogenética representam os valores de <i>bootstrap</i>	126
35	Árvore filogenética do gene N do RABV AgV3 gerada pelo método de Distância Neighbor-joining (NJ), incluindo seqüências de linhagens representativas da epidemia 1997-2002 (caixa alta) e dos anos de 2007 e 2008 (caixa baixa) isoladas na mesma área epizootica. Os números próximos aos nós dos ramos da árvore filogenética representam os valores de <i>bootstrap</i>	127

36	Árvore filogenética do gene G do RABV, gerada pelo método de Distância Neighbor-joining (NJ), incluindo seqüências de referência AgV3 RABV e linhagens do gene G AgV3 RABV isoladas de bovinos do Estado de São Paulo, Brasil. A seqüência de referência <i>Duvenhage</i> foi utilizada como <i>outgroup</i> . Os números próximos aos nós dos ramos da árvore filogenética representam os valores de <i>bootstrap</i>	128
37	Média da distância genética entre as linhagens RABV AgV3 isoladas de bovinos no Estado de São Paulo (diversidade intra-população) e entre estas linhagens e a amostra fixa PV como também entre o Consenso Brasileiro AgV3 (divergência intra-população) baseado no gene N da nucleoproteína. B. Diversidade do gene N entre as linhagens RABV AgV3 isoladas em bovinos no Estado de São Paulo entre 1997 a 2001. C. Divergência do gene N entre as linhagens do RABV AgV3 isoladas no Estado de São Paulo entre 1997 a 2001 e a linhagem da amostra fixa PV e entre as linhagens do Consenso Brasileiro RABV AgV3.....	130
38	A. Média da distância genética entre as linhagens RABV AgV3 isoladas de bovinos no Estado de São Paulo (diversidade intra-população) e entre estas linhagens e a amostra fixa PV como também entre o Consenso Brasileiro AgV3 (divergência intra-população) baseado no gene G da glicoproteína. B. Diversidade do gene G entre as linhagens RABV AgV3 isoladas em bovinos no Estado de São Paulo entre 1997 a 2001. C. Divergência do gene G entre as linhagens do RABV AgV3 isoladas no Estado de São Paulo entre 1997 a 2001 e a linhagem da amostra fixa PV e entre as linhagens do Consenso Brasileiro RABV AgV3.....	131
39	Entropia do gene N (acima) e da nucleoproteína N (abaixo). H= Grau de entropia (incerteza) e x= número de seqüências analisadas.....	136
40	Entropia do gene G (acima) e da glicoproteína G (abaixo). H= Grau de entropia (incerteza) e x= número de seqüências analisadas.....	137

- 41 Comparação das seqüências de amino ácidos alinhados e deduzidos a partir das seqüências genéticas do gene da N da nucleoproteína das linhagens do RABV AgV3 estudada. Os amino ácidos das colunas em tom cinza são aqueles encontrados em todas as linhagens e, portanto, são assinaturas genéticas. A seqüência Consenso BR está em vermelho. O nome das seqüências da área RD1 é mostrado em cor verde e os amino ácidos que caracterizam estas seqüências, as assinaturas da área RD1, estão circundados também em verde. A numeração da primeira linha da figura se refere ao número da posição do amino ácido em relação à amostra fixa Pasteur Virus..... 195
- 42 Comparação das seqüências de amino ácidos alinhados e deduzidos a partir das seqüências genéticas do gene da Glicoproteína G das linhagens do RABV AgV3 estudadas. Os amino ácidos das colunas em tom cinza são aqueles encontrados em todas as linhagens e, portanto, são assinaturas genéticas. A seqüência Consenso BR está em vermelho. A numeração da primeira linha da figura se refere ao número da posição do amino ácido em relação à amostra fixa Pasteur Virus..... 198

Índice

1.Introdução.....	25
1.1.A Raiva.....	25
1.2.História da Raiva.....	25
1.3.Classificação do RABV.....	29
1.4.O RABV.....	32
1.4.1.Morfologia do RABV.....	32
1.4.2.Organização genômica do RABV.....	34
1.4.3.Transcrição e Tradução do RABV.....	37
1.4.3.1.Os transcritos mRNA do RABV.....	38
1.4.4.Replicação do RABV.....	39
1.4.5.Variação genotípica do RABV.....	40
1.4.6.O ciclo de infecção do RABV.....	42
1.4.6.1.Morfogênese e gemação do RABV.....	44
1.4.7.As proteínas e os genes do RABV.....	47
1.4.7.1.A Nucleoproteína N.....	47
1.4.7.2.O gene N.....	50
1.4.7.3.A Glicoproteína G.....	50
1.4.7.4.O gene G.....	53
1.4.7.5.A Fosfoproteína P.....	53
1.4.7.6.Proteína matriz M.....	54
1.4.7.7.RNA polimerase-RNA-dependente L.....	55
1.4.8.O RABV e a patogenia da raiva.....	57
1.5.A Epidemiologia da Raiva.....	59

1.5.1.A raiva na na África.....	59
1.5.2.A raiva na Ásia.....	60
1.5.3.A raiva na Europa.....	60
1.5.4.A raiva na América do Norte.....	65
1.5.5.A raiva na América Central e do Sul.....	67
1.5.5.1.As variantes antigênicas e genéticas do RABV na América Latina espanhola.....	72
1.5.6.A raiva no Brasil.....	74
1.5.6.1.As variantes antigênicas e genéticas do RABV no Brasil.....	82
1.5.7.O <i>Desmodus rotundus</i> e a raiva em bovinos.....	85
1.5.7.1.A biologia do <i>Desmodus rotundus</i>	85
1.5.8.A dinâmica da raiva em bovinos.....	93
1.5.9.A epidemia de raiva 1997-2002 no Estado de São Paulo.....	95
2.Objetivos.....	108
3.Material e Métodos.....	109
3.1.Amostras.....	109
3.2.Transcrição reversa seguida da Reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) e Seqüenciamento do DNA.....	112
3.3.Análise filogenética.....	114
3.4.Seqüências de consenso.....	115
3.5.Análise de Distância Genética.....	116
3.6.Análise de polimorfismos.....	116
3.7.Entropia dos genes N e G e das proteínas N e G.....	116
4.Resultados.....	120
4.1. RT-PCR e Seqüenciamento.....	120
4.2. Análise Filogenética.....	120

4.3.Análise de Distância Genética.....	129
4.4.Análise do Polimorfismo dos genes N e G.....	129
4.5.Análise das Regiões com Atividade Biológica da Nucleoproteína N e da Glicoproteína G.....	133
4.6.Entropia dos genes N e G e das proteínas N e G.....	135
5.Discussão.....	138
6.Conclusões.....	160
Referências.....	161
Anexos.....	188
Seqüências putativas da nucleoproteína N e da glicoproteína G do RABV.....	188
Protocolos das Reações de Material e Métodos.....	199

1.Introdução

1.1.A Raiva

A raiva é uma doença infecciosa aguda e progressiva do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos, causada pelo Vírus da Raiva (RABV). O vírus é presente na saliva de animais infectados e, assim, a transmissão ocorre, em geral, através de mordedura (Acha e Szyfres, 2003).

A doença é um grave problema de saúde pública, apesar de ser uma doença que pode ser prevenida por meio de vacina (Briggs e Hanlon, 2007). A Organização Mundial da Saúde (OMS), estima a morte de 55.000 pessoas por ano, principalmente na Ásia e na África, onde se calcula haver, aproximadamente, 31000 casos/ano e 24000 casos/ano, respectivamente (WHO, 2005). A raiva é a décima primeira causa de morte humana entre as doenças infecciosas (WHO, 2000). A doença mata mais pessoas que febre amarela, dengue e encefalite japonesa, pois uma pessoa morre de raiva a cada 15 minutos e, no mesmo intervalo de tempo, outras 300 são expostas ao vírus (Rupprecht, Hanlon, Hemachuda, 2002).

A importância da raiva para a saúde pública não se limita apenas ao número de casos, mas também pela alta letalidade, que alcança 100% dos enfermos. Também é necessário considerar o caráter econômico da doença (WHO, 2005), pois aproximadamente dez milhões de pessoas/ano são submetidas à profilaxia pós-exposição (Plotkin, 2000; Rupprecht, Hanlon, Hemachuda, 2002).

Além dos problemas anteriormente citados, é necessário o contínuo desenvolvimento de procedimentos diagnósticos e análises epidemiológicas. Em humanos, doenças infecciosas como tétano, malária cerebral, doenças causadas por rickettsias, febre tifóide e outras não infecciosas, como a síndrome de Guillain-Barré, intoxicação por produtos químicos e encefalomielite alérgica vacinal, se confundem com a raiva (Hemachudha, Laothamatas, Ruprecht, 2002). Em animais de interesse econômico, como o gado, as meningoencefalites, principalmente virais, como a pseudo-raiva, a rinotraqueíte infecciosa e a febre catarral maligna, também são confundidas clinicamente com a raiva (Heuschele, 1987).

1.2.História da Raiva

A raiva é bem documentada, pois é uma das doenças mais antigas conhecidas pelo homem. Foi sempre motivo de temor para a população devido às peculiaridades de sua transmissão, das manifestações clínicas no

doente e o curso invariavelmente fatal, comprovando-se tal fato na extensa e interessante história da raiva registrada na literatura (Steele e Fernandez, 1991).

A palavra raiva deriva do latim “*Rabies*”, e significa “fúria e delírio”. Do sânscrito a palavra “*Rabhas*” significa “loucura e demência” (Steele e Fernandez, 1991). Os gregos a chamavam de “*Lyssa*” ou “*Lyta*”, que também significam loucura (Wilkinson, 2002).

No código de “*Eshnunna*”, escrito cerca de 2.000 anos a.C. na Mesopotâmia, foram registrados os primeiros relatos de morte humana devido a mordeduras por cães raivosos (Wilkinson, 2002). Era considerada por povos Assírios, Egípcios e Caldeus como uma doença de origem religiosa, enquanto que Chineses e Hindus acreditavam que o desequilíbrio entre os quatro elementos que constituíam o corpo humano favorecia o aparecimento da doença (Barata, 1985).

Há várias citações sobre a doença na mitologia grega e nela encontramos os deuses Aristeu, que era invocado na proteção contra este mal e Artemis, que era cultuado como a divindade com poderes para sua cura (Barata, 1985).

Homero, em A *Ilíada*, relacionava problemas da saúde humana e canina com o aparecimento da estrela “*Sirius*”, a estrela do cão na constelação de “*Orion*”, que surge no firmamento da região do Mediterrâneo no mês de Agosto. Ainda hoje persiste a crença popular que relaciona o mês de Agosto como o “mês do cachorro louco” (Schneider e Santos-Burgoa, 1994).

Demócrito, em 500 a.C., foi o primeiro a descrever o quadro clínico da raiva canina e Aristóteles, no século IV a.C., escreveu no livro *História Natural dos Animais* que os cães com raiva ficavam irritados e os animais mordidos por aqueles cães também adquiriam raiva. Aristóteles, no entanto, acreditava que o ser humano não era acometido pela raiva animal. O filósofo Plínio não concordava com esta afirmação e dizia que a raiva animal também poderia ser transmitida aos humanos (Villasenõr, 1974; Baer, 2007).

Vários autores da antigüidade, como Xenofontes, Virgílio, Horácio e Ovídio, relataram em suas obras aspectos sobre a raiva, como a importância do cão na transmissão da doença ao homem, e a infectividade da saliva dos cães raivosos. Naquela época, acreditava-se que havia um “veneno”, em latim “*virus*”, na saliva dos animais com raiva que era o responsável pela doença (Wilkinson, 2002).

Celsius, no século I d.C., estudou vários aspectos da raiva, enfatizando a importância da saliva dos animais com raiva na transmissão

da doença ao homem. Considerou que outros animais como gatos, macacos, além do cão, poderiam transmitir a doença. Quanto aos cuidados com os ferimentos causados por animais com raiva, recomendava o uso de ventosas para a sucção do veneno inoculado e, posteriormente, a cauterização das feridas com substâncias cáusticas corrosivas ou ferro em brasa. Celsius explicava ainda que (para combater a hidrofobia) "quando a doença aparece, o único remédio é colocar o doente inesperadamente dentro de um tanque, fazendo com que ele possa beber água, desaparecendo ao mesmo tempo a sede e o medo da água". Estes procedimentos foram usados até o fim do século XIX (Dean, Baer, Thompson, 1963).

Só no ano de 900 d.C. a raiva silvestre foi descrita na Europa, quando um urso com raiva saiu de um bosque, perto do porto de Lyon, na França, e atacou vinte lenhadores que tentaram matá-lo a pauladas. Em consequência das mordeduras seis lenhadores desenvolveram raiva e foram mortos por sufocamento, que era um dos procedimentos com que "piedosamente" se resolviam os casos de raiva humana naquela época (Bravo, 1978).

A primeira grande epidemia descrita da doença data de 1271, quando lobos com raiva invadiram cidades e vilarejos da França, atacando o rebanho e as pessoas. Sabe-se que 30 pessoas morreram devido aos ataques. Em 1500, a Espanha foi assolada pela raiva canina. Em 1604, espalha-se por Paris e por toda a Europa Central. Na Inglaterra, o reconhecimento da doença se deu em 1735 (Wilkinson, 2002) e no século XIX, a doença volta a ganhar grandes proporções na Europa, principalmente na França, Inglaterra e Alemanha (Baer, Belli, Fishbein, 1990).

Nas Américas, a primeira referencia feita a raiva foi escrita em 1514 pelo capitão Fernandez de Oviedo, durante a conquista espanhola da península mexicana de Yucatan. Fernandez de Oviedo relacionou a raiva com a morte de vários soldados, após estes serem mordidos por morcegos (primeira e única descrição da raiva transmitida por morcegos até o século XX) e, ao mesmo tempo, ficou intrigado pelo desconhecimento dos nativos em relação à doença em cães, comum no Velho Mundo (Baer, 2007).

Apesar dos conhecimentos sobre a raiva se avolumarem, crenças supersticiosas e mágicas eram mantidas para explicá-la. Isto favoreceu a adoção de condutas exóticas e sem nenhum embasamento científico, e que muitas vezes submetiam o doente a um sofrimento adicional inútil. Estes fatos levaram a comunidade científica do século XVII a posicionar-se frente a esta situação, e em declaração feita a 10 de junho de 1671, em reunião na Sorbonne, foram condenadas todas as práticas supersticiosas para o tratamento da raiva (Steele e Fernandez, 1991).

Em 1804, na Alemanha, Zinke fez a primeira abordagem científica, inoculando saliva de cães com raiva em cães saudáveis, induzindo-os a contrair a raiva. Zinke pincelou saliva de um animal com raiva na pata ferida de outro cachorro e observou que, após 17 dias, em média, começaram os sintomas da doença e, no vigésimo dia o animal tinha a raiva de forma aparente. Nos seus ensinamentos sobre a doença, Zinke alertou para o cuidado de não ser contaminado pela saliva de pessoas com raiva, como também ao tocar com as mãos desprotegidas objetos que estiveram em contacto com a boca dos doentes (Baer et al., 1990).

Galtier, em 1879, inoculando extrato de tecido nervoso de coelhos com raiva em cabras e carneiros, visando induzir proteção imunológica em animais de laboratório, exerceu influência sobre Louis Pasteur nas suas pesquisas com a raiva (Wilkinson, 2002).

Em 1881, Pasteur publica seu primeiro estudo sobre a raiva, concluindo que “o sistema nervoso central, especialmente o bulbo, é particularmente ativo no desenvolvimento da doença”. Provou, ainda, que a fonte da doença não era somente a saliva, pois reproduziu a doença em animais através de injeções de material coletado do SNC e fluido espinhal. Posteriormente, Pasteur e col. cultivaram o vírus, inoculando-o sucessivamente em animais, observando que o período de incubação, antes variável, encurtava e se estabilizava. Esta nova amostra viral, obtida experimentalmente, foi chamada de “atenuada”. Desta adaptação do vírus da raiva originou-se o vírus “fixo”, cuja virulência é constante e reprodutível para a espécie na qual foi adaptado, ao contrário do vírus “de rua”, isolado de animais infectados naturalmente (Baer, 2007).

Pasteur, em 1884, utilizando medulas de coelhos, inoculadas com vírus “fixos” e dessecadas com potassa (NaOH) a 22 °C, inoculou durante nove dias, intracerebralmente, o macerado deste material em cães, e estes não adquiriram raiva. Posteriormente, observou que animais inoculados diariamente com este material, por via subcutânea, também se tornavam imunes. A partir dessas observações Pasteur produziu a primeira vacina para a raiva (Baer, 2007).

Pasteur e col. tinham todos os resultados muito bem estabelecidos e favoráveis para começar a testar as vacinas em humanos, mas Pasteur declara, em carta escrita ao então Imperador brasileiro Dom Pedro II, datada de 22 de setembro de 1884, “Nada ousei até aqui no homem, apesar de minha confiança nos resultados e das numerosas oportunidades que tive depois de meu último comunicado à Academia de Ciências. Mas, apesar de ter múltiplos exemplos de profilaxia de raiva em cães, parece que minha mão tremeria quando fosse passá-la à espécie humana”. Mais adiante, na

mesma carta, Pasteur faz uma insinuação de que “se fosse imperador de um grande país (no caso o Brasil), obrigaria condenados à morte a serem alvo de experimentação das vacinas”. Em troca, se a vacina funcionasse, o condenado ganharia a liberdade. Dom Pedro II, muito elegantemente e em carta resposta a Pasteur, negou a proposta do amigo, dizendo que, no Brasil, a pena de morte nunca chegava a se concretizar e que nenhum condenado arriscaria entrar em um experimento que pudesse o levar a morte. E diz, ainda, que se Pasteur quisesse, poderia vir ao Brasil para realizar pesquisas com vacinação da febre amarela, que era um problema muito maior no país (Vieira e Hossne, 1998).

Nesse tempo, chega até Pasteur o garoto Joseph Meister, de nove anos, que havia sido mordido severamente por um cachorro com raiva. O menino foi examinado por médicos que consideraram inevitável o aparecimento da doença. Motivado pelas suplicas da mãe de Joseph, Pasteur decidiu usar o método que havia sido um sucesso em cachorros no tratamento do garoto. Assim foi feito e, após 60 horas dos ferimentos, foi inoculado na criança metade do volume de uma seringa de medula de um coelho infectado com o RABV, preservado por 15 dias. Após essa primeira injeção, seguiram-se mais 13 inoculações diárias, e a doença não se manifestou (Wilkinson, 2002).

Em 1886, Pasteur registrou os resultados do tratamento de mais 350 casos, conseguindo estabelecer a profilaxia da raiva, faltando apenas um centro para a vacinação contra a doença (Wilkinson, 2002).

A Academia de Ciências de Paris propõe uma comissão para executar a proposta de Pasteur e, assim, foi criado o primeiro Instituto Pasteur na França. Dez anos depois havia vários Institutos Pasteur por todo o mundo, se responsabilizando pela pesquisa e tratamento da raiva. No final de 1886, mais de 2000 pessoas estavam sendo tratadas e a mortalidade da doença diminuía (Wilkinson, 2002). A partir de então teve início uma nova etapa na história da raiva, tornando viável e seguro o tratamento de indivíduos expostos ao RABV.

1.3.Classificação do RABV

O RABV, como outros vírus da Ordem *Mononegavirales* (Fauquet et al., 2007), possuem genoma constituído de RNA fita simples, não-segmentado e com sentido negativo (-ssRNA). Outros representantes desta Ordem de vírus são, por exemplo, os vírus Ebola (*Filoviridae*) e os vírus do sarampo (*Paramyxoviridae*).

O RABV pertence à Família *Rhabdoviridae*, uma das quatro Famílias da Ordem *Mononegavirales*. A família *Rhabdoviridae* (do grego “*rhabdos*”, que significa “roda”) possui cinco Gêneros:

1. *Cytorhabdovirus*: infectam plantas e são transmitidos por artrópodes.
2. *Nucleorhabdovirus*: infectam plantas.
3. *Vesiculovirus*: infectam mamíferos, peixes e insetos.
4. *Ephemerovirus*: infectam mamíferos e são transmitidos por insetos hematófagos.
5. *Lyssavirus*: infectam mamíferos.

O RABV pertence ao Gênero *Lyssavirus*, que possui sete espécies, também designadas por Genótipos. A Tabela 01 sumariza as espécies reconhecidas e as espécies propostas do Gênero *Lyssavirus*.

O RABV é o vírus protótipo do Gênero *Lyssavirus*, designado como genótipo 1 e é o único do Gênero que causa a raiva. Os genótipos 2 até 7 são chamados de vírus aparentados ao RABV (“*rabies-like*”) (Fauquet et al., 2007). Os genótipos 2 até 7 apresentam sintomatologia clínica semelhante e algumas vezes indistinguível da raiva clássica e, por isto, todos os membros do Gênero *Lyssavirus* são atualmente citados como causadores de lissavirose (Hanlon et al., 2005).

A classificação inicial do Gênero *Lyssavirus* utilizava o termo sorotipo, devido às suas características antigênicas, identificadas por meio de estudos de reações cruzadas com soros. Em 1994, especialistas em raiva propuseram a denominação de “genótipos” em substituição aos “sorotipos”, até então utilizados para designar os diferentes membros do gênero *Lyssavirus* (Gould et al., 2005). Portanto os genótipos 1 a 4 podem também ser designados por sorotipos 1 a 4, respectivamente.

Badrane et al. (2001a), estudando a homologia genética dos sete membros do Gênero *Lyssavirus* os agrupou em dois grupos distintos. O primeiro grupo, designado por Filogrupo I, é composto pelos genótipos 1, 4, 5, 6 e 7, enquanto que o Filogrupo II, é composto pelos genótipos 2 e 3.

Novos *Lyssavirus*, isolados recentemente na Rússia e Ásia Central, ainda estão em estudo, mas muitos estudiosos já os consideram novas espécies do Gênero (Kusmin et al., 2003; Kusmin et al., 2008).

Tabela 01: Espécies reconhecidas e espécies propostas do Gênero *Lyssavirus*, Família *Rhabdoviridae*. (Childs e Real, 2007).

Espécie Sorotipo/Genótipo/ Abreviação ICTV ^a	Espécies relacionadas na manutenção	Distribuição	Mortes humanas anual	Referência
Rabies Virus (ST 1/GT 1) RABV	Cães, carnívoros silvestres, morcegos	Mundial, com exceção da Austrália, Antártica e países designados como "rabies-free" (Japão e os da Grã-Bretanha)	~55000	Shope, 1982
Lagos bat (ST 2/GT 2) LBV	Morcegos - <i>Megachiroptera</i> ; <i>Eidolon helvum</i> , <i>Micropterus pusillus</i> , <i>Epomophourus wahlbergi</i>	África: República Africana, Etiópia, Nigéria, Senegal, África do Sul	Não descrito	Bouglér e Porterfield, 1958.
Mokola (ST 3/GT 3) MOKV	Shrew - <i>Insectivora</i> ; <i>Crocidura spp</i> ; Rodentia; <i>Lophyromys sikapusi</i>	África: Cameron Central, República Africana, Etiópia, Nigéria, África do Sul, Zimbábue	Ocasional	Shope et al., 1970.
Duvenhage (ST 4/G 4) DUVV	Morcegos - <i>Microchiroptera</i> ; <i>Miniopterus schreibersii</i> , <i>Nycteris gambiensis</i> , <i>N. hebaica</i>	África: África do Sul, Guiné, Zimbábue	Ocasional	Meredith, Rossouw e Van Pragg., 1971.
European bat Lyssavirus 1 (GT 5) EBLV- 1	Morcegos - <i>Microchiroptera</i> ; <i>Myotis dasycneme</i> , <i>M. daubentonii</i>	Europa	Ocasional	Bourhy, Kissi e Tordo, 1993.
European bat Lyssavirus 2 (GT 6) EBLV-2	Morcegos - <i>Microchiroptera</i> ; <i>Eptesicus serotinus</i>	Europa	Ocasional	Bourhy, Kissi e Tordo, 1993.
Australian bat Lyssavirus (GT 7) ABLV	Morcegos - <i>Megachiroptera</i> ; <i>Pteropus alecto</i> , <i>P. scapulatus</i>	Austrália, 1996; possivelmente e ocasionalmente Sudeste do continente asiático	Ocasional	Speare et al., 1997.
Aravan virus ^b ARAV	Morcegos - <i>Microchiroptera</i> ; <i>Myotis blythi</i>	Quirquístão, 1991	Não descrito	Arai et al., 2003.
Khujand vírus ^b KHUV	Morcegos - <i>Microchiroptera</i> ; <i>Myotis mystacinus</i>	Tajiquistão, 2001	Não descrito	Kuzmin et al., 2003.
Irkut vírus ^b IRKV	Morcegos - <i>Microchiroptera</i> ; <i>Murina leucogaster</i>	Sibéria Oriental, 2002	Não descrito	Kuzmin et al., 2003.
West Caucasian bat vírus ^b WCBV	Morcegos - <i>Microchiroptera</i> ; <i>Miniopterus schreibersi</i>	Montanhas do Cáucaso, 2003	Não descrito	Botvinkin, 2003.

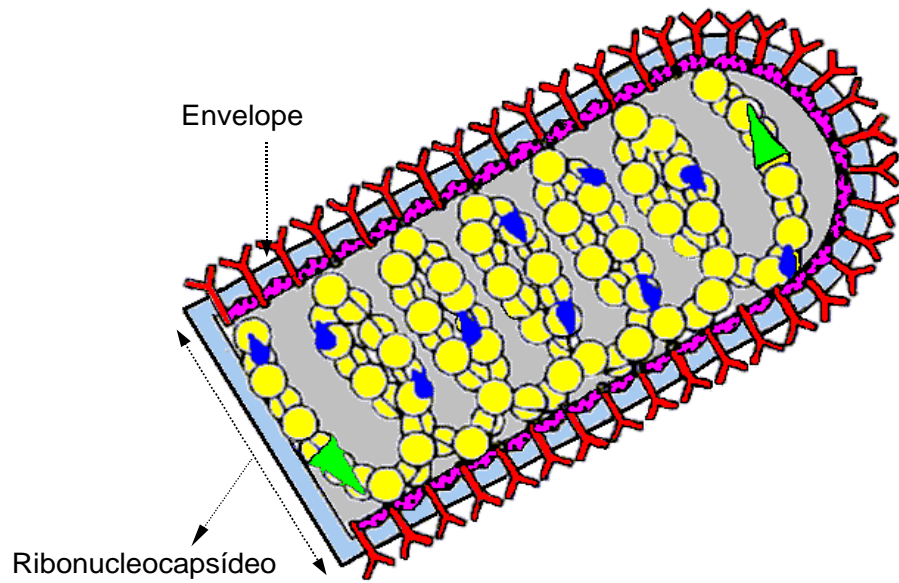
a- ICTV=International Committee on Taxonomy of Viruses (Fauquet et al., 2007). b- Novos *Lyssavirus* ainda não classificados (WHO, 2004).

1.4.O RABV

1.4.1.Morfologia do RABV

O RABV é baciliforme, com 100 a 250 nanômetros (nm) de comprimento e 75 nm de diâmetro, em média, com uma extremidade semicircular e a outra plana (Sokol, 1975). Possui envoltório externo (envelope) formado por lipídios da célula hospedeira, com espículas de 5 a 10 nm de comprimento, cerca de 3 nm de espessura, distanciadas em 5 nm, formadas por trímeros da glicoproteína G (G) (Gaudin et al., 1992). Madore e England (1977) calcularam haver 450 espículas de G triméricas por *virion* (partícula viral). No envelope também são encontradas algumas proteínas da célula hospedeira, como por exemplo, calnexin, proteínas do citoesqueleto e os receptores glicoprotéicos CD44 e CD99 (Gupta et al., 2000). A constituição do envelope é semelhante ao da membrana celular da célula infectada pelo vírus e, normalmente, são detectados fosfolipídios, lipídeos neutros e glicolipídeos (Wunner, 1991). Abaixo do envelope encontra-se uma camada matriz formada por proteínas matriz M (M), que une o envelope do vírus à ribonucleoproteína (RNP) interna. A RNP é helicoidal, possuindo 30 a 35 giros, com 50 nm de espessura por 170 nm de comprimento, em média, e é composta pelo RNA genômico de fita simples, sentido negativo, não segmentado, associado às proteínas RNA polimerase RNA dependente L, fosfoproteína P, nucleoproteína N, além de proteínas M. Formando a RNP há, aproximadamente, 1800 moléculas de N, 950 de P e 30 a 60 L. Devido a presença de L a transcrição e a replicação são autônomas e independentes da célula hospedeira (Wunner, 2002; Van Regenmortel et al., 2000) (Figura 1, Figura 2).

O peso seco do *virion* é composto por 67–74 % de proteínas; 2-3 % de RNA; 3 % de carboidratos e 15-25 % de lipídios, sendo que deste percentual 55-60 % é fosfolipídio e 35-40 % glicolipídio. O RABV tem peso molecular entre 500 a 700 x 10⁶ Da, densidade em CsCl de 1,19 a 1,20 g/cm³ e densidade em sucrose de 1,17 a 1,19 g/cm³. A infectividade do vírus é estável entre pH 5,0 e pH 10,0 e é rapidamente inativado a 50°C; por irradiação ultravioleta ou raio-X; exposição a solventes lipídicos ou agentes oxidantes (Gaudin et al., 1992).



Legenda







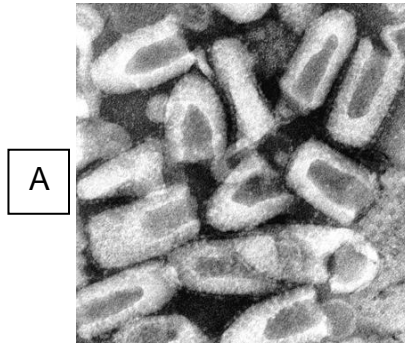
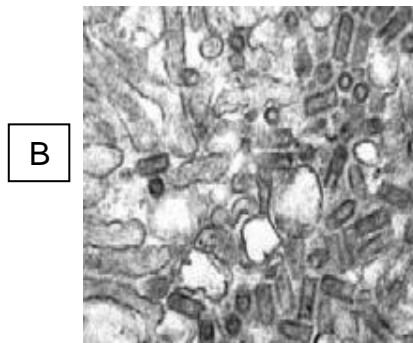
-  **Proteína M**
-  **Glicoproteína G**
-  **Fosfoproteína P**
-  **Nucleoproteína N**
-  **Proteína L**
-  **RNA genômico**

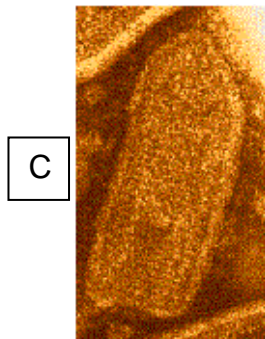
Figura 1: Esquema da composição estrutural do Vírus da Raiva.
Fonte: www.sciencephoto.com.br.



Fonte: www.utmb.edu/images/Rabies_virus.jpg



Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov/Rabies_virus_fox.jpe



Fonte: www.cdc.gov/kidsrabies/images/rabvir1.gif

Figura 2: Micrografias do RABV corados negativamente. A- x70000, B- x40000 e C- x200000, respectivamente e aproximadamente.

1.4.2. Organização genômica do RABV

O genoma do RABV, na amostra fixa Pasteur Virus (PV), contém 11932 nucleotídeos (nt). O RNA genômico é linear e policistrônico, com sentido negativo, codificando do extremo 3' (região amino-terminal) para 5' (carboxi-terminal), com o final 5' trifosfatado e não poliadenilado. Possui

cinco genes dispostos nesta ordem: gene da nucleoproteína N (1350 nt), gene da fosfoproteína P (M1 ou NS) (891 nt), gene da proteína matriz M (M2) (606 nt), gene da glicoproteína G (1572 nt) e gene da RNA polimerase RNA dependente L (6426 nt). Possui 5 ORF (*“open reading frame”*), transcrevendo as proteínas estruturais com as mesmas designações dos seus respectivos genes (Tordo et al., 1986).

Um promotor multifuncional, designado por *“leader”* (Le), que atua de forma *“cis-acting”* (inserido e atuando no genoma), para polimerização, é reconhecido pela transcriptase (somente L) ou pelo complexo polimerase (L mais P). O promotor Le se situa na extremidade 3' e transcreve um pequeno mRNA, o RNA líder (RNA-Le), não traduzido, com 58 nt de comprimento, correspondente ao trecho de nt do extremo 3' do genoma precedendo o gene N. O RNA-Le não é poli (U), ou seja, poliadenilado, e indiretamente, controla a mudança (*“switch”*) da transcrição para a replicação do genoma do vírus. A mudança do modo de transcrição para replicação pode estar associado à capsidização destes RNA-Le por N (Yang et al., 1998, 1999).

Além destas funções, o RNA-Le parece funcionar como um sinalizador para que a N se ligue ao RNA genômico (Yang et al., 1998). Há evidências que os aa 298 a 352 de N, região altamente conservada, parece ser o sítio de ligação para a região compreendida entre os nt 20 a 30 do RNA-Le (Kouznetzoff, Buckle e Tordo, 1998).

No extremo 5', no final do genoma, há uma seqüência de 69 nt, designado por *“trailer”* (Tr), que é o promotor para a síntese do antígenoma, de sentido positivo, necessário para a replicação do genoma com sentido negativo (Tordo e Kouknetzoff, 1993; Conzelmann e Schnell, 1994; Whelan e Wertz, 1999).

As regiões Le e Tr são ricas em resíduos uracila (U) e adenina (A) entre os nt 7 a 40, em todos os *Lyssavirus*. As áreas entre os nt 10 e 20 das regiões Le e Tr, possuem uma perfeita complementaridade quando comparadas, indicando ser uma área com iguais funções durante a transcrição e replicação (Tordo e Kouknetzoff, 1993). Essas áreas podem corresponder ao sinal de reconhecimento do complexo polimerase L na transcrição e na replicação. Também existe uma perfeita complementaridade entre os 11 primeiros nt das extremidades 3' e 5'. Esta complementaridade é encontrada em todos os vírus RNA não segmentados de sentido negativo e pode representar a conservação de sinais entre o genoma e o antígenoma, sinalização esta fundamental para a replicação (Tordo, 1996). Como o extremo 3' do genoma possui um promotor para a acomodação de L, o antígenoma também necessita o ter para a replicação (Finke e Conzelmann,

1997). Assim, a conservação das extremidades 3' e 5', do genoma (e antígeno) são fundamentais para a transcrição e replicação (Wunner, 2002).

Os sinais genômicos internos de início e parada da transcrição do RABV flanqueiam os genes. São compostos por nove nt de uma seqüência de consenso entre os *Rhabdoviridae* (Tordo, 1996). No final de cada gene há uma seqüência poli (U) (códon de parada) que poliadenila as regiões finais dos mRNA, de sentido positivo. Nos genes M e G de algumas amostras do RABV há códons de terminação alternativa, pois existem dois códons de parada em cada um dos genes (Tordo e Poch, 1988).

As seqüências intergênicas do genoma variam em composição e tamanho e, em alguns casos, a região 5' do mRNA transcrito se sobrepõe à região 3' do gene seguinte. A região entre os genes N e P tem os nt GA; a região entre os genes P e M tem GUCCG; a região entre os genes M e G tem GAUAA e a região intergênica entre os genes G e L [chamada psi (Ψ) ou G-L] tem, em média, 423 nt (Tordo, 1996; Finke, Cox e Conzelmann, 2000).

A região intergênica G-L, a mais extensa, possui 423 nt na amostra fixa PV (Tordo et al., 1986). Esta região é um dos alvos para o estudo da evolução molecular do RABV, pois é susceptível a mutações, mesmo quando livre de pressões seletivas e, assim, é pouco conservada (Sacramento, Bourhy e Tordo, 1991). Segundo Tordo et al. (1986), esta região representa um gene remanescente, um pseudogene, uma vez que é longa o suficiente para sintetizar um peptídeo e apresenta os sinais clássicos de início e parada de transcrição do vírus. No entanto, até a presente data não há registro de isolamento de nenhuma proteína derivada desta região. Em outros *Rhabdoviridae*, como os *Vesiculovirus*, nesta região há um sexto gene (Tordo, 1996).

Morimoto, Ohkubo e Kawai (1989), estudando as amostras fixas HEP-Flury (*High Egg Passage-Flury*) e ERA (*Evelyn-Rokitnicki-Albelseth*), encontraram uma organização genômica diferente na região G-L daquela descrita por Tordo et al. (1986). Os autores demonstraram que a amostra HEP-Flury não apresenta o sinal de parada de transcrição (poli A) entre a extremidade 5' do gene G e a 3' da região não-codificante G-L, considerando, portanto, que esta região esteja integrada ao gene G, podendo ser transcrita como parte deste gene. Na amostra ERA, verificaram a mesma organização genômica de PV sugerida por Tordo et al. (1986), porém mostraram, através do isolamento de glicoproteínas de tamanhos diferentes, que a transcrição do gene da glicoproteína pode terminar em dois

pontos distintos: na posição +10 a partir da extremidade 5' do gene ou na extremidade 5' da região G-L (sinal de poliadenilação).

Resumindo e em relação ao gene G, no genoma das amostras vacinais PV e ERA, há dois sinais de poliadenilação (ou *códon* de parada), enquanto que em outras amostras vacinais há somente um. O primeiro *códon* de parada das amostras vacinais PV e ERA são localizados no final do gene G, enquanto que o segundo se localiza no final da região intergênica G-L (Figura 3).

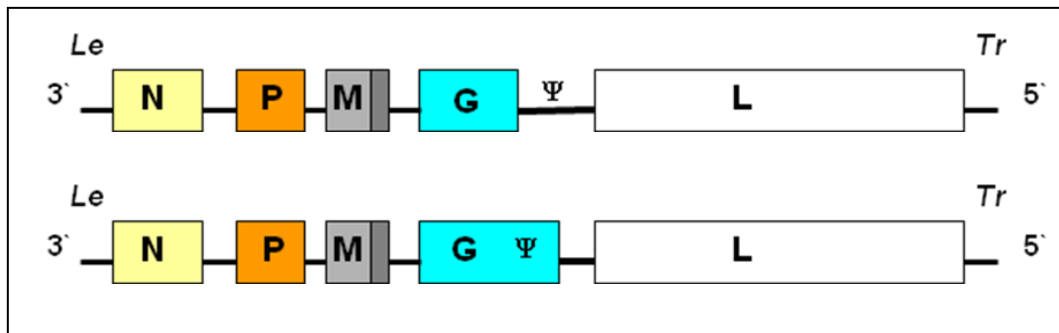


Figura 3: Representação esquemática da organização genômica das amostras fixas PV e ERA do RABV proposto por Tordo et al. (1986) (acima) e a representação esquemática da organização genômica da amostras fixa HEP-Flury (abaixo) do RABV proposto por Morimoto, Ohkubo, Kawai (1989), mostrando a integração da região não-codificante G-L dentro do gene que codifica para a glicoproteína do vírus. Fonte: Morimoto, Ohkubo, Kawai (1989).

1.4.3. Transcrição e Tradução do RABV

A transcrição inicia-se pela extremidade 3' do genoma e segue formando os cinco tipos de mRNA com “*cap*” (adição de metil-guanosina) na região 5' e poliadenilados na região 3'. A transcrição é iniciada no momento em que L reconhece o sinal “*cis acting*” Le. Primeiramente é transcrito o RNA-Le, sem “*cap*” ou poliadenilado, relativo à região Le, que não é traduzido. O transcrito Le interage com os promotores (“*start codon*”) situados no início de cada gene, permitindo que a transcrição dos mesmos ocorra. A interação de Le com os promotores é necessária para que L “se apóie” em Le e inicie a transcrição (Yang et al., 1999).

1.4.3.1. Os transcritos mRNA do RABV

Os transcritos mRNA possuem sentido positivo e são monocistrônicos. A seqüência invariável 3'-UUGU-5' do genoma (5'-AACAA-3' em cada transcrito complementar ao genoma) identifica o sinal de início da transcrição (“*start codon*”). Durante a síntese dos mRNA nascentes L adiciona ao nt final 5' uma metilguanósina (5'-m7Gppp) (“*cap*”) (Testa, Chanda, Banerjee, 1980). No RABV, a seqüência 3'-AC(U)₇₋₈-5', na região final 5' de cada gene (“*upstream*” em relação as seqüências intergênicas), é a região-sinal de parada (*códon* de parada) para a poliadenilação dos mRNA (5'-UGAAAAAAA-3' no final 3' de cada mRNA complementar). O último mRNA é a ORF do gene G mais a seqüência intergênica G-L (em algumas amostras, como discutido anteriormente). Quando L opera no modo de transcrição, ao alcançar a região com 7 ou 8 uracilas no genoma, ela pára e, repetidamente, copia esta área. Este processo gera a cauda poli-A (com mais de 200 'A's) no final 3' do mRNA. O novo mRNA é liberado e a transcriptase, após “saltar” a próxima região intergênica e reconhecer o próximo “*start codon*” já ligado à Le, inicia a transcrição do mRNA do próximo gene (Tordo e Kouknetzoff, 1993; Gould et al., 1998).

A produção dos cinco diferentes mRNA não é igual em número. Ocorre um gradiente decrescente na produção dos mRNA (e das proteínas traduzidas) nesta ordem: N > P > M > G > L. O que determina esta molaridade decrescente dos produtos gênicos é a progressão seqüencial de L. Nem todas L que transcreveram o gene anterior iniciam a transcrição do próximo. O tamanho da região intergênica G-L (423 nt, em média) causa uma grave diminuição na transcrição do gene L (Finke, Cox, Conzelmann, 2000). Portanto, a localização de um gene influencia diretamente sua taxa de transcrição, indicando que o controle da expressão gênica está relacionado com a localização do gene no genoma (Banerjee e Barik, 1992).

Pensa-se que L dissocia-se do genoma após a leitura de cada sinal de parada, antes de reconhecer o próximo sinal de início do gene seguinte. Como as regiões intergênicas, não transcritas, são muito curtas (dois ou cinco nt e com exceção da região G-L), o grande complexo polimerase tem dificuldade em unir-se ao próximo sinal de início. Este mecanismo explicaria o grande número de produtos do primeiro gene e pouquíssimos do último (1800 e 60 respectiva e aproximadamente) (Banerjee e Barik, 1992; Finke, Cox, Conzelmann, 2000). Esta característica não é restrita ao RABV, pois está presente em todos os representantes da Ordem *Mononegavirales*, onde os genes das proteínas estruturais se posicionam na região 3', enquanto o gene da polimerase, necessária em pequenas concentrações, se encontra na posição 5' (Tordo et al., 1992).

A tradução dos cinco mRNA (ver item 1.4.6. O ciclo de infecção do RABV) inicia-se com o *códon* de iniciação AUG (metionina) na região 5' e termina na posição 3', com os *códons* de parada: UAA ou UGA (Wunner, 2002).

1.4.4.Replicação do RABV

A replicação do genoma ocorre após a tradução, com a formação de vários RNAs intermediários com sentido positivo, os antigenomas, que são moldes para a síntese do RNA genômico de sentido negativo (Tordo, 1996; Wunner et al., 2002).

Os antigenomas são sintetizados no sentido positivo e de modo policistrônico, pois L deixa de reconhecer os sinais de início e parada dos genes. Logo que o antigenoma e o genoma são produzidos eles são recobertos (capsidados) por proteína N. Tanto o genoma quanto o antigenoma, para serem funcionais, devem estar revestidos por proteína N e, portanto, a replicação é dependente da síntese desta proteína (Banerjee e Barik, 1992; Tordo e Kouknetzoff, 1993).

O início da síntese do antigenoma e, posteriormente, o genoma, é produto de alguns eventos.

Inicialmente ocorre a cobertura dos RNA-Le pelas proteínas N recém-produzidas, inativando-as. Este fenômeno impede que L inicie a transcrição dos mRNA monocistrônicos de cada um dos genes, pois a união de L aos promotores de transcrição é dependente da presença de RNA-Le (Yang et al., 1998, 1999).

Outro evento necessário para que ocorra a replicação do genoma do RABV é a união de proteína N ao RNA genômico. Assim que N recém produzida se une ao RNA genômico L não reconhece os sinais de início e parada, respeitados na transcrição. Enquanto a quantidade de proteína N unida ao genoma for pequena, L reconhece os sinais de poliadenilação ("*stop códon*"), se solta do RNA genômico e reconhece os sinais de início dos genes seguintes, produzindo novos mRNA. Portanto, havendo quantidade suficiente de N sobre o RNA genômico, os sinais internos não são respeitados e a polimerase segue a leitura do genoma ininterruptamente (Wertz, Davis e Patton, 1987; Banerjee e Barik, 1992).

Nas fases iniciais da infecção, como a presença de N ainda é pequena, a replicação viral é praticamente inexistente, no entanto, após a síntese de grandes quantidades de N, inicia-se a replicação do genoma do RABV. Assim, N é a responsável pela mudança ("*switch*") entre transcrição e

replicação (Tordo, 1996; Wertz, Davis, Patton, 1987; Banerjee e Barik, 1992). Como resultado, ocorre à transcrição do RNA genômico com sentido positivo, o antígenoma, que servirá de molde para a produção do genoma com sentido negativo do RABV (Wunner, 2007).

1.4.5. Variação genotípica do RABV

Como outros vírus RNA, o RABV apresenta pouca fidelidade durante a replicação pela falta de reparo (“*proofreading*”) e correção dos erros após a replicação. Isto ocorre porque L não tem atividade exonucleásica, que retira nt adicionados incorretamente. Isto causa a incorporação de mutações e, portanto, inicia a formação de distintos genomas de mesma origem que o ambiente selecionará (Kissi et al., 1999).

Apesar deste aumento progressivo de variação genotípica, uma linhagem do RABV pode evoluir e expressar mutações características que determinam fenótipos que são expressos nas relações vírus-hospedeiro (Morimoto et al., 1998).

As mutações no RABV ocorrem com frequência média de 10^{-4} - 10^{-5} /nt por ciclo de replicação, alterando a frequência genômica da população viral. Assim, as novas linhagens do vírus que incorporam novas mutações, na tentativa de se adaptarem, são selecionadas. Este fenômeno forma subpopulações designadas como “*quasispecies*” (Tsimring, Levine, Kessler, 1996). As diferenças encontradas entre amostras de vírus de diversas regiões, em diferentes momentos, podem ser analisadas através deste modelo genético (Morimoto et al., 1998; Kissi et al., 1999).

O ambiente de um vírus RNA é fechado, porém possui componentes que afetam sua adaptação. Áreas do citoplasma das células infectadas, individualidade dos hospedeiros e o próprio ambiente ecológico habitado pelo hospedeiro, modulam a resposta adaptativa dos vírus RNA (Domingo e Holland, 1997).

Populações com altas taxas de mutações, como os vírus RNA, possuem uma significativa proporção de mutantes deletérios. Além disto, mutações individuais podem ser perdidas por deriva genética e também por estrangulamento populacional (“*bottlenecks*”), permitindo que características de alta ou baixa adaptação ambiental possam se tornar prevalentes no hospedeiro (Clarke et al., 1993).

A baixa taxa de mutação de um genoma diminui a possibilidade de variações adaptativas selecionáveis (Muller, 1964). Em grandes populações,

como as de vírus, uma mutação benéfica pode ocorrer durante o crescimento populacional. Assim, a probabilidade de características com grande valor adaptativo ser transferida para um novo hospedeiro é alta (Clarke et al., 1993).

A falta de diferenciação de variações ambientais induz competição entre os componentes de uma dada população (Hardin, 1960), porém as altas taxas de mutações dos vírus RNA podem causar coexistência de varias linhagens geneticamente distintas. A coexistência é possível porque elas utilizam o ambiente de forma diferente e em taxas diferentes, diretamente proporcionais ao tamanho de cada linhagem (Miralles et al., 1999).

Nas linhagens de vírus, as mutações com alto valor adaptativo tendem a se fixar no conjunto delas quando estão agrupadas. Os vírus se adaptam pelo aparecimento e fixação de mutações com alto valor adaptativo (Clarke et al., 1993). Esta situação tem limites. Havendo aumento na adaptação das linhagens mais elas crescem, chegando a um ponto que o ambiente cria resistência, como por exemplo, pela falta de matéria prima (nt e aa), espaço, morte prematura da célula, ativação de sistemas SOS do metabolismo celular, entre outros (Miralles et al., 1999).

A diversidade e abundância de nt e aa são fatores que afetam sobremaneira a sobrevivência das linhagens dos vírus. Os sinais de início e parada de transcrição são pontos conservados, onde as taxas de mutações são pequenas. Alterações nestas áreas alteram a produção dos ácidos nucléicos (e cosequentemente proteínas), fazendo com que ocorra a abundância de certos nt ou aa e a falta de outros. A ocorrência de mutações que favoreçam a replicação de uma linhagem de vírus, com seqüência nucleotídica diferenciada, determina o maior uso de certos nt ou aa, levando-os à escassez, enquanto há a abundância de outros. Inserções sinônimas podem produzir o mesmo efeito, como também a presença de partículas defectivas (Bracho, Moya, Barrio, 1998).

O conceito de "*quasispecies*" (Eigen e Schuster, 1977) afirma que o alvo da seleção ambiental não é um simples genótipo, mas um conjunto de genótipos mutantes distribuídos ao redor do mais freqüente. Ou seja, "*quasispecies*" é uma classe de mutantes dentro das probabilidades de mutações. A classe de uma "*quasispecies*" que replicar mais rapidamente será selecionada positivamente. Assim, a seqüência individual não é selecionável e sim o conjunto de "*quasispecies*".

Dentro do ponto de vista da genética de populações os vírus são variadas populações mutantes dispersas, e não um conjunto proveniente de uma seqüência selvagem original, como as "*quasispecies*" (Eigen, 1996).

Para a genética populacional, as populações de vírus possuem uma extrema variabilidade genética. Estas populações são derivadas de “*replicons*”, originados através de mutações, e selecionados de forma simples através de adaptações ambientais. A genética de população não se baseia no indivíduo ou nos conjuntos de indivíduos, e sim em um grupo semelhante com variação genética (Miralles, Moya, Elena, 1997).

Os autores que moldaram o conceito “*quasispecies*” afirmam que a genética de populações é uma boa teoria para populações de reprodução sexuada, onde mutação é um evento raro e a seleção de genótipos é a principal força atuante, gerando populações homogêneas, pois adiciona e fixa possíveis variações neutras por deriva genética (Felsenstein, 1971; Haigh, 1978).

Miralles, Moya, Elena (1997), analisando e comparando os dois modelos de estudo, genética de população e “*quasispecies*”, concluem que um pesquisador deve e pode optar pelo modelo o qual estiver mais familiarizado, pois os resultados da análise, principalmente em relação aos vírus RNA, serão os mesmos.

1.4.6.O ciclo de infecção do RABV

Os eventos no ciclo de replicação do RABV, na célula hospedeira, são semelhantes aos de muitos outros vírus, ou seja: adsorção, penetração, transcrição, tradução, replicação, maturação e liberação por brotamento (gemação) (Fauquet et al., 2007). Todas as fases intracelulares ocorrem no citoplasma celular, motivo pelo qual o genoma do vírus possui o gene L. No que diz respeito aos genes estruturais do vírus estes apresentam diferentes funções, de acordo com o estágio da infecção (Wunner, 2007).

O vírus liga-se a receptores celulares (proteínas de membrana) por meio das espículas, formadas por trímeros da glicoproteína G encontradas sobre a superfície do envelope do vírus (Lafon, 2005).

A adsorção não é dependente de temperatura, mas de pH, sendo o pH 6,3 o mais favorável, pois este pH determina pequenas mudanças conformacionais em G. As espículas, em pH ácido, mudam de conformação, tornando-se mais compridas e irregulares. Esta mudança é reversível e, de novo em pH 7, retomam a sua conformação original. Portanto, a conformação de G é dependente de pH (Gaudin et al., 1995).

O reconhecimento dos receptores celulares depende da topografia das espículas. O sítio antigênico III, que possui o aa arginina na posição

333, que determina a neurovirulência do RABV, é preservado na configuração ácida (Gaudin et al., 1995).

Em relação ao neurotropismo, é provável que o vírus reconheça receptores de membrana, como o receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) encontrado nas junções neuromusculares, os prováveis locais de entrada do vírus no Sistema Nervoso (SN) (Lentz et al., 1982). Lentz et al., (1984) verificaram uma grande semelhança estrutural entre os aa 189 a 214 de G com a neurotoxina extraída de serpentes venenosas, um forte ligante do nAChR. Porém nem todas as células susceptíveis a infecção pelo RABV possuem nAChR (Lafay et al., 1991). Há indícios que componentes das membranas celulares com fosfolípidios e glicolípidios estimulam o neurotropismo do RABV. Em neurônios e fibroblastos, componentes de membrana como o ácido siálico e gangliosídeos, podem estar envolvidos (Lentz et al., 1986). Outros dois receptores descritos como importantes para a entrada do vírus na célula hospedeira são a molécula de adesão de neurônios CD56 (*“neural cell adhesion molecule”*) (NCAM) (Thoulouze et al., 1998) e o receptor de neurotrofina de baixa afinidade (*“low-affinity neurotrophin receptor”*) (p75NTR) (Tuffereau et al., 1998).

Após o RABV se ligar ao receptor celular ocorre a invasão da célula hospedeira, normalmente pela fusão do envelope com a membrana celular (Superti, Derer, Tsiang, 1984). A penetração do vírus é dependente de temperatura, sendo 37°C o ponto ótimo. A endocitose (pinocitose) é a hipótese aceita para explicar a entrada do vírus na célula. Cada uma das vesículas endocíticas incorpora vários (dois até cinco) *virions* (Tsiang, 1993; Gaudin et al., 1993).

No interior da célula ocorre a decapsulação do *virion*, ou seja, a liberação da ribonucleoproteína (RNP) no citoplasma. O baixo pH interno do vacúolo digestivo, formado pela união do endossomo mais lisossomo celular, faz com que a membrana do vacúolo una-se à membrana do envelope do vírus. Esta união membranosa aumenta a pressão interna do *virion*, ejetando a RNP diretamente no citoplasma. Desta forma, o genoma não é lesado pelo suco digestivo dos lisossomos e também pelas nucleases e proteases celulares, pois são protegidos pelo próprio endossomo (Gosztonyi, 1994; Wunner, 2007).

Uma vez a RNP livre no citoplasma, ela desespiraliza para que a transcrição e a replicação possam ocorrer (Iseni et al., 1998). Nesta situação, imediatamente se inicia a transcrição dos cinco mRNA, sua tradução e, logo em seguida e concomitantemente, a replicação (Marsh e Helenius, 1989; Whitt et al., 1991; Gaudin et al., 1992).

A transcrição é realizada pelo complexo polimerase, L mais a proteína P que age como cofator. Este complexo age sobre os sinais de início (“*start códon*”) produzindo os cinco mRNA monocistrônicos (Flamand e Delagneau, 1978). Em cada junção intergênica o complexo polimerase pausa e uma estimada porcentagem deles (20% a 30%) se dissociam e, conseqüentemente, há uma atenuação da transcrição em direção a região 5’ (“*downstream*”) (Finke, Cox, Conzelmann, 2000).

Todas as proteínas virais são transcritas e traduzidas simultaneamente. As proteínas N, P, M e L são traduzidas nos ribossomos livres do citoplasma, enquanto que G é nos ribossomos ligados a membrana do retículo endoplasmático rugoso (ergastoplasma) (RER) (Gaudin et al., 1992).

Após a síntese de G, esta é transportada para o *lúmen* do RER, onde é iniciado seu processamento. No interior do RER, pontes dissulfídicas são adicionadas em G, além das dobras realizadas por enzimas e “*chaperones*” celulares. Além disto, o monômero de G sofre modificações e é glicosilada. Alguns dos seus aa asparagina são glicosilados pelo processo N-glycan (oligossacarídeos ligados a cadeia lateral do aa asparagina). Em seguida, o pós-processamento dos monômeros de G é finalizado no complexo de Golgi (CG), onde G são agrupadas, três a três, formando os trímeros das espículas do vírus. São as espículas que possuem atividade biológica (Shakin-Eshleman et al., 1992; Whitt et al., 1991; Gaudin et al., 1992; Gaudin, 1997a).

Após a transcrição das proteínas, principalmente N, a replicação se torna o evento dominante (Finke e Conzelmann, 1997).

1.4.6.1. Morfogênese e gemação do RABV

Havendo suficiente número das cinco diferentes proteínas e, também, RNA genômico, ocorre a montagem do vírus (morfogênese). Concomitantemente à formação da RNP (a união de N, P e L ao RNA), as proteínas M e G se deslocam em direção a membrana celular para que, em seguida, ocorra a gemação do *virion* (Wunner, 2007). Estes eventos ocorrem enquanto a célula se mantém metabolicamente competente. A morfogênese viral está associada à formação de uma matriz intracitoplasmática, conhecida como corpúsculos de Negri ou de inclusão, que antecede a formação dos novos *virions* (Matsumoto, 1962). Lahaye et al. (2009) obtiveram evidências que o corpúsculo de Negri pode ser o local de replicação e transcrição do RABV (Figura 4 e Figura 5).

No citoplasma da célula infectada, as proteínas N e P recém-formadas formam complexos homólogos (N-N ou P-P) ou heterólogos (N-P) (Gigant et al., 2000). Em seguida, ocorre a associação de P com N, na proporção de 2N para 1P. A razão 2N:1P é encontrada nos *virions* (Mavrakis et al., 2003). Supõe-se que esta razão permita a capsidização específica dos genomas dos vírus RNA negativos, e não de outros RNA celulares (Banerjee e Barik, 1992). Liu et al. (2004), acreditam que P impede a fosforilação imediata de N, determinando que esta se ligue mais fortemente ao RNA do RABV, além de impedir a capsidização de RNA celular. A seguir ocorre a capsidização do RNA, ou seja, a cobertura do genoma do RABV pelas proteínas N e P e, conseqüentemente, a formação da RNP.

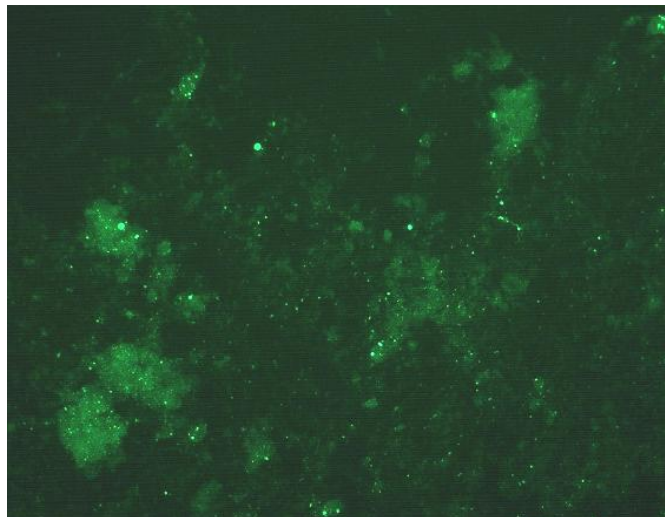


Figura 4: Reação de imunofluorescência positiva para a pesquisa de antígeno rábico em impressões de tecido nervoso de animal infectado. Observar corpúsculos de inclusão (estruturas circulares) Fonte: Instituto Pasteur (www.pasteur.saude.sp.gov.br).

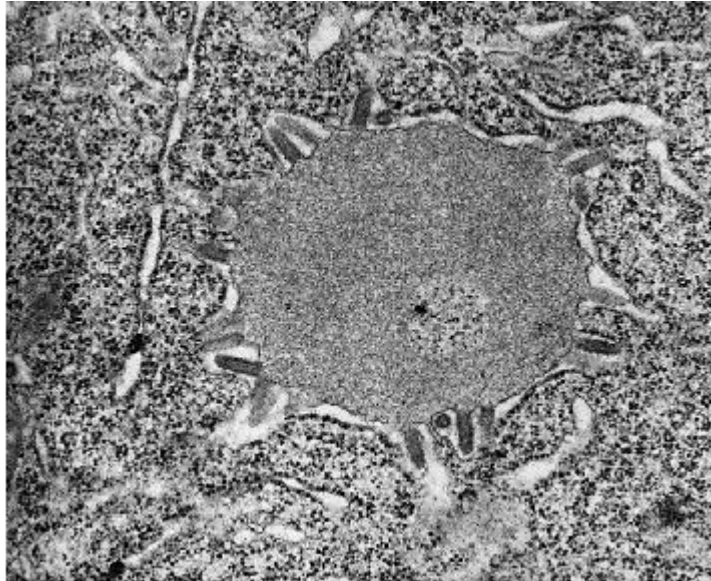


Figura 5: Micrografia eletrônica corada negativamente de Corpúsculo de Negri (estrutura central circular). Observar partículas do RABV ao redor do Corpúsculo de Negri. X64000. Fonte: www.news.bbc/diseases/img/rabies.

Pouco se conhece do modo pelo qual L se liga ao RNA. Do estudo de outros vírus RNA negativos, acredita-se que P auxilie L a se ligar no RNA (Buchholz et al., 1994). Estudos recentes com o RABV descrevem estruturas em forma de anel que parecem definir as relações bioquímicas e biofísicas para a montagem da RNP. Porém, a função dos aa ou dos “*motifs*” destes anéis necessitam ser elucidados (Albertini et al., 2006).

Proteínas M são multifuncionais e seguem dois caminhos. Uma parte se une a RNP, condensando-a, fazendo cessar a transcrição e replicação, além de dar o formato característico do RABV (Finke, Mueller-Waldeck, Conzelmann, 2003) e, também, inicia o “enovelamento” da RNP, conferindo-lhe o formato de “mola” que caracteriza a disposição helicoidal da RNP (Batista, Franco, Roehe, 2007).

Outra parte se une a membrana da célula hospedeira, preparando-a para a liberação dos *virions*. Outra função atribuída a M é a supressão de L durante o processo de gemação do *virion* (Ito et al., 1996).

A proteína M é reconhecida tanto por G como também pelas proteínas P e N. A presença de M na membrana celular desencadeia a migração da RNP em direção as regiões da membrana onde se encontra G, e são nestas regiões que ocorre a gemação do *virion* pelas vias normais de secreção celular (Mebatsion, Weiland, Conzelmann, 1999).

Nos estágios finais da morfogênese a pressão exercida pela RNP, nos locais onde G e M estão presentes, faz com que ocorra o revestimento do *virion* pela membrana da célula hospedeira, formando desta forma o envelope do RABV e, finalmente, liberando novas partículas infectantes (Gaudin et al., 1993) (Figura 6).

Todas as atividades, diretas e indiretas, relacionadas anteriormente tornam a proteína M de fundamental importância na morfogênese do vírus (Wunner, 2002). Porém, G também tem um papel crítico na liberação e biogênese do RABV. Primeiramente, esta proteína agrega-se em regiões basolaterais da membrana celular, direcionada, provavelmente, por enzimas presentes no citoesqueleto celular. O domínio citoplasmático de G, com carga negativa, parece dirigir a reunião da RNP, revestida por M, à membrana celular (Gaudin et al., 1992; Gaudin et al., 1993).

Durante o ciclo de vida do RABV no interior da célula ocorre a inibição, mesmo que pequena, da síntese de RNA, DNA e proteínas celulares. Os dois principais fatores destas inibições, provavelmente, são os RNA-Le, formados no início da transcrição, e a proteína M do vírus, pois ambos são encontrados no núcleo das células infectadas e, provavelmente, devem ter alguma ação sobre a expressão gênica celular (Remenick, Kenny, McGowan, 1988).

Após a saída dos *virions* das células hospedeiras, em direção aos espaços intercelulares, eles podem infectar outras células vizinhas, mesmo na presença de anticorpos neutralizantes (AcN). Porém, se a distância for maior a presença de AcN inativa o *virion*, bloqueando sua união aos receptores celulares (Dietzschold et al., 1985). *In vivo* e no SN o RABV é infectante mesmo a distâncias consideráveis (Kucera et al., 1985).

1.4.7.As proteínas e os genes do RABV

1.4.7.1.A Nucleoproteína N

A nucleoproteína N possui 450 aa e é muito conservada durante o processo evolutivo do RABV (Ertl et al., 1989). A conservação genética de N ao longo do tempo ocorre, provavelmente, pelos seguintes fatos: interage com o RNA capsidando-o; é a mais abundante proteína do capsídeo; protege o genoma contra nucleases celulares; regula a replicação; modula a transcrição e interage com a fosfoproteína P durante a replicação e tradução (Wunner, 2002). A proteína N também é a mais conservada

antigenicamente, e por estas razões é a mais utilizada em diagnósticos e estudos das relações evolutivas e epidemiológicas (Tordo e Kouknetzoff, 1993) (Figura 7).

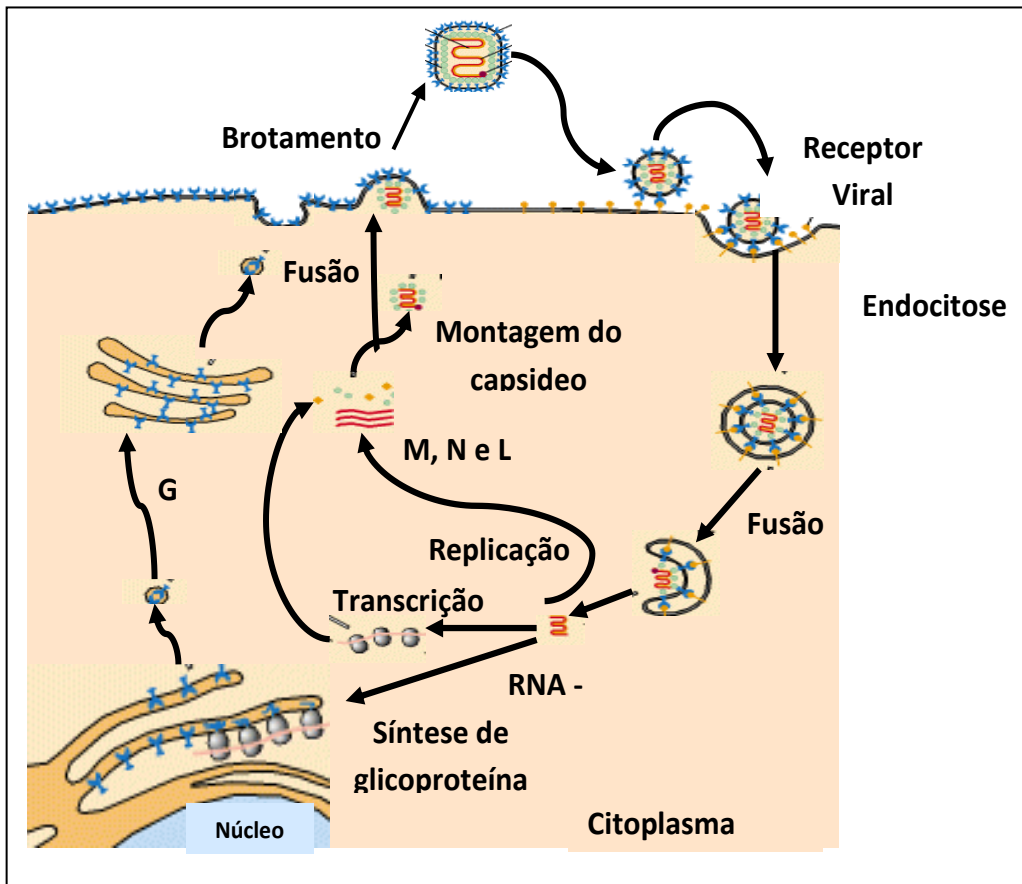


Figura 6: Representação esquemática do ciclo de replicação do vírus da raiva, evidenciando-se os processos de ligação, entrada, replicação, maturação e saída de novas partículas virais infectantes. Fonte: Piere (2003).

A interação da nucleoproteína N com o RNA genômico ocorre no trecho compreendido entre os aa 298-352 (Kouznetzoff, Buckle, Tordo, 1998). Uma N é encontrada a cada nove nt do RNA (Iseni et al., 1998; Luo et al., 2007). Acredita-se que após o genoma RNA do RABV ser capsidado por N, este sofre alterações estruturais que permitem a fosforilação da sua serina 389 (Kawai et al., 1999). Esta fosforilação de N é necessária para a ação da polimerase L durante a transcrição e replicação (Wu et al., 2002), como também para a interação de N com P na RNP (Toriumi e Kawai,

2004). A interação de P com N ocorre próximo a serina 389 fosforilada (Albertini et al., 2006; Luo et al., 2007).

Há um grande interesse na função imunológica de N. Epítomos para células B e T foram mapeados e encontrados nesta proteína em todos *Lyssavirus* (Lafon e Wiktor, 1985; Ertl et al., 1989). Também possui três epítomos antigênicos lineares no sítio antigênico I (aa 358-367) e mais três epítomos antigênicos lineares no sítio IV (em duas regiões: aa 359-366 e aa 375-383) (Goto et al., 2000). Os epítomos encontrados entre os aa 359-366 fazem parte dos sítios antigênicos I e IV e refletem diferentes estados conformacionais de N. Os epítomos encontrados entre os sítios I e IV também são conservados em todos *Lyssavirus*. Epítomos dependentes de conformação também formam os sítios antigênicos II e III (Goto et al., 2000; Wunner, 2002).

A proteína N é o principal antígeno para células T auxiliares CD4+ (Th). Vários epítomos para células Th foram localizados entre os aa 404-418 (Ertl et al., 1989). Esta proteína não induz a produção de AcN, porém induz o aumento da produção de AcN dirigidos à G (Fu et al., 1991). Os epítomos de N são imunodominantes, pois após ser inoculada periféricamente em diversas espécies animais, infectadas com amostras do RABV “de rua” e selvagens, os protegeu (Dietzschold et al., 1987). Esta proteína é o antígeno alvo das células Th em diferentes variantes antigênicas do RABV e, também, entre os diferentes genótipos do gênero *Lyssavirus* (Lafon et al., 1992).

A nucleoproteína N, associada ao RNP, é considerada um super-antígeno, pois potencializa a ativação periférica de linfócitos sanguíneos na utilização de várias vacinas humanas. Também estimula a produção de células T V β 8 CD4+ e liga-se a antígeno MHC classe II, expressos nas superfícies das células (Lafon et al., 1992).

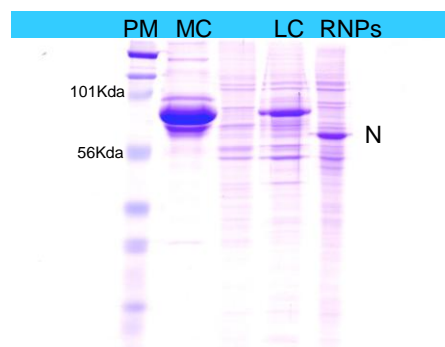


Figura 7: Eletroforese em gel de poliacrilamida mostrando o peso molecular da nucleoproteína N do RABV. PM= peso molecular, MC= meio de cultura, LC= lisado celular e RNPs= nucleoproteína N com 57KDa. Imagem cedida por Caporale, GMM.

1.4.7.2.O gene N

O gene N possui 1350 nt na amostra vacinal PV e, apesar de ser conservado, há uma relativa variação entre as amostras estudadas (Kuzmin et al., 2005).

A escolha do gene N como alvo para amplificação através de RT-PCR ocorre por dois aspectos principais: a) é a região gênica do RABV mais conservada (Kissi, Tordo, Bourhy, 1995); b) o gene situa-se no extremo 3' do genoma, e assim sua transcrição é favorecida, pois ocorre perda de eficiência da transcrição na direção 5' do genoma ("*downstream*") (Finke, Cox, Conzelmann, 2000). Principalmente por estas razões o gene N é muito utilizado nos estudos das relações filogenéticas do vírus (Kissi, Tordo, Bourhy, 1995; Holmes et al., 2002).

Kissi, Tordo, Bourhy (1995) estudando o polimorfismo genético do gene N, em amostras de RABV obtidas de vários continentes, demonstraram que a região central do gene é conservada e seus extremos são pouco conservados. Há baixa similaridade entre os nt 99-405 e 1080-1278. A menor similaridade encontrada situa-se entre os nt 30-300, enquanto que há grande similaridade entre os nt 500-900, ocorrendo maior similaridade entre os nt 750-850. A porcentagem mínima de similaridade nucleotídica foi de 83.3% nt, e 92.2 % em relação aos aa que formam a proteína N, portanto muitas mutações sinônimas são encontradas.

Provavelmente não há seleção dominante no gene N, e sim seleção estabilizadora. Esta seleção atua estabilizando o fenótipo ótimo no ambiente, mas pode ocorrer acúmulo de mutações neutras em populações de vírus separadas geograficamente. Este fato pode ocasionar divergências genotípicas, pois não há acúmulo de mutações não sinônimas (Holmes et al., 2002).

1.4.7.3.A Glicoproteína G

A Glicoproteína G é a única proteína do RABV capaz de induzir a formação e reagir com os AcN produzidos pelo hospedeiro do vírus. Esta glicoproteína tem 524 aa, deduzidos da clonagem de genes G de várias amostras do RABV, possuindo a mesma equivalência em nt no mRNA que a traduz. Pós-processada no RER, G contém 505 aa, pois ocorre uma clivagem retirando 19 aa da região N-terminal ainda no RER (Benmansour et al., 1992). A função deste segmento de G, com 19 aa, é dirigir a proteína

recém-traduzida em direção ao RER para que possa ser processada. Este fragmento de G recebe o nome de peptídeo sinal (SP) (Gaudin et al., 1992).

Pós-processada G é dividida em três regiões (domínios). O ectodomínio (ED), externo ao vírus e com 439 aa (1 a 439) da região N-terminal, o domínio transmembrana (TM), com 22 aa (440 a 461) e o endodomínio (ENDO), com 44 aa (462 a 505) da região C-terminal e situado no interior do vírus (Wunner, 2007).

Em células infectadas ocorre a produção de duas formas de G. Uma delas é semelhante à encontrada no envelope do RABV (pós-processada), que forma as espículas do vírus, com 505 aa. A outra, designada como a forma solúvel de G (Gs), possui com 447 aa, referente ao domínio externo ED e somente é encontrada no citoplasma celular. O gene G possui terminação alternativa, determinando a formação de G com os dois tamanhos descritos (Tordo, 1996).

O domínio TM é conservado, provavelmente por estar imerso no envelope do vírus, formado pela membrana plasmática dos diferentes hospedeiros. Esta conservação pode representar uma adaptação das linhagens do RABV adquirida durante o processo evolutivo vírus/hospedeiro (Wunner, 2007). O domínio TM é “ancorado” na membrana celular e no envelope do vírus pelo segmento de aa 439 a 461 após a palmitilação de G (Gaudin et al., 1992). O processo de palmitilação ocorre durante o processamento de G no RER. Neste processo é adicionado um ácido palmítico no aa cisteína 461, que determina a “ancoragem”, pois estabiliza o domínio TM de G no envelope do vírus (Gaudin et al., 1991). O sítio de palmitilação na cisteína 461 é conservado em todos *Lyssavirus*. Este sítio, provavelmente, também influencia no processo de gemação, pois este sítio também interage com a proteína matriz M (Wunner, 2007).

O domínio ENDO é o mais conservado, pois a identidade protéica aferida em linhagens do RABV isoladas em diferentes continentes permanece grande (Benmansour et al., 1992). A conservação deste domínio é justificada pelo fato de ENDO estar no interior do *virion* e ser a área de G responsável pela migração da RNP em direção a membrana celular, direcionada pelo citoesqueleto celular (veja morfogênese) (Wunner, 2007).

O domínio extracelular ED de G é o menos conservado, provavelmente pela pressão seletiva exercida pelo ambiente externo nesta área do vírus. A região ED é a mais imunogênica, estimulando tanto linfócitos B quanto linfócitos Th e T citotóxicos (Tc) (Dietzschold et al., 1990; Kawai e Morimoto, 1994).

A glicosilação de G no RER ocorre pela adição de oligossacarídeos no aa asparagina (N) no *sequon* (seqüência) NXS/T (S/T= serina ou treonina), onde X é qualquer aa diferente de prolina (P). A glicosilação é importante para a expressão e função de G, ou seja, determina suas atividades biológicas, como, por exemplo, estabilidade e antigenicidade (Shakin-Eshleman et al., 1992). Até o momento, três potenciais sítios de glicosilação foram encontrados nas linhagens do RABV. Estes sítios estão posicionados nos aa 26 (*sequon* NNS) (Carnieli et al., 2009), aa 37 (*sequon* NLS) e aa 319 (*sequon* NKT) (Wunner, 2007).

O aa alanina (A) 319 é conservado em todos *Lyssavirus* e é essencial para o correto e completo dobramento (“*fold*ing”) de G recém-processada, necessário para o subsequente transporte à superfície celular (Bourhy, Kissi, Tordo, 1993; Wojczyk et al., 2005).

A região entre os aa 189-214 de G interage com o receptor celular nAChR, o receptor celular preferencial do RABV em muitos tipos de células (Tsiang et al., 1986), enquanto que a região entre os aa 318-352 é, provavelmente, o sítio de ligação que reconhece e interage com o receptor celular p75NTR em neurônios (Lanvegin e Tuffereau, 2002).

Acredita-se que o domínio protéico de G relacionado à interação da membrana do endossomo com os lisossomos, no interior da célula infectada e para que ocorra a ejeção da RNP do RABV no citoplasma, se situa entre os aa 102 e 179 (Gaudin, 1997b; Kankanamge et al., 2003).

Apesar de não se saber o motivo, as cisteínas (C) de G são conservadas no RABV, como também o é em todos os outros *Lyssavirus* (Badrane e Tordo, 2001).

O aa arginina (R) ou lisina (K), na posição 333, desencadeiam a neurovirulência do RABV, principalmente pelo fato de permitir que ocorra o transporte das RNP através dos axônios e sinapses dos neurônios (Lafon, 2005).

Epítomos estimuladores de linfócitos B e T (Th e Tc) foram localizados em G (Celis et al., 1988). Oito sítios antigênicos (I-VI, “a” e G1) foram mapeados em ENDO. Os sítios antigênicos I, III, VI e “a” situam-se entre os aa 231, 330-338, 264 e 342, respectivamente. O sítio II é descontínuo e localizado entre os aa 34-42 e 198-200. Os sítios VI e G1 são lineares ou conformacionais (Wunner, 2007).

Para uma melhor análise da glicoproteína G é necessário sua cristalização, que até hoje é difícil, pela existência de dobras estruturais e que são perdidas durante o processo de cristalização (Wunner, 2002).

É provável que as variações de aa nas proteínas G permitam adaptações a novos hospedeiros e possibilitem a emergência de novos *Lyssavirus* no ambiente (Badrane et al., 2001).

1.4.7.4.O gene G

O gene G é de grande interesse para os estudos filogenéticos do RABV. Os principais motivos destes estudos são: importância na resposta imunológica; relação entre hospedeiros suscetíveis e patogênese da raiva (Badrane et al., 2001).

Foram detectadas regiões de elevada diversidade no gene G. As regiões com elevada diversidade relacionam-se com o reconhecimento de receptores neuronais e estimulação do sistema imune. Estas características podem facilitar a disseminação do vírus dentro de uma mesma espécie ou, ainda, entre espécies diferentes, o que pode alterar a epidemiologia da infecção (Benmansour et al., 1992; Morimoto et al., 1998; Badrane e Tordo, 2001). A razão de substituições sinônimas e não sinônimas no gene G é maior que 01, sugerindo seleção positiva neste gene (Badrane et al., 2001).

1.4.7.5.A Fosfoproteína P

A fosfoproteína P é formada por 297 aa, é multifuncional e é a menos conservada entre as outras proteínas do RABV (Wu et al., 2007).

Existem duas formas de P, uma menor (37 kDa) e outra maior (40 kDa), devido a existência de dois códons de início (“*start*” *códon*) (AUG) em “*frame*” no mRNA (Toriumi e Kawai, 2004). Esta proteína é fosforilada na região N-terminal por quinases celulares, que podem ser encontradas nos *virions* do RABV (Gupta et al., 2000).

Dois domínios protéicos de P interagem com N. Um encontrado na região C-terminal (entre os aa 267 e 297) e, outro, na região N-terminal (entre os aa 69 e 177) (Chenik et al., 1994). Depois que P se liga ao RNP em formação (RNA mais N) ela auxilia a ligação de L ao RNP. A interação de P com L ocorrem nos seus primeiros 19 aa (Chenik et al., 1998; Gerard et al., 2009).

Interagindo com N, a proteína P regula a ação da polimerase L na replicação e transcrição. É um “*chaperone*”, pois é uma proteína que age em ligações não covalentes de outras moléculas durante a formação ou quebra das suas estruturas, mas não está presente no substrato ao término da sua ação. Atua sobre N recém sintetizadas, impedindo sua polimerização ou sua união com RNA que não seja o do RABV (Mavrakis et al., 2003), como também direciona a capsidização do RNA por N (Gigant et al., 2000).

Como subunidade de L, P tem um papel duplo, pois é um co-fator não-catalítico, necessário para a transcrição dos genes e, também, para a replicação do genoma, estabilizando L e posicionando o complexo polimerase (L mais P) sobre o molde (“*template*”) RNA (Fu et al., 1994).

Outras interações que envolvem P estão relacionadas ao tropismo do RABV, a propagação do vírus célula a célula e a inibição da resposta imune inata que interfere ou cessa a replicação dos vírus (Wunner, 2007).

A proteína citoplasmática LC8 (“*dynein light chain*”), envolvida no transporte intracelular de organelas, interage fortemente com o domínio de P localizado entre os aa 138 e 172 (Raux, Flamand, Blondel, 2000; Gerard et al., 2009). A proteína LC8 parece estar envolvida com o transporte do RABV através dos neurônios, pois ela faz parte do complexo miosina V. Nos neurônios do cérebro, o complexo miosina V é a estrutura que forma os microtúbulos relacionados com o complexo actina das vesículas do RE (Jacob et al., 2000). Assim, o transporte da RNP ao longo dos dendritos em direção ao próximo neurônio, pode ser mediado pelo complexo P-dineína LC8, transportando a RNP pelo sistema de microtúbulos da célula (Ceccaldi, Gillet, Tsiang, 1989).

A proteína P também é responsável por inibir o fator de ativação IRF-3, que é necessário para o início da resposta imune pelo interferon (IFN), portanto, P é necessária para inibir a resposta do INF nas células infectadas pelo RABV (Wunner, 2007).

1.4.7.6. Proteína matriz M

A proteína M é a menor do RABV e contém 202 aa (24 kDa) (Conzelmann, Cox, Schneider, 1990). Há duas formas de M, uma menor, com 23 kDa (25-30% do total no *virion*) e outra maior, com 24 kDa (70-75% do total nos *virions*) (Ameyama et al., 2003).

Aproximadamente 1200-1500 proteínas M se ligam ao RNP, condensando-a e formando o arcabouço do *virion*. O tropismo da RNP pela

membrana celular é determinado por esta proteína, possibilitando sua gemação (Mebatsion, Weiland, Conzelmann, 1999). Um “*motif*” rico em prolina (PPPY ou PY) (P= prolina; Y= tirosina), localizado nos aa 35-38, na região N-terminal altamente conservada, parece estar associado à gemação (Harty et al., 1999, 2001). O “*motif*” PY é similar em outras proteínas relacionadas à função de M em diferentes vírus (Wills et al., 1994). Apesar da presença de M ligada na RNP ser responsável pela gemação do vírus, a interação desta proteína com G, presente nas membranas celulares, estimula fortemente o processo (Mebatsion, Weiland, Conzelmann, 1999).

1.4.7.7.RNA polimerase-RNA-dependente L

Na amostra vacinal PV, a polimerase L possui 2142 aa e o gene L ocupa, aproximadamente, 54% do genoma do RABV (Wunner, 2007).

A polimerase L é o componente catalítico do complexo polimerase que, juntamente com o cofator P, é responsável pela maioria das atividades enzimáticas que ocorrem tanto na transcrição quanto na replicação do genoma do RABV. Muitas das atividades deste complexo advêm de estudos com o Vírus da Estomatite Vesicular (VSV), o vírus protótipo da Família *Rhabdoviridae*. Além das atividades enzimáticas necessárias para a transcrição e replicação, L é responsável pelas modificações co-transcricionais dos mRNA, como por exemplo: 5'-capping, metilação e 3'-poliadenilação (Banerjee e Chattopadhyay, 1990).

Muitos pesquisadores dos vírus RNA com sentido negativo auxiliaram a determinar áreas do gene L com o objetivo de localizar seqüências genéticas do gene responsáveis pelas atividades enzimáticas da polimerase L (Tordo et al., 1986; Barik et al., 1990; Poch et al., 1990).

Uma das principais características de L é a existência de agrupamentos de aa conservados em blocos ao longo da proteína e nomeados com os números romanos I até VI (Poch et al., 1990). Nestes seis blocos alguns aa formam domínios conservados, enquanto outros não o são (Tordo e Poch, 1988; Banerjee e Chattopadhyay, 1990; Poch et al., 1990).

No bloco III, por exemplo, o domínio catalítico, entre os aa 530 e 1177, possui quatro “*motifs*” (A, B, C e D), e representa a região com o maior grau de conservação (Tordo e Poch, 1988; Poch et al, 1989). Estes “*motifs*”, que são considerados os módulos polimerase de L, mantém o mesmo arranjo linear e localização nas RNA polimerase e nas DNA polimerase (Barik et al., 1990; Delarue et al., 1990; Poch et al., 1990).

Entre as seqüências conservadas dos quatro “*motifs*” A, B, C e D, a seqüência GDN (glicina, ácido aspártico e asparagina), no “*motif*” C, é muito conservada em todos os vírus RNA com sentido negativo e não segmentados, sugerindo ser uma função catalítica da atividade polimerase (Poch et al., 1989). Não só a seqüência GDN, mas também alguns aa específicos, “*downstream*” da seqüência GDN, são fundamentais pela manutenção da atividade polimerase que polimeriza nt (Schnell e Conzelmann, 1995).

Duas outras seqüências, entre os aa 754 a 778 e 1332 a 1351, na polimerase L do VSV, foram definidos como sítios de consenso para a ligação e utilização de Trifosfato de Adenosina (ATP), similar as encontradas nas quinases celulares, isto é, as fosfotransferases, pois catalisam a transferência de um grupo fosfato do ATP alterando moléculas orgânicas (Barik et al., 1990; Canter, Jackson, Perrault, 1993). Três atividades essenciais realizadas por L necessitam de utilização do ATP: 1- a atividade transcricional requer ligação com o substrato ribonucleosídeo-trifosfato; 2- poliadenilação e, 3- a atividade quinase para a fosforilação de P necessária para a ativação da transcrição (Sánchez e Banerjee, 1985; Banerjee e Chattopadhyay, 1990).

Outras funções da polimerase L, que necessariamente devem existir, incluem: mRNA “*capping*” (adição de 7-metilguanossina (m₇G) no final 5’, metilação (adição de grupo metila no RNA) e poliadenilação (formação da cauda poli-A) (Schnell e Conzelmann, 1995).

Qanungo et al. (2004) propuseram uma nova abordagem para a atividade da polimerase L durante a transcrição e a replicação. A RNA polimerase L, segundo os autores, existe em duas configurações, uma designada por replicase e a outra por transcriptase e ambas são complexos multienzimáticos (holoenzimas). A replicase, relacionada à replicação, é formada pelas proteínas L, P e N, enquanto que a transcriptase, relacionada à transcrição, é formada pelas proteínas L, P e mais três moléculas celulares. Estas moléculas são: “*translation elongation factor 1 α* ”, o chaperone “*heat-shock protein 60*” e o “*mRNA-cap guanylyltransferase*”. A transcriptase sintetiza os cinco mRNA “*capped*” e monocistrônicos, transcritos a partir dos cinco genes do RABV. A replicase, por sua vez, inicia a sua atividade no primeiro nt da região 3’ do genoma. A replicase e a transcriptase reconhecem *códons* de iniciação (“*start codon*”) diferentes. Enquanto a transcriptase reconhece a seqüência-sinal de consenso dos *Mononegavirales*, para “*cap*”, inclusa no *códon* de iniciação, a replicase não o reconhece (reconhece a seqüência de nt da extremidade 3’ do genoma). Estas descobertas realizadas por Qanungo et al. (2004), abrem novas

perspectivas para a compreensão efetiva dos processos de transcrição e replicação dos *Mononegavirales*, entre eles o RABV, até hoje pouco compreendidas.

1.4.8.O RABV e a patogenia da raiva

Dietzschold et al. (2009), escreveram uma revisão sobre a patogenia da raiva e a sintetizaram em cinco tópicos principais, que apresentamos a seguir.

1. RAIVA E A BIOLOGIA DO RABV

- a) A raiva é uma encefalomielite aguda causada pelo RABV.
- b) O RABV pode infectar quase todos os mamíferos, inclusive o homem.
- c) Cães, morcegos e carnívoros silvestres são os reservatórios naturais do RABV.
- d) O RABV é um vírus RNA de sentido negativo que pertence à família *Rhabdoviridae*.
- e) Neuroinvasividade, neurotropismo e neurovirulência são as principais características do RABV.
- f) O RABV é, normalmente, transmitido por mordidas de mamíferos em um sítio periférico do SNC.
- g) Após entrar em axônios terminais o vírus é transportado em direção retrógrada ao SNC.
- h) RABV de “rua” (selvagens) e outros adaptados a culturas celulares (atenuados) diferem significativamente uns dos outros em relação a sua capacidade de invadir o SNC.
- i) Considerando que as linhagens de RABV adaptados às culturas celulares têm (ou não) capacidade limitada de invadir o SNC a partir de um local periférico, RABV de “rua” são altamente neuroinvasivos.

2. FATORES QUE DETERMINAM A VIRULÊNCIA DO RABV.

- a) Os principais fatores que determinam a virulência do RABV são: captação pela célula hospedeira, propagação célula-a-célula, sua taxa de replicação e expressão de glicoproteína G.

- b) A patogenicidade correlaciona diretamente com a cinética de absorção e propagação do vírus, mas inversamente com a taxa de replicação viral e do nível de expressão da glicoproteína G.
3. ELEMENTOS DO VÍRUS QUE CONTROLAM A PATOGENICIDADE DE RABV.
- a) A patogenicidade do RABV é uma característica multigênica, envolvendo diferentes proteínas do RABV, além de outros elementos celulares.
- b) A glicoproteína G é o principal determinante da patogenia da raiva.
- c) A glicoproteína G facilita a rápida entrada do vírus na célula e sua rápida propagação trans-sináptica e, também, regula a taxa de replicação do vírus em conjunto com outros elementos virais.
4. O PAPEL DA APOPTOSE NA PATOGENIA DA RAIVA.
- a) A patogenicidade do RABV se correlaciona inversamente com a sua capacidade de induzir apoptose neuronal.
- b) Existe uma correlação direta entre o nível de expressão da glicoproteína G com o da apoptose.
- c) Em contraste com a patogenicidade de RABV atenuado, o vírus de “rua” expressa níveis muito limitados da proteína G e não induzem apoptose ou necrose.
5. O PAPEL DE FATORES DE INDUÇÃO DA CÉLULA HOSPEDEIRA NA PATOGÊNESE DA RAIVA.
- a) A infecção com uma linhagem não patogênica do RABV causa mais fortemente a ativação das vias de síntese de fatores nucleares (NF)- κ B (fator nuclear kappa B) do que a infecção com RABV patogênicos.
- b) O NF- κ B é um fator de transcrição e é envolvido com a resposta celular a estímulos e desempenha papel fundamental na regulação da resposta imune.
- c) A forte ativação de genes relacionados com as vias NF- κ B desencadeia uma forte resposta imune que, provavelmente, limita a replicação de linhagens de RABV não patogênicos no sítio primário de infecção e, eventualmente, eliminam a infecção.
- d) A fraca ativação de genes relacionados com as vias NF- κ B pelas linhagens patogênicas induz uma resposta imune mais fraca e, conseqüentemente, pode permitir a propagação do vírus no SNC.

1.5.A Epidemiologia da Raiva

O RABV é mantido em diferentes ciclos epidemiológicos envolvendo diversas espécies de mamíferos, principalmente das Ordens *Carnivora* e *Chiroptera*. As espécies de hospedeiros do RABV são distribuídas geograficamente de acordo com suas histórias naturais. Assim, as variantes e linhagens do RABV circulam ao longo de um determinado território, o que permite suas identificações, pois elas estão adaptadas e são mantidas pelas diferentes espécies animais distribuídas regionalmente. Esta distribuição pode ser alterada se ocorrer a transmissão do vírus de um hospedeiro primário para um secundário (“*spillover*”) e, se esta nova população infectada mantiver a infecção ao longo do tempo, a área de distribuição do vírus é alterada, podendo ser ampliada (Childs e Real, 2007).

A partir do exposto acima é conveniente analisar a epidemiologia da raiva regionalmente e, portanto, a seção Epidemiologia da Raiva deste trabalho, está subdividida em relação às grandes regiões geográficas, isto é, os continentes.

1.5.1.A raiva na África

O cão (*Canis familiares*) é o principal reservatório do RABV no continente africano, é o responsável por milhares de casos de raiva humana e um sério problema para os mamíferos silvestres. Em 2005, foram confirmados 28823 casos de raiva humana; 17937 casos na área rural e 5886 casos na área urbana (WHO, 2005).

Além do imenso problema da raiva humana, os cães são responsáveis pela transmissão do vírus aos animais silvestres. Um caso extremo é a contaminação de canídeos raros, como o lobo etíope (*Canis simensis*) e o cão-silvestre-africano (*Lycaon pictus*). A infecção nas pequenas e raras populações destes animais atingiu tal ponto que se acredita ser irreversível seu processo de extinção. Em algumas populações de chacais (*Canis adustus* e *C. mesomelas*) e raposas (*Otocyon megalotis*) o RABV típico de cão circula endemicamente (WHO, 2005). Além dos canídeos silvestres africanos são relatados esporadicamente casos de raiva em leões, leopardos, camelos, hipopótamos, girafas, primatas e muitas outras espécies de mamíferos terrestres (Hanlon, Niezgodna, Rupprecht, 2007).

1.5.2.A raiva na Ásia

Como na África, o cão é o principal reservatório do RABV na Ásia, com exceção da Rússia asiática, onde o principal reservatório do vírus é a raposa vermelha. Pouco é conhecido de espécies silvestres com raiva neste continente, mesmo que casos esporádicos sejam relatados. Entretanto, a raiva humana transmitida por cães é o grande problema. Em 2005 foram relatados 30828 casos, assim distribuídos: Índia com 19259 casos (1058 na área urbana e 18201 na rural), China com 2581 casos (1324 na área urbana e 1257 na rural) e nos outros países asiáticos 8988 (853 na área urbana e 8135 na rural) (WHO, 2005).

1.5.3.A raiva na Europa

A Europa possui uma excelente documentação histórica sobre a raiva. Este histórico, inserido dentro da própria História do continente, demonstra que o controle desta zoonose é diretamente ligado às condições políticas e econômicas de uma região (WHO, 2005).

A raiva canina na Europa é conhecida desde a Antiguidade, mas por volta de 1940, teve suas características epidemiológicas alteradas. Desde esta época a raiva é mantida pela raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), em contraste com o início do século XX, quando os cães (*Canis familiaris*) eram os principais transmissores do RABV. Portanto, ocorreu a mudança do ciclo urbano, típico do início do século XX, para o ciclo silvestre, predominante até hoje (Baer, 2007).

Em um período mais recente, outra população de hospedeiros primários foi determinada, os “raccoon-dogs” (*Nyctereutes procyonoides*), sendo hoje a segunda espécie em importância para a raiva no continente europeu. Esta espécie foi introduzida na Europa a partir da Rússia Oriental, no continente asiático, para a produção de casacos de pele (WHO, 2005).

Várias outras espécies de animais silvestres são diagnosticadas com raiva no continente europeu; são casos esporádicos e sem importância epidemiológica. Os casos, provavelmente, são infecções que ocorrem durante o relacionamento ecológico presa-predador, principalmente envolvendo raposas (Kusmin et al., 2004).

Na Europa, quatro espécies são reconhecidamente capazes de manter seu próprio ciclo epidemiológico: a raposa vermelha, o cão, a raposa ártica (*Alopex lagopus*) e os “raccoon-dogs”. Outra espécie silvestre que gera preocupações em algumas áreas (como a Ucrânia) é o lobo (*Canis*

lupus), principalmente por já ter sido um eficiente vetor do RABV. Os casos de raiva envolvendo esta espécie haviam diminuído, juntamente com os cães, e agora alguns focos reapareceram (Bourhy et al., 1999).

A Turquia é o único país europeu onde o cão mantém o ciclo epidemiológico local, pois raramente é diagnosticado raiva em animais silvestres. Em uma região entre a Ucrânia e a Federação Russa são encontrados cães e raposas com raiva, mas cada uma das espécies é infectada com amostras de vírus típicas de suas espécies (Rabies Bulletin Europe, 2009).

Existem poucos dados que certifiquem a raposa do ártico como reservatório do RABV no continente europeu (diferentemente do Alasca). Pesquisadores russos afirmam que ao norte da Federação Russa existem focos de raiva mantidos por esta espécie (Botvinkin et al., 2006).

A análise filogenética do RABV que circula na Europa mostra que existem distintos filogrupos do RABV associados a determinadas áreas geográficas separadas por barreiras geográficas; os rios Vístula e Danúbio e as montanhas da Boêmia e Cárpatos. Quatro áreas geográficas podem ser observadas com distintos filogrupos do RABV e são designados por WE (Europa Ocidental), CE (Europa Central), EE (Europa Oriental) e NEE (Norte Oriental – Polônia, Estônia, Lituânia e Finlândia). Na região NEE é onde se encontra o filogrupo mais divergente filogeneticamente e é característico das raposas do ártico. O grande filogrupo *Vulpes vulpes* é encontrado nas quatro áreas geográficas. Os filogrupos *Vulpes vulpes* e “raccoon-dog” são típicos da área geográfica NEE (Kissi, Tordo, Bourhy, 1995; Bourhy et al., 1999; Badrane et al., 2001).

Atualmente a estratégia para o controle da raiva, na grande maioria dos países europeus, é a vacinação parenteral para cães e gatos e vacinação oral de raposas por meio de iscas imunogênicas (um polímero de extratos vegetais e animais revestindo uma cápsula com Glicoproteína). Com este esquema vacinal a raiva canina e vulpina desapareceu da Europa ocidental, com exceção da Turquia Européia e da região Europa Oriental (Rabies Bulletin Europe, 2009).

A Tabela 2 sumariza a epidemiologia da raiva na Europa.

Tabela 2: Número de casos de raiva, por espécie animal na Europa no período 1990-2008. O número de casos de raiva em raposas e raccoon-dog são mostrados separadamente, mas pertencem ao grupo de silvestres
 Fonte: Rabies Bulletin Europe.

Ano	Silvestres	Cães e gatos	Humanos	Raposas	Raccoon-dogs	Total
1990	15484	5503	22	12833	148	21049
1991	12269	4194	27	10637	226	16505
1992	8346	2705	15	7318	302	11080
1993	6976	2381	10	6197	290	9385
1994	6644	2160	11	5966	183	8823
1995	5843	2274	16	5294	162	8140
1996	5379	2677	15	4814	181	8087
1997	3413	1626	18	3019	176	5082
1998	3901	2313	4	3380	264	6250
1999	4227	2318	5	3630	345	6592
2000	5837	2276	9	4896	622	8155
2001	6847	3537	12	5724	683	10435
2002	6052	3967	7	4795	874	10051
2003	7093	3952	6	5460	1163	11085
2004	3243	2150	13	2521	500	5453
2005	5806	3980	13	4379	1009	9831
2006	6174	3003	2	4352	1399	9215
2007	5230	4378	9	4537	364	9643
2008	5707	3953	14	5106	359	9707

A primeira observação relevante na Tabela 2 é a relação animais silvestres/domésticos, mostrando a importância do ciclo silvestre e da raiva vulpina na Europa. É possível também observar o decréscimo da raiva vulpina, a partir de 1990, quando o protocolo de imunização por meio de iscas foi estabelecido. O aumento no número geral de casos de raiva observado a partir de 2001 ocorreu devido à constante integração de vários países do Leste Europeu na Comunidade Européia. A segunda observação importante é o aumento de casos entre “raccoon-dogs”, a partir de 1990 e até 2005 e, atualmente, os dados indicam que o número de casos está estabilizado. Os casos envolvendo “raccoon-dogs” ocorrem, principalmente, na Polônia e Estados Bálticos, e isto pode refletir a densidade populacional da espécie nestas regiões.

Ainda hoje a raiva continua um problema de saúde pública e animal em algumas regiões européias. A análise espacial de casos mostra agrupamentos nos Estados Bálticos, Federação Russa, Estados Balcânicos

e Polônia. As diferenças encontradas dentro destas áreas refletem diferentes “*status*” de estudo e de vigilância epidemiológica. A partir de 2005 a Europa Oriental também adotou o uso de vacinação oral e, em um futuro próximo será possível avaliar esta nova situação da região no controle da raiva (Rabies Bulletin Europe, 2009).

Os casos de raiva em cães e gatos podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3: Número de casos de raiva em cães e gatos na Europa. 1990-2003. Fonte: Rabies Bulletin Europe.

Ano	Cães	Gatos	Gado	Ovinos/Caprinos
1990	1282	1182	2014	2014
1991	1099	847	1348	1348
1992	780	622	919	919
1993	736	593	760	760
1994	609	572	752	752
1995	605	589	890	890
1996	905	593	890	890
1997	602	419	521	521
1998	777	577	774	111
1999	781	519	787	94
2000	779	593	783	52
2001	1012	1134	1211	89
2002	1099	1037	1520	216
2003	1437	1202	1098	90
2004	739	699	592	54
2005	1378	1230	1134	123
2006	1105	950	793	79
2007	1415	1421	1304	129
2008	1694	1343	703	100

Tabela 4: Número de casos de raiva em alguns países europeus com diferentes “*status*” de vigilância epidemiológica (1977-2008). Fonte: Rabies Bulletin Europe.

	1977	1981	1986	1991	1996	2000	2008
França	1668	2341	2465	2166	20	5	3
Alemanha	6738	7327	6830	3599	153	192	1
Polônia	1287	449	1087	2287	2526	2211	26
Rússia	-	170	0	1387	1785	1239	3353
Espanha	6	1	10	8	1	7	2
Itália	97	367	29	4	1	0	9
Hungria	736	1002	1264	881	1357	514	7
Áustria	3058	779	1387	2460	14	2	0
Turquia	1205	2260	1266	428	125	297	301
Portugal	0	0	0	0	0	0	0
Estônia	0	13	1	209	99	129	3

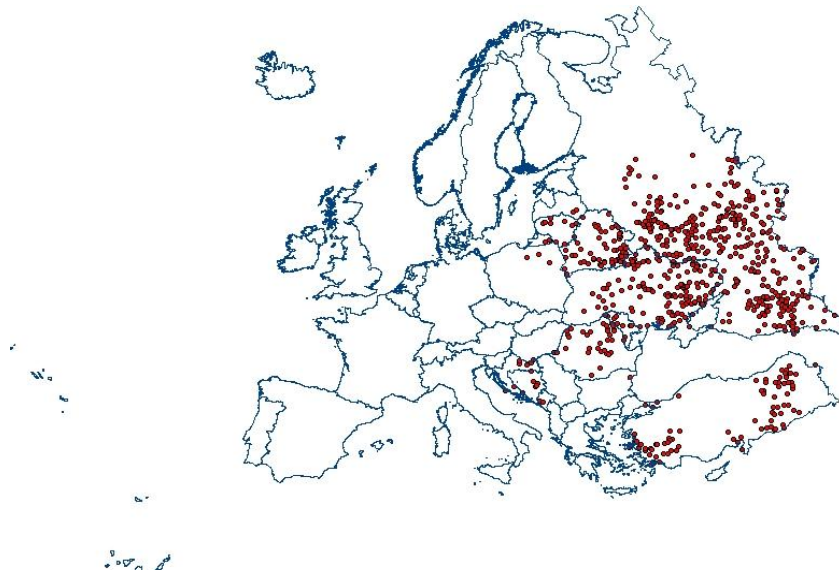


Figura 8: Mapa da Europa mostrando os 703 casos de raiva em bovinos nos diferentes países no ano de 2008. Os casos de raiva são indicados por pontos vermelhos. Fonte: Rabies Bulletin Europe.

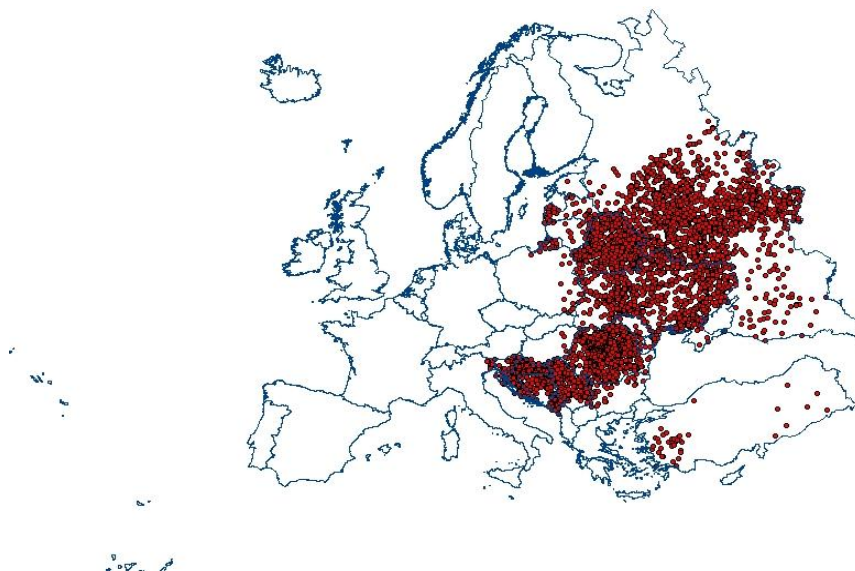


Figura 9: Mapa da Europa mostrando os 5106 casos de raiva em raposas (*Vulpes vulpes*) nos diferentes países no ano de 2008. Os casos de raiva são indicados por pontos vermelhos. Fonte: Rabies Bulletin Europe.

1.5.4.A raiva na América do Norte

No Canadá, a raiva tem sido um problema persistente desde 1940, quando surtos de raiva em raposas moveram-se do Sul do Ártico (Alasca) para as províncias canadenses. A epidemia tornou-se estável na população de raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) no Sul de Ontário. A raiva também se estendeu do sul do Ártico para a população de coiotes (*Canis latrans*) em Alberta e se fixou no Sul de Ontário. Poucos anos mais tarde, as províncias das pradarias foram invadidas por uma epidemia em cangambás (*Mephitis mephitis*) (Nadin-Davis, Casey, Wandeler, 1993).

Em 1999, o primeiro caso de raiva causado pela linhagem do RABV associado a “raccoons” (*Procyon lotor*) foi diagnosticado em “raccoons” em Ontário, na divisa com Nova York. No período de 2000 a 2003, 120 casos de raiva foram diagnosticados nesta espécie animal (Nadin-Davis et al., 1999).

Recentemente e no mesmo país, os casos de animais silvestres com raiva foram identificados com maior frequência em cangambás (gêneros *Mephitis*, *Spilogale* e *Putorius*) (40,6%) e morcegos (35,3%). No Canadá, morcegos “big brown” (*Eptesicus fuscus*) é a espécie de morcego mais comumente diagnosticada, seguindo-se várias espécies de *Myotis*, “silver-haired bat” (*Lasionycteris noctivagans*) e membros do gênero *Lasiurus*, especialmente *L. cinereus* e *L. borealis* (Nunan et al., 2002).

Poucos casos de raiva ocorrem em cães e gatos, pois são vacinados periodicamente, mas centenas de casos em herbívoros de criação (principalmente bovinos) são diagnosticados. Estes casos de raiva são em sua maioria transmitidos pelos animais silvestres terrestres (Nunan et al., 2002).

Nos Estados Unidos da América (EUA), atualmente, espécies silvestres de animais são responsáveis por 93 % dos casos de raiva diagnosticados neste país, enquanto que espécies domésticas foram responsáveis por 7%. A maior parte destes casos domésticos ocorre em bovinos, mas um número significativo é diagnosticado em gatos (Krebs, Wheeling, Childs, 2003).

A maioria dos casos de raiva relatados em animais silvestres nos EUA ocorre em “raccoons” (*Procyon lotor*), cangambás (gêneros *Mephitis*, *Spilogale* e *Putorius*), raposas (gêneros *Vulpes*, *Urocyon* e *Alopex*) e uma diversidade de espécies de quirópteros, sobretudo insetívoros. Estes são grupos de animais com distribuição e importância nacionais e são

considerados como hospedeiros primários de variantes específicas do RABV (Krebs et al., 2003).

“*Raccoons*” e cangambás (*skunks*) são espécies sinantrópicas que vêm merecendo destaque na epidemiologia da raiva nos EUA. Desde 1981, uma epidemia de raiva em “*raccoons*” espalhou-se pelo leste dos EUA, com um aumento concomitante da frequência de raiva em cangambás. A raiva em “*raccoons*” afeta todos os Estados costeiros do Leste, em uma área estimada de um milhão de quilômetros quadrado. Em 2005 foram diagnosticados mais de seis mil casos nestes animais. Já a raiva em cangambás afeta uma área de mais de 3,5 milhões de quilômetros quadrados e mais de mil casos/ano são diagnosticados (Rupprecht, Hanlon, Hemachudha, 2002; Hanlon, Niezgoda, Rupprecht, 2007).

No Sul do Estado do Texas e em Porto Rico (país associado aos EUA), coiotes (*Canis latrans*) e mangustos (*Herpestes javanicus*), respectivamente, são espécies silvestres de carnívoros de importância na manutenção regional da raiva. No Alasca, raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) e raposas do ártico (*Alopex lagopus*) são espécies implicadas na manutenção do RABV e, em menor grau, nos Estados de Nova York, Vermont, New Hampshire e Maine (Krebs et al., 2003; Kelly e Sleeman, 2003).

Outros mamíferos carnívoros, ainda que menos encontrados como positivos para a raiva nos EUA, podem ser fontes de infecção para cães e gatos e humanos, como, por exemplo, lobos (*Canis lupus*), lince (*Lynx rufus*) e coiotes (*Canis latrans*) (Kelly e Sleeman, 2003).

A raiva em quirópteros é largamente distribuída nos EUA, com casos relatados nos 48 Estados contíguos e relacionados a 17,2% de todos os casos de raiva em animais em 2001. Os morcegos “*big brown bat*” (*Eptesicus fuscus*), foi a espécie mais frequentemente detectada com o RABV, com 47,1% dos casos, seguido por *Tadarida brasiliensis* (28,3%), *Lasiurus cinereus* (5,5%), *Lasiurus borealis* (4,3%), *Myotis lucifugus* (3,7%), *Lasionycteris noctivagans* (3%), *Myotis yumanensis* (1,7%), *Pipistrellus hesperus* (1,7%) e *Pipistrellus subflavus* (1,2%); espécies não identificadas do gênero *Myotis* (3,0%) e outras espécies (< 3,5%) foram responsáveis pelos casos restantes (Rupprecht, Hanlon, Hemachudha, 2002).

Através de análises filogenéticas aliadas à vigilância epidemiológica e a um eficiente trabalho de zoologia, diversas linhagens do RABV puderam ser associadas a espécies de animais silvestres e a regiões específicas. Por exemplo, em relação ao morcego *Eptesicus fuscus*, há duas linhagens de RABV exclusivas desta espécie, uma que ocorre em populações do

Sudoeste e outra em populações do Leste e do Norte dos EUA. Em cangambás, são encontradas duas linhagens do RABV, uma associada aos Estados do Centro-Norte e outra aos Estados do Centro-Sul (Rupprecht, Hanlon, Hemachudha, 2002).

No México, a raiva humana foi reduzida na última década. Em 1960, foram relatadas 60 mortes humanas envolvendo transmissão por cães, contrastando com somente um caso em 2003. Essa redução é consequência de um decréscimo significativo de raiva em cães, de 8706 casos em 1990 para 261 casos em 2003, resultado de uma massiva campanha de vacinação em cães. Quanto aos casos de raiva em animais de criação a situação é semelhante a do Brasil. Centenas de casos transmitidos pelo *D. rotundus* são diagnosticados em bovinos e eqüinos (Mattos et al., 1999).

A raiva no México é caracterizada pelo envolvimento da vida selvagem que mantém ciclos estáveis de transmissão em áreas geográficas particulares. A maioria dos casos ocorre em cangambás (gêneros *Spilogale* e *Conepatus*) e raposas (gênero *Urocyon*). Estes grupos de animais são considerados hospedeiros primários do RABV. Uma variante antigênica, a AgV7, foi isolada primeiramente no México de duas raposas cinzas (*Urocyon cinereoargenteus*), o reservatório natural dessa variante. Essa mesma variante foi também isolada em lincos (*Felis rufus*) e coiotes (*Canis latrans*). Variantes isoladas de lincos foram isoladas em raposas cinza do Arizona, nos EUA, indicando uma ampla distribuição dessa variante (Velasco-Villa et al., 2005).

A análise de amostras de morcegos hematófagos *D. rotundus* mostra que existem no mínimo duas variantes antigênicas, AgV3 e AgV11, na população deste animal no México. Em relação aos morcegos frugívoros, existem duas variantes do RABV, AgV4 e AgV9, estabelecidas na população de *Tadarida brasiliensis mexicana* (Velasco-Villa et al., 2002, 2006).

1.5.5.A raiva na América Central e do Sul

A epidemiologia da raiva nos países da América Latina é muito semelhante. Segundo a Organização Pan-americana de Saúde/Organização Mundial de Saúde (SIRVERA, 2009), ainda hoje, o cão é o principal transmissor da raiva humana, mas pelo aumento do controle da raiva canina os morcegos hematófagos *D. rotundus* estão se tornando o principal transmissor (Scheneider et al., 2009). Além deste fato, *D. rotundus* é o principal transmissor da raiva aos herbívoros (silvestres e de interesse econômico), infectando milhares de animais anualmente.

A importância do *D. rotundus* na América Latina se deve ao fato deste mamífero ser encontrado somente nesta região, do sul do México ao norte da Argentina. Como a população de *D. rotundus* não é passível de uma campanha de vacinação em massa, apesar de alguns estudos preliminares se desenvolverem nesta direção (Sétien et al., 1998; Almeida et al., 2008), esta importância epidemiológica, provavelmente, será mantida.

Atualmente, além do cão e de *D. rotundus*, um número cada vez maior de morcegos insetívoros, de várias espécies, são diagnosticados com raiva (Kotait et al., 2007), porém, atualmente não está totalmente estabelecida a importância destas espécies na epidemiologia da raiva humana e animal.

Quanto aos animais silvestres, na América Latina e com exceção dos morcegos, somente após o atual estágio do controle da raiva canina é que estão sendo definitivamente estudados (Carnieli et al., 2009).

A seguir são apresentadas e comentadas algumas tabelas obtidas a partir do endereço eletrônico do Sistema Regional de Vigilância da Raiva nas Américas (SIRVERA, 2009). Após a apresentação das tabelas é apresentado um levantamento dos principais trabalhos relacionados aos estudos das tipificações antigênicas e genéticas de isolados do RABV na América Latina. Finalizando, dados da epidemiologia da raiva do Brasil e dos estudos antigênicos e genéticos de isolados do país são também apresentados.

Na Tabela 5 são apresentados os 517 casos de raiva humana no continente americano, entre 1999-2008. Em 1999 ocorreram 71 casos e em 2008 quatro casos. Este decréscimo está diretamente ligado ao sucesso no controle da raiva canina. O maior número de casos observados no Brasil, na Tabela 5, é ligado a sua extensão territorial, número de habitantes e, conseqüentemente, maior número de cães. Nos anos de 2004 e 2005, no Brasil, ocorreram respectivamente 30 e 44 casos e no Peru, em 2007, 24 casos. Praticamente a totalidade destes casos foi transmitida por *D. rotundus* em áreas da Região Amazônica, onde alguns agrupamentos humanos são constantemente agredidos por estes morcegos.

A Tabela 6 apresenta o número de casos de raiva em animais infectados pelo RABV e diagnosticados laboratorialmente nas Américas, no período de 1999-2008. Os números referem-se às diferentes regiões nomeadas pela OPAS/OMS e os países que as compõe estão descritos na Tabela 7.

Tabela 5: Histórico dos últimos 10 anos mostrando o número de casos de raiva humana por país da América Latina. Fonte: <http://sirvera.panaftosa.org.br>

	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Bolívia	10	9	7	2	2	4	9	4	2	...
Colômbia	3	1	0	0	1	14	3	2	3	0
Equador	5	3	3	0	0	0	2	0	0	0
Peru	9	4	2	1	2	8	8	3	24	0
Venezuela	2	1	1	0	2	5	0	1	1	0
Paraguai	4	1	0	5	0	1	0	0	0	0
Brasil	25	26	22	10	17	30	44	9	1	1
El Salvador	0	1	4	6	5	3	1	2	2	1
Guatemala	2	6	1	0	0	0	1	1	1	2
Honduras	0	1	0	0	0	0	0	0	0	...
Nicaragua	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Panamá	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
México	9	4	7	3	1	0	8	1	4	0
Cuba	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
Haiti	3	1	9	5	3	5	1	11	5	...
Porto Rico	0	0	0	0	1	0
Rep. Dominicana	0	0	0	2	1	1	0	1	0	0
Guiana	0	0	1	0	0	0
Canadá	0	1	0	0	1	0	0	0
Estados Unidos	0	5	1	3	2	8	1	3

**** Sem informação

Tabela 6: Histórico dos últimos 10 anos mostrando os casos de raiva em animais e sua distribuição. Fonte: <http://sirvera.panaftosa.org.br>

	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
A. do Norte	7.492	7.949	7.779	8.223	7.414	7.090	6.664	7.169	0	0
Canadá	500	665	441	343	264	254	248	229	0	0
EUA	6.992	7.284	7.338	7.880	7.150	6.836	6.416	6.940	0	0
A. Latina	6.644	6.135	4.880	3.895	4.476	4.384	4.255	3.556	2.748	1.340
Am. Central	406	278	336	273	410	314	248	329	189	131
Área Andina	719	784	854	571	529	846	1.322	1.117	600	154
Brasil	4.059	3.910	2.830	2.233	2.530	2.354	1.638	1.367	1.255	596
Caribe Latino	374	331	299	315	270	240	120	146	157	245
Cone Sul	600	272	257	213	319	184	241	316	259	89
México	486	560	304	290	418	446	686	281	288	125
Caribe	35	88	46	5	1	76	1	0	0	0
Total	14.171	14.172	12.705	12.123	11.891	11.550	10.920	10.725	2.748	1.340

É importante comentar que a maioria absoluta dos casos apresentados na Tabela 6 e relativos à América do Norte refere-se a animais silvestres. Os números de casos apresentados pelo Brasil e México, em sua maioria absoluta, são casos de cães infectados. Neste ponto é necessário alertar que os dados contabilizados pela OPS/OMS e relativos à América Latina possuem sub-notificações e, em relação a alguns países, são altas (SIRVERA, 2009).

A Tabela 7 apresenta os casos de bovinos com raiva, diagnosticados e notificados. Como esperado, estes animais são os mais acometidos pela raiva devido ao seu maior número e, conseqüentemente, exposição ao ataque de *D. rotundus*, com exceção da América do Norte.

Tabela 7: Histórico dos últimos 10 anos mostrando os casos de raiva em bovinos. Fonte: <http://sirvera.panaftosa.org.br>.

	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
América Latina	3225	3327	2322	1869	2465	2591	2012	1689	1549	727
Área Andina	140	169	197	251	247	249	255	294	270	125
Bolívia	41	36	35	59	80	55	44	60	26	...
Colômbia	0	22	54	47	63	65	82	95	84	82
Equador	20	14	22	16	7	10	17	5	22	21
Peru	49	97	86	110	86	102	106	127	120	4
Venezuela	30	0	0	19	11	17	6	7	18	18
Cone Sul	126	129	136	92	66	68	89	192	153	40
Argentina	31	32	25	13	3	12	10	136	51	...
Chile	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Paraguai	95	97	111	79	63	56	79	56	76	14
Uruguai	0	0	0	0	0	0	0	0	26	26
Brasil	2628	2660	1759	1321	1816	1863	1127	961	864	433
América Central	209	79	72	41	49	37	52	58	33	30
Belize	6	0	1	...	2	6	6	1
Costa Rica	2	0	2	...	4	6	5	2	1	0
El Salvador	5	7	13	19	5	21	29	34	18	3
Guatemala	3	7	3	11	10	0	7	5	11	15
Honduras	6	3	9	0	0	1	1	0	0	...
Nicarágua	3	2	3	2	1	1	0	6	0	0
Panamá	184	60	41	9	27	2	4	10	3	12
México	108	271	148	154	275	363	479	181	227	94
Caribe Latino	14	19	10	10	12	11	10	3	2	5
Cuba	7	14	5	6	9	5	5	1	1	3
Haití	1	1	0	0	0	0	0	0	0	...
Porto Rico	0	1	2	1	0	2
República Dominicana	6	3	3	3	3	4	5	2	1	2
Caribe	34	88	46	5	1	76	1	0	0	0
Anguila	0	0	0
Antigua e Barbuda	0	0	0
Antilhas Holandesas	0	0	0	0
Aruba	0	...	0	0	0	0

Bahamas	0
Barbados	0	0	0
Dominica	0	0	0
Granada	0	0	0	0
Guadalupe
Guiana	30	49	45	76	0	0
Guiana Francesa
Ilhas Caiman	...	0
Ilhas Turks e Caicos
Ilhas Virgens
Jamaica	...	0	...	0	0	0	0
Martinica
Montserrat	0	0	0	0
Santa Lucia	0	0	0
S.Vicente e Granadinas	0	0	0
St. Kitts e Nevis	0	0	0
Suriname	...	15	0	5	0	0	0	0
Trinidad e Tobago	4	24	1	0	1	0	1	0
América do Norte	174	118	102	127	108	130	109	108	0	0
Bermuda
Canadá	39	36	22	12	10	15	16	26
Estados Unidos	135	82	80	115	98	115	93	82
Total	3433	3533	2470	2001	2574	2797	2122	1797	1549	727

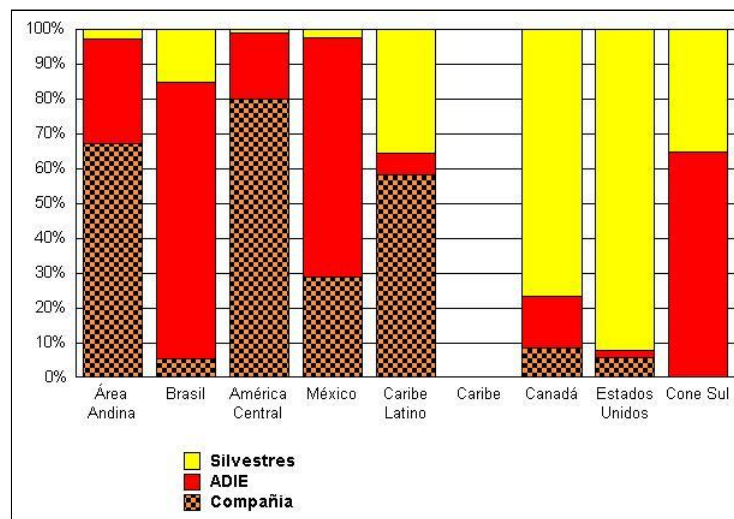


Figura 10: Gráfico de distribuição de casos de raiva nas Américas, 2006. Fonte: <http://sirvera.panaftosa.org.br>.

A Figura 10 mostra graficamente a distribuição da raiva nas diferentes regiões e relativos aos diferentes grupos de animais (silvestres, ADIE= de importância econômica e de companhia) e resume o escrito anteriormente. Este gráfico se refere aos dados de 2006, isto porque os dados relativos ao ano de 2008 da América do Norte não foram disponibilizados para a OPAS/OIE. Porém, comparando os gráficos de distribuição dos anos de

2006 e 2008 (não apresentado) é observado uma variação mínima no aumento de casos de silvestres e um menor número de casos em animais de companhia.

1.5.5.1.As variantes antigênicas e genéticas do RABV na América Latina espanhola

Para dar início a esta seção é necessário esclarecer que, apesar do termo “variante” ser utilizado indistintamente por vários autores para tipificação antigênica e genética, aqui será utilizado o termo “variante” exclusivamente para tipificação antigênica, enquanto que para tipificação genética será usado o termo “linhagem”, que melhor caracteriza os agrupamentos genéticos do RABV de uma mesma variante antigênica (AgV), como expresso em Velasco-Villa et al. (2008).

Antes de se fazer uma análise das tipificações antigênicas e genéticas realizadas na América Latina, também é necessário informar que as tipificações antigênicas realizadas nas Américas se baseiam em um painel de anticorpos monoclonais produzido pelo Center of Disease Control (CDC) e distribuído pela OPAS/OMS. Quanto à tipificação genética, infelizmente, não há regras seguidas pelos pesquisadores do RABV. O número de nucleotídeos seqüenciados pode variar de uma centena a mais de um milhar e, também, as áreas seqüenciadas são muito variáveis. Uma única característica destes seqüenciamentos é que, felizmente, grande parte deles utiliza como alvo o gene N do RABV.

Na Colômbia, a caracterização genética determinou oito linhagens, três delas são associadas a cães e pertencem a variante antigênica AgV1. Outra linhagem genética é composta pelas variantes antigênicas AgV3, associada a *D. rotundus*. Duas linhagens genéticas são associadas a AgV4, típica do morcego insetívoro colonial *Tadarida brasiliensis*. Duas outras linhagens genéticas, composta por morcegos insetívoros solitários, não puderam ser tipificadas pelo painel de MAbs distribuído pela OPAS/OMS, fato comum entre morcegos insetívoros (Paez et al., 2007). Em relação aos canídeos silvestres na Colômbia, Paez et al. (2005) tipificaram geneticamente e antigenicamente raposas cinzas (*Urocyon cinereoargenteus*) como AgV2, típica de cão.

Na Bolívia, a tipificação genética e antigênica do RABV identificou quatro variantes antigênicas: AgV1 e 2, típicas de cão, e AgV3 e 5, típicas de *D. rotundus*. A identificação genética foi concordante com a antigênica,

demonstrando haver três agrupamentos genéticos do RABV no país (Favi et al., 2003).

No Chile, de Mattos et al. (2000), caracterizaram o morcego insetívoro *Tadarida brasiliensis* como o hospedeiro do RABV mais importante na epidemiologia da raiva no país. Em 1996, no mesmo país, ocorreu um caso de raiva em humano, fato que não ocorria desde 1972. A análise desta amostra humana caracterizou o RABV isolado como linhagem genética e variante antigênica AgV4, de *T. brasiliensis* (Favi et al., 2002). Yung, Favi, Fernández (2002) tipificaram geneticamente e antigenicamente isolados do RABV e identificaram as variantes AgV3 (*D. rotundus*), AgV4 (*T. brasiliensis*) e AgV6, típica do morcego insetívoro *Lasiurus cinereus*. Neste estudo, as tipificações genéticas e antigênicas foram concordantes. Recentemente, Favi et al. (2008) fizeram um estudo retrospectivo com isolados do RABV, também no Chile, e identificaram as variantes antigênicas AgV1, AgV3, AgV4 e AgV6. Além de reconfirmarem a importância de *T. brasiliensis* na epidemiologia da raiva no Chile também reconfirmaram que alguns isolados não puderam ser tipificados com o painel de MAbs distribuído pela OPAS/OMS.

Na Venezuela, de Mattos et al. (1996) identificaram antigenicamente as variantes AgV1, 3 e 5. A tipificação genética destas variantes foi concordante com as genéticas.

Delpietro et al. (1997), na Argentina, tipificaram isolados do RABV e descreveram três variantes antigênicas, AgV2, 3 e 4, além de outras não determinadas e pertencentes a morcegos insetívoros. No mesmo, país Cisterna et al. (2005) tipificaram genética e antigenicamente isolados do vírus e identificaram as variantes antigênicas AgV 2, 3, 4 e 6, concordantes com a tipificação genética.

Finalizando o estudo das tipificações genéticas e antigênicas na América Latina (com exceção do Brasil), é necessário escrever sobre a variante do RABV isolada em mangustos (*Herpestes auropunctatus*), encontrados em várias ilhas do Caribe, como por exemplo, Cuba e República Dominicana. Estes animais foram importados da Índia, no início do século XX, para o combate de cobras peçonhentas encontradas em grande número nos canais destas ilhas. Além de causar sérios distúrbios ambientais, devido à falta de predadores naturais, a população de mangustos cresceu demasiadamente e mostrou ser altamente susceptível ao RABV e, com o tempo, iniciou uma epidemia de raiva, com uma variante típica, provavelmente, originada de “*raccons*”. Hoje, os mangustos são os

transmissores do RABV mais importante desta região americana (Blanton et al., 2006).

1.5.6.A raiva no Brasil

Em 2004, o Brasil gastou US\$28 milhões (dólares americanos) na prevenção da raiva (Childs e Real, 2007). Este valor se refere aos gastos com vacinas para humanos e cães e gatos, imunoglobulinas, diagnósticos laboratoriais, treinamento de pessoal envolvido com a campanha anual de vacinação de cães e gatos, médicos e veterinários.

A seguir, são apresentadas e comentadas algumas imagens e tabelas da Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde do Brasil (SVS/MS), que resumem a situação da raiva no Brasil. Posteriormente, são apresentados dados relativos aos estudos antigênicos e genéticos dos principais vetores e hospedeiros do RABV do Brasil.

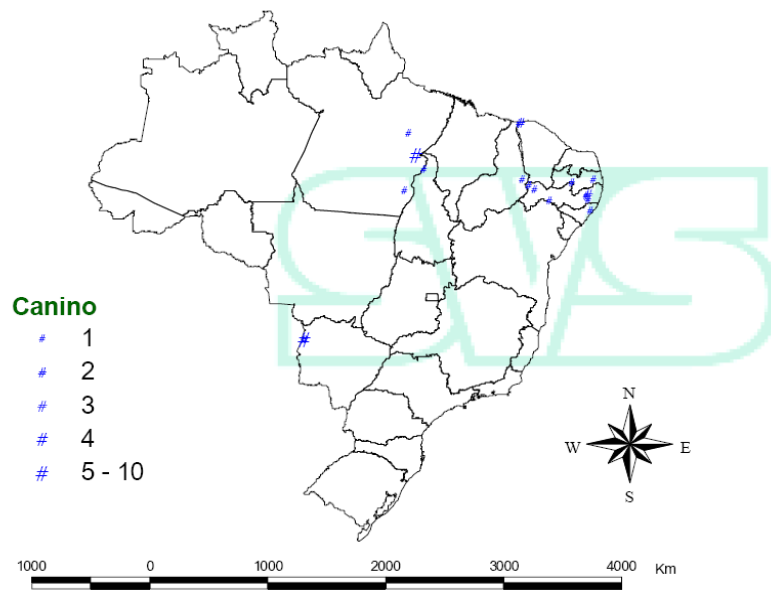


Figura 11: Casos de raiva em cães no Brasil no ano de 2008. Fonte: SVS/MS.

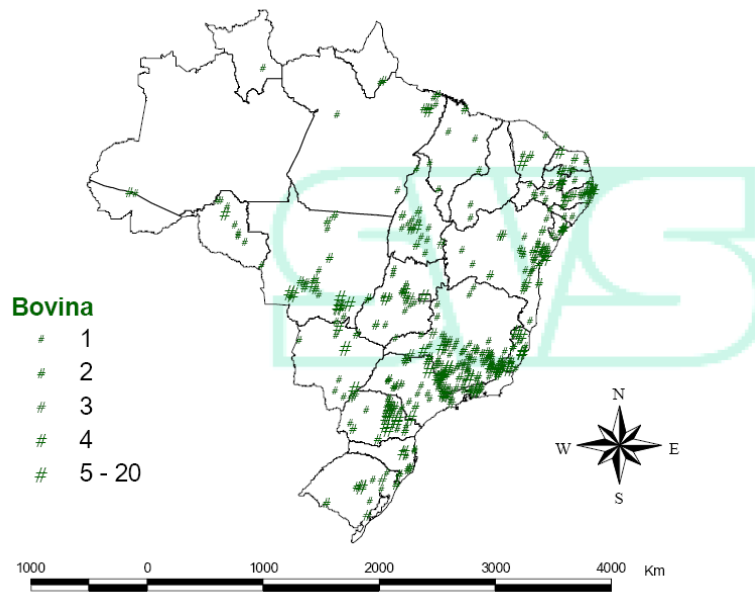


Figura 12: Casos de raiva em bovinos no Brasil no ano de 2008. Fonte: SVS/MS.

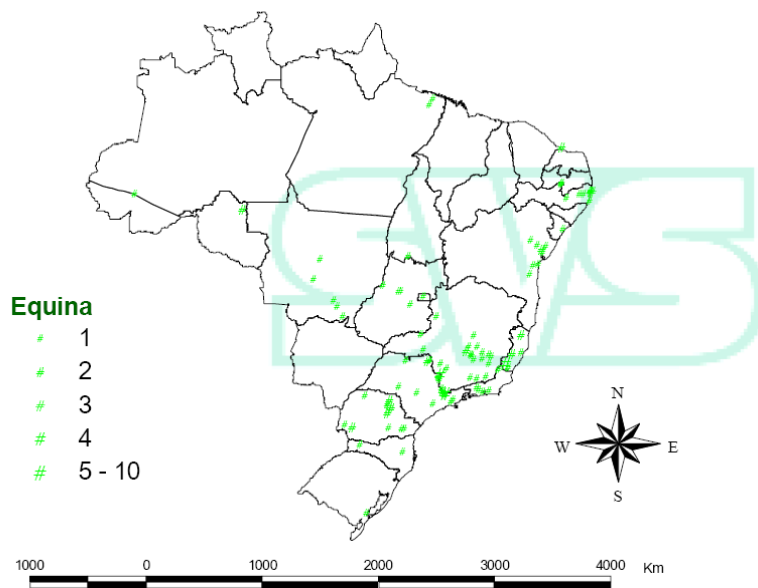


Figura 13: Casos de raiva em equinos no Brasil no ano de 2008. Fonte: SVS/MS.

Analisando a Figura 11 é observado que a raiva canina, hoje, é um problema das Regiões Norte e Nordeste do Brasil, onde as campanhas anuais de vacinação de cães e gatos não atingiram uma situação

satisfatória. O foco no Estado do Mato Grosso do Sul é de origem boliviana. É importante salientar que as campanhas anuais de vacinação de cães e gatos na Região Sul do Brasil, a partir da década de 1990, por decisões de autoridades estaduais, não é realizada. Schneider et al. (1996), analisando os casos de raiva canina no Brasil e no período 1980-1990, citam um decréscimo de 90% de casos, determinados pela vacinação anual de cães e gatos que, naquela década, atingiu mais de nove milhões de animais/ano. Em 2007, a mesma campanha, que teve uma cobertura vacinal de 94% da população estimada de cães e gatos, vacinou 23.256.155 de cães e gatos (SVS/MS).

O decréscimo da raiva canina é uma grande conquista e para que se possa compreender o fato alguns trabalhos são citados. da Silva et al. (2004), analisaram 1984 amostras de cães do Noroeste do Estado de São Paulo, no período 1993-1997, sendo que 351 foram diagnosticados positivamente. Queiroz et al. (2009), descreveram a situação da raiva no período de 1993-2007, também na região Noroeste do Estado de São Paulo, onde foram diagnosticadas 10579 amostras de animais provenientes de 42 municípios. Do total, 4,9% (518) foram positivas para a raiva, assim distribuídas: 67% cães (346), 16% bovinos (84) e 9% morcegos (50). Para que se possa ter uma idéia da dimensão da campanha anual de vacinação contra a raiva de cães e gatos do Brasil, a análise dos números publicados por Andrade et al. (2008) também é esclarecedora. Os autores estimaram a população canina na região de Araçatuba, no Noroeste do Estado de São Paulo, para cada 10 habitantes, em 1,7 (ano de 1994); 2,0 (ano de 1999) e 1,8 (ano de 2004).

Da análise das Figuras 12 e 13 (Casos de raiva em bovinos no Brasil no ano de 2008 e Casos de raiva em equinos no Brasil no ano de 2008) fica nítido que a raiva em animais de importância econômica, transmitida pelo *D. rotundus*, é disseminado por todo o Brasil. O pequeno número de casos na Região Norte do país é diretamente relacionado à vigilância epidemiológica nesta região, ainda de difícil acesso e baixa densidade demográfica.

A Figura 14, que mostra os Casos de raiva em humanos e animais no Brasil, no ano de 2008, reafirma o escrito anteriormente, porém são necessários dois comentários. O maior número de casos de raiva em morcegos não-hematófagos, no Estado de São Paulo, se deve a vigilância epidemiológica ativa em relação a estes animais no Estado. Quanto aos casos de raiva em primatas e canídeos silvestres, exclusivamente na Região Nordeste, será discutido em maiores detalhes no tópico relativo as tipificações antigênicas e genéticas do RABV no Brasil.