

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

JULIANA HELENA CHÁVEZ

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-RÁBICA *IN VITRO*
DE COMPOSTOS FENÓLICOS SINTÉTICOS**

**FLORIANÓPOLIS
2005**

JULIANA HELENA CHÁVEZ

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-RÁBICA *IN VITRO*
DE COMPOSTOS FENÓLICOS SINTÉTICOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti

Co-Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões

FLORIANÓPOLIS

2005

Chávez, Juliana Helena

Avaliação da atividade anti-rábica *in vitro* de compostos fenólicos sintéticos. 114p

xiv, 112 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2005.

Orientador: Carlos Roberto Zanetti

Co-orientadora: Cláudia Maria Oliveira Simões

Bibliografia: f. 98-112

1. Vírus rábico – 2. Compostos fenólicos – 3. Citotoxicidade – 4. Ensaio do MTT – 5. Atividade anti-rábica – 6. Inibição do efeito citopático viral. I. Carlos Roberto Zanetti. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia. III. Título.

JULIANA HELENA CHÁVEZ

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-RÁBICA *IN VITRO* DE COMPOSTOS FENÓLICOS SINTÉTICOS

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração: Saúde, e aprovada em sua forma final pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 20 de maio de 2005.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Izabel Christina de Palmer Paixão Frugulhetti

Membro
UFF/Niterói/ RJ

Prof.Dr. Márcio Alvarez da Silva

Membro
CCS/CCB/ UFSC

Profª.Dra. Célia Regina Monte Barardi

Membro
MIP/ CCB/ UFSC

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti
Orientador

Profª. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões
Co-Orientadora

Prof.Dr. Mário Steindel
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Imunologia Aplicada e de Virologia Aplicada, coordenados, respectivamente, pelos Professores Dr. Carlos Roberto Zanetti (Departamento de Microbiologia e Parasitologia, CCB) e Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões (Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS) da Universidade Federal de Santa Catarina.

Dedico este trabalho a minha avó materna, Giacomina Dalfovo Buzzi, por me inspirar com sua força, coragem e determinação.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por minha existência, por tudo que vivenciei, por me permitir concretizar mais um sonho e dar mais um passo em minha caminhada e, principalmente, por semear em mim o amor incondicional e a compreensão perante as adversidades.

Aos meus pais, Jesus Herland e Janete, por minha vida, por representarem a bússola da minha existência e por tornarem possível tudo que sou.

Aos meus queridos irmãos, Herland e Luciana, por existirem e sempre fazerem parte da minha vida de uma maneira tão alegre e doce.

À minha avó Giacomina, por todo incentivo, desde meus primeiros anos de vida, por nunca ter desistido, por ter e continuar lutando pela vida e pelo amor por mais de oitenta e sete anos e, sobretudo, pela compreensão de toda minha ausência.

Ao professor e amigo, Carlos Roberto Zanetti, por todos os seus ensinamentos, pela confiança, por todas as oportunidades, por me compreender sempre, por direcionar minha busca pelo conhecimento e por me mostrar que a capacidade crítica pode caminhar junto com a humildade.

À professora e amiga, Cláudia Maria Oliveira Simões, pela oportunidade, pela orientação, por acreditar em mim, por me fazer compreender o sentido de muitas palavras, em especial, dedicação, organização, compromisso e ciência e, principalmente, por me ensinar que as dificuldades nunca serão maiores do que a vontade de superá-las.

À Lílian Ruon, Ana Carolina e Guilherme, por fazerem parte da nossa família e nos proporcionarem um convívio tão alegre.

Às sempre amigas Márcia Cristina Carriel Gomes, Regina Felippi, Sabrina Gonçalves, Sílvia dal Bó, Vanessa Müller, por todo o incentivo, atenção, carinho, cumplicidade e por me ensinarem o verdadeiro significado da amizade.

Ao meu amigo Rodrigo Almeida, pelo incansável e constante apoio e também pela compreensão de toda minha ausência e da minha maneira de ser.

Aos amigos Maurício Valente, Marcílio Jorge, Kleber e Christiane Pieri, Jean Passold, Rafael Koerich, Fernando Oliveira, Alessandro Fontanella, por toda amizade e compreensão.

Aos colegas de turma Magali, Alessandra, Tarcísio, Danielle, Ana Kelly, Liana, Jussara, Carla, pelo convívio sempre alegre.

Aos professores Mário Steindel, Edmundo Grisard, Carlos Pinto, Sônia Carobrez, Aguinaldo Pinto e Célia Regina Monte Barardi, pela orientação, amizade, e pela extraordinária convivência.

Aos colegas do LIA, Paula, Larissa, Ana Paula, Dayse, Jerzy, Vanessa Valgas, por todo o companheirismo, incentivo, solidariedade e inesquecível convívio.

Aos colegas do LVA, Jadel, Vanessa, Thaís, Carla, Cláudia, Thiago, Márcia, Alexandre, Adriana, Cris e todos os demais, por todo o auxílio e por possibilitarem a realização desde trabalho num ambiente agradável e tranqüilo.

Aos colegas da Protozoologia, Leonardo, Carlos Rodrigo, Bibiana, Rúbia, Mônica, Roberto, Milene, Letícia, Juliana, João e Cris pela alegria e pela disponibilidade.

Às Mestres Iriane Eger-Mangrich e Gicelma Lima, que com o toque suave de suas mãos abriram meu coração para energia Reiki e me conduziram ao caminho da cura através do amor.

À Secretaria do Programa de pós-Graduação em Biotecnologia, por disponibilizar todo o suporte técnico.

À Universidade Federal de Santa Catarina, por possibilitar minha formação profissional e humana e por não me fazer esquecer que o acesso a educação deve ser um direito de todos.

Aos meus chefes Sandro e Adelaide, por toda a compreensão e por tornarem financeiramente possível a concretização desta etapa da minha vida.

Ao computador e ao Windows, por me permitirem usufruir desta tecnologia e de tantos recursos.

À cada momento que fez parte desta maravilhosa experiência, por ter me transformado e por promover a busca incessante da transformação.

À todas as pessoas e situações que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, as quais, direta ou indiretamente, participaram da minha formação como profissional e ser humano, a minha eterna gratidão,

Juliana Helena

Florianópolis, 2005.

“Mestre é alguém que indica um caminho de compreensão; discípulo é alguém que, tendo compreendido, segue sua própria compreensão”.

RESUMO

A raiva humana é uma doença de etiologia viral com grande impacto na saúde pública, principalmente por seu curso fatal, na grande maioria dos casos. Apesar da difundida e estabelecida profilaxia através da vacinação, acredita-se que a raiva seja responsável por aproximadamente 40.000 a 70.000 mortes por ano, especialmente em áreas endêmicas. Atualmente, não há disponibilidade de qualquer fármaco antiviral com ação específica contra o vírus rábico. Em combinação com a profilaxia, um fármaco antiviral poderia ser usado para o tratamento da raiva humana e aumentar a proteção contra a encefalite causada pelo vírus. Os compostos fenólicos (CF) são derivados do metabolismo vegetal secundário, podendo ser obtidos através de síntese. Muitos estudos demonstraram que os CF possuem inúmeras atividades farmacológicas, incluindo ações vasodilatadora, antialérgica, antiinflamatória, antiviral, entre outras. Neste trabalho, a potencial atividade anti-rábica *in vitro* de 24 CF foi avaliada utilizando-se células McCoy e a cepa PV do vírus rábico. A citotoxicidade (CC_{50}) foi determinada pelo ensaio colorimétrico do MTT e a atividade anti-rábica (CE_{50}) foi estimada através da técnica de inibição do efeito citopático viral. Isoprinosina e quetamina foram utilizadas como controles positivos. A padronização do ensaio do MTT para avaliação da atividade anti-rábica também foi realizada, mas os resultados mostraram que este ensaio é inadequado para tal avaliação. Os compostos testados apresentaram índices de seletividade ($IS = CC_{50}/CE_{50}$) que variaram de 1,0 a 3,9. Seis CF não inibiram o efeito citopático viral em qualquer grau, em concentrações \leq a seus valores de CC_{50} . Quatro CF apresentaram valores de $IS > 3,0$. Através dos resultados obtidos, foram sugeridas algumas possíveis relações estrutura-atividade. Observou-se que a presença de hidroxilas livres e de grupamentos éteres influenciou a atividade anti-rábica. Contudo, estudos adicionais são necessários para o estabelecimento dessa relação.

Palavras-chave: vírus rábico, compostos fenólicos, citotoxicidade, ensaio do MTT, atividade anti-rábica, inibição do efeito citopático viral.

ABSTRACT

Human rabies is a viral disease with a great impact in public health, mainly for its fatal course, in most of the cases. Despite the widespread and well-established prophylaxis by immunization, rabies is believed to be responsible for 40.000 to 70.000 human deaths per year, mostly in endemic areas. No antiviral drugs are currently available to fight against rabies virus. In combination with the prophylaxis, an antiviral drug could be useful for human rabies treatment providing enhanced protection against the encephalitis caused by the virus. Phenolic compounds (PC) are derived from the secondary vegetal metabolism, which can also be obtained by synthetic process. Many studies have shown a great range of pharmacological activities, including vasodilatation actions, antiallergenic, anti-inflammatory and antiviral, among others. In this study the potential *in vitro* anti-rabic activity of twenty-four PC was evaluated using McCoy cells and PV rabies strain. The cytotoxicity (CC_{50}) was assayed by MTT colorimetric method and the antiviral activity (IC_{50}) was estimated by the inhibition of the cytopathic effect. Isoprinosine and ketamine were used as positive controls. The MTT colorimetric method standardization was also performed to evaluate the anti-rabies activity, but the results showed that the assay was unsuitable for this evaluation. The compounds tested showed selectivity index ($SI=CC_{50}/IC_{50}$) ranging from 1.0 to 3.9. Six PC did not inhibit the cytopathic effect in any degree and four other showed SI greater than 3.0. According to these results, some possible structure-activity relationships were suggested. It was observed that the presence of free hydroxyl groups and ether groups influenced the anti-rabies activity. However, additional studies are required to establish this relationship.

Key-words: Rabies virus, phenolic compounds, cytotoxicity, MTT assay, anti-rabies activity, cytopathic viral effect inhibition.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema representativo da estrutura do vírus rábico 26
- Figura 2:** Esquema representativo da replicação do vírus rábico em uma célula hospedeira 29
- Figura 3:** Distribuição mundial dos principais animais transmissores de raiva 35
- Figura 4:** Número de casos de raiva humana no Brasil , no período de 1990 a 2003. 37
- Figura 5:** Disposição da placa de microtitulação usada para a determinação da inibição do efeito citopático viral das diferentes concentrações dos materiais teste, em células McCOY 62
- Figura 6:** Diferentes intensidades do efeito citopático em células McCoy (20x) tratadas com 3,4,5 trimetóxi benzoato de etila, a partir de 1200 μ M(b) infectadas com vírus rábico (cepa PV MOI =1,0). 64
- Figura 7:** Representação gráfica em ordem crescente dos valores de CC₅₀ dos compostos fenólicos sobre as células McCoy, obtidos através do ensaio colorimétrico do MTT. Valores expressam a média de três experimentos independentes e a barra o desvio padrão da média 71
- Figura 8:** Valores de absorbância obtidos através do ensaio do MTT. 2,5 x 10⁵ cél/mL foram infectadas com diferentes MOI (0,1 a 1,0) do vírus rábico e incubadas durante 96h. Em seguida o MTT (1mg/mL) foi solubilizado em PBS e meio DMEM, acrescido à cultura, permanecendo nesta por 4h. *valores estatisticamente significativos em relação ao controle celular (ANOVA/Tukey-Kramer, p<0,001). 75
- Figura 9:** Valores de absorbância obtidos através do ensaio do MTT. 2,5 x 10⁵ cél/mL foram infectadas com diferentes MOI (0,5 e 1,0) do vírus rábico e incubadas durante os tempos indicados. Em seguida o MTT (1mg/mL) foi solubilizado em PBS e meio DMEM, acrescido à cultura, permanecendo nesta por 4h. *valores estatisticamente significativos em relação ao controle celular (ANOVA/Tukey-Kramer, p<0,001). 77

Figura 10: Valores de absorvância obtidos através do ensaio do MTT. $2,5 \times 10^5$ cél/mL foram infectadas com diferentes MOI (0,5 e 1,0) do vírus rábico e incubadas durante 96h. Em seguida o MTT (1mg/mL) foi solubilizado em PBS e meio DMEM, acrescido à cultura, permanecendo nesta nos tempos indicados.*valores estatisticamente significativos em relação ao controle celular (ANOVA/Tukey-Kramer, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

78

Figura 11: Valores de absorvância e relações $A_{(CV)} / A_{(CC)}$ ao se comparar o ensaio colorimétrico do MTT utilizando células McCoy e vírus rábico com dois outros sistemas já padronizados.Condições gerais do ensaio: número de células: $2,5 \times 10^5$ cel/mL, MTT(1mg/mL), tempo de redução de 4h. **Adenovírus:** MOI=0,5, título: $1,6 \times 10^8$ pfu/mL, células Hep-2 mantidas em MEM. **Herpesvírus (HSV-1):** MOI=0,5, título: $2,6 \times 10^7$ TCID₅₀/mL, células VERO mantidas em MEM. **Vírus Rábico:** MOI=0,5, título: 5×10^8 TCID₅₀/mL, células McCoy: mantidas em DMEM *diferenças estatisticamente significativas entre os valores de absorvância dos controles celular e viral (ANOVA Tukey-Kramer, $p < 0,001$)

80

Figura 12: Valores de índices de seletividade $> 3,0$ dos compostos fenólicos testados. *Controles positivos utilizados no ensaio

90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variáveis utilizadas para a padronização do ensaio colorimétrico do MTT	60
Tabela 2: Títulos infecciosos dos estoques virais utilizados	66
Tabela 3: Valores de CC_{50} dos compostos fenólicos sobre as células McCoy, obtidos através do ensaio colorimétrico de MTT	70
Tabela 4: Valores das relações $A_{(CV)} / A_{(CC)}$ obtidas no ensaio colorimétrico do MTT. Células McCoy foram infectadas com diferentes MOI (0,5 e 1,0) do vírus rábico, permanecendo em cultura nos tempos indicados. O MTT foi solubilizado com PBS e DMEM, com tempo total de redução de 4h	76
Tabela 5: Valores das relações $A_{(CV)} / A_{(CC)}$ obtidas no ensaio colorimétrico do MTT. Células McCoy foram infectadas com diferentes MOI (0,5 e 1,0) do vírus rábico, permanecendo em cultura por 96h. O MTT foi solubilizado com PBS e DMEM, com tempo total de redução indicado	79
Tabela 6: Valores de citotoxicidade, atividade antiviral e índice de seletividade de compostos fenólicos, testados no modelo de células McCoy infectadas com vírus rábico (cepa PV).	89

SUMÁRIO

<u>1</u>	<u>INTRODUÇÃO</u>	15
<u>2</u>	<u>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	17
<u>2.1</u>	<u>A IMPORTÂNCIA DOS FÁRMACOS ANTIVIRAIS</u>	17
<u>2.2</u>	<u>FÁRMACOS ANTIVIRAIS DE ORIGEM NATURAL</u>	20
<u>2.3</u>	<u>O VÍRUS RÁBICO</u>	21
<u>2.3.1</u>	<u><i>Histórico</i></u>	21
<u>2.3.2</u>	<u><i>Características do vírus da raiva</i></u>	24
<u>2.3.2.1</u>	<u>Classificação</u>	24
<u>2.3.2.2</u>	<u>Estrutura e morfologia</u>	26
<u>2.3.2.3</u>	<u>Genoma e replicação do vírus rábico</u>	28
<u>2.3.3</u>	<u><i>Patogênese</i></u>	29
<u>2.3.4</u>	<u><i>Diagnóstico</i></u>	31
<u>2.3.5</u>	<u><i>Epidemiologia</i></u>	35
<u>2.3.6</u>	<u><i>Prevenção e controle da doença</i></u>	37
<u>2.3.7</u>	<u><i>Profilaxia e tratamento</i></u>	38
<u>2.4</u>	<u>AGENTES COM AÇÃO ANTI-RÁBICA</u>	41
<u>2.5</u>	<u>COMPOSTOS FENÓLICOS E AÇÃO ANTIVIRAL</u>	46
<u>3</u>	<u>OBJETIVOS</u>	50
	<u>OBJETIVO GERAL</u>	50
	<u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	50
<u>4</u>	<u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	51
<u>4.1</u>	<u>CULTURAS CELULARES</u>	51
<u>4.1.1</u>	<u><i>CÉLULAS</i></u>	51
<u>4.1.2</u>	<u><i>MEIO DE CULTURA E REAGENTES</i></u>	51
<u>4.2</u>	<u>VÍRUS</u>	52
<u>4.2.1</u>	<u><i>ORIGEM DAS CEPAS</i></u>	52
<u>4.2.2</u>	<u><i>PREPARO DAS SUSPENSÕES-ESTOQUES VIRAIS</i></u>	52
<u>4.2.3</u>	<u><i>DETERMINAÇÃO DO TÍTULO INFECCIOSO VIRAL</i></u>	53

<u>4.2.3.1</u>	<u>TITULAÇÃO DO VÍRUS RÁBICO</u>	53
<u>4.3</u>	<u>MATERIAIS-TESTE</u>	54
<u>4.3.1</u>	<u><i>Compostos fenólicos</i></u>	54
<u>4.3.1.1</u>	<u>Preparação das soluções-estoques</u>	57
<u>4.4</u>	<u>AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE ATRAVÉS DO ENSAIO COLORIMÉTRICO COM SAL DE TETRAZOLIUM (MTT)</u>	58
<u>4.5</u>	<u>PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO COLORIMÉTRICO DO MTT PARA AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-RÁBICA IN VITRO</u>	59
<u>4.6</u>	<u>AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-RÁBICA ATRAVÉS DA INIBIÇÃO DO EFEITO CITOPÁTICO VIRAL</u>	60
<u>4.7</u>	<u>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA</u>	64
<u>5</u>	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	66
<u>5.1</u>	<u>DETERMINAÇÃO DO TÍTULO VIRAL</u>	66
<u>5.2</u>	<u>AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE ATRAVÉS DO ENSAIO DO MTT</u>	67
<u>5.3</u>	<u>PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO COLORIMÉTRICO DO MTT PARA A AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-RÁBICA IN VITRO</u>	73
<u>5.4</u>	<u>AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-RÁBICA ATRAVÉS DO ENSAIO DE INIBIÇÃO DO EFEITO CITOPÁTICO VIRAL</u>	85
<u>6</u>	<u>CONCLUSÕES</u>	95
<u>7</u>	<u>PERSPECTIVAS</u>	97
	<u>REFERÊNCIAS</u>	98

1 INTRODUÇÃO

Por mais de três milênios, a raiva tem sido uma das mais temidas e, talvez, a mais conhecida e estudada dentre as doenças humanas, sendo provavelmente a mais antiga infecção relatada pela humanidade. A cada ano, mais de dez milhões de pessoas, a grande maioria sem vacinação, experimenta ansiedade e medo, após a exposição a um animal suspeito da doença (FU, 1997; MESLIN; STÖHR, 1997; WARREL; WARREL, 2004).

A raiva é considerada uma antropozoonose de etiologia viral, que acomete mamíferos, sendo transmitida pela inoculação do vírus contido na saliva de animais infectados, principalmente através de mordeduras, ocasionando uma encefalite fatal, na maioria dos casos (WUNNER, 2002).

Cento e vinte anos após a primeira imunização anti-rábica humana, realizada por Louis Pasteur, medidas profiláticas de pré- e pós-exposição, como o uso de vacina e imunoglobulina anti-rábica humana ou equina, foram muito bem estabelecidas com resultados satisfatórios, tornando a raiva humana passível de prevenção. Entretanto, apesar de reduzir em muito o risco de infecção, a profilaxia não assegura totalmente que o indivíduo esteja protegido da doença (INSTITUTO PASTEUR, 2000).

Com as medidas de controle associadas à vacinação, a raiva foi aparentemente eliminada ou controlada em muitas partes da Europa, Austrália, Japão e grande parte da América do Norte, mais ainda permanece como uma das mais aterrorizantes e perigosas doenças em muitos outros países. A real incidência da raiva humana é, possivelmente, muito maior do que aquela fornecida pelos órgãos oficiais, como a Organização Mundial da Saúde, em virtude da subnotificação (WOLDEHIWET, 2005).

Estima-se que o número de óbitos anuais no mundo, ocasionado pela raiva, possa ser em torno de 70.000 pessoas, especialmente em áreas endêmicas, como em países da África e Ásia. Aproximadamente, 10 milhões de pessoas recebem tratamentos profiláticos pós-exposição a cada ano, após contatos com animais suspeitos da doença (WHO, 2005).

Em dezembro de 2004, foi documentado o primeiro caso de cura de raiva humana, sem prévia profilaxia contra a doença. Com a documentação deste caso inédito, torna-se imperativo a busca de novos e possíveis tratamentos, incluindo agentes antivirais (CDC, 2004).

O estudo e o desenho racional de fármacos antivirais contra o vírus rábico, assim como contra outros vírus, não depende apenas do conhecimento da morfologia e estrutura das proteínas virais, mas de uma maior compreensão das interações que resultam na progênie dos vírions, assim como do entendimento de todas as etapas da replicação viral (WUNNER; PALLATRONI; CURTIS, 2004).

Atualmente, não há disponibilidade de fármaco algum com ação antiviral específica, estabelecida e confiável contra o vírus rábico (WARREL; WARREL, 2004). Em combinação com a profilaxia realizada através de vacinas e/ou administração de imunoglobulina anti-rábica, um fármaco antiviral eficaz poderia aumentar consideravelmente a proteção contra esta grave encefalite.

Este trabalho propôs a triagem de agentes com potencial ação anti-rábica, através de técnicas que podem representar uma alternativa às metodologias já estabelecidas para a detecção do vírus rábico, além da simples realização e baixo custo, permitindo, dessa forma, a triagem de agentes promissores, candidatos a futuros estudos acerca de sua atividade anti-rábica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A IMPORTÂNCIA DOS FÁRMACOS ANTIVIRAIS

A virologia apresentou, sem dúvida, grandes avanços com a introdução de vacinas que contribuíram, em muito, para a erradicação e o controle de diversas doenças. Entretanto, a vacinação pode ser responsável por muitas complicações, tais como reativação viral em vacinas de vírus atenuados, ou reações adversas graves para todas as outras vacinas, incluindo a vacina anti-rábica (INSTITUTO PASTEUR, 2000; DE CLERQ, 2004).

Uma segunda alternativa para a defesa antiviral, além da utilização de vacinas, é o desenvolvimento e o uso de agentes antivirais capazes de prevenir a infecção ou de combatê-la. A pesquisa na busca de novos fármacos mostrou avanços importantes nos últimos anos, principalmente, após o desenvolvimento de modelos biológicos a serem realizados *in vitro* e em grande escala, os quais permitem a análise de várias amostras, em tempo reduzido, possibilitando a realização de várias repetições experimentais, além de propiciar uma análise estatística consistente dos resultados e conseqüente reprodutibilidade (HOUGHTON, 2000).

Há pouco mais de uma década, apenas cinco fármacos antivirais tinham sido licenciados para o tratamento de infecções virais. Desde então, os avanços na virologia, particularmente pela necessidade de combate ao vírus HIV, resultaram na descoberta e validação de vários alvos para intervenção terapêutica (DE CLERCQ, 2002).

O atual arsenal quimioterápico para infecções virais consiste em 37 fármacos antivirais licenciados pelas autoridades governamentais. A maioria deles foi aprovada nos últimos cinco anos, sendo que 19 destes fármacos são utilizados para o tratamento do vírus HIV. Os demais antivirais são utilizados contra os vírus das hepatites B e C,

vírus influenza, vírus respiratório sincicial, vírus herpéticos, incluindo neste último grupo o vírus da varicela zoster, o citomegalovírus e os vírus herpes simplex (DE CLERCQ, 2004).

A efetividade das vacinas levou à erradicação e ao controle de importantes doenças virais, tais a poliomielite, varíola, sarampo, caxumba e rubéola. Entretanto, outras importantes doenças virais, particularmente, as causadas pelos vírus da hepatite C, gastroenterites e HIV não apresentaram resultados promissores com vacinas, até o momento. A grande necessidade de fármacos antivirais é fortemente enfatizada pela falta de vacinas eficazes contra uma enorme variedade de patógenos virais, como a maioria dos vírus respiratórios (adenovírus, rinovírus, vírus parainfluenza e vírus sincicial respiratório), o papilomavírus humano, os herpesvírus humanos (HSV-1 e 2, varicela zoster, citomegalovírus, vírus Epstein-Barr), além dos vírus que causam febres hemorrágicas (DE CLERCQ, 2002).

De maneira geral, existem duas categorias de antivirais: aqueles com ação indireta, incluindo os imunomoduladores, como os interferons, ou indutores desses, e vacinas, as quais estimulam o mecanismo de defesa das células hospedeiras; e aqueles com ação direta, que são os agentes virucidas e todos aqueles que agem em etapas específicas da replicação viral (CHE, 1991). Os agentes antivirais diretos interferem em um ou mais processos dinâmicos da replicação viral, e são candidatos potenciais a tornarem-se fármacos antivirais de aplicação clínica; os agentes virucidas inativam os vírus extracelularmente e são então candidatos a antissépticos, com amplo espectro de atividade germicida (VLITINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGUE, 1997).

Intensas são as pesquisas para a busca de novos fármacos antivirais, mas mesmo com os avanços já alcançados, a maioria destes agentes possui aplicações limitadas e

poucos antivirais foram aprovados pelas autoridades governamentais para uso clínico, representando um arsenal bastante incipiente se comparado aos avanços da quimioterapia antimicrobiana (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGUE, 1997).

Uma das principais razões da falta de sucesso no desenvolvimento de fármacos antivirais é, principalmente, a natureza dos vírus, os quais possuem uma estrutura aparentemente simples e um sistema enzimático restrito, sendo totalmente dependentes dos processos metabólicos celulares para multiplicação. Dessa maneira, agentes que inibem ou causam a morte de vírus, conseqüentemente exibem um certo grau de toxicidade às células hospedeiras. O compromisso com a especificidade pelas células infectadas, a eficácia e um baixo nível de toxicidade são indispensáveis para a seleção de agentes antivirais eficazes (VANDEN BERGUE; VLIETINCK, 1991, WHITE; FENNER, 1994; VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGUE, 1997).

Muitos métodos *in vitro* têm sido desenvolvidos para a seleção de novos agentes antivirais, e esta seleção busca fundamentalmente a determinação de dois parâmetros, a citotoxicidade, que determinará o nível de toxicidade do agente para as células-alvo (CC_{50}); e a concentração efetiva ou inibitória (CE_{50} ou CI_{50}), que determinará o quanto a replicação viral é inibida. De posse desses valores, torna-se possível determinar o índice de seletividade ($IS=CC_{50}/CE_{50}$), que reflete o quão promissor é o futuro candidato à fármaco antiviral. Agentes que apresentarem $IS \geq 4$ merecem uma investigação mais aprofundada (SIDWELL, 1986).

2.2 FÁRMACOS ANTIVIRAIS DE ORIGEM NATURAL

Atualmente, muitos fármacos de origem natural encontram-se disponíveis no mercado, em decorrência da extensa diversidade química dos produtos naturais, sendo que esses constituem uma fonte inesgotável de compostos com promissora atividade antiviral, não apenas pelo grande número de espécies com propriedades medicinais inexploradas, mas principalmente pela variedade de metabólitos sintetizados. Grande parte das substâncias ativas pode ser isolada e modificada estruturalmente, alcançando maior eficácia e menor citotoxicidade (HUDSON, 1990; CHE, 1991; HOUGHTON, 1996; NIELSEN, 2002).

Fármacos antivirais derivados de produtos naturais podem atuar nas etapas da replicação viral, desde a adsorção do vírus na célula hospedeira até sua liberação, o que pode resultar em mecanismos de ação complementares àqueles dos fármacos atualmente disponíveis (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997).

Uma das estratégias na busca de novos fármacos antivirais derivados de produtos naturais é baseada no estudo de extratos vegetais de plantas medicinais (VLIETINCK; VANDEN BERGHE, 1991). Estes extratos constituem uma grande fonte de metabólitos secundários, com comprovada atividade antiviral *in vitro*, tais como flavonóides (AMOROS; SIMÕES, GIRRE, 1992; ROBIN et al., 1998; LIN et al., 1999; LI et al., 2000; SHAHAT et al., 2002), alcalóides (VANDEN BERGHE; VLIETINCK; VAN HOOF, 1986; MONTANHA et al., 1995; MCCORMICK et al., 1996), taninos (YOSHIDA et al., 1996; ELDERMEIER et al., 1996; LIU et al., 1999), lignanas (ASANO et al., 1996; KERNAN et al., 1997; CHARLTON, 1998; KUO et al., 2001), compostos fenólicos (VANDEN BERGHE; VLIETINCK; VAN HOOF, 1986; CHE,

1991; HAYASHI et al., 2001; ABDEL-KADER, 2001; CHIANG et al., 2002; TOYOKUNI et al., 2003; SAVI et al., 2005), entre outros.

Dentre os metabólitos vegetais secundários já estudados, os compostos fenólicos despertam um interesse especial em virtude de sua diversidade estrutural e propriedades biológicas e farmacológicas (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000; PIETTA, 2000). Acerca de sua atividade antiviral, vários compostos fenólicos são capazes de inibir a replicação de vários vírus; a título ilustrativo, pode-se citar os trabalhos de inibição da replicação dos herpesvírus (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000; MEERBACH et al., 2001; CHIANG et al., 2002; SAVI et al., 2005) e HIV (BURKE et al., 1995; YOSHIDA et al., 1996; NAZUNDER et al., 1996; MEERBACH et al., 2001)

2.3 O VÍRUS RÁBICO

2.3.1 Histórico

A raiva é uma das doenças mais antigas conhecidas pela humanidade, que causa grande temor para a população devido às peculiaridades de sua transmissão, de suas manifestações clínicas e ao seu curso geralmente fatal, comprovando-se tal fato na extensa e interessante história registrada na literatura (STEELE; FERNANDEZ, 1991).

A palavra raiva deriva do latim *rabies*, significando “fúria ou delírio” e do sânscrito *rhabas*, que significa “loucura, demência”. Os gregos a chamavam de *lyssa* ou *lyta*, que significa loucura (STEELE; FERNANDEZ, 1991; WILKINSON, 2002).

No código de Eshunna, escrito há mais de 2.000 anos a.C. na Mesopotâmia, encontram-se registrados os primeiros relatos de mortes humanas relacionadas com mordeduras de animais (BARATA, 1985).

Supõe-se ser de Hipócrates a primeira descrição sobre a sintomatologia da raiva humana, com a afirmação de que: “Pessoas loucas bebem muito pouco, são perturbadas e assustadas”, além de ter sido o primeiro a mencionar que a mordedura do cão seria o provável mecanismo de transmissão da raiva. Existem várias citações sobre a doença na mitologia, o que mostra a grande preocupação com a raiva desde a antigüidade. Os gregos, por exemplo, cultivavam deuses como Aristeu, que era invocado na proteção contra este mal, e Artemis, que era cultuada como a divindade com poderes para curar a raiva (BAER, 1991; ZANETTI, 1994).

Os primeiros registros acerca da propagação da raiva são de Aristóteles, no ano IV a.C., em seu livro “História Natural dos Animais”, no qual afirmava que os cães sofriam de loucura e a transmitiam através de mordidas aos outros animais, exceto o homem; já Plínio defendia a hipótese da raiva ser também transmitida aos humanos e preconizava que pessoas expostas ao contágio poderiam prevenir-se da doença com a extração de seus freios linguais, submetendo-os ao fogo por três vezes e ingerindo-os em seguida (BAER, 1991; WILKINSON, 2002).

Em 1584, o italiano Girolamo Fracastoro, em seu tratado “A Ferida Incurável”, descreveu a raiva, tal como ela é conhecida atualmente, afirmando que os humanos não são apenas susceptíveis à doença, como também morrem, quase na maioria dos casos, após o aparecimento dos sintomas clínicos (FU, 1997; RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002).

As tentativas de tratamento para a raiva foram amplamente difundidas no século XIX, e entre estas constavam sangrias, cauterizações, imersões, tratamentos químicos e tratamentos empíricos com plantas e partes de animais (RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002).

Em 1804, Zinke foi o primeiro a demonstrar a transmissão da doença através da saliva; ele pincelou a saliva de um cão raivoso na pata ferida de outro cão sadio, observando o desenvolvimento da doença após vinte dias, e alertou para a possível transmissão da doença através da saliva de pessoas doentes (BAER; BELL; FISHBEIN, 1990).

Galtier (1881), através de estudos sobre a indução de proteção de animais de laboratório, influenciou Louis Pasteur nas pesquisas que o mesmo vinha realizando com a raiva desde 1880, além de adaptar experimentalmente a doença em coelhos (RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA; 2002). Pasteur e seus colaboradores, em 1881, isolaram e adaptaram o vírus da raiva em animais de laboratório, tornando-o estável e, desta forma, originando o chamado vírus fixo, de virulência constante, com características bem definidas e reprodutíveis em laboratório (PASTEUR, 1882). Logo em seguida, estes pesquisadores avançaram em suas pesquisas com o uso de animais e do chamado vírus fixo, obtendo imunidade à raiva, após desafio intracerebral (PASTEUR; CHAMBERLAND; ROUX, 1884).

Em virtude de tal fato, surgiu a hipótese de se testar a vacinação humana. Mesmo com resultados bem estabelecidos e favoráveis, Pasteur ainda estava temeroso. É o que consta em uma carta escrita ao imperador brasileiro, D. Pedro II, em 1884, na qual o cientista insinuou a experimentação da vacinação em condenados à morte, em troca da liberdade, caso a imunização obtivesse sucesso. Em resposta ao amigo, D. Pedro II negou a proposta, alegando que a pena de morte não existia no Brasil e que não arriscaria a vida de nenhum condenado. No entanto, ofereceu à Pasteur recursos para realizar pesquisas com a febre amarela, julgando ser esse um problema muito maior no Brasil (VIEIRA; HOSSNE, 1998).

Em 1885, Pasteur realizou a primeira inoculação humana com sua vacina, em Joseph Meister, um garoto de nove anos, que havia sido mordido 14 vezes por um cão raivoso. O menino foi examinado por médicos, que consideravam inevitável o aparecimento da doença. Foi inoculada nesta criança a medula desidratada por 15 dias de um coelho raivoso, através de 14 administrações sucessivas, sem a manifestação da doença (PASTEUR, 1885).

Mais de 350 inoculações bem sucedidas em pacientes foram registrados por Pasteur, em 1886, estabelecendo-se desta forma a profilaxia da raiva. Diante deste fato, a Academia de Ciências de Paris propôs uma comissão para viabilizar tal procedimento, em maior escala, e foi inaugurado, nesta cidade, o primeiro Instituto Pasteur. Alguns anos depois, vários outros Institutos foram criados em todo o mundo, sendo responsáveis pela pesquisa, estudo e tratamento da raiva (WILKINSON, 2002).

2.3.2 Características do vírus da raiva

2.3.2.1 Classificação

O vírus rábico pertence à família Rhabdoviridae, a qual agrupa vírus que infectam vertebrados, invertebrados e algumas espécies de plantas. Nela estão incluídos cinco gêneros: *Vesiculovirus*, *Ephemerovirus*, *Cytorhabdovirus*, *Nucleorhabdovirus* e *Lyssavirus* (MURPHY et al., 1995; DIETZCHOLD et al., 1996). Apenas vírus de dois gêneros da família Rhabdoviridae infectam mamíferos: o *Vesiculovirus*, cujo protótipo é o vírus da estomatite vesicular e o *Lyssavirus*, representado pelo vírus da raiva (KAPLAN; TURNER; WARREL, 1986; WUNNER, 2002).

Os vírus pertencentes ao gênero *Lyssavirus* foram classificados de acordo com suas propriedades antigênicas e sorológicas, originalmente em quatro sorotipos, a

partir de estudos de proteção cruzada em camundongos e técnicas que utilizavam anticorpos monoclonais (WIKTOR et al., 1973).

Através de técnicas moleculares foram caracterizados quatro genótipos, coincidentes com os sorotipos previamente caracterizados. Atualmente, o gênero *Lyssavirus* é classificado em sete genótipos, baseados na sua variabilidade genômica. O genótipo 1 compreende amostras clássicas, incluindo vírus fixos (de laboratório) e vírus isolados de mamíferos em geral e de morcegos insetívoros e hematófagos. O genótipo 2 compreende a amostra Lagos bat, isolado de morcegos da África; o genótipo 3 é representado pelo vírus Mokola, isolada do mussaranho e de humanos da África; o genótipo 4 compreende o vírus Duvenhage, isolado de humanos e morcegos da África. Ainda foram isoladas amostras de morcegos europeus ("*European bat Lyssavirus*"), como a do *Epitesicus serotinus* (EBL 1) e a do *Myotis* sp. (EBL 2), representando desta forma mais dois genótipos (5 e 6). O último genótipo foi isolado e caracterizado por Gould et al. (1998), na Austrália, até então considerada livre da raiva (FOOKS et al., 2003; WARRELL; WARRELL, 2004).

O gênero foi, ainda, dividido em dois filogrupos: o filogrupo 2 engloba os vírus Mokola e Lagos Bat, e o filogrupo 1 engloba os demais genótipos, que causam encefalite fatal em humanos. O filogrupo 2 é menos patogênico; entretanto o vírus Mokola, provavelmente, foi responsável por três casos de infecção em humanos, incluindo um caracterizado por encefalite fatal, sem os padrões típicos observados na raiva humana (FAMILUSI et al., 1972; BADRANE et al., 2001).

2.3.2.2 Estrutura e morfologia

O vírus rábico possui a forma de um projétil, com uma extremidade plana e a outra arredondada, como mostra a Figura 1. Seu diâmetro médio é de 75nm e seu comprimento varia entre 100 a 300nm (TORDO,1996).

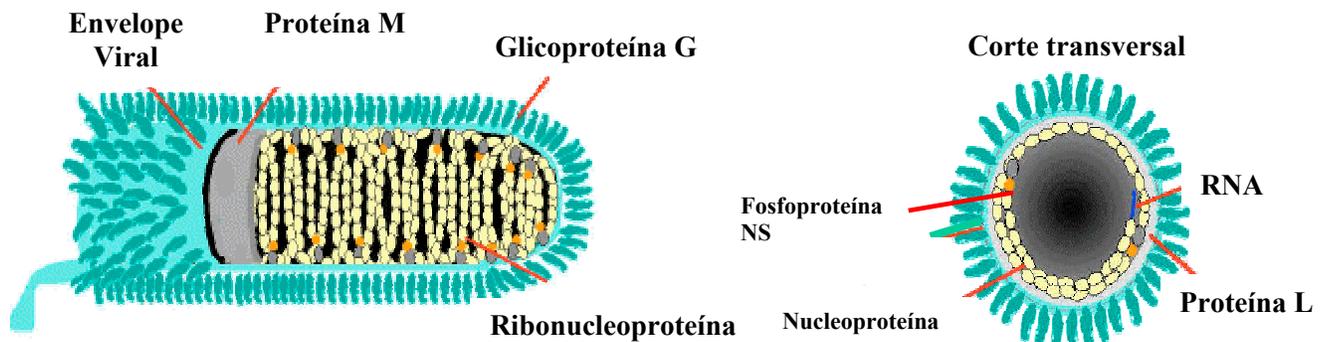


Figura 1. Esquema representativo da estrutura do vírus rábico

Fonte: Center of Disease Control. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies>

O vírus é constituído por dois elementos estruturais principais, a ribonucleoproteína e o envelope viral que a envolve (WUNNER, 2002).

A ribonucleoproteína ou nucleocapsídeo apresenta-se sob a forma de um complexo helicoidal constituído de RNA de fita simples, não segmentado e de sentido negativo (5'-3'), que está associado à uma nucleoproteína (N), à uma fosfoproteína (NS) e à RNA polimerase, denominada proteína L (WUNNER, 2002).

A nucleoproteína N é a mais conservada dentre todos os componentes virais, entre os diversos genótipos (WUNNER, 2002), sendo a proteína mais importante no processo de encapsidação, estando intimamente ligada ao genoma (TORDO et al., 1986a). Ela é composta por 450 aminoácidos, com peso molecular de 50.500 Da, e é fosforilada na posição 389 (TORDO et al., 1986b).

A fosfoproteína NS é constituída por 297 aminoácidos, apresenta um peso molecular de 33.000 Da, sendo fortemente fosforilada (TORDO et al., 1986b). É uma proteína interna, não estrutural, com papel importante na replicação viral, já que anticorpos monoclonais específicos para esta proteína podem inibir este evento (DELAGNAU et al., 1981).

A proteína L tem 2.142 aminoácidos e um peso molecular de 224.000 Da, sendo responsável pela transcrição e replicação do genoma (TORDO et al., 1988).

O envelope viral possui tamanho aproximado de 8 nm e é composto por uma bicamada lipídica, à qual estão associadas duas proteínas: a proteína M e a glicoproteína G (WUNNER, 2002).

A proteína M possui 202 aminoácidos e peso molecular de 23.000 Da e parece estar relacionada com a ligação entre o envelope e o complexo ribonucleoproteína, exercendo grande importância na regulação da replicação viral (SOKOL; STANCEK; KOPROWSKI, 1971; TORDO et al., 1986a).

A glicoproteína G possui 524 aminoácidos e peso molecular de 58.500 Da, apresenta-se na forma de projeções de espículas glicosiladas para o exterior do envelope viral (TORDO, 1996). Esta proteína também é responsável pela indução de anticorpos neutralizantes, com no mínimo seis sítios antigênicos distintos (WITKOR et al., 1973; COX; DIETZSCHOLD; SCHNEIDER, 1977). Funções biológicas e imunológicas, tais como servir de receptor na superfície celular e ser sítio de ligação de anticorpos neutralizantes, também são atribuídas à esta proteína. Variações nas seqüências de aminoácidos, em algumas regiões dessa proteína, podem alterar as propriedades patogênicas e imunológicas do vírus (WUNNER, 2002).

2.3.2.3 Genoma e replicação do vírus rábico

O genoma do vírus possui 11.932 nucleotídeos, é constituído de RNA fita simples não-segmentado de polaridade negativa, o que o impossibilita de ser traduzido diretamente em proteínas pela maquinaria enzimática das células; entretanto, ele serve de molde para uma transcrição autônoma, dando origem a moléculas complementares positivas, capazes de produzir novas partículas virais (TORDO,1996).

A seqüência de eventos da replicação do vírus rábico pode ser dividida em três fases. A primeira inclui a ligação do vírus aos receptores celulares da célula hospedeira. A segunda fase inclui a transcrição e a replicação do genoma viral. Na terceira fase, após a associação e o acúmulo suficientes de RNA viral e das proteínas N, P, e L nas células infectadas, os nucleocapsídeos virais são montados e a formação dos vírus ocorre, sendo que as células permanecem metabolicamente competentes. Todas as fases da replicação viral podem ser esquematicamente visualizadas na Figura 2 (WUNNER, 2002).

Depois de se fixar na célula hospedeira, através da glicoproteína G, ocorre a penetração do vírus por endocitose e a liberação da ribonucleoproteína. Após a entrada do vírus na célula, ocorre a síntese do genoma complementar, fita positiva (3' – 5'), em mRNA transcrito pela RNA polimerase viral. A transcrição da fita positiva forma um RNA líder e depois RNAs mensageiros, que correspondem às proteínas virais. O genoma codifica cinco genes estruturais (N, P, M, G, e L), além de regiões não codificantes; tanto a transcrição quanto a replicação são etapas autônomas e independentes da célula hospedeira, sendo catalizadas pela RNA polimerase L, presente no genoma do vírus. A replicação ocorre após a tradução dos mRNA, com a formação de vários RNAs intermediários com sentido positivo (TORDO et al., 1986a). Em

seguida, as fitas positivas tornam-se moldes para a produção de fitas negativas, que são encapsuladas. Finalmente, o vírus deixa a célula por brotamento (COX; DIETZSCHOLD; SCHNEIDER, 1977).

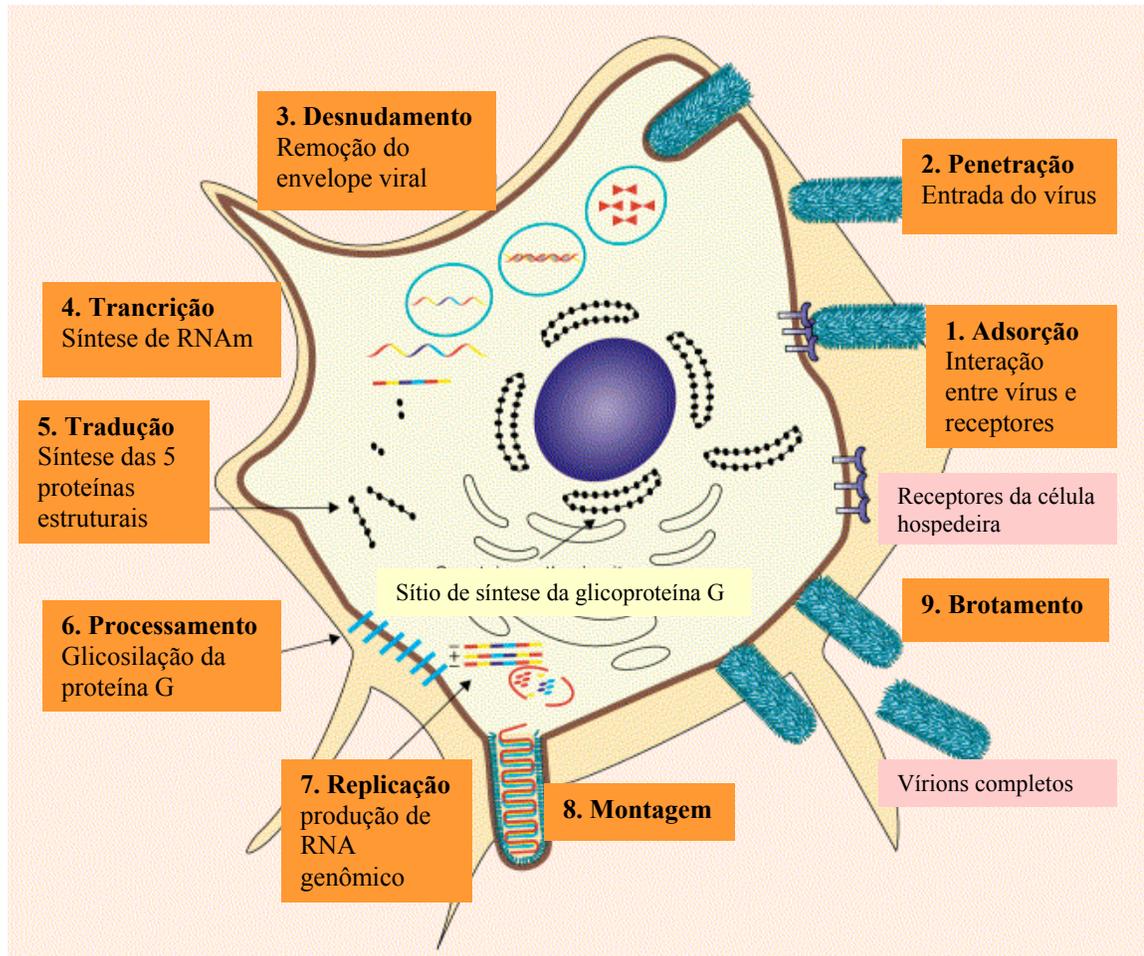


Figura 2. Esquema representativo da replicação do vírus rábico em uma célula hospedeira.

Fonte: Modificado de RUPPRECHT, HALON; HEMACHUDHA (2002).

2.3.3 Patogênese

A grande maioria dos casos de raiva humana ocorre pela penetração do vírus presente na saliva de animais infectados, através de mordidas e lambeduras. Existem relatos de casos de arranhões, contato de mucosas com saliva ou materiais contaminados e inalação de aerossóis em laboratórios ou cavernas, embora as chances

de infecção nessas últimas circunstâncias sejam menores. A profundidade e a localização da mordida determinam a probabilidade do desenvolvimento da doença, sendo maior em lesões mais profundas e próximas a regiões enervadas, como cabeça, mãos e pés (WUNNER, 2002).

A raiva humana possui cinco estágios segundo, Hemachudha, Laothamatas e Rupprecht (2002). Estes estágios são definidos como períodos de incubação, prodrômico e neurológico, seguidos de coma e morte. Embora apresente sintomas clássicos, a raiva é uma doença de difícil diagnóstico e reconhecimento. Geralmente no início dos sintomas, a doença é confundida com outras patologias, o que conduz a diagnósticos tardios ou, até mesmo, realizados somente após a morte do paciente.

O período de incubação é o tempo decorrido entre a exposição ao vírus e o aparecimento dos sintomas, que é bastante variável, com relatos de 30 dias a um ano, sendo que, na maioria dos casos, os sintomas ocorrem entre 30 e 60 dias (DEAN; EVANS; McCLURE, 1963).

O período prodrômico pode variar de 2 a 10 dias e é caracterizado pelo aparecimento de sintomas inespecíficos, que dificultam o diagnóstico, sendo os mais específicos, formigamento e dor na região da lesão. Após inoculação, o vírus replica-se no próprio sítio de entrada e segue em direção ao sistema nervoso central. Depois de um breve período de persistência no local da infecção, o vírus entra em fase de eclipse, traduzida pela impossibilidade de detecção em qualquer tecido (BAER, 1991). A replicação viral ocorre no tecido muscular e, através das conexões neuro-musculares, os vírus penetram nos nervos periféricos, ocorrendo a amplificação necessária para que se tenha uma quantidade de vírus suficiente para invasão do sistema nervoso periférico (MURPHY et al., 1973).

Ao atingirem o cérebro, os vírions encontram a região do hipocampo superior, denominado Corno de Amon, no sistema límbico, local mais propício para a replicação, onde se multiplicam com maior intensidade, caracterizando o período neurológico evidenciado pela encefalite. Nesta fase ocorrem distúrbios psíquicos e alterações comportamentais, alternando-se fases de lucidez e confusão mental. Outros sintomas clássicos na raiva humana são hidrofobia e aerofobia, possivelmente, devido a espasmos dolorosos na faringe (BAER, 1991).

Do cérebro ocorre uma migração viral centrípeta para vários locais (coração, rins, cavidades nasais, córnea, etc.). O forte tropismo pelas glândulas salivares representa o final do ciclo do hospedeiro, que culmina com a morte, antecedido pelo coma (MURPHY, 1985).

2.3.4 Diagnóstico

É importante ressaltar que, anteriormente ao diagnóstico laboratorial, uma avaliação clínica deve ser realizada, considerando-se aspectos como espécie do animal agressor, regiões endêmicas, local e gravidade do ferimento. Devido à gravidade da doença, há necessidade de um diagnóstico correto e confiável. As técnicas laboratoriais devem identificar e/ou isolar o vírus rábico. A metodologia de diagnóstico é normatizada pela Organização Mundial da Saúde (WHO 1992, 1994).

As técnicas laboratoriais podem ser divididas em diagnóstico *antemortem* e diagnóstico *postmortem*, diferindo especialmente na natureza do material a ser analisado (WOLDEHIWET, 2005).

No indivíduo suspeito de infecção, o diagnóstico *intravivum* pode ser feito após análises da saliva, do bulbo piloso e da impressão da córnea. As últimas duas estruturas

são altamente enervadas e a primeira, a principal porta de saída do vírus (KAPLAN, 1996).

Geralmente, realiza-se o diagnóstico *postmortem* com amostras de tecido cerebral e grande parte dos laboratórios utiliza duas técnicas: a prova de imunofluorescência direta (FAT), como teste principal, seguida da prova de inoculação intracerebral em camundongos (MIT), como teste confirmatório. As duas, quando utilizadas conjuntamente, oferecem altas sensibilidade e especificidade (WHO, 1992; DEAN; ABELSETH; ATANASIU, 1996, KOPROWSKI, 1996).

Recentemente, a técnica do MIT vem sendo substituída por bioensaios em sistemas de cultura de células, nos quais o vírus pode ser isolado *postmortem* de tecido cerebral, além de utilizar glândulas salivares e saliva, pele e fluido cérebro-espinhal para o diagnóstico *intravivum* de humanos e *antemortem* em animais. Esta substituição vem ocorrendo em virtude do baixo custo, da relativa sensibilidade e da redução substancial do tempo requerido para a obtenção dos resultados: de 30 dias no MIT para 4 a 5 dias em cultura de células, além de esta dispensar o uso de animais. A linhagem celular que se mostrou mais susceptível para o isolamento do vírus é um neuroblastoma murino (C-1300), produzindo resultados em cinco dias, com sensibilidade semelhante à do MIT para vírus fixos e selvagens (WEBSTER; CASEY, 1996; WOLDEHIWET, 2005).

A infecção rábica provoca uma extensa invasão neuronal, com dano celular limitado, sendo que a única mudança patologicamente aparente é um discreto edema cerebral, sem mudanças histopatológicas. Em 1903, Adelchi Negri observou a presença de inclusões citoplasmáticas eosinofílicas em tecidos cerebrais infectados, denominadas posteriormente de corpúsculos de Negri, de caráter patognomônico para raiva, representando um diagnóstico definitivo. Entretanto, estes corpúsculos, em cortes

histológicos, são detectados em apenas 50 a 80% de animais infectados, sendo, desta forma, necessária a utilização de técnicas imunológicas para obtenção de resultados fidedignos (MESLIN; KAPLAN; KOPROWSKI, 1996; JOGAI; RADOTRA; BANERJEE, 2000; WOLDEHIWET, 2005).

Com relação à detecção dos antígenos virais, várias técnicas foram desenvolvidas. Nos últimos trinta anos, a detecção dos corpúsculos de Negri foi substituída pela detecção de antígenos específicos por fluorescência direta ou indireta (FAT), sendo recomendada pela OMS. Esta técnica é particularmente sensível em amostras frescas. Com o uso de anticorpos monoclonais, pode-se aumentar o grau de especificidade e diferenciar alguns vírus, sendo que a principal vantagem desta técnica é a rapidez com que se obtém os resultados (WHO, 1992; DEAN; ABELSETH; ATANASIU, 1996; WHITFIELD et al. 2001; WOLDEHIWET, 2005).

O diagnóstico também pode ser realizado por métodos imunohistoquímicos, que basicamente utilizam anticorpos monoclonais ou policlonais específicos para o vírus, tais como anticorpos primários e anticorpos espécie-específicos conjugados com peroxidase ou avidina-biotina como anticorpos secundários, fornecendo resultados tão sensíveis quanto a técnica de FAT (KOTWAL; NARAYAN, 1985; ANJARA; JHALA, 1985, WOLDEHIWET, 2005).

O método imunoenzimático (ELISA), baseado na detecção do nucleocapsídeo, desenvolvido por Perrin e colaboradores (1986), também é uma ferramenta diagnóstica. Neste ensaio, anticorpos IgG de coelho antinucleocapsídeo são imobilizados nas placas e usados para capturar o antígeno do material suspeito, seguido do mesmo anticorpo conjugado a peroxidase para demonstrar ligação específica. Esta técnica pode ser usada para detecção de antígenos em amostras em decomposição, as quais são inadequadas

para a técnica de FAT (SAXENA et al., 1989), além de ser uma reação com resultados rápidos e facilmente obtidos (BOURHY; PERRIN, 1996).

O vírus pode ser também detectado em amostras de saliva e cérebro de cachorro, através do ensaio de aglutinação em látex, no qual são utilizadas partículas de látex revestidas com anticorpo anti-rábico IgG purificado de soro equino hiperimune. Os resultados obtidos com esta técnica mostraram sensibilidade e especificidade altas. Uma modificação da técnica pode ser utilizada para a dosagem de anticorpos neutralizantes (KASEMPIMOLPORN et al., 1992; MADHUSUDANA; SARASWATI, 2003; WOLDEHIWET, 2005).

Com a clonagem e o seqüenciamento do genoma do vírus rábico, além da confirmação diagnóstica do mesmo e de *Lyssavirus* relacionados, tornou-se possível também sua caracterização molecular e epidemiológica, utilizando sondas de ácidos nucléicos ou iniciadores específicos para um ou mais genes. A detecção de ácidos nucléicos por RT-PCR é particularmente importante em espécimes com avançado estado de decomposição e amostras fluidas como saliva e fluido cérebro espinhal (CREPIN et al., 1998; DAVID et al., 2002), além de reduzir em horas o tempo requerido para o estabelecimento do diagnóstico. Os iniciadores utilizados visam como principal alvo o gene da nucleoproteína, em virtude desse ser o mais conservado entre todas as espécies de *Lyssavirus*. Estudos comparativos entre as técnicas de RT-PCR e FAT mostraram uma sensibilidade equivalente entre as mesmas (SACRAMENTO; BOURHY; TORDO, 1991; BORDIGNON et al., 2004).

Outra forma de detectar o vírus rábico é através da técnica de hibridização *in situ*, que utiliza sondas RNA de fita simples que tem como alvo o RNA genômico ou o

RNA mensageiro codificante para uma ou todas as cinco proteínas virais (JACKSON; REIMER; WUNNER, 1989; WARNER; WHITFIELD; FEKADU, 1997).

2.3.5 Epidemiologia

A distribuição da raiva ocorre em todos os continentes, com exceção da Antártica. Muitos tipos de mamíferos podem servir como hospedeiros para o vírus rábico, de acordo com a localização geográfica, sendo os principais representados por carnívoros e quirópteros, conforme observado na Figura 3. Existem dois ciclos distintos e bem caracterizados da doença, o urbano e o silvestre. No primeiro, os principais transmissores são cães e gatos, e no segundo, morcegos hematófagos, o que possibilita a circulação do vírus e sua possível reintrodução no ciclo doméstico, podendo alcançar proporções epizoóticas, com a infecção de outros animais domésticos e, até mesmo, o homem (RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002; CHILDS, 2002).

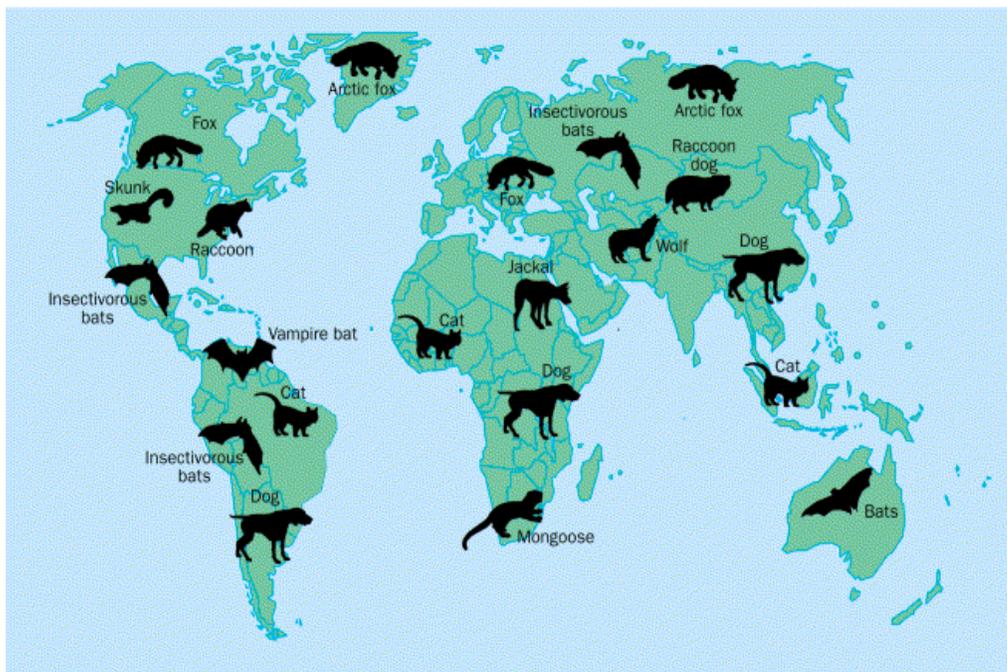


Figura 3. Distribuição mundial dos principais animais transmissores de raiva.

Fonte: RUPPRECHT, HALON e HEMACHUDHA (2002).

Entre os quirópteros, os morcegos hematófagos, principalmente a espécie *Desmodus rotundus*, são o o maior reservatório para o vírus rábico na América Latina, embora outras espécies insetívoras e frugívoras também sejam passíveis de transmitir a doença, caracterizando o ciclo silvestre. Em outras regiões, como Europa e América do norte, este ciclo é representado por outros animais como raposa, lobo, chacal, guaxinins, entre outros (GERMANO, 1994; RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA; 2002).

Dados confiáveis a respeito da real incidência da raiva são escassos em muitas áreas do globo, dificultando dessa forma, a compreensão do verdadeiro impacto desta zoonose, tanto na saúde humana como animal. O número de óbitos anuais, no mundo, ocasionados pela raiva varia de 40.000 a 70.000, especialmente em áreas endêmicas de países da África e Ásia (WHO, 2005).

No Brasil, a raiva é considerada endêmica, com uma tendência à redução na taxa de incidência. Uma diminuição notória do número de casos desde 1990 até 2003 vem sendo observada, conforme mostra a Figura 4. Entretanto, um novo perfil se apresentou em 2004, com 29 casos confirmados até outubro, sendo que 23 foram transmitidos por morcegos e apenas seis por cães, com uma evidente inversão do principal transmissor, e o que pode levar a uma suposta transição do ciclo urbano para o ciclo silvestre. Outro dado importante é que de todos casos registrados, 22 ocorreram no Estado do Pará (INSTITUTO PASTEUR, 2005).

Em Santa Catarina, como em toda a região sul, o ciclo urbano do vírus foi controlado desde 1982, com apenas uma única notificação da doença em 1987, transmitida por um morcego hematófago. Entretanto, a raiva silvestre, principalmente em bovinos, acarreta grande prejuízo para a indústria agropecuária. Dessa forma, torna-

se fundamental o controle da doença, para que esta não retome seu ciclo urbano, ocasionando danos à saúde pública (CIDASC, 1999; FUNASA, 2001).

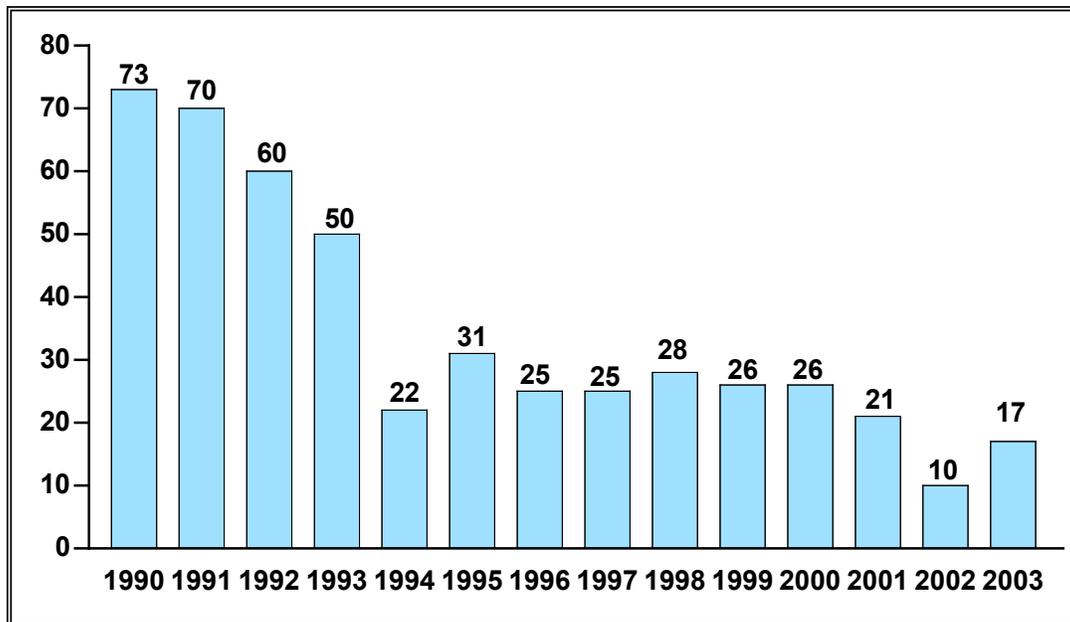


Figura 4. Número de casos de raiva humana no Brasil , no período de 1990 a 2003.

Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde, 2005.

2.3.6 Prevenção e controle da doença

A raiva humana é passível de ser controlada com o estabelecimento de algumas medidas, tais como ações de educação em saúde, eliminação dos focos da doença, vacinação de animais transmissores, imunização de pessoas expostas ao risco na pré- ou pós-exposição e cuidados de assepsia com o ferimento (WHO, 1992).

As decisões sobre o tratamento resultam basicamente do entendimento do ciclo de transmissão entre os animais e da definição da exposição (RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA; 2002). No passado, medidas letais eram empregadas para o controle da doença, como a destruição dos animais, que apresentavam risco potencial, através do

uso de venenos, armadilhas e, até mesmo, sua execução (HANLON; CHILDS; NETTLES, 1999).

As ações de controle, em países desenvolvidos, estão voltadas principalmente para a raiva silvestre, visto que tais países controlaram a raiva urbana, através da vacinação de cães e gatos. Nos países em desenvolvimento, a raiva continua a ser transmitida pelo ciclo urbano, sendo necessárias ações mais rígidas de controle e prevenção. A vacinação anual de animais domésticos é a medida mais importante a ser tomada e a captura de cães não domiciliados também deve ser considerada para evitar o aparecimento de novos focos da doença (WARRELL; WARRELL, 2004).

Nos países desenvolvidos, a raiva silvestre tem sido bem controlada com a utilização de vacinas orais de vírus atenuados e vacinas recombinantes. Mesmo assim, o controle da raiva, em algumas espécies inacessíveis, como morcegos insetívoros, aumenta o risco de infecção humana. Nestes casos, evitar o contato com este vetor, além de medidas pré-exposição e a vacinação imediata em pessoas expostas, são as únicas medidas de prevenção da infecção humana (WARRELL; WARRELL, 2004).

2.3.7 Profilaxia e tratamento

A vacinação anti-rábica é a principal medida profilática contra raiva humana e está dividida em dois tipos de tratamentos, o de pré e de pós-exposição. A indicação do tipo de tratamento será definida pelas circunstâncias da potencial exposição ao agente etiológico da doença (INSTITUTO PASTEUR, 2000).

O tratamento pré-exposição apenas é recomendado em situações com elevado e constante risco de infecção, como ocorre em laboratórios de pesquisa, com veterinários, biólogos, entre outros (BRIGGS, 2000). Este tipo de tratamento é a mais bem sucedida

forma de prevenção contra a raiva. Nenhuma morte decorrente da doença foi registrada entre indivíduos que realizaram este tratamento, seguido de um reforço após a exposição. Entretanto, é essencial que todos aqueles que receberam este tipo de tratamento, passem regularmente por avaliações sorológicas, assegurando títulos de anticorpos neutralizantes superiores a 0,5 UI/mL (WHO, 1992).

O tratamento pós-exposição é, principalmente, indicado após o contato com um animal provavelmente infectado. A OMS classifica a exposição em três categorias e conforme a gravidade, recomenda a vacinação. Outras medidas como, a observação do animal agressor (somente no caso de cães e gatos), quando possível, e a administração da imunoglobulina de origem humana ou equina nos casos de exposição considerados mais graves, também são definidos nas recomendações da OMS (WHO, 1992). Medidas como a assepsia dos ferimentos com agentes virucidas (iodo e álcool) realizadas imediatamente após a exposição, podem minimizar a infecção em até 50% dos casos (KAPLAN; COHEN, 1962; DEAN; BAER; THOMPSON, 1963).

Atualmente, as vacinas utilizadas para a prevenção da raiva humana são de dois tipos, uma desenvolvida em tecido nervoso animal e outra a partir de cultura de células. Os países desenvolvidos optam pela última, em virtude da maior segurança oferecida, já que as vacinas de tecido cerebral podem ocasionar sérias reações adversas relacionadas à mielina. Entretanto, muitos países em desenvolvimento não dispõem de vacinas obtidas a partir de cultura celular, em virtude do seu elevado custo de produção (RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA; 2002).

No Brasil, a profilaxia da raiva humana desde 2003 é realizada com vacinas preparadas em cultivo celular, sendo pioneiro, o Estado de São Paulo, que desde de 2000 disponibiliza este tipo de vacina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005)

Existem vários regimes de administração de vacinas, que variam entre países e, até mesmo, de região para região, devido às diferenças epidemiológicas e à disponibilidade de recursos. Os mais comumente empregados são o de três doses, com eventuais reforços na pré-exposição e o de cinco doses nos casos de pós-exposição (WARRELL; WARREL, 2004).

Uma vez diagnosticada a encefalite rábica, com sintomas clínicos bem estabelecidos, pouco há o que fazer, já que a quase totalidade dos casos é irreversível e culmina com a morte do paciente. Várias abordagens têm sido implementadas para a assistência do paciente com raiva, desde medidas paliativas até tratamentos experimentais, que combinam antivirais, anestésicos e outros agentes, tais como, ribavirina, vidarabina, aciclovir, isoprinosina, quetamina, alfa-interferon, anticorpos monoclonais, vacina anti-rábica e imunoglobulina anti-rábica (HEMACHUDHA; HALON; HEMACHUDHA, 2002; JACKSON; WARRELL; RUPPRECHT, 2003; WARRELL; WARRELL, 2004), com poucos casos bem sucedidos descrito na literatura (CDC, 2004).

Desde 1970, há apenas seis notificações de sobreviventes à encefalite rábica. Desses seis pacientes, com exceção de um notificado recentemente, todos os demais receberam vacina anti-rábica, antes do aparecimento dos sintomas. Em nenhum paciente houve detecção do vírus ou de algum antígeno viral, o diagnóstico foi baseado apenas na presença de altas concentrações de anticorpos neutralizantes no fluido cérebro-espinhal e a recuperação implicou em profundo déficit neurológico (HATTWICK et al., 1972; PORRAS et al., 1976; CDC, 1977; ALVAREZ et al., 1994; MADHUSUDANA et al., 2002; CDC, 2004)

2.4 AGENTES COM AÇÃO ANTI-RÁBICA

A potencial atividade anti-rábica de vários agentes foi muito pouco estudada. Alguns destes estudos foram conduzidos há duas décadas, e apesar de resultados aparentemente promissores, as pesquisas não avançaram e pouco se sabe a respeito.

A atividade anti-rábica *in vitro* da isoprinosina, um potente imunomodulador (MASIHI, 2000), foi avaliada por Hernandez-Jáuregui e colaboradores, em 1980. Neste estudo foram usadas as cepas ERA e V319 do vírus rábico, obtendo-se a diminuição do título viral em 1,9 log (cepa ERA) e 1,3 log (cepa V319) após 24h; e de 1,7 log (cepa ERA) e 1,2 log (cepa V319) após 48h do tratamento com isoprinosina. Ainda neste estudo, foi possível observar a redução de focos fluorescentes em células BHK-21, que indicam infecção, além da diminuição do número de matrizes e partículas virais analisadas por microscopia eletrônica (HERNANDEZ-JÁUREGUI et al., 1980).

O efeito inibitório da replicação de nove vírus de genoma RNA, incluindo o vírus rábico, foi descrito por Yamamoto e colaboradores em 1990, que avaliaram a atividade antiviral do 7- N óxido de guanina, isolado de culturas de *Streptomyces* sp. Neste trabalho, a citotoxicidade foi avaliada por duas metodologias: a observação das alterações morfológicas celulares e através da inibição do crescimento celular realizada por contagens após cinco dias em contato com o metabólito. Desta maneira, foram obtidos, dois índices de seletividade para cada vírus. Para o vírus rábico foram utilizadas as células BHK-21 e a técnica de imunofluorescência para avaliação antiviral e encontraram-se índices de seletividade de > 65 e $> 0,33$, que expressam a correlação entre concentrações citotóxicas e efetivas (YAMAMOTO et al., 1990).

Estudos realizados com o anestésico quetamina, um antagonista competitivo do receptor N-metil-D-aspartato, demonstraram seu efeito anti-rábico *in vitro* e *in*

vivo. Culturas de neurônios de ratos, tratadas com quetamina e infectadas com a cepa CVS do vírus rábico, demonstraram diminuição do título viral de $6,9 \times 10^5$ para $5,7 \times 10^2$ PFU/mL, além de uma forte redução dos focos fluorescentes, envolvendo a síntese de duas proteínas virais, a nucleoproteína e a glicoproteína, através de análise por imunofluorescência, radiomarcção de enxofre e *Northern blotting*. O tratamento de ratos infectados reduziu a infecção rábica em diferentes regiões cerebrais, quando avaliados pelas mesmas técnicas. O provável mecanismo de ação deste anestésico está relacionado com a transcrição genômica do vírus (LOCKHART et al., 1991; LOCKHART; TORDO; TSIANG, 1992).

Vários polímeros naturais e semi-sintéticos foram avaliados contra a cepa CVS do vírus rábico em células CER. A atividade antiviral foi mensurada pela técnica de imunofluorescência, enquanto que a citotoxicidade foi determinada por avaliação microscópica das alterações morfológicas celulares. Dos 14 polímeros testados, cinco deles apresentaram índices de seletividade que variaram de 10 a 400. Os dados obtidos através de ensaios de adsorção e penetração viral, levam a crer que o mecanismo de inibição viral estaria relacionado com a habilidade destes compostos de ligarem-se ao envelope viral, não descartando a hipótese dessas substâncias interagirem com os receptores celulares de superfícies (PIETROPAOLO et al., 1993).

Onze diferentes glicoproteínas com características de lectinas, isoladas de várias fontes, foram investigadas quanto à sua potencial atividade antiviral frente aos vírus herpético (HSV-1), da raiva e da rubéola. Para o estudo da atividade anti-rábica, foram utilizadas as células CER e a cepa viral CVS, através da técnica de imunofluorescência. Dentre as lectinas avaliadas, quatro apresentaram bons resultados no que concerne ao vírus rábico, com índices de seletividade variando de 2,3 a 48,8.

Acredita-se que, de acordo com a especificidade em virtude de interações químicas, como a configuração de oligômeros ou a presença de carboidratos específicos ligantes a outros açúcares, possivelmente ocorre a ligação destas lectinas em células eucarióticas ou membranas glicoprotéicas virais e glicolípídeos (MARCHETTI et al., 1995).

Lentz e colaboradores observaram a infecção rábica *in vitro* frente a uma variedade de agentes, incluído substâncias neuroquímicas, tais como agonistas e antagonistas colinérgicos, anticorpos e substâncias com tropismo lisossomal, tais como fosfato de cloroquina, sulfato de quinina e cloreto de amônio. Neste estudo, foram utilizadas células de neuroblastoma humano (IMR-32), por expressarem receptores nicotínicos de acetilcolina. Os ensaios antivirais, de infectividade e de adsorção, utilizaram a cepa CVS e foram quantificados pela técnica de imunofluorescência. Foi possível verificar a inibição da infecção viral com anticorpos contra a glicoproteína viral, gangliosídeos de cérebro bovino, o peptídeo sintético *Torpedo* AchR 32mer, a α -bungarotoxina e as três substâncias com tropismo lisossomal citadas acima. Com exceção destas três últimas, todos os outros agentes foram capazes de inibir a adsorção viral na superfície celular (LENTZ; FU; LEWIS, 1997).

O papel do óxido nítrico na inibição da replicação do vírus rábico foi estudado utilizando-se células de neuroblastoma de camundongo e a cepa CVS do vírus. As células infectadas foram tratadas com óxido nítrico originado do nitroprussiato de sódio, com e sem a presença de ascorbato, gerando desta forma dois tipos de radicais. Foi possível observar apenas na presença de ascorbato, uma supressão na produção de partículas virais infecciosas. O mecanismo desta inibição está relacionado com a expressão gênica, o que foi confirmado pela redução da expressão dos genes codificantes das proteínas virais (nucleoproteína, glicoproteína e L-polimerase),

avaliadas por RT-PCR. Também se observou nas células infectadas e tratadas com óxido nítrico na presença de ascorbato, uma redução importante na síntese da nucleoproteína, através da técnica de *Western blotting* (UBOL et al., 2001).

Análogos de nucleosídeos têm demonstrado amplo espectro de atividades farmacológicas, especialmente antivirais e antitumorais. Um estudo descreveu a síntese de quatro C-nucleosídeos sintéticos de núcleos pirazol e tetrazol, com porções modificadas de açúcares e avaliação da sua potencial atividade anti-rábica *in vitro*. A determinação da citotoxicidade destes nucleosídeos foi realizada em células N₂A e BHK-21, enquanto sua atividade antiviral foi avaliada utilizando a cepa CVS do vírus rábico através da inibição das inclusões fluorescentes, utilizando um conjugado antinucleocapsídeo marcado com FITC. Apenas um nucleosídeo apresentou moderada atividade anti-rábica, questionável em virtude da alta citotoxicidade por ele exercida (POPSAVIN et al., 2002).

Recentemente, a cinabarina, um metabólito secundário isolado do fungo saprófita *Pycnoporus sanguineus*, demonstrou atividade anti-rábica. Neste estudo, foram utilizadas a cepa PV e células de neuroblastoma murino, N₂A. O título viral foi arbitrariamente estabelecido, através da técnica de fluorescência, como a recíproca da diluição viral que infectou 50% das células, e o título padrão, estabelecido por diluições, foi de 128. A cinabarina, nas concentrações de 0,155 e 0,310 mg/mL, inibiu a infecção rábica, através da redução de título viral para 64 e 32, respectivamente (SMÂNIA JR et al., 2003).

O ácido ascórbico representa outro potencial agente com ação anti-rábica, já que estudos demonstraram a capacidade de inativação viral ao utilizá-lo em associação com o sulfato de cobre, com resultados tão significantes quantos aos obtidos pelo

processo usual de inativação realizado com a beta-propiolactona (MADHUSUDANA; SHAMSUNDAR; SEETHRAMAN, 2004).

Uma abordagem recente utilizou a seleção de inibidores moleculares que inibem a expressão gênica ou a função protéica, afetando, desta forma, a replicação viral. Estes inibidores foram denominados de elementos supressores genéticos (ESGs). Basicamente, eles foram obtidos utilizando-se uma biblioteca de cDNA, contida num plasmídeo, preparada a partir da cepa viral ERA do vírus rábico, contendo quatro genes virais (N, P, M e G). O plasmídeo foi transfecado em células BHK-21, clonado e selecionado através de sua resistência à replicação do vírus rábico cepa CVS. Depois de devidamente isolados, estes ESGs foram transfectados em células BSR e tiveram sua habilidade de inibir a infecção rábica mensurada através das técnicas de ELISA e de imunofluorescência. Dois ESGs foram capazes de inibir a replicação viral; um deles produz um RNAm que codifica um segmento do gene N, não funcional, enquanto o outro, contém um segmento do gene P, atuando como um RNA de sentido inverso, podendo resultar em um anelamento com o RNA viral, induzindo resposta de interferon tipo I, não específica, ou de RNA de interferência, capaz de degradação específica (WUNNER; PALLATRONI; CURTIS, 2004).

De maneira geral, todos ensaios de atividade anti-rábica *in vitro* utilizam culturas celulares de linhagens permissíveis ao vírus, baseando-se na sua capacidade de replicarem nessas células. Várias linhagens celulares são permissivas ao vírus rábico, entre elas encontram-se BHK-21, N₂A, CER, McCOY e, mais recentemente, foi descrita a linhagem C6 (BORDIGNON et al., 2001). No entanto, poucas linhagens celulares apresentam efeito citopático, em virtude da natureza do ciclo replicativo viral, que não

causa lise celular. Este efeito foi descrito para as linhagens CER e McCOY (BUSSEAREAU; FLAMAND; PESE-PART, 1982; CONSALES et al., 1990; KING, 1996), o que pode representar uma ferramenta alternativa para o estudo *in vitro* de agentes com potencial atividade anti-rábica.

2.5 COMPOSTOS FENÓLICOS E AÇÃO ANTIVIRAL

O reino vegetal é composto por uma imensa variedade de constituintes, os quais podem inibir a replicação de vários vírus de genoma RNA e DNA. Em virtude disso, há um grande interesse em compostos obtidos a partir de fontes vegetais como fármacos potenciais no controle de infecções virais (JASSIM; NAJI, 2003).

Dentre a grande diversidade de metabólitos secundários vegetais, encontram-se os compostos fenólicos, cuja estrutura fundamental é constituída por dois ou mais anéis benzênicos, aos quais está ligada, no mínimo, uma hidroxila livre ou conjugada às funções éster, éter ou como heterosídeo, quando ligados a açúcares (BRUNETON, 1995).

No grupo dos compostos fenólicos podem ser encontradas estruturas químicas tão variadas como as dos ácidos fenólicos, dos flavonóides e dos taninos, sendo um dos grupos mais numerosos e amplamente distribuídos no reino vegetal, com mais de 8.000 estruturas químicas conhecidas (CROFT, 1998; PIETTA, 2000).

Considerando-se o grupo dos ácidos fenólicos, compostos importantes como o ácido gálico, ácido salicílico e ácido gentísico derivam estruturalmente do ácido benzóico, enquanto os ácidos caféico, vanílico e ferúlico derivam do ácido cinâmico (BELL; CHARLWOOD, 1980). Os galatos são estruturalmente relacionados ao ácido

gálico, o qual é tri-hidroxilado, os quais são acrescentados de uma cadeia alquílica lateral (WAN DER HEIJDEN et al., 1986; OW; STUPANS, 2003; SAVI et al., 2005).

Outro importante grupo de compostos fenólicos é representado pelos taninos, os quais podem ser estruturalmente classificados em hidrolisáveis ou condensados, sendo, estes últimos, oligômeros e polímeros formados pela condensação de unidades de flavan-3-óis e/ou flavan-3,4-dióis, também conhecidos como protoantocianidinas. Os flavan-3-óis são denominados de catequinas e possuem quatro isômeros, em virtude da presença de dois carbonos assimétricos na sua estrutura (CHUNG et al., 1998; SANTOS; MELLO, 2003).

Os flavonóides também são um grupo de grande importância nos compostos fenólicos, possuindo uma estrutura básica com dois anéis aromáticos ligados por uma ponte de três átomos de carbono (BELL; CHARLWOOD, 1980; ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

Várias propriedades farmacológicas dos compostos fenólicos, já foram descritas, entre elas; antialérgica, antiviral, antiinflamatória, vasodilatadora, antioxidante, entre outras (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000; PIETTA, 2000; ZENEBE; PECHANOVA, 2002).

A propriedade antiviral dos compostos fenólicos sintéticos e extraídos de vegetais foi extensamente estudada e existem vários relatos, especialmente de ação anti-influenza (GREEN, 1949; TURAN; NAGATA; KURU, 1996; KERNAN et al., 1997; SERKEDJIEVA; HAY, 1998; SERKEDJIEVA, 2000) e anti-herpética (KANE et al., 1988; BENENCIA; COURREGES; 1999; DE LOGU; 2000; SAVI, 2004; SAVI et al., 2005).

Acredita-se que os compostos polifenólicos atuem através da associação com proteínas das partículas virais e/ou das superfícies das células hospedeiras, resultando na redução e até mesmo, na prevenção da adsorção viral (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGUE, 1997).

Klöcking e colaboradores (2002) detectaram uma significativa atividade anti-HSV-1 para compostos fenólicos polimerizados com índices de seletividade superiores a 10. Polifenóis extraídos de vegetais mostraram marcada atividade inibitória contra o HSV-1 (ERDELMAYER et al., 1996).

Taninos hidrolisados, um importante grupo de compostos fenólicos, extraídos dos extratos de folhas de *Shepherdia argentea*, mostraram elevada atividade contra a enzima transcriptase reversa do HIV-1, superior ao controle positivo do teste, o galato de epigallocatequina (YOSHIDA et al., 1996).

Meebach et al (2001) afirmaram que a atividade anti-herpética e anti-HIV de polímeros fenólicos é dependente da presença de um número mínimo de grupos carboxílicos e o mecanismo da ação antiviral detectada estaria relacionado à inibição da adsorção viral.

O ácido gálico, açúcares com radicais galatos, além de galatos de flavonóis glicosídicos extraídos de *Euphorbia pekinensis*, em pesquisas recentes, foram relacionados à inibição da enzima integrase do HIV-1 (AHN et al., 2002).

Ainda com relação à atividade antiviral dos galatos, estudos mostraram que compostos derivados da simplificação estrutural de galatos de epicatequina e galatos de epigallocatequina foram capazes de inibir processos realizados pela transcriptase reversa do HIV (TILLEKERATNE et al., 2002).

A atividade anti-herpética *in vitro* de alquil-ésteres do ácido gálico foi avaliada por Savi et al. (2005). Foram utilizadas, neste estudo, duas cepas do HSV-1 (KOS e 29-R) e 14 alquil ésteres do ácido gálico, sendo que os índices de seletividade encontrados variaram de 0,89 a 18,34.

Compostos fenólicos extraídos de *Millettia erythrocalyx* e *Artocarpus lakoocha* exibiram moderada ação contra vírus como o HSV-1 e 2, e uma cepa do HIV-1, sendo o oxiresveratrol, a miletocalixina A, o metil éter de pongol e a ovalifolina, os compostos com ação antiviral mais pronunciada (LIKHITWITAYAWUID et al., 2005).

3 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- ✓ Estabelecer metodologias para a detecção *in vitro* de agentes com potencial atividade anti-rábica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Padronizar a metodologia da determinação da atividade anti-rábica *in vitro*, de 24 compostos fenólicos, através do ensaio de inibição do efeito citopático viral e do ensaio colorimétrico do MTT
- ✓ Avaliar a citotoxicidade de 24 compostos fenólicos sobre as células McCoy, através do ensaio colorimétrico do MTT e por avaliação microscópica das alterações morfológicas.
- ✓ Avaliar a potencial atividade anti-rábica de 24 compostos fenólicos utilizando as metodologias *in vitro* padronizadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CULTURAS CELULARES

4.1.1 CÉLULAS

Foi utilizada a linhagem celular McCoy (ATCC: CRL 1696), que são culturas fibroblásticas derivadas de líquido sinovial de rato. Essas células foram escolhidas por serem permissivas ao vírus rábico, possibilitando sua multiplicação, além da visualização do efeito citopático (CONSALES et al.,1990; NOGUEIRA,1992; NOGUEIRA; AMARAL, 1992), de forma reprodutível e facilmente observável sob microscopia óptica invertida.

4.1.2 MEIO DE CULTURA E REAGENTES

O meio utilizado para o crescimento e manutenção das células McCoy foi o meio DMEM (Cultilab), adicionado de 3,7% de bicarbonato de sódio.

O soro fetal bovino (SFB) foi adicionado ao meio na proporção de 10% para promoção do crescimento e 5% para manutenção da linhagem celular.

Uma solução de antibióticos e antifúngico (PSA) foi adicionada ao meio, como forma de prevenção de contaminações das culturas celulares por bactérias, fungos e leveduras, na proporção de 1mL de penicilina G/estreptomicina/anfotericina B (10.000U de penicilina G, 10.000µg de estreptomicina e 25µg de anfotericina B – Gibco/BRL) para cada 100mL de meio.

A enzima proteolítica tripsina a 0,25% (tripsina de pâncreas de porco preparada em uma solução de EDTA 1: 250, Sigma) foi o agente de dispersão celular utilizado

para a obtenção de subculturas, para manutenção das células e para a realização dos experimentos.

4.2 VÍRUS

4.2.1 ORIGEM DAS CEPAS

Os experimentos foram todos realizados com o vírus rábico fixo cepa PV (Instituto Pasteur, SP).

4.2.2 PREPARO DAS SUSPENSÕES-ESTOQUES VIRAIS

Para a obtenção da suspensão-estoque viral, uma suspensão viral pré-existente foi inoculada em frasco de cultura de 75cm² contendo uma monocamada de células McCoy, cultivadas em meio DMEM, suplementados com 5% de SFB e 1% de PSA, tendo sido tripsinizadas 24h antes da infecção. O meio de cultura foi aspirado da garrafa e a monocamada celular foi lavada 3 vezes com tampão salina fosfato (PBS); em seguida, foi inoculado 1mL da suspensão viral e a garrafa foi mantida a 37°C por 1 hora, em estufa de CO₂ (5%) para adsorção viral. O inóculo foi retirado por sucção a vácuo e completou-se o volume do frasco de cultura com meio DMEM com 5% de SFB. A cultura infectada foi mantida nas mesmas condições descritas acima.

O efeito citopático viral do vírus rábico foi monitorado em microscópio invertido por até 72h. Quando este foi evidenciado na maior parte do tapete celular, o frasco foi congelado a -80°C e descongelado a 37°C por 3x. A suspensão foi centrifugada a 350 Xg, durante 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi distribuído em tubos estéreis e armazenados a -80°C para posterior utilização.

4.2.3 DETERMINAÇÃO DO TÍTULO INFECCIOSO VIRAL

A determinação do título infeccioso das suspensões virais é um procedimento imprescindível à subsequente avaliação adequada de qualquer atividade antiviral. Esta determinação consiste em contar o número de partículas virais, por unidade de volume, capazes de infectar células permissivas. Tal determinação foi efetuada segundo o método das diluições-limites, com cálculo do ponto de infecção 50%, de acordo com a metodologia clássica de Reed e Muench (1938).

4.2.3.1 TITULAÇÃO DO VÍRUS RÁBICO

A partir da suspensão-estoque viral, foi preparada uma série de diluições na razão de 1:10 em tubos de microtitulação, em banho de gelo, com meio DMEM sem SFB (225µL de meio + 25µL da suspensão viral). Esta série de diluições foi adicionada ao tapete celular previamente formado e o efeito citopático viral foi observado microscopicamente. A titulação foi realizada em placas de microtitulação de 96 cavidades, contendo uma monocamada de células McCoy ($2,5 \times 10^5$ células/mL), com oito cavidades para cada diluição, cada cavidade contendo 200µl da suspensão viral. As microplacas foram mantidas a 37°C, em estufa de CO₂ durante 72h; após este intervalo, foi realizada a contagem do número de cavidades onde houve ou não efeito citopático. Determinou-se, desta forma, a diluição que produz resposta positiva em 50% das amostras (TCID₅₀ = 50% *tissue culture infectious dose* = ID₅₀ = dose infectante 50%).

Em cada diluição, foram contadas as cavidades infectadas (positivas) e as não infectadas (negativas) e foram calculadas as porcentagens de cavidades infectadas para cada diluição. Caso a diluição que infecta 50% das cavidades variar entre duas

diluições, o título pode ser calculado através da distância proporcional (DP) entre as mesmas, pelas seguintes fórmulas:

$$DP = \frac{(\% \text{ de positivas acima de } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ de positivas acima de } 50\%) - (\% \text{ de positivas abaixo de } 50\%)}$$

$$\log TCID_{50} = (DP \times \log \text{ do fator de diluição}) + (\log \text{ da diluição acima de } 50\%)$$

O valor encontrado foi multiplicado pelo volume adicionado a cada cavidade, no caso 200 μ L, e obteve-se o valor de TCID₅₀/mL.

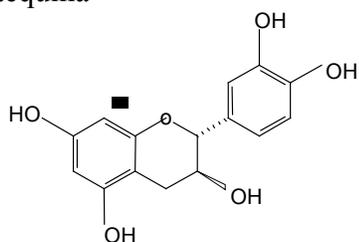
O TCID₅₀ não revela quantas unidades infecciosas estão presentes, mas somente se esta dose ou diluição produz ECP em cerca de 50% das unidades experimentais (no caso, cada cavidade). A partir do valor de TCID₅₀ pode-se calcular a multiplicidade de infecção (MOI), que é a relação entre o título infeccioso e o número de células.

4.3 MATERIAIS-TESTE

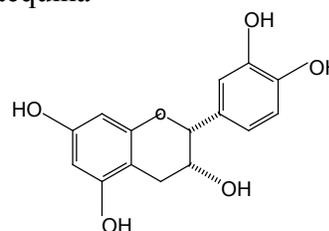
4.3.1 Compostos fenólicos

A seguir, são apresentadas as estruturas químicas das amostras utilizadas para a avaliação da citotoxicidade e da potencial atividade anti-rábica:

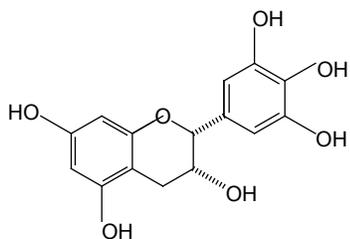
1. Catequina



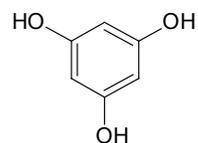
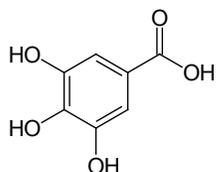
2. Epicatequina



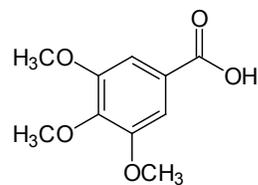
2. Epigalocatequina



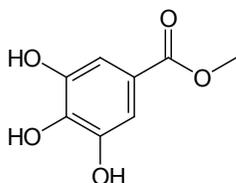
3. 1,3,5-trihidróxibenzeno

5. Ácido gálico
(ácido 3,4,5-trihidróxibenzóico)

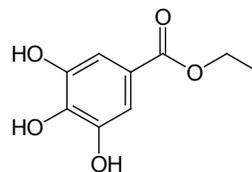
6. Ácido 3,4,5-trimetóxibenzóico



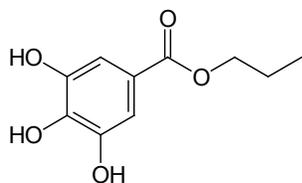
7. Galato de metila



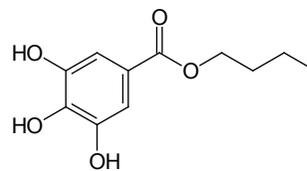
8. Galato de etila



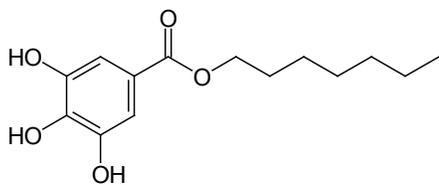
9. Galato de propila



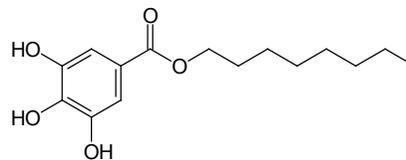
10. Galato de butila



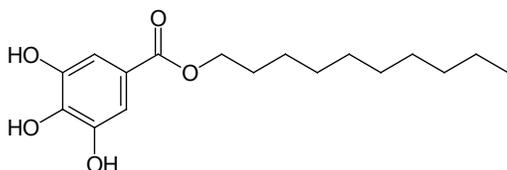
13. Galato de heptila



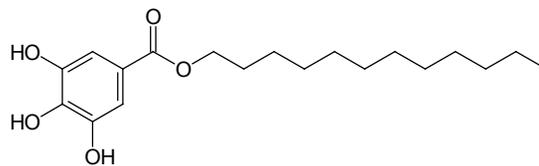
14. Galato de octila



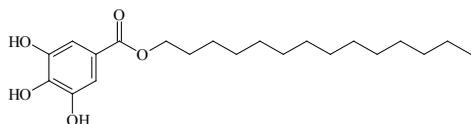
15. Galato de decila



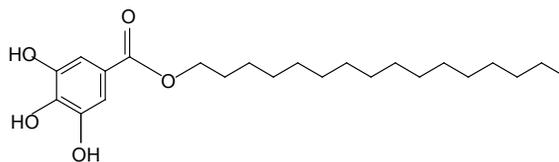
16. Galato de dodecila



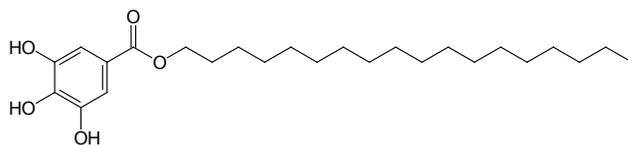
17. Galato de tetradecila



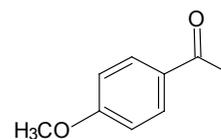
18. Galato de cetila



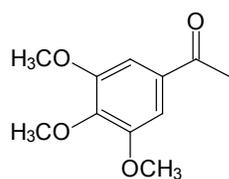
19. Galato de octadecila



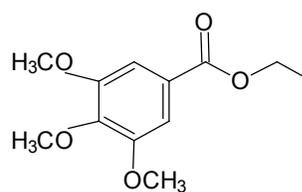
20. 4-metóxiacetofenona



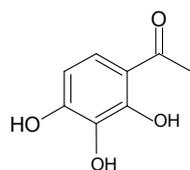
21. 3,4,5-trimetóxiacetofenona



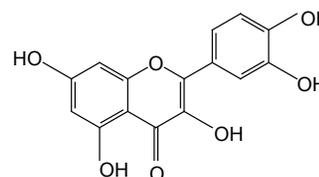
22. 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila



23. Galacetofenona(2,3,4-trihidróxiacetofenona)



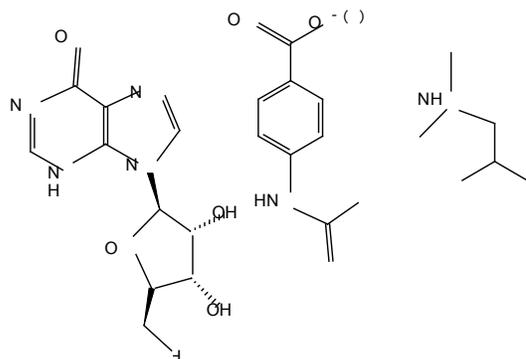
24. Quercetina



25. Quetamina



26. Isoprinosina



As amostras 1, 2 e 24 foram obtidas da Extrasynthèse (Genay,. France); a amostra 3 foi obtida da Sigma (St. Louis, USA); a amostra 25 é da marca comercial Dopalem® do fabricante Agribrands do Brasil; a amostra 26 foi obtida da UNIBIOS (Itália); as demais amostras foram sintetizadas no Laboratório de Síntese Estrutura e Atividade, LABSEAT, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, por Paulo César Leal, sob a orientação dos Professores Doutores Ricardo Nunes e Rosendo Yunes.

4.3.1.1 Preparação das soluções-estoques

Foram pesados 10mg de cada amostra, que foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck), na concentração final de, no máximo, 1%, qsp 10mL de meio DMEM. Portanto, a concentração final de cada solução-estoque foi de 1mg/mL. As soluções foram filtradas em condições assépticas, em tubos estéreis, usando filtros de 0,22µm (Millipore®). Em seguida, essas soluções foram mantidas sob refrigeração a 4°C e protegidas da luz até seu uso. A amostra 26 foi diluída em meio DMEM na concentração final de 1mg/mL.

4.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE ATRAVÉS DO ENSAIO COLORIMÉTRICO COM SAL DE TETRAZOLIUM (MTT)

Neste trabalho, a determinação da citotoxicidade foi realizada através do ensaio colorimétrico do MTT, conforme proposto por Takeuchi, Baba e Shigeta (1991), com algumas modificações segundo Sieuwerts e colaboradores (1995).

Procedimento: Uma suspensão de células McCoy, contendo aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células/mL, obtida por tripsinização de um frasco de cultura celular, foi distribuída (200µL/cavidade) em placas de 96 cavidades. As contagens foram realizadas em câmara de Neubauer e as células foram mantidas em meio DMEM, suplementado com 5% de SFB, a 37°C/5%CO₂ até confluência (24h). Em seguida, o meio foi aspirado e foram adicionados 200µL/ cavidade dos materiais-teste diluídos na razão 1:2, a partir de 1 até 0,0078 mg/mL. Foram realizados controles celulares (200µL meio DMEM/cavidade) e branco (100µL de DMSO/cavidade). Em seguida, as placas foram mantidas a 37°C/5%CO₂, por 96h. Transcorrido esse período, os sobrenadantes foram cuidadosamente aspirados, sendo em seguida adicionados 50µL da solução de MTT/cavidade (Sigma), a 1mg/mL em meio DMEM. As placas foram mantidas por mais 4h, nas mesmas condições. Após este período, foi retirado o meio contendo MTT de cada cavidade, cuidadosamente, sem danificar as células, e adicionados 100µL de DMSO/cavidade (Nuclear) para solubilização dos cristais de formazana. As placas foram agitadas, levemente, à temperatura ambiente, por 10 min, para que toda a formazana fosse solubilizada e lidas em espectrofotômetro a 540nm (Bio-Tek, El_x 800).

As percentagens de viabilidade celular foram calculadas em relação aos controles celulares. Para cada material-teste, foi calculado o valor de CC₅₀, que é

definido como a concentração que reduz em 50% a absorvância das células, quando comparada aos controles celulares.

4.5 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO COLORIMÉTRICO DO MTT PARA AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-RÁBICA *IN VITRO*

Inicialmente, a determinação *in vitro* da potencial atividade anti-rábica dos materiais-teste foi idealizada para ser efetuada através do ensaio colorimétrico do MTT (TAKEUCHI; BABA; SHIGETA; 1991), em vista da presença do efeito citopático exercido pelo vírus rábico em células McCoy (CONSALES et al.,1990; NOGUEIRA,1992; NOGUEIRA; AMARAL, 1992). A padronização do ensaio utilizando vírus rábico e células McCoy está abaixo descrita.

Procedimento: células McCoy foram cultivadas em placas de microtitulação de 96 cavidades ($2,5 \times 10^4$ células/cavidade) até confluência (24h), usando meio DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino, a 37°C e 5% CO₂. O meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 100µL da suspensão viral com diferentes MOI (0,1 a 1,0) em pelo menos oito cavidades e 100µL de meio DMEM. Foram feitos controles celulares (200µL meio DMEM), controles positivos (100µL suspensão viral + 100µL isoprinosina 500µg/mL e quetamina 250µg/mL) e branco (100µL de DMSO). Em seguida, as placas foram novamente mantidas nas condições iniciais de cultivo, por 72h, 96h e 120h. Posteriormente, aspirou-se todo o meio e foram adicionados 50 µL de MTT/ cavidade (Sigma;1mg/mL em meio DMEM ou PBS) e as placas foram mantidas nas mesmas condições anteriores por mais 1, 2, 3 e 4h. Após estes períodos, o meio + MTT foi cuidadosamente aspirado, sem danificar as células, e foram adicionados 100µL de DMSO/cavidade (Nuclear) para solubilizar os cristais de formazana. As placas foram

agitadas levemente, à temperatura ambiente, por 10 min, para que toda a formazana fosse solubilizada e lidas a 540nm num espectrofotômetro (Bio-Tek, El_x 800). As variáveis utilizadas nesta padronização estão demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1: Variáveis utilizadas para a padronização do ensaio colorimétrico do MTT.

Variáveis	Especificações
Número de partículas virais	MOI de 0,1 a 1,0*
Duração total do ensaio	72h, 96h e 120h
Reagente de solubilização do MTT (1mg/mL)	DMEM e PBS
Tempo de redução do MTT	Entre 1 e 4 horas**

*realizados com intervalos de 0,1 unidade.

**realizados em intervalos de 1h.

Com a finalidade de se estabelecer as melhores condições para o ensaio do MTT, para a posterior avaliação da potencial atividade anti-rábica dos materiais-teste, durante a padronização somente foram utilizados os controles, isoprinosina e quetamina, nas concentrações anteriormente descritas.

4.6 AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-RÁBICA ATRAVÉS DA INIBIÇÃO DO EFEITO CITOPÁTICO VIRAL

Enders, Weller e Robbins (1949) definiram todas as lesões provocadas por um vírus nas células onde ele se multiplica como o efeito citopático (ECP) viral. A maioria dos vírus provoca modificações celulares variáveis, fáceis de observar ao microscópio e geralmente específicas e, na maioria dos casos, estas modificações levam à morte celular.

O efeito citopático causado pelo vírus rábico *in vitro* não é de fácil detecção na maioria das linhagens celulares comumente utilizadas. Entretanto, em células McCoy,

alterações morfológicas ocorrem de 48 e 72h após a infecção (CONSALES et al., 1990; NOGUEIRA, 1992; NOGUEIRA; AMARAL, 1992), sendo facilmente visualizáveis em microscópio invertido.

Procedimento: uma suspensão celular contendo aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células/mL foi distribuída (100 μ L/cavidade) em uma placa de microtitulação de 96 cavidades. Após 24h, a 37°C e 5% CO₂, com a confluência do tapete celular, retirou-se o meio e foram adicionados 100 μ L dos materiais em estudo, em diferentes concentrações (inferiores aos valores de CC₅₀), e 100 μ l da suspensão viral (MOI=1,0). Foram realizados controles virais (CV), que atestam a infectividade da suspensão viral utilizada; controles celulares (CC), que atestam a integridade do tapete celular na ausência dos materiais-teste e do vírus; além de controles positivos realizados com isoprinosina (0,5 mg/mL) e quetamina (0,25 mg/mL), que mostram a inibição parcial da multiplicação do vírus rábico. Depois de mantidas por 96h, a 37°C e 5% CO₂, as leituras foram feitas ao microscópio invertido e a inibição do ECP provocado pelo vírus rábico foi comparada à dos controles. Um exemplo hipotético deste experimento está esquematizado na Figura 5.

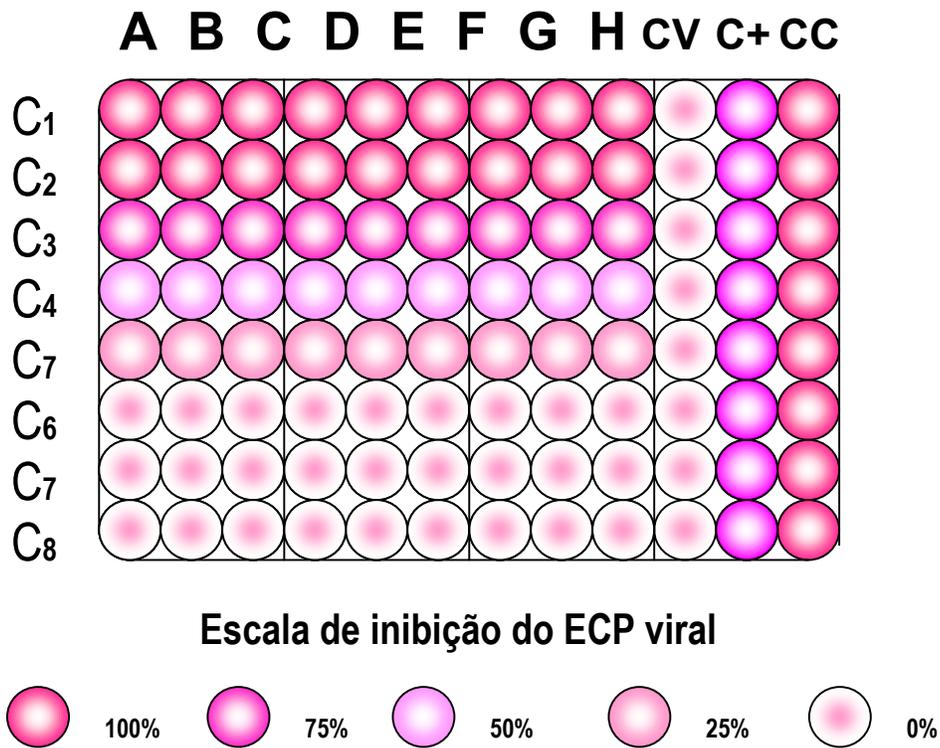


Figura 5. Disposição da placa de microtitulação usada para a determinação da inibição do efeito citopático viral das diferentes concentrações dos materiais-teste, em células McCoy:

A – H/ C₁- C₈: diferentes concentrações (razão 1:2) dos materiais-teste e suspensão viral com MOI =1,0

CV: controle viral MOI =1,0

C+: isoprinosina (0,5 mg/mL) e quetamina (0,25 mg/mL) + suspensão viral com MOI =1,0

CC: controles celulares contendo apenas meio DMEM

A inibição do efeito citopático foi estimada, de acordo com as proposições de Sidwell (1986), adaptada por Simões e colaboradores (1999), segundo uma escala que vai de 1 a 5, de acordo com o grau da destruição celular:

ESCALA

- ECP = 1** Células unidas, bem espalhadas, transparentes e idênticas às células dos controles celulares com 0 a 20% de destruição;
- ECP = 2** Pequenos focos de infecção viral; a proporção das células mortas é igual à ± 21 a 40% da monocamada celular;
- ECP = 3** ± 51 a 60% da monocamada celular encontra-se destruída;
- ECP = 4** ± 61 a 80% da monocamada celular encontra-se destruída;
- ECP = 5** Quase todas as células estão mortas - monocamada celular encontra-se com 81 a 100% de destruição.

Essa escala pode ser melhor compreendida observando-se a Figura 6, na qual as células McCoy, infectadas com o vírus rábico, exibem o ECP viral em diferentes intensidades.

Com esta metodologia foi possível estimar, em relação aos controles virais, os percentuais de inibição do efeito citopático viral provocados por cada concentração de cada material-teste e os valores de CE_{50} (concentração que inibe o efeito citopático viral em aproximadamente 50% das células).

De posse dos valores de CC_{50} e CE_{50} , foi possível determinar o IS (índice de seletividade), que consiste na relação entre CC_{50} e CE_{50} ($IS = CC_{50}/CE_{50}$) e expressa o quão promissora é a atividade antiviral de determinado agente, por relacionar a concentração tóxica do mesmo à sua concentração efetiva. Quanto maior o IS, mais

promissora é a atividade antiviral, dando indicação de que seria viável a realização posterior de estudos mais detalhados, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

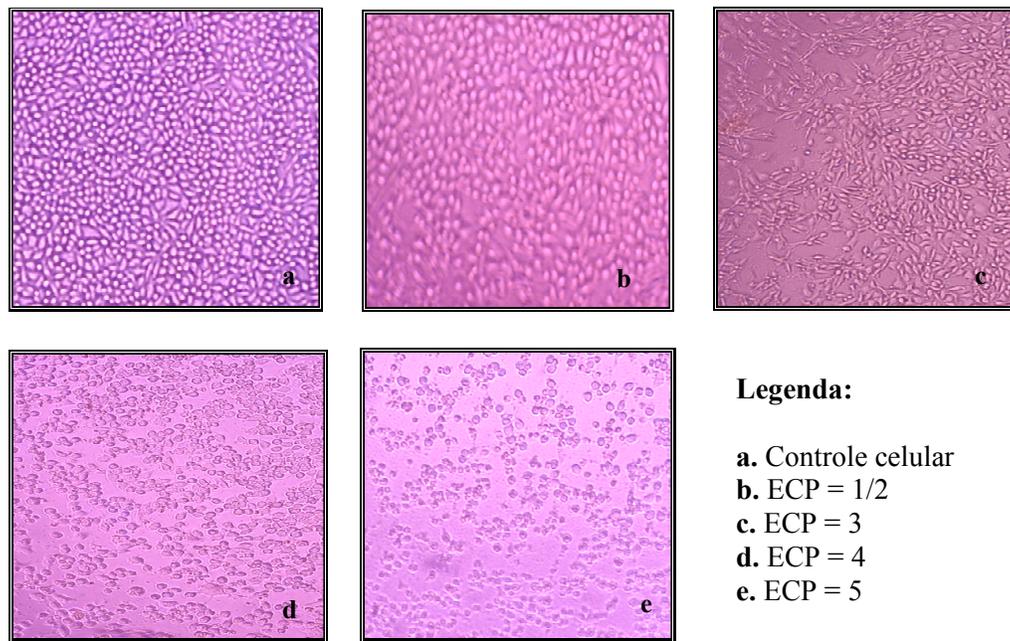


Figura 6. Diferentes intensidades do efeito citopático em células McCoy (20x) tratadas com 3,4,5 trimetóxi benzoato de etila, a partir de 1200 μ M (b) infectadas com vírus rábico (cepa PV MOI =1,0).

4.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Tanto na avaliação da citotoxicidade, como na avaliação da potencial atividade antiviral, foi utilizada a metodologia de blocos completamente casualizados (BCC) e um arranjo multifatorial dos tratamentos (SOKAL; ROHLF, 1995), onde cada cavidade da placa constitui uma unidade experimental e os tratamentos foram os diferentes materiais-teste *versus* as diferentes concentrações testadas.

Os tratamentos foram distribuídos aleatoriamente entre as cavidades da placa. Foram realizadas três repetições em placas diferentes e em dias diferentes, o que

caracteriza uma triplicata. O sorteio dos tratamentos em relação às unidades experimentais aumenta a probabilidade de que possíveis fatores interferentes desconhecidos fiquem igualmente distribuídos nos blocos e faz com que a estimativa dos valores e médias dos tratamentos e do erro experimental não sejam tendenciosas. Cada bloco (placa) agrupa uma repetição de todos os tratamentos.

Realizou-se uma análise de regressão linear para calcular os valores de CC_{50} (concentração que causa citotoxicidade a 50% das células de uma cavidade) e de CE_{50} (concentração que inibe o efeito citopático em aproximadamente 50% das células de uma cavidade), a partir de curvas de concentração *versus* efeito.

A partir dos resultados obtidos através destas curvas foi realizado o tratamento estatístico entre as três repetições de cada material-teste, tanto para o cálculo da citotoxicidade (CC_{50}), quanto para o cálculo da atividade antiviral (CE_{50}). O tratamento estatístico consistiu no cálculo do desvio padrão, já que este fornece a variação obtida em relação à média das três repetições (SOKAL; ROHLF, 1995).

Os resultados obtidos na padronização do ensaio colorimétrico do MTT foram tratados com análise de variância ANOVA seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DO TÍTULO VIRAL

As determinações clássicas do título infeccioso do vírus rábico normalmente são realizadas através das técnicas de imunofluorescência (KING, 1996) e inoculação intracerebral em camundongos (KOPROWSKI, 1996). Esta última, apesar da grande sensibilidade, vem sendo substituída por modelos *in vitro* por dispensarem o uso de animais, além da sua praticidade e da rapidez com que os resultados são obtidos (WOLDEHIWET, 2005). O método de contagem de placas de lise também pode ser utilizado para obtenção do título viral (BUSSEREAU; FLAMAND; PESE-PART, 1982). Nogueira e Amaral (1992) descreveram a titulação viral através da observação direta do efeito citopático, calculada pelo método de Reed e Muench (1938), e a consideraram uma determinação tão sensível e eficiente quanto as técnicas clássicas.

No presente estudo, em virtude do fato das células McCoy apresentarem efeito citopático quando infectadas pelo vírus rábico (CONSALES et al, 1990; NOGUEIRA, 1992), o título infeccioso foi obtido conforme a metodologia descrita no item 4.2.3.1, através da determinação de TCID₅₀. No decorrer do trabalho, foram utilizadas três soluções-estoques, preparadas de acordo com o descrito no item 4.2.2. Os resultados da determinação dos títulos infecciosos virais obtidos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Títulos infecciosos dos estoques virais utilizados.

Solução-estoque viral	Título
1	5×10^7 TCID ₅₀ /mL
2	5×10^8 TCID ₅₀ /mL
3	$5 \times 10^{6,7}$ TCID ₅₀ /mL

5.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE ATRAVÉS DO ENSAIO DO MTT

A citotoxicidade foi definida por Nardone (1977) como o conjunto de alterações da homeostase celular, que ocasiona várias modificações que interferem na capacidade adaptativa das células, assim como em sua sobrevivência, multiplicação, divisão e desempenho de funções metabólicas. Desta forma, a reação *in vitro* das células frente a uma substância ou composto pode ser evidenciada pela desorganização da monocama celular, acompanhada do aspecto granuloso e arredondado das células (STREISSLE; SCHWOBEL; HEWLETT, 1981). A intensidade da lesão celular é influenciada por inúmeros fatores, tais como a concentração e a permeabilidade celular do material testado, o tempo de exposição, a linhagem celular, entre outros (HU; HSIUNG, 1989).

Na escolha de um agente antiviral em potencial, torna-se indispensável a avaliação de sua possível toxicidade em relação às células em questão, em decorrência do fato de que um agente antiviral ideal deve inibir o ciclo de replicação viral, interferindo ao mínimo nas células hospedeiras, de forma que essas sejam capazes de se recuperar da infecção, mantendo suas atividades metabólicas (VANDEN BERGHE; VLIETINCK; VAN HOOFF, 1986). A relação entre os efeitos farmacológicos e tóxicos de um composto é um importante requisito ao se avaliar sua aplicabilidade como agente terapêutico (MELO et al., 2000), e tal informação provém do cálculo do índice de seletividade ($IS=CC_{50}/CE_{50}$), quando da realização dos estudos pré-clínicos *in vitro*.

Os testes de citotoxicidade *in vitro* de potenciais agentes antivirais são de grande importância nos estágios iniciais do desenvolvimento de fármacos pois, além de avaliar sua capacidade de causar alterações celulares, podem definir os intervalos de concentrações a serem utilizadas (EISENBRAND et al., 2002) em avaliações posteriores, como por exemplo, o estudo da genotoxicidade (SILVA et al., 2002).

Os ensaios mais comumente utilizados para a avaliação da citotoxicidade baseiam-se na alteração da permeabilidade celular, nas funções celulares ou mitocondriais e nas alterações da morfologia celular e da proliferação celular. Como exemplos de ensaios para determinação da citotoxicidade encontram-se os de dosagem de ATP (UNTCH et al., 1994), os que avaliam as alterações na permeabilidade celular, como os que usam o corante vermelho neutro (BABICH; BORENFREUND, 1991), os que medem a liberação de LDH associada à integridade da membrana (KORZENIEWSKI; CALLEWAERT, 1983; LOBNER, 2000), além daqueles que avaliam as funções celulares através de reações enzimáticas de oxi-redução, como por exemplo, o “*alamar blue*” (JAHN; STUBEN; BHAKDI, 1996; HAMID et al., 2004). Esses ensaios estão bem estabelecidos para várias linhagens celulares e avaliam diversos aspectos das funções celulares (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGUE, 1997; WILSON, 2000; EISENBRAND et al., 2002).

Neste trabalho, a citotoxicidade foi avaliada através da determinação da viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico com o sal de tetrazolium MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium] (item 4.4), um composto hidrossolúvel que, em solução, possui coloração amarelo-pálido, facilmente incorporado por células viáveis e é reduzido pelas desidrogenases mitocondriais. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em formazana, um composto azul-escuro, insolúvel, que fica armazenado no citoplasma celular. Este ensaio colorimétrico mede a quantidade produzida de formazana através de espectrofotometria, e é sensível e quantitativo, já que o valor de absorbância é proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983; BARILE, 1994).

O ensaio do MTT é apropriado para uma variedade de linhagens celulares, que apresentam crescimento exponencial em cultura e alto nível de atividade mitocondrial. Deve-se levar em consideração que alguns compostos podem afetar seletivamente as enzimas responsáveis pela redução do MTT, resultando numa superestimação da toxicidade (BARILE, 1994; SMEE et al., 2002). Outro aspecto importante a ser considerado é que a redução do MTT pode não estar exclusivamente relacionada às desidrogenases mitocondriais, mas também a outras enzimas celulares (LIU et al., 1997; LIU; SCHUBERT, 1997) e quaisquer fatores que afetem os mecanismos desta redução, poderiam fornecer resultados não fidedignos (CARMICHAEL et al., 1987; VISTICA et al., 1991; SIEUWERTS et al., 1995).

A avaliação da citotoxicidade dos compostos fenólicos, da isoprinosina e da quetamina sobre as células McCoy foi realizada através do ensaio colorimétrico do MTT, concomitantemente à avaliação microscópica diária das alterações morfológicas celulares. Os valores de CC_{50} dos compostos fenólicos, obtidos através de análise de regressão linear, estão reunidos na Tabela 3 e representados na Figura 7. Todos os compostos fenólicos, além da isoprinosina e da quetamina, foram testados em diluições na razão 2, a partir da concentração de 1 até 0,0078 mg/mL, com resultados expressos em μ M.

Foi possível observar que o grupo de compostos fenólicos representado pelas catequinas (**1**, **2** e **3**) apresentou baixos valores de CC_{50} (Tabela 3), o que indica elevada citotoxicidade, provavelmente relacionada ao número de hidroxilas livres. A quercetina (**24**), cuja estrutura química é bastante semelhante às das catequinas, embora menos tóxica, apresenta uma maior citotoxicidade em relação aos demais compostos testados, como por exemplo as acetofenonas, cujos valores médios CC_{50} estão em torno de 3.000

μM . Este fato poderia ser explicado, em virtude deste composto possuir uma maior permeabilidade celular, resultante de sua hidrofobicidade (JOHNSON; LOO, 2000), além da presença de ligações duplas entre os C2 e C3, e da carbonila em C4 no anel C principal, o que favorece maior toxicidade (COS et al., 2000), ainda, em altas concentrações, a quercetina e outros flavonóides podem estar relacionados ao aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) (MATSUO et al., 2005).

Tabela 3: Valores de CC_{50} dos compostos fenólicos sobre as células McCoy, obtidos através do ensaio colorimétrico de MTT.

Amostras	CC_{50} (μM)*
1 Catequina	124,33 \pm 33,53
2 Epicatequina	165,99 \pm 55,28
3 Epigallocatequina	326,29 \pm 60,40
4 1,3,5-trihidróxibenzeno	2.467,49 \pm 773,84
5 Ácido gálico	565,77 \pm 343,43
6 Ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico	>5.042,41
7 Galato de metila	372,75 \pm 91,30
8 Galato de etila	121,14 \pm 37,74
9 Galato de propila	149,53 \pm 97,94
10 Galato de butila	113,23 \pm 52,35
11 Galato de pentila	254,94 \pm 166,90
12 Galato de hexila	119,46 \pm 34,82
13 Galato heptila	321,36 \pm 167,42
14 Galato de octila	645,72 \pm 122,75
15 Galato de decila	> 3.769,45
16 Galato de dodecila	>3.003,98
17 Galato de tetradecila	>3.056,02
18 Galato de cetila	>2.553,41
19 Galato de octadecila	>2.673,92
20 4-metóxiacetofenona	2.459,76 \pm 462,97
21 3,4,5-trimetóxiacetofenona	3.738,98 \pm 1099,17
22 3,4,5- trimetóxi benzoato de etila	3.204,20 \pm 397,87
23 Galatocetofenona (2,3,4-trihidróxiacetofenona)	3.426,03 \pm 738,81
24 Quercetina	670,02 \pm 180,18
25 Quetamina**	3.010,69 \pm 171,26
26 Isoprinosina**	>1.798,14

* Concentração citotóxica a 50%; valores representados pela média de três experimentos independentes \pm desvio padrão da média

** Substâncias com ação anti-rábica já descrita na literatura (HERNANDEZ-JÁUREGUI et al., 1980; LOCKHART et al., 1991; LOCKHART; TORDO; TSIANG,1992).

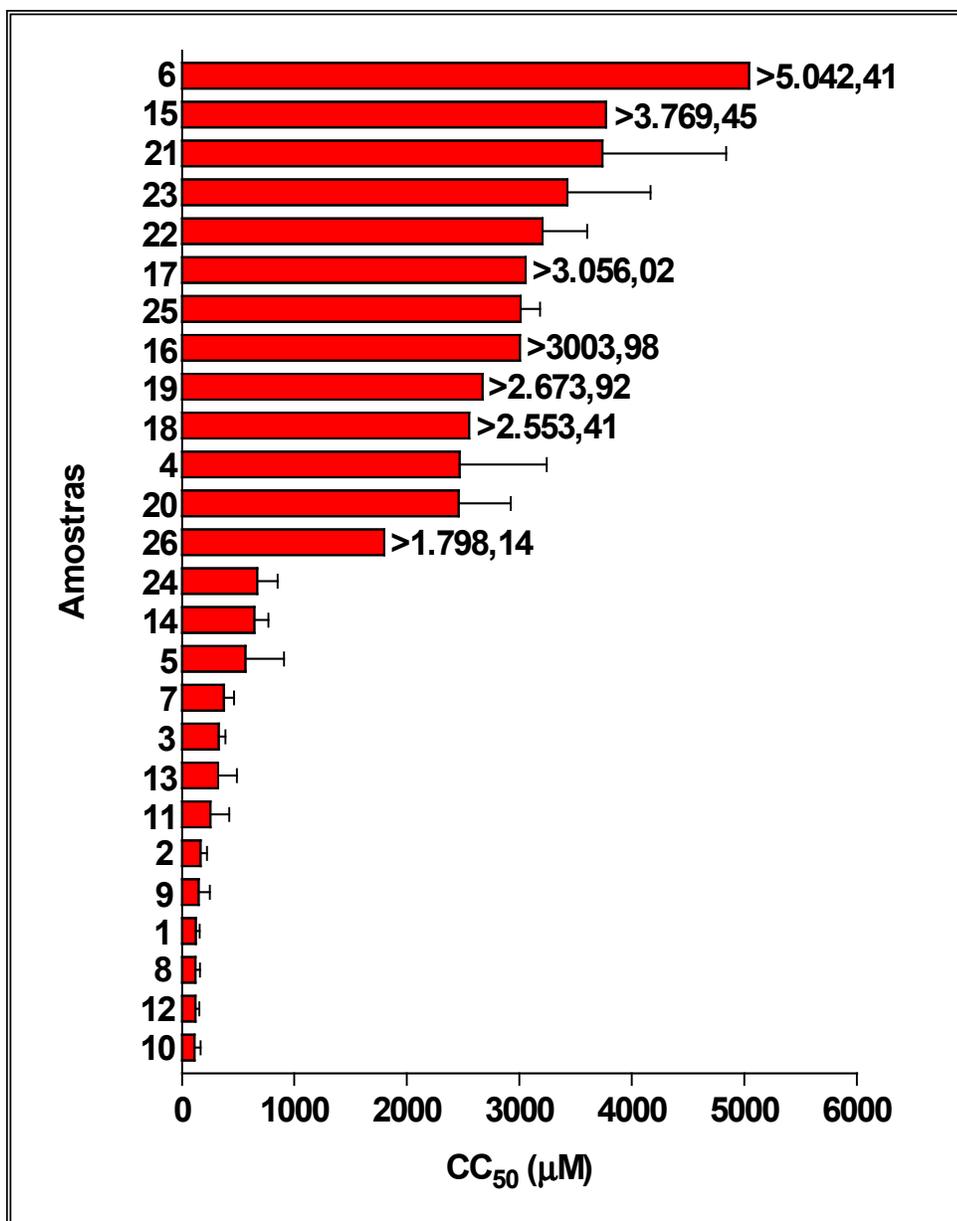


Figura 7: Representação gráfica em ordem crescente dos valores de CC_{50} dos compostos fenólicos sobre as células McCoy, obtidos através do ensaio colorimétrico do MTT. Valores expressam a média de três experimentos independentes e a barra o desvio padrão da média.

O ácido gálico (**5**) é pelo menos 4 vezes mais citotóxico que o ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico (**6**), cujas estruturas químicas são muito semelhantes, sendo que este último possui apenas uma hidroxila livre, enquanto que o primeiro, possui quatro.

Observou-se que os ésteres do ácido gálico com cadeia carbônica lateral superior a dez carbonos (**15 a 19**) apresentaram dificuldade de solubilização, apesar do uso prévio de DMSO, requerendo, em alguns casos, agitação em aparelho de ultra-som (Fisher Scientific), o que poderia ter resultado numa menor disponibilidade do composto às células, com conseqüente subestimativa da sua citotoxicidade. De fato, tais compostos apresentaram valores de CC_{50} bastante altos (entre 2.553,41 e 3.769,45 μM). Estes resultados estão de acordo com os verificados por Savi et al. (2005), que avaliou os mesmos compostos frente às células VERO. Os demais ésteres do ácido gálico (**7 a 14**), apresentaram valores de CC_{50} bem inferiores, os quais variaram de 113,23 a 645,72 μM , mostrando graus de citotoxicidade semelhantes ao observado no grupo das catequinas (Tabela 3).

O grupo representado pelas acetofenonas (**20 a 23**) apresentou valores de CC_{50} altos, em relação aos demais compostos testados e muito semelhantes aos valores encontrados por Savi (2004), variando de 2.459,76 a 3.738,98 μM .

Deve-se salientar, que alguns fatores podem contribuir para a elevação dos valores de CC_{50} , fornecendo parâmetros de citotoxicidade menores que os reais. De acordo com Habtemariam (1995), compostos que possuem hidroxilas podem interagir com ferro e outros metais de transição, presentes no meio de cultura suplementado com soro, induzindo a redução do MTT. Da mesma forma, substâncias que, em meio de cultura, apresentam forte coloração podem interferir na leitura das absorbâncias, fornecendo valores mais elevados (SMEE et al., 2002).

O anestésico quetamina (**25**) mostrou-se pouco citotóxico na concentração testada ($CC_{50}=3.010,69 \mu\text{M}$). O estudo prévio de sua atividade anti-rábica afirmou que nenhuma alteração morfológica foi observada em células neuronais, na concentração

máxima utilizada (1.500 μM), sugerindo que sua ação antiviral não afetaria as células (LOCKHART; TORDO; TSIANG, 1992).

A isoprinosina (**26**) não apresentou citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas ($\text{CC}_{50} > 1.798,14 \mu\text{M}$), as quais são muito maiores que a concentração na qual foi detectada atividade contra o vírus rábico (150 $\mu\text{g/mL}$) (HERNANDEZ-JÁUREGUI et al., 1980).

5.3 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO COLORIMÉTRICO DO MTT PARA A AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-RÁBICA *IN VITRO*

Para o estudo da atividade anti-rábica *in vitro* foi realizada a padronização do ensaio colorimétrico do MTT, conforme descrito no item 4.5. Os resultados da padronização são mostrados nas Figuras 8 a 11.

Ao utilizar o ensaio do MTT para avaliar a atividade antiviral é importante a obtenção de valores iguais ou inferiores a 0,2 na razão $(A)_{\text{CV}} / (A)_{\text{CC}}$. Isto significa que a garantia da sensibilidade do ensaio se deve à diferença entre os valores de absorbância (A) (entenda-se viabilidade celular) dos controles viral (CV) e celular (CC). O ideal é que, ao final do tempo de incubação da placa, o controle celular esteja viável enquanto o controle viral esteja totalmente destruído. Qualquer porcentagem de viabilidade celular detectada nos testes será conferida à ação antiviral do material em teste e o grau desta proteção poderá ser calculado para cada concentração do material testado (TAKEUCHI; BABA; SHIGETA, 1991).

No início da padronização do ensaio do MTT para avaliação da atividade anti-rábica, um dos primeiros parâmetros testados foi a quantidade de partículas infecciosas virais em relação ao número de células, representada pelo índice de multiplicidade de infecção (MOI). Foram testados MOIs entre 0,1 a 1,0, em culturas de 96h. Também,

foram testados dois diluentes (PBS e meio DMEM) para a solubilização do MTT, na concentração de 1mg/mL, o qual teve um tempo total de redução de 4h. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 8. Foi possível observar que os valores de absorbância, independente do MOI, ficaram muito próximos aos dos controles celulares. Este perfil foi mais evidente ao se utilizar o meio DMEM para a solubilização do MTT, cujos valores de absorbância do controle celular e das células infectadas foram praticamente iguais, em torno de 0,600, com valores da relação $A_{(CV)}/A_{(CC)}$ próximos a 1,0 em todos os MOI testados, sem significância estatística ($p > 0,05$). Uma ligeira diminuição destes valores, em relação ao controle celular, foi observada ao se utilizar PBS para a solubilização do MTT. Embora esta redução tenha se mostrado estatisticamente significativa através de análise de variância ANOVA, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer ($p < 0,001$), ela não foi suficiente para se obter valores de $A_{(CV)}/A_{(CC)}$ próximos a 0,2, conforme recomendado (TAKEUCHI; BABA; SHIGETA, 1991). Isto pôde ser observado, por exemplo, ao se considerar a maior quantidade de vírus (MOI = 1,0), cujo valor médio de absorbância foi de $0,394 \pm 0,004$, enquanto o controle celular foi de $0,533 \pm 0,017$, resultando numa relação $A_{(CV)}/A_{(CC)}$ de 0,74, muito distante do valor de 0,2, que assegura a sensibilidade do ensaio.

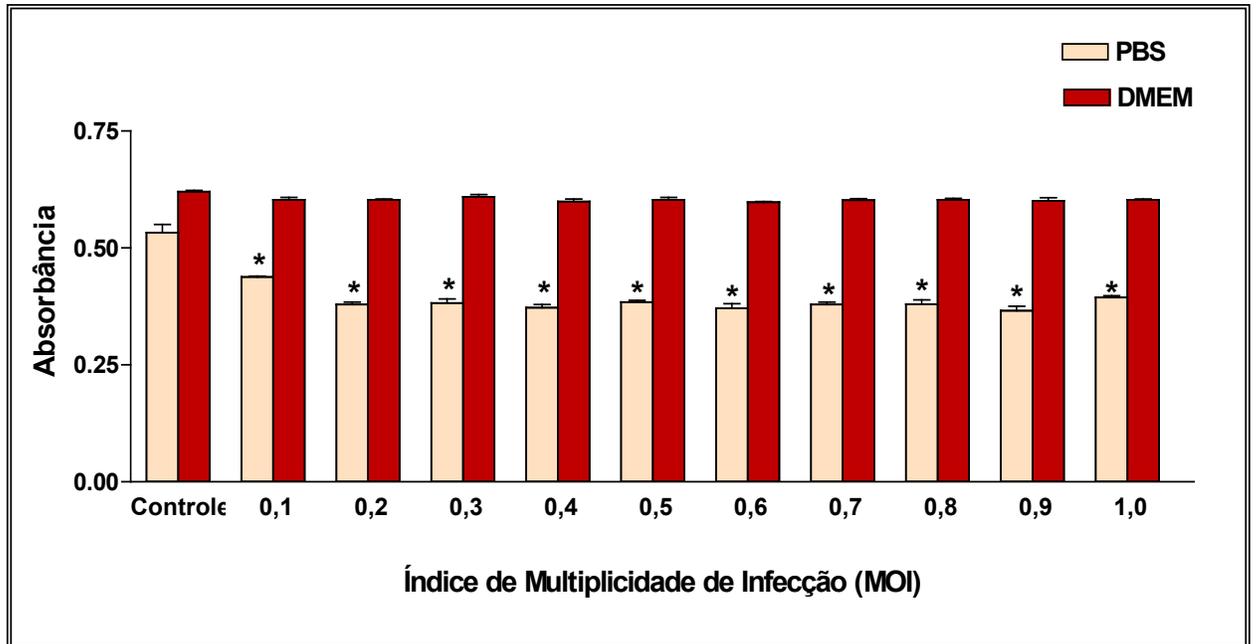


Figura 8: Valores de absorbância obtidos através do ensaio do MTT. $2,5 \times 10^5$ cél/mL foram infectadas com diferentes MOI (0,1 a 1,0) do vírus rábico e incubadas durante 96h. Em seguida o MTT (1mg/mL) foi solubilizado em PBS e meio DMEM, acrescido à cultura, permanecendo nesta por 4h. *valores estatisticamente significativos em relação ao controle celular (ANOVA/Tukey-Kramer, $p < 0,001$).

Na tentativa de se melhorar os valores da relação $A_{(CV)} / A_{(CC)}$, optou-se por variar, neste estudo a duração total do ensaio, ou seja, o tempo em que o vírus permaneceu em cultura. Para esta avaliação, os ensaios foram realizados com 72, 96 e 120h. Utilizaram-se dois valores de multiplicidade de infecção (MOI=0,5 e 1,0), além de DMEM e PBS para a solubilização do MTT (1mg/mL). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 9 (A) e (B). Observou-se claramente que, ao se utilizar o meio DMEM para a solubilização do MTT, os valores de absorbância sofreram alterações mínimas, independente da quantidade de vírus e do tempo que esses permaneceram na cultura. Ao se usar PBS, os valores apresentaram uma leve diminuição, embora não tenha sido possível estabelecer uma relação $A_{(CV)} / A_{(CC)}$ próxima a 0,2, conforme mostra a Tabela 4 .

Como mostra a Figura 9 (A), não houve nenhuma alteração significativa, quando se utilizou DMEM para a solubilização do MTT, independentemente do MOI e do tempo de incubação testados.

Na Figura 9 (B), observa-se, que embora tenha havido uma redução significativa ($p < 0,001$) nos valores de absorvância das células infectadas em relação ao controle celular, quando PBS foi utilizado como solubilizante do MTT, ainda não foi possível uma efetiva redução nos valores da relação $A_{(CV)} / A_{(CC)}$ em nenhuma das variações testadas (Tabela 4).

Tabela 4: Valores das relações $A_{(CV)} / A_{(CC)}$ obtidas no ensaio colorimétrico do MTT. Células McCoy foram infectadas com diferentes MOI (0,5 e 1,0) do vírus rábico, permanecendo em cultura nos tempos indicados. O MTT foi solubilizado com PBS e DMEM, com tempo total de redução de 4h.

MOI	Agente solubilizante do MTT	72 horas	96 horas	120 horas
0,5	(DMEM)	0,995	0,996	0,973
0,5	(PBS)	0,885	0,913	0,720
1,0	DMEM)	0,999	1,065	0,973
1,0	(PBS)	0,797	0,762	0,739

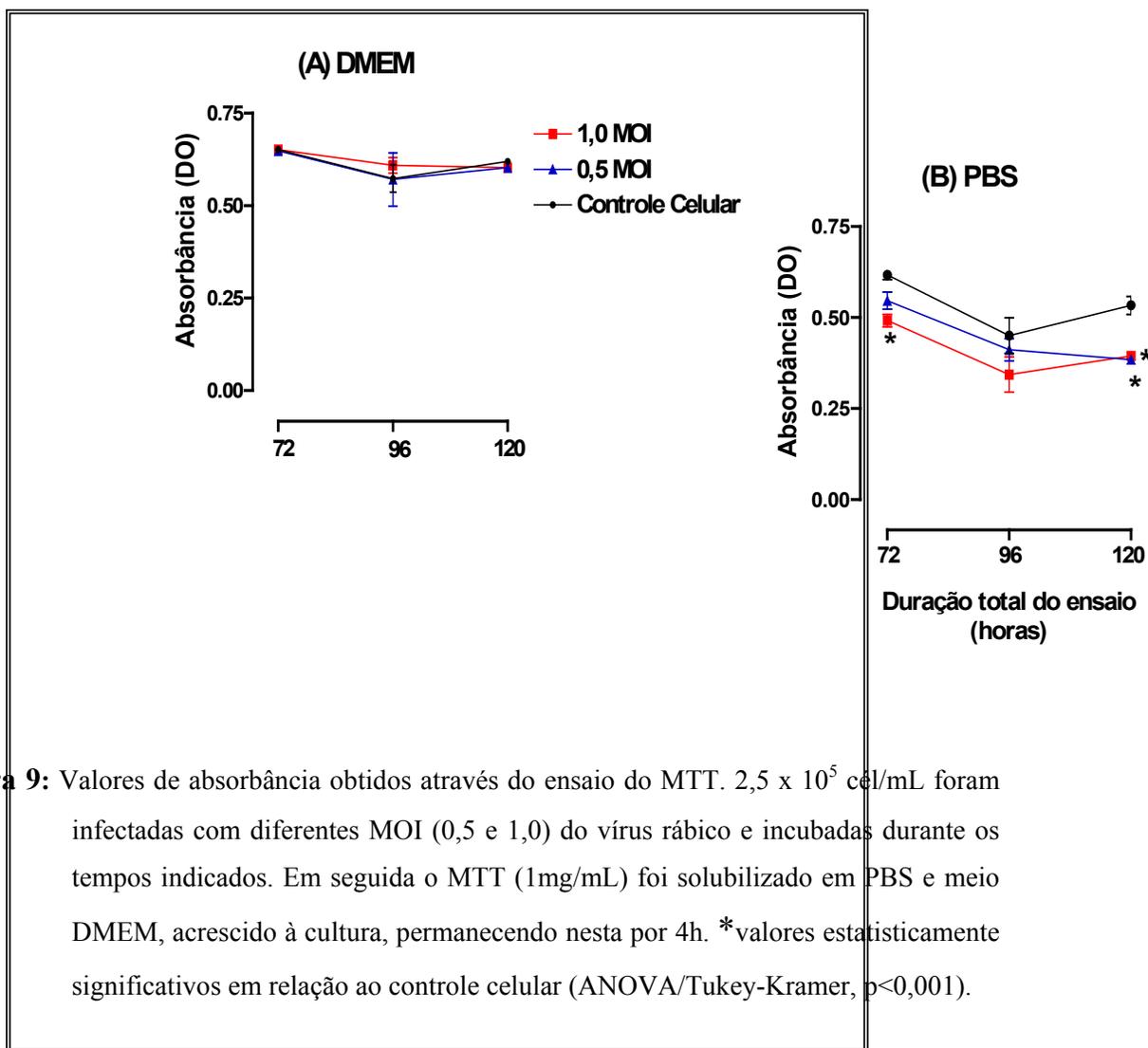


Figura 9: Valores de absorbância obtidos através do ensaio do MTT. $2,5 \times 10^5$ cél/mL foram infectadas com diferentes MOI (0,5 e 1,0) do vírus rábico e incubadas durante os tempos indicados. Em seguida o MTT (1mg/mL) foi solubilizado em PBS e meio DMEM, acrescido à cultura, permanecendo nesta por 4h. *valores estatisticamente significativos em relação ao controle celular (ANOVA/Tukey-Kramer, $p < 0,001$).

Em seguida, variou-se o tempo de redução do MTT, nas mesmas condições dos experimentos anteriores. Os valores das relações $A_{(CV)} / A_{(CC)}$ encontradas nessas condições são mostrados na Tabela 5. Novamente, embora algumas variações tenham demonstrados reduções estatisticamente significantes entre as células infectadas e os controle celulares (como ressaltado na Figura 10), nenhum progresso significativo foi obtido para a redução da relação $A_{(CV)} / A_{(CC)}$.

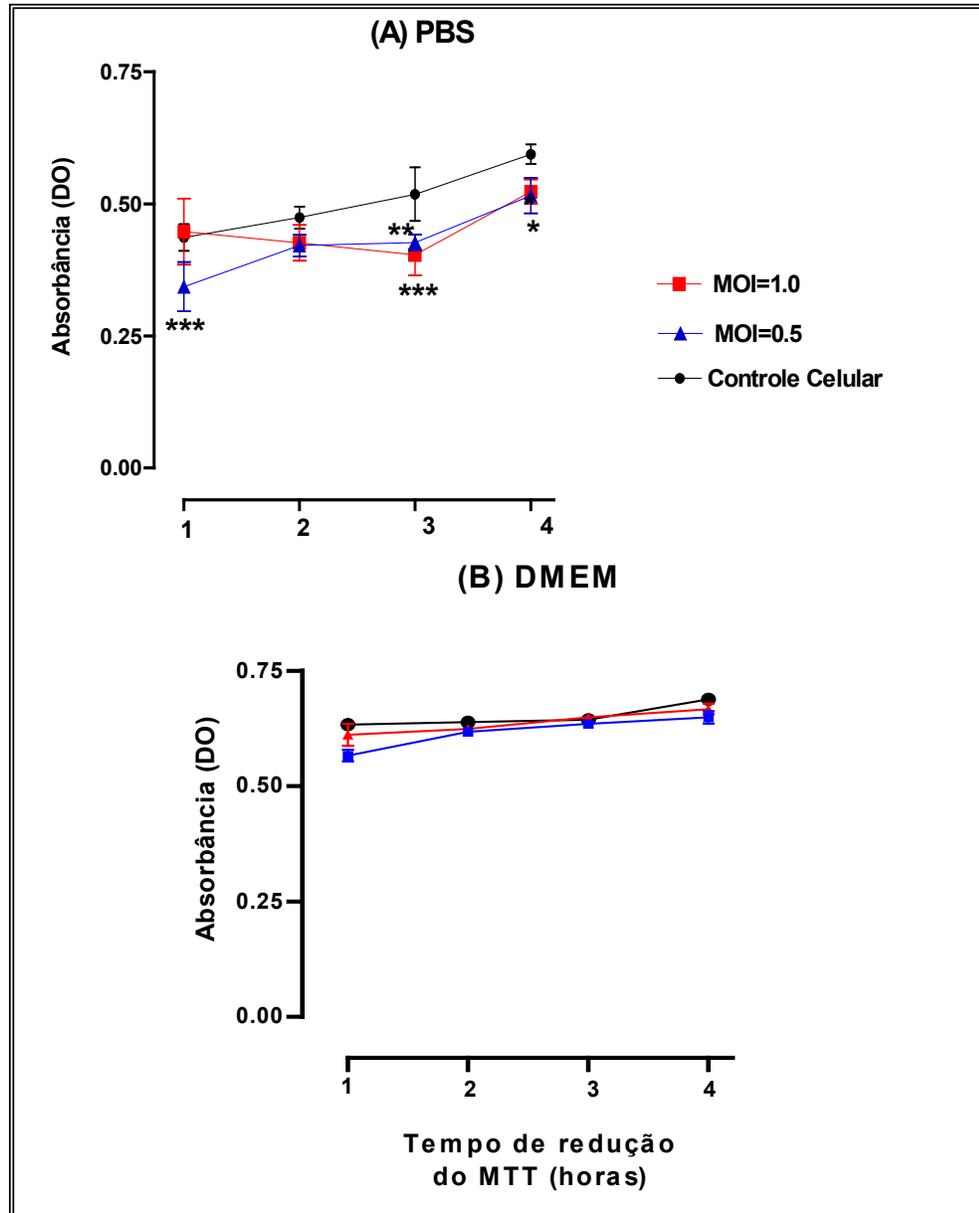


Figura 10: Valores de absorbância obtidos através do ensaio do MTT. $2,5 \times 10^5$ cél/mL foram infectadas com diferentes MOI (0,5 e 1,0) do vírus rábico e incubadas durante 96h. Em seguida o MTT (1mg/mL) foi solubilizado em PBS e meio DMEM, acrescido à cultura, permanecendo nesta nos tempos indicados.*valores estatisticamente significativos em relação ao controle celular (ANOVA/Tukey-Kramer, * $p < 0,05$ ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

Tabela 5: Valores das relações $A_{(CV)}/A_{(CC)}$ obtidas no ensaio colorimétrico do MTT. Células McCoy foram infectadas com diferentes MOI (0,5 e 1,0) do vírus rábico,

permanecendo em cultura por 96h. O MTT foi solubilizado com PBS e DMEM, com tempo total de redução indicado.

MOI	Agente solubilizante do MTT	1h	2h	3h	4h
0,5	(DMEM)	0,894	0,969	0,986	0,944
0,5	(PBS)	0,786	0,888	0,8233	0,868
1,0	(DMEM)	0,965	0,978	1,015	0,969
1,0	(PBS)	1,021	0,898	0,778	0,880

Em vista da dificuldade da padronização do ensaio colorimétrico do MTT com vírus rábico e células McCoy e no intuito de se descartar a possibilidade de erro técnico, foi realizada uma comparação com dois outros sistemas já padronizados no LVA. Nesta comparação, células VERO (ATCC: CCL 81), permissivas ao vírus herpético humano tipo 1 (HSV-1, cepa KOS); e células Hep-2 (ATCC: CCL 23), permissivas ao adenovírus humano tipo 5, foram submetidas ao mesmo ensaio do MTT, sendo os resultados apresentados na Figura 11.

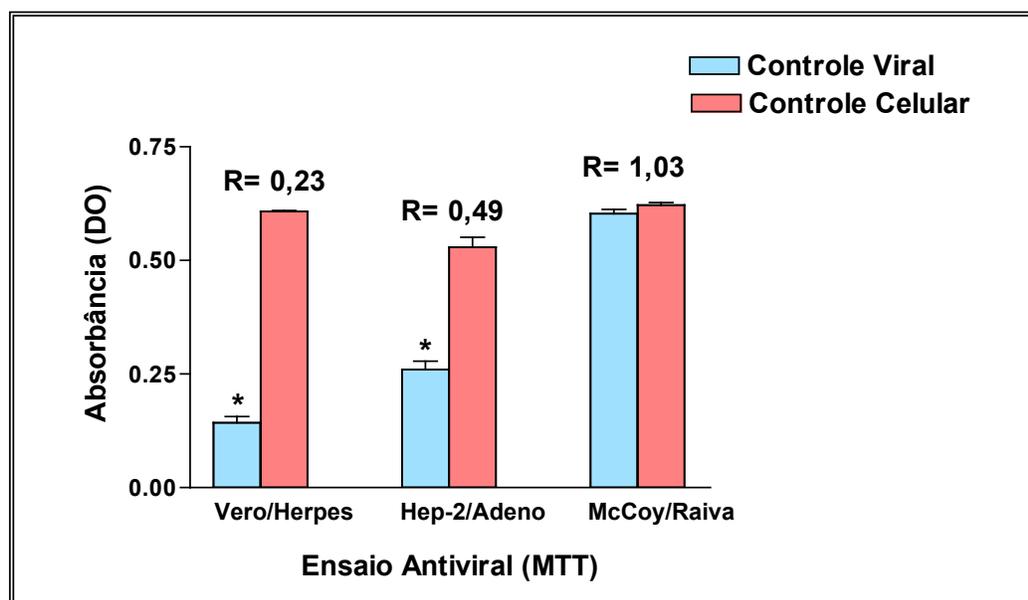


Figura 11: Valores de absorbância e relações $A_{(CV)} / A_{(CC)}$ ao se comparar o ensaio colorimétrico do MTT utilizando células McCoy e vírus rábico com dois outros sistemas já padronizados. **Condições gerais do ensaio:** número de células: $2,5 \times 10^5$ cel/mL, MTT(1mg/mL), tempo de redução de 4h. **Adenovírus:** MOI=0,5, título: $1,6 \times 10^8$ pfu/mL, células Hep-2 mantidas em MEM. **Herpesvírus (HSV-1):** MOI=0,5, título: $2,6 \times 10^7$ TCID₅₀/mL, células VERO mantidas em MEM. **Vírus Rábico:** MOI=0,5, título: 5×10^8 TCID₅₀/mL, células McCoy: mantidas em DMEM *diferenças estatisticamente significativas entre os valores de absorbância dos controles celular e viral (ANOVA Tukey-Kramer, $p < 0.001$).

Nos resultados apresentados, tornaram-se evidentes as diferenças das absorbâncias dos controles virais e celulares nestes sistemas e, conseqüentemente, a obtenção de relações $A_{(CV)} / A_{(CC)}$ próximas a 0,2. Já no sistema utilizando o vírus rábico, os valores de absorbância foram muito semelhantes aos observados em ensaios anteriores. Entretanto, não foram avaliados no presente estudo as possíveis causas que inviabilizaram a utilização do ensaio do MTT utilizando o vírus rábico e células McCoy.

Ainda, neste experimento comparativo, algumas diferenças devem ser levadas em consideração: nos sistemas com células VERO/HSV-1 e células Hep-2/Adenovírus foi utilizado meio MEM e vírus que causam infecções líticas.

O meio DMEM usado no sistema de células McCoy/ vírus rábico apresenta algumas diferenças em termos de composição em relação ao meio MEM. Além de mais enriquecido, o meio DMEM possui o dobro de L-cisteína (62,57mg/L) e de L-metionina (30 mg/L) do que o meio MEM (31,29 e 15 mg/L, respectivamente); a quantidade do vermelho de fenol é ligeiramente superior, além da presença do piruvato de sódio no meio DMEM (CULTILAB, 2004).

A maior quantidade dos aminoácidos sulfatados, associada a uma maior concentração do vermelho de fenol, que em vista da sua coloração mais acentuada pode alterar os valores de absorbância, além da presença do piruvato de sódio, um agente que pode alterar o balanço da oxido-redução celular, podem ter promovido uma maior redução do MTT em formazana, pois a potencialização no mecanismo de redução, na presença destas substâncias, já foi descrita na literatura (CARMICHAEL et al., 1987; LIU et al., 1997, NATARAJAN et al., 2000; SHOEMAKER; COHEN; CAMPBELL, 2004).

Optou-se pela utilização desta técnica para avaliação da atividade anti-rábica, com base em relatos da literatura, que mostraram o aparecimento do efeito citopático provocado pelo vírus rábico em células McCoy (CONSALES et al., 1990; NOGUEIRA, 1992; NOGUEIRA; AMARAL, 1992), o qual é muito pouco observado em outros modelos de infecção viral *in vitro* (KING, 1996). Entretanto, em vista da natureza do ciclo de replicação viral não causar lise (WUNNER, 2002), é possível que as células McCoy, apesar das evidentes alterações morfológicas detectadas, continuem metabolicamente ativas e capazes de reduzir o MTT a formazana.

Num estudo comparativo entre métodos colorimétricos, fluorimétricos e de avaliação visual, propõe-se a aplicabilidade desses métodos para a avaliação antiviral, ao se utilizar vírus que causam infecções líticas. Vírus não líticos ou que causam efeitos citopáticos parciais, não destroem completamente as células, sendo as mesmas, então, capazes de incorporar corantes ou, até mesmo, metabolizar reagentes, como o MTT. Acredita-se que, mesmo nos casos em que as células são destruídas, mas permanecem aderidas ao fundo da placa, alguns métodos utilizados podem não ser tão adequados, como, por exemplo, aqueles que usam de corantes que se ligam às proteínas ou

intercalantes de DNA, pois estes continuarão a se ligar às células não viáveis, fornecendo resultados inapropriados (SMEE et al., 2002).

Desta forma, é necessário que os mecanismos envolvidos na redução do MTT sejam bem compreendidos, além da identificação dos possíveis interferentes, que possam ter impossibilitado a aplicação desta técnica. A redução do MTT foi inicialmente atribuída, exclusivamente, às desidrogenases mitocondriais (MOSMANN, 1983; TAKEUCHI; BABA; SHIGETA; 1991; BARILE, 1994); entretanto dados mais recentes sugerem que o processo de redução deste composto não é exclusivamente mitocondrial, sendo que outras enzimas microssomais e citosólicas também podem estar envolvidas neste processo, com o auxílio de cofatores como NADH e NADPH (LIU et al., 1997; LIU; SCHUBERT, 1997, GONZÁLES; TARLOFF, 2001), o que também poderia contribuir para o aumento da redução deste composto em algumas situações.

O completo mecanismo de redução celular do MTT não está totalmente compreendido. Entretanto alguns estudos sugeriram que o MTT, impermeável à membrana celular, é incorporado pelas células viáveis por endocitose e, então, reduzido por enzimas a formazana, cujos cristais ficam acumulados em compartimentos endossomais ou lissomais, e são, posteriormente, transportados para a superfície celular por exocitose. Tanto a exocitose quanto a redução do MTT aparentemente requerem ATP e NADH gerados na glicólise, o que explica o fato da glicose e dos nucleotídeos de piridina afetarem a redução do MTT (VISTICA et al., 1991). Adicionalmente, é sugerido, que a exocitose dos cristais de formazana poderia afetar a redução do MTT, uma vez que quanto maior a exocitose, mais cristais recobririam a membrana celular e, conseqüentemente, inibiriam a entrada do MTT por endocitose (LIU et al., 1997; LIU; SCHUBERT; 1997)

Siewwerts e colaboradores (1995) afirmaram que o ensaio do MTT pode ser uma excelente ferramenta para a medida da atividade metabólica *in vitro*, desde que algumas precauções sejam tomadas, já que a habilidade das células viáveis em produzir formazana pode ser influenciada, significativamente, por algumas condições. O controle dos valores de pH, durante a incubação do MTT nas células e após a solubilização dos cristais de formazana; a qualidade do agente solubilizante de formazana; e a linhagem celular associada ao requerimento de diferentes períodos de incubação para redução do MTT são os principais fatores que podem interferir no ensaio, afetando desde o espectro de produção da formazana até a quantidade produzida pela célula.

Vistica et al. (1991) demonstraram variações significativas na capacidade de redução do MTT entre nove diferentes linhagens celulares. A quantidade de formazana gerada, em algumas destas linhagens, decresceu com o aumento da idade da cultura. Estes resultados indicaram uma correlação da redução do MTT com a concentração de glicose, presente no meio e consumida para a manutenção da cultura, sugerindo que o transporte intracelular de glicose é requerido para se obter um nível ótimo de redução. Fatores como o pH e a concentração de NADH e NADPH, também foram capazes de influenciar a redução do MTT (VISTICA et al., 1991).

Outro estudo propôs que a otimização do ensaio do MTT para a avaliação da viabilidade celular deve ser realizada para cada linhagem celular, observando-se a quantidade de células e a duração total do ensaio, pois é essencial que o tempo determinado seja suficiente para que as células se tornem inviáveis com a perda da atividade enzimática e que, neste período, o controle celular esteja em crescimento exponencial. Caso isto não ocorra, a viabilidade das células afetadas poderá ser seriamente superestimada (CARMICHAEL et al., 1987).

Shoemaker e colaboradores (2004) demonstraram a redução do MTT por extratos aquosos de plantas na ausência de células, atribuindo tal redução a grupos tiólicos livres (SH) presentes nos extratos. Esta constatação foi possível ao se observar um nível de redução significativamente menor quando se adicionou aos extratos, ácido iodo acético, um conhecido agente quelante de grupamentos tiólicos. O estudo ainda demonstrou que a quantidade de formazana formada, quando os extratos foram diluídos em meio DMEM com soro, foi significativamente maior do que quando diluídos em PBS, sugerindo que a composição do meio DMEM com soro poderia potencializar a redução do MTT. Adicionalmente, Natarajan et al. (2000) demonstraram que diferentes antioxidantes com grupamentos tiólicos, como β -mercaptoetanol, ditioneitol, ditiocarbamato de pirrolidina e N-acetilcisteína foram capazes de reduzir o MTT a cristais de formazana, na ausência de células, de maneira dose-dependente.

O aumento do potencial de redução do MTT na ausência de células, também observado com a utilização de fitoestrógenos (campferol e resveratrol), extratos de *Hypericum perforatum* e *Cimicifuga racemosa*, além de N-acetilcisteína e vitaminas C (BRUGGISSER et al., 2002).

Como durante a padronização do ensaio colorimétrico do MTT não foi possível a obtenção de valores da relação $A_{(CV)} / A_{(CC)}$ próximos a 0,2, optou-se por realizar a avaliação da atividade anti-rábica exclusivamente pelo ensaio da inibição do efeito citopático viral.

Embora a utilização do ensaio do MTT tenha se apresentado inadequado para a avaliação anti-rábica em células McCoy, é importante ressaltar que este pode ser amplamente utilizado com grande reprodutibilidade na avaliação da atividade antiviral de vírus que causam infecções líticas como herpesvírus, adenovírus, entre outros

(SUDO et al., 1994; KODAMA et al., 1996; BETANCUR-GALVIS et al., 2002; SMEE et al., 2002; ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2003; SAVI et al., 2005).

5.4 AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-RÁBICA ATRAVÉS DO ENSAIO DE INIBIÇÃO DO EFEITO CITOPÁTICO VIRAL

A subnotificação do número de casos de raiva humana, com uma estimativa de 40.000 a 70.000 mortes/ano, especialmente em áreas endêmicas (WHO, 2005), além do surgimento de casos relacionados a transplantes de órgãos sólidos, tais como fígado, rins e segmento arterial (MIŠAK, 2004; SRINIVASAN et al., 2005), antes apenas relacionados a transplantes de córnea (GODE; Bhide, 1988; JAVADI et al., 1996), associados a falhas após vacinação (ARYA, 1989; WILDE, 1989), além de efeitos adversos (INSTITUTO PASTEUR, 2000), e ao curso, geralmente, fatal da encefalite rábica, são alguns dos fatores que reforçam a importância de um agente antiviral com eficaz ação anti-rábica.

No final de 2004, após a descrição do primeiro caso de cura de raiva humana, sem administração da profilaxia (CDC, 2004), a busca por um tratamento antiviral eficaz foi ressaltada, já que o protocolo experimental com fármacos, incluía um antiviral clássico, a ribavirina. Curiosamente, este mesmo fármaco e seus análogos não demonstraram qualquer ação anti-rábica *in vivo*, quando camundongos foram desafiados intracerebralmente (BUSSEREAU et al., 1988), o que leva a se questionar o modelo animal utilizado, assim como fica demonstrada a necessidade de se realizar estudos adicionais com este fármaco para elucidar sua ação anti-rábica.

Muitos estudos já foram realizados para a busca de um agente com atividade anti-rábica, mas, até o momento, não foi encontrado um fármaco antiviral com eficácia e segurança comprovadas para uso clínico. A maioria das pesquisas realizadas nessa área não apresentou uma padronização nas metodologias normalmente avaliadas, o que dificultou uma análise comparativa entre as mesmas. Desta forma, torna-se necessário o estabelecimento de uma metodologia padrão para a triagem de potenciais agentes com ação anti-rábica, e esta metodologia deve contemplar a seletividade destes agentes em relação ao seu alvo viral, sendo a citotoxicidade, um parâmetro essencial neste tipo de avaliação.

Dentre as pesquisas disponíveis encontradas na literatura, poucos trabalhos determinaram os índices de seletividade dos agentes estudados. Yamamoto et al. (1990), ao estudarem a ação do 7-N-óxido de guanina sobre nove vírus de RNA, determinaram dois índices de seletividade ($IS > 65$ e $> 0,33$) deste metabólito para o vírus rábico. A grande diferença entre estes valores de IS pode ser explicada pela utilização de duas técnicas para a avaliação da citotoxicidade, uma baseada nas alterações morfológicas e outra na inibição do crescimento celular, enquanto que a atividade antiviral foi avaliada por imunofluorescência.

Pietro Paolo e colaboradores (1993) encontraram altos índices de seletividade quando avaliaram a ação de vários carboidratos contra o vírus rábico. Os valores de IS variaram de 10 a 400; entretanto, a avaliação da citotoxicidade foi realizada apenas através da avaliação microscópica das alterações morfológicas celulares e a utilização de uma técnica menos subjetiva poderia fornecer valores de IS diferentes dos apresentados.

Outro estudo, no qual foi avaliada a atividade anti-rábica de lectinas, os valores de IS foram determinados por parâmetros bem definidos de citotoxicidade e de ação antiviral. As lectinas apresentaram índices de seletividade de 20 e 48, sendo a citotoxicidade determinada pela técnica do vermelho neutro e a atividade antiviral avaliada pela técnica de inibição de imunofluorescência (MARCHETTI et al., 1995).

Os demais trabalhos encontrados na literatura, que avaliaram a atividade anti-rábica *in vitro*, utilizaram outras técnicas, tais como a avaliação do nível de expressão gênica de proteínas virais, uso de antagonistas de receptores, além de abordagens mais modernas, como a construção de elementos supressores genéticos. Entretanto, em virtude da natureza das técnicas utilizadas, não foram determinados os índices de seletividade dos agentes estudados (LOCKHART; TORDO; TSIANG, 1992; LENTZ; FU; LEWIS, 1997; WUNNER; PALLATRONI; CURTIS; 2004).

Embora com outro enfoque, estudos recentes demonstraram a inativação completa do vírus rábico (cepa CVS) com a utilização da vitamina C, ou ácido ascórbico (0,5 mg/mL), associada ao sulfato de cobre (5µg/ mL). O vírus inativado com vitamina C apresentou antigenicidade comparável ao método usual de inativação viral, que utiliza beta propiolactona (BPL), representando uma alternativa à inativação viral requerida no preparo de vacinas, reagentes diagnósticos e para fins de pesquisa, além de ser uma alternativa mais barata e não oferecer os riscos de carcinogenicidade, apresentados pela BPL (MADHUSUDANA; SHAMSUNDAR; SEETHRAMAN, 2004). A vitamina C, ainda, em outro estudo, quando associada à vacinação, apresentou um efeito imunomodulador capaz de aumentar a produção de interferon, desempenhando um papel de proteção na infecção rábica (STANTIC- PAVLINIC et al., 2004).

A ação antiviral *in vitro* de glicocorticóides foi demonstrada em células L929, nas quais se observou uma inibição de placas de lise provocadas pelo VSV, um vírus de genoma RNA da mesma família do vírus rábico. Os glicocorticóides são potentes moduladores da função eucariótica, que podem formar complexos com receptores celulares e alterar a transcrição e síntese de proteínas (LANCZ et al., 1985).

Nesta dissertação, a avaliação da atividade anti-rábica foi realizada através do ensaio de inibição do efeito citopático viral, conforme descrito no item 4.5.2. Os valores de CE_{50%} foram calculados através de análise de regressão e estão demonstrados na Tabela 6. Apesar da subjetividade na leitura deste ensaio, os resultados foram bastante reprodutíveis e adequados para a triagem de substâncias com ação anti-rábica, representando uma alternativa menos onerosa à técnica de imunofluorescência, classicamente utilizada para avaliação da atividade anti-rábica, para a dosagem de anticorpos neutralizantes, além de possibilitar a detecção viral em tecidos, ou mesmo, em cultura de células (HERNANDEZ-JÁUREGUI et al., 1980; MARCHETTI et al., 1995; DEAN; ABELSETH; ATANASIU, 1996).

Observou-se que, dos 24 compostos fenólicos avaliados, dez foram capazes de causar 50% de inibição do efeito citopático viral provocado pelo vírus, e apenas quatro apresentaram índices de seletividade $\geq 3,0$ (Figura 12). Seis compostos fenólicos não foram capazes de causar qualquer inibição no efeito citopático viral, enquanto oito inibiram em até 25% o efeito citopático viral (Tabela 6).

Tabela 6: Valores de citotoxicidade, atividade antiviral e índice de seletividade de compostos fenólicos, testados no modelo de células McCoy infectadas com vírus rábico (cepa PV)

Amostras	CC ₅₀ μM*	CE ₅₀ μM*	% **	IS(CC ₅₀ / CE ₅₀)
----------	-------------------------	-------------------------	---------	---------------------------------------------

Catequina	124,33 ± 33,53	36,50 ± 8,40	—	3,4
Epicatequina	165,99 ± 55,28	85,38 ± 13,74	—	1,9
Epigalocatequina	326,29 ± 60,40	257,41 ± 64,78	—	1,3
Ácido gálico	565,77 ± 343,43	—	≤25	***
Ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico	>5042,41	2142,74 ± 266,37	—	>2,4
Galato de metila	372,75 ± 91,30	—	≤25	***
Galato de etila	121,14 ± 37,74	—	≤25	**
Galato de butila	113,23 ± 52,35	109,79	—	1,0
Galato de hexila	119,46 ± 34,82	—	≤25	***
Galato de octila	645,72 ± 122,75	674,76	—	1,0
Galato de dodecila	>3003,98	1867,52 ± 229,46	—	>1,6
Galato de tetradecila	>3056,02	—	≤25	***
Galato de cetila	>2553,41	—	≤25	**
Galato de octadecila	>2673,92	—	≤25	***
4-metóxiacetofenona	2459,76 ± 462,97	—	≤25	***
3,4,5-trimetóxiacetofenona	3738,98 ± 1099,17	1023,98 ± 64,62	—	3,7
3,4,5- trimetóxi benzoato de etila	3204,20 ± 397,87	822,23 ± 134,38	—	3,9
Quercetina	670,02 ± 180,18	191,68 ± 24,25	—	3,5
Quetamina	3010,69 ± 171,26	922,93 ± 68,48	—	3,3
Isoprinosina	>1.798,14	347,25 ± 27,14	—	>5,2

* Valores representados pela média de três experimentos independentes ± desvio padrão da média, determinados através do ensaio colorimétrico do MTT.

** Percentual de inibição de efeito citopático viral em relação aos controles celulares (valores estimados).

*** Índice de seletividade não calculado.

Título infeccioso viral utilizado: $5 \times 10^{6,7}$ TCID₅₀/mL.

A utilização dos controles positivos, representados pela isoprinosina e quetamina, os quais apresentaram índices de seletividade >5,2 e 3,3, respectivamente, assegurou a validade dos ensaios. Ambas as substâncias apresentam ação anti-rábica já descrita na literatura, além de serem utilizadas em protocolos experimentais para tratamentos da encefalite rábica humana (RUPPRECHT; HALON; HEMACHUDHA, 2002; JACKSON; WARRELL; RUPPRECHT, 2003; WARRELL; WARRELL, 2004; HENDEKLI, 2005).

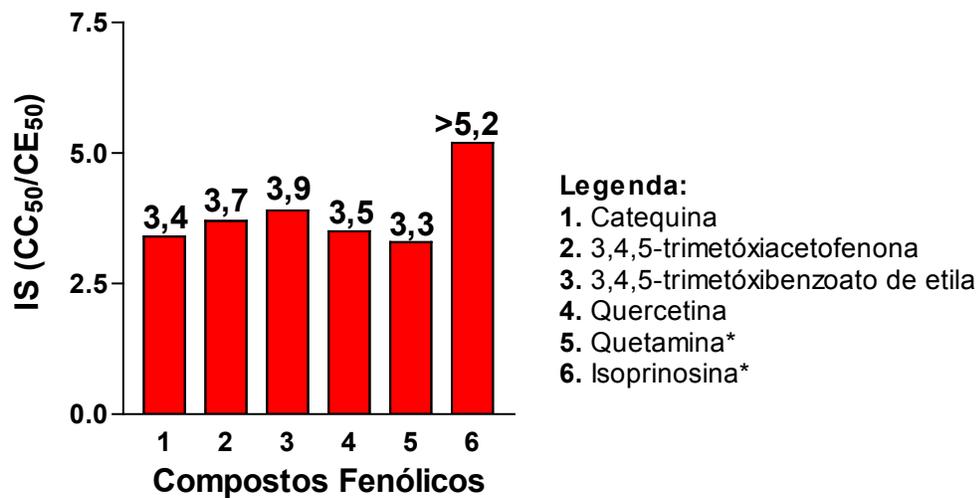


Figura 12: Valores de índices de seletividade $> 3,0$ dos compostos fenólicos testados.

*Controles positivos utilizados no ensaio.

O anestésico quetamina é um antagonista não competitivo do receptor N-metil- D- aspartato. A neurotoxicidade de aminoácidos excitatórios, como L-glutamato e L-aspartato, é relacionada à ativação deste receptor no desenvolvimento de algumas doenças neurológicas, como as doenças de Alzheimer e de Parkinson (GREENAMYRE et al., 1987; KLOCKGETHER; TURSKI; 1989). Em virtude da infecção pelo vírus rábico ser altamente neurotrópica e com poucas mudanças histopatológicas, as quais por si só não explicariam a letalidade da infecção, permite que se cogite a possibilidade do envolvimento de uma disfunção neuronal. Tanto a quetamina, como outros antagonistas deste mesmo receptor, (MK-801 e outros derivados da fenciclidina), demonstraram ação anti-rábica (TSIANG et al., 1991). O mecanismo de ação destes anestésicos não está completamente elucidado, mas acredita-se que pela facilidade de penetração nas células neuronais, seja possível sua interação com proteínas intracelulares, como a β -tubulina, ou até mesmo que estes desregulem sistemas metabólicos, como os que controlam

níveis de ATP, essenciais para uma transcrição viral eficiente (LOCKHART; TORDO; TSIANG; 1992).

Já a isoprinosina, é um imunomodulador que aumenta a produção de interferon e tem sido usada no tratamento de inúmeras doenças virais, tais como algumas infecções herpéticas e outras causadas por vírus influenza ou rinovírus (MASIHI, 2000). O mecanismo de ação anti-rábica não é totalmente esclarecido, mas acredita-se que haja uma interação em nível ribossomal, que interfere na produção do RNA viral (HERNANDEZ-JÁUREGUI et al., 1980).

Baseada na determinação dos índices de seletividade, em alguns casos, pode-se estabelecer relações entre a estrutura e a atividade e até predizer características estruturais responsáveis pela atividade biológica de um composto (BETANCUR-GALVIS et al., 2001).

No presente trabalho, observou-se que os maiores índices de seletividade alcançados são de compostos com estruturas bastante semelhantes, tais como a catequina (**1**) e a quercetina (**24**), a 3,4,5-trimetóxiacetofenona (**21**) e o 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila (**22**) (ver estruturas, materiais e métodos p.56 a 59). A atividade antiviral detectada para as duas primeiras substâncias poderia estar relacionada ao número de hidroxilas livres apresentado por estas, embora este seja um parâmetro insuficiente, já que compostos com o mesmo número de hidroxilas e estrutura muito semelhantes, como a epicatequina (**2**) e a epigalocatequina (**3**), não demonstraram a mesma atividade (Tabela 6).

Os autores dos estudos que avaliaram a inativação viral através do uso do ácido ascórbico, afirmaram que esse composto pode sofrer auto-oxidação, resultando na

formação de grupos hidroxilas, aos quais foi atribuída a ação inativante (MURATA et al., 1986, MADHUSUDANA; SHAMSUNDAR; SEETHRAMAN, 2004).

Em outros modelos, como o apresentado por Middleton, Kandaswami e Theoharides (2000), foi relatada a atividade anti-HSV-1 de flavonóides, atribuindo-se esta atividade à presença de hidroxilas nas posições 3',4', 3, 5 e 7 em suas moléculas. A catequina e a quercetina são compostos que apresentam estas características estruturais e , coincidentemente, apresentaram os maiores IS para o vírus rábico. Em outro estudo mais recente, no entanto, não foi detectada ação anti-HSV-1 muito considerável destes mesmos compostos (SAVI, 2004).

Alguns estudos sugeriram que as presenças de grupamentos hidroxilas no anel benzênico, além do peso molecular são determinantes para ação anti-HSV-1 (FIKUCHI et al., 1989). Ainda, foi descrito que a presença de grupos carboxílicos em polihidroxicarboxilatos derivados de compostos fenólicos é essencial para a atividade anti-herpética e anti-HIV (MEERBACH et al., 2001).

Considerando-se o grupo das acetofenonas, que também apresentou os maiores IS neste trabalho, a presença de grupos éteres poderia ser relacionada à sua atividade anti-rábica, já que duas outras substâncias da mesma classe **(20)** e **(23)**, com nenhum ou apenas um grupamento éter, não apresentaram atividade antiviral considerável.

Os compostos fenólicos **(4)**, **(9)**, **(11)**, **(13)**, **(15)** e **(23)** não foram capazes de inibir o efeito citopático viral em nenhum grau, com exceção dos compostos **(4)** e **(23)**, todos os demais compostos fazem parte dos alquil ésteres do ácido gálico, que apresentaram atividade anti-rábica muito baixa, sem a possibilidade da determinação de um índice de seletividade, na maioria das vezes (Tabela 6).

Alguns pesquisadores relataram a importância da cadeia carbônica lateral na atividade anti-herpética dos alquil-ésteres do ácido gálico, destacando-se o galato de metila com ação antiviral específica para o HSV-2, HSV-1 e CMV, em ordem crescente. Além da cadeia lateral carbônica, foi também demonstrado que as hidroxilas são importantes para a atividade antiviral, tendo sido sugerido que a interação entre os galatos e as proteínas virais produz alterações na adsorção e penetração viral nas células (KANE et al, 1988).

Resultados semelhantes foram encontrados numa avaliação recente da atividade anti-herpética de 14 alquil-ésteres do ácido gálico, com índices de seletividade consideráveis, embora, nenhuma relação entre a estrutura e a atividade tenha sido estabelecida com o aumento da cadeia carbônica lateral (SAVI et al., 2005).

Entretanto, o mesmo não foi observado na atividade anti-rábica dos galatos, como já descrito anteriormente, a qual foi baixa, independente do tamanho da cadeia alquílica lateral, sendo o galato de dodecila, o composto que apresentou o maior índice de seletividade (IS=1,61), o que, no entanto é ainda muitíssimo baixo.

Algumas diferenças observadas entre os índices de seletividade de compostos com a mesma estrutura química ou estruturas relacionadas, obtidos para diferentes vírus, como por exemplo, o vírus rábico e o HSV-1, podem ser facilmente explicadas, através de diferenças acerca da morfologia, estrutura genômica, replicação e citopatogenia nas células infectadas, além receptores celulares distintos envolvidos na infecção viral.

Com estrutura bastante semelhante a dos galatos, mas acrescida de três grupamentos éteres na posição das hidroxilas, o ácido 3,4,5-trimetóxi-benzóico, assemelha-se, desta forma, à estrutura química das duas fenonas que apresentaram os

maiores índices de seletividade, apresentando neste trabalho uma atividade anti-rábica moderada (IS=2,4).

O composto com maior índice de seletividade neste estudo foi o 3,4,5-trimetóxiibenzoato de etila (IS=3,9). Em outro estudo recente, este composto demonstrou alta atividade anti-herpética, com IS=33 (SAVI, 2004).

As observações realizadas neste trabalho sugerem uma possível relação entre a estrutura e a atividade dos compostos testados, entretanto, estes parâmetros ainda são insuficientes para que se possa realmente estabelecer sua ação anti-rábica, sendo necessários estudos mais aprofundados.

6 CONCLUSÕES

- O ensaio colorimétrico do MTT mostrou-se inapropriado para a avaliação da atividade anti-rábica, utilizando-se células McCoy, já que o evidente efeito citopático causado pela amostra PV não correspondeu à inibição da formação de formazana.
- A técnica de inibição do efeito citopático viral em células McCoy, mostrou-se apropriada para a determinação da atividade anti-rábica de compostos fenólicos.
- O ensaio colorimétrico do MTT mostrou-se adequado para a avaliação da citotoxicidade de compostos testados sobre as células McCoy.
- Os únicos compostos que não foram citóxicos para as células McCoy, nas concentrações testadas, foram todos derivados do ácido gálico com cadeia alquílica igual ou superior a dez carbonos, o ácido 3,4,5-trimetóxicibenzóico e a isoprinosina.
- Os compostos que apresentaram maior citotoxicidade para as células McCoy pertencem ao grupo dos galatos com cadeia alquílica inferior a dez carbonos e as catequinas.
- Embora não seja estabelecida a relação entre a estrutura química e efeito citotóxico, a quantidade de hidroxilas é diretamente proporcional a citotoxicidade sobre as células McCoy.

- Todos os compostos testados para o vírus rábico utilizando células McCoy apresentaram índices de seletividades inferiores a 4.
- Os compostos catequina, quercetina, 3,4,5-trimetóxiacetofenona e 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila apresentaram os maiores índices de seletividade para o vírus rábico, sendo que os dois primeiros exibem maior número de hidroxilas livres, enquanto os dois últimos apresentam maior número de grupamentos éteres.
- O número de hidroxilas livres e a presença de grupamentos éteres são parâmetros insuficientes para se relacionar a estrutura química com a atividade anti-rábica *in vitro* detectada dos compostos testados.

7 PERSPECTIVAS

- O presente estudo fornece uma ferramenta economicamente viável e de fácil realização para triagem em larga escala de compostos com ação anti-rábica.
- Após a determinação de índices de seletividade consideráveis, a técnica de inibição de efeito citopático poderia ser comparada à outra técnica, menos subjetiva, como o ensaio de inibição da formação de placas de lise, desde de que padronizado.
- Após comparada com a técnica de inibição da formação de placas de lise, os compostos que continuarem apresentando atividade anti-rábica considerável, poderiam ser avaliados quanto a seu mecanismo de ação.
- Para a realização da triagem de agentes com possível ação anti-rábica, o estudo da estrutura química e das propriedades pode fornecer informações importantes para a eleição das substâncias a serem testadas.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-KADER, M.S. Phenolic constituents of *Ononis vaginalis* roots. **Planta Medica**, v.67, n.4, p.388-390, 2001.
- AHN, M.J.; KIM, C.Y.; LEE, J.S.; KIM, T.J.; KIM, S.H.; LEE, C.K.; LEE, B.B.; SHIN, C.G.; HUH, H.; KIM, J. Inhibition of HIV-1 integrase by galloyl glucoses from *Terminalia chebula* and flavonol glycoside gallates from *Euphorbia pekinensis*. **Planta Medica**, v.68, n.5, p.457-459, 2002.
- ALVAREZ, L.; FAJARDO, R.; LOPEZ, E.; PEDROZA, R.; HEMACHUDHA, T.; KAMOLVARIN, N.; CORTES, G.; BAER, G.M. Partial recovery from rabies in a nine-year-old boy. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.13, p.1154-5, 1994.
- AMOROS, M.; SIMÕES, C.M.O.; GIRRE, L. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type I in cell culture – comparison with the antiviral activity of propolis. **Journal of Natural Products**, v.55, n.12, p.1732-1740, 1992.
- ANDRIGHETTI-FROHNER C.R.; ANTONIO, R.V.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; BARARDI, C.R.; SIMÕES, C.M.O. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 6, p. 843-848, 2003.
- ANJARA, J.M.; JHALA, C.I. Immunoperoxidase reaction in diagnosis of rabies **International Journal of Zoonoses**, v.12, p.267-275, 1985.
- ARYA, S. C. Failures of post-exposure rabies and others immunotherapies in developing countries. **Vaccine**, v.7, p. 372, 1989
- ASANO, J.; CHIBA, K.; TADA, M.; YOSHII, T. Antiviral activity of lignans and their glycosides from *Justicia procumbens*. **Phytochemistry**, v. 42, p. 713-717, 1996.
- BABICH, H.; BORENFREUND, E. Cytotoxicity of T-2 toxin and its metabolites determined with the neutral red cell viability assay, **Applied & Environmental Microbiology**, v.57, n.7, p.2101-2103, 1991.
- BADRANE. H.; BABLOUL, C.; PERRIN, P.; TORDO, N. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. **Journal of Virology**, v.75, p. 3268-3276, 2001.
- BAER, G. M.; BELLI, W.J.; FISHBEIN, D.B. Rhabdoviruses. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M. **Virology**, New York, Raven, 1990, p.883-930.
- BAER, G. M. The natural history of rabies. 2.ed. New York Academic Press, 1991.
- BARATA, R.C.B. A Historicidade do Conceito de Causa. In: **Textos de Apoio: Epidemiologia I**. Rio de Janeiro. ENSP/ABRASCO, 1985, p.13-27.
- BARILE, F. A. **In vitro cytotoxicology**: mechanisms and methods. Florida: CRC, 1994. 222p.

- BELL, A. E.; CHARLWOOD, B. V. **Secondary Plant Products**. Nova York : Springer, 1980. 674 p., p. 329-402.
- BENENCIA, F.; COURREGES, M.C. Antiviral activity of sandalwood oil against herpes simplex viruses-1 and-2. **Phytomedicine**, v.6, p.119-123, 1999.
- BETANCUR-GALVIS, L.; ZULUAGA, C.; ARNO, M.; GONZALEZ, M.A.; ZARAGOZA, R.J. Structure-activity relationship of in vitro antiviral and cytotoxic activity of semisynthetic analogues of scopadulane diterpenes. **Journal of Natural Products**, v.64, n.10, p.1318-1321, 2001.
- BETANCUR-GALVIS, L.A.; MORALES, G.E.; FORERO, J.E.; ROLDAN, J. Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the Euphorbia genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, v.4, p.541-546, 2002.
- BORDIGNON, J.; PIZA, A. T.; ALVAREZ-SILVA, M.; CAPORALE, G. M. M.; CARRIERI, M. L.; KOTAIT, I.; ZANETTI, C. R. Isolation and replication of rabies virus in C6 rat glioma cells (clone CCL- 107). **Biologicals**, v.29, p.67-73, 2001.
- BORDIGNON, J.; BRASIL-DOS ANJOS, G.; BUENO, C.R.; SALVATIARA-OPORTO, J.; DAVILA, A.M.; GRISARD, E.C.; ZANETTI, C.R. Detection and characterization of rabies virus in Southern Brazil by PCR amplification and sequencing of the nucleoprotein gene. **Archives of Virology**, v.10, n.6, p.1096-1108, 2004.
- BOURHY, H.; PERRIN, P. Rapid rabies enzyme immunodiagnosics or rabies antigen detection. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. World Health Organization, Geneva, 1996, p.105-113.
- BRIGGS, D.J. Public Health Management of Humans at Risk. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**. New York, Academic Press, 2002, 12: 401-443.
- BRUGGISSER, R.; VON DAENIKEN, K.; JUNDT, G.; SCHAFFNER, W.; TULLBERG-REINERT, H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. **Planta Medica**, v.68, n.5, p.445-448, 2002.
- BRUNETON, J. **Éléments de phytochimie et de pharmacognosie**. 2 ed. Paris: Lavoisier, 1995. 584 p., p. 123-184.
- BURKE, T.R. JR.; FESEN, M.R., MAZUNDER, A.; WANG, J.; CAROTHERS, A.M.; GRUNBERGER, D.; DRISCOLL. J. KOHN, K.; POMMIER, Y. Hydroxylated aromatic inhibitors of HIV-1 integrase. **Journal of Medical Chemistry**, v.38, n.21, p.4171-8, 1995.
- BUSSEREAU, F.; FLAMAND, A.; PESE-PART, D. Reproducible plaquing system for rabies in CER cells. **Journal of Virological Methods**, v.4, p.277-282, 1982.
- BUSSEREAU, F.; PICARD, M.; BLANCOU, J.; SUREAU, P. Treatment of rabies in mice and foxes with antiviral compounds. **Acta Virologica**, v.32, n.1, p.33-49, 1988.
- CARMICHAEL, J.; DEGRAFF, W.G.; GAZDAR, A.F.; MINNA, J.D.; MITCHELL, J.B. Evaluation of a tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing. **Cancer Research**, v.47, p.936-942, 1987.

- CENTER OF DISEASE CONTROL (CDC) – Rabies Structure. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies>> Acesso: 19/11/2004.
- CDC. Rabies in a laboratory worker---New York. *MMWR* v.26, p.183-4, 1977.
- CDC. Recovery of a Patient from Clinical Rabies --- Wisconsin, 2004. v.53, n.50, p.1171-1173, 2004.
- CHARLTON, J.L. Antiviral activity of lignans. **Journal of Natural Products**, v.61, p.1447-1451, 1998.
- CHE, C. T. Plants as a source of potential antiviral agents. In: WAGNER, H.; FARNSWORTH, N. R. (Eds.). **Economic and medicinal plants research**. Londres: Academic, 1991. p. 167-251.
- CHIANG, L.C.; CHIANG, M.Y.; NG, L.T.; LIN, C.C. Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds in vitro. **Antiviral research**, v.55, p.53-62, 2002.
- CHILDS, J.E. Epidemiology. In: JACKSON, A.C.; WUNNER, W.H. **Rabies**. San Diego, Academic Press, 2002, p.113-162.
- CHUNG, K.; WONG, T. Y.; WEI, C. HUANG, Y.; LIN, Y. Tanins and human health: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n.6, p. 421-464, 1998.
- CIDASC. Plano estadual de combate à raiva-Fase I, Secretaria do desenvolvimento rural e da agricultura, Florianópolis, 1999, 27p.
- CONSALES, C.A.; MENDONÇA, R.Z.; GALLINA, N.M.; PEREIRA, R.A. Cythopathic effect induced by rabies virus in McCoy cells. **Journal of Virological Methods**, v.27, p.277-85, 1990.
- COS, P.; CALOMME, M.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J.; VANDEN BERGUE, D. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as antioxidant and pro-oxidant compounds. In: RAHMAN. **Studies in Natural Products Chemistry**. Pakistan: Elsevier, 2000. p.307-341.
- COX, J.H.I.; DIETZSCHOLD, B.; SCHNEIDER, L.G. Rabies virus glycoprotein. 2 Biological and serological characterization. **Infection and Immunity**, v.16, p.754-9, 1977.
- CREPIN, P.; AUDRY, L.; ROTIVEL, Y.; GACOIN, A.; CAROFF, C.; BOURHY, H. Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 1117-21, 1998.
- CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 854, p. 435-442, 1998.
- CULTILAB – Composição Meio DMEM. Disponível em: <http://www.cultilab.com.br/bmem.html>> Acesso em: 28/10/2004.
- CULTILAB – Composição Meio MEM. Disponível em: <<http://www.cultilab.com.br/bdmem.html>> Acesso em: 28/10/2004.

- DAVID, D.; YAKOBSON, B.; ROTENBERG, D.; DVERES, N.; DAVIDSON, I.; STRAM, Y. Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. **Veterinary Microbiology**, v.87, p.111-118, 2002.
- DE CLERCQ, E. Antiviral drugs in current clinical use. **Journal of Clinical Virology**, v.30, p.115-133, 2004.
- DE CLERCQ, E. Strategies in the design of antiviral drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.1, p.13-24, 2002.
- DE LOGU, A.; LOY, G.; PELLERANO, M.L.; BONSIGNORE, L.; SCHIVO, M.L. Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to cell virus spread by *Santolina insularis* essential oil. **Antiviral Research**, v.68, p.177-185, 2000.
- DEAN, D.J.; EVANS, W., McCLURE, R. C. Pathogenesis of rabies. **Bulletin of World Health Organization**, v.29, p.803-11, 1963.
- DEAN, D.J.; BAER, G.M.; THOMPSON, W.R. Studies on the local treatment of Rabies – Infected Wounds. **Bulletin of World Health Organization**, v.28, p.477-486, 1963.
- DEAN, D.J.; ABELSETH, M.K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. World Health Organization, Geneva, 1996, p. 88-95.
- DELAGNEAU, J.F.; PERRIN, P.; ATANASIU, P. Structure of the rabies virus: spatial relationship of the proteins G, M1, M2 and N. **Ann Virol. (Inst. Pasteur)**. v.132, p. 473-93, 1981.
- DIETZCHOLD, B.; RUPPRECHT, C.E.; ZHEN, F.F.; KOPROWSKI, H. Induction of protein immunity against by immunization with virus ribonucleoprotein. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M., HOWLY, P.M. **Virology**. Lippencott Haven Publishers, Philadelphia, 1996, p.1140-1157.
- EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B.J.; BOOBIS, A.; CARERE, A., KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J.C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, p.193-236, 2002.
- ENDERS, J. F.; WELLER, T.H.; ROBBINS, F.C. Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in the cultures of various embryonic tissues. **Science**, v. 109, p.85-7, 1949.
- ERDELMEIER, C.A.; CINATL, J.JR; RABENAU, H.; DOERR, H.W.; BIBER, A.; KOCH, E. Antiviral and antiphlogistic activities of Hamamelis virginiana bark. **Planta Medica**, v.62, n.3, p.241-245, 1996.
- FAMILUSI, J.B.; OSUNKOYA, B.O.; MOORE, D.L.; KEMP, G.E.; FABIYI, A. A fatal human infection with Mokola virus. The **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.21, p.959-63, 1972.
- FIKUCHI, K.; SAKAGAMI, H.; OKUDA, T.; HATANO, T.; TANUMA, S.; KITAJIMA, K.; INOUE, Y.; INOUE, S.; ICHIKAWA, S.; NONOYAMA, M.; KONNO, K. Inhibition of herpes simplex virus infection by tannins and related compounds. **Antiviral Research**, v.11, p.285-298, 1989.

- FOOKS, A.R.; BROOKES, S.M.; JONHSON, N.; McELHINNEY, L.M.; HUTSON, A.M. European bat *Lyssaviruses*: an emerging zoonosis. **Epidemiology and Infection**, v.133, p.1029-39, 2003.
- FU, Z. F. Rabies and rabies research: past, present and future. **Vaccine**, vol. 15, Suppl., pp. S20-S24, 1997.
- FUNASA. Boletim epidemiológico, Ministério da Saúde, Edição Especial, 2001, p.21-22.
- GALTIER, V. Les injection de virus rabique dans le torrent circulatoire ne provoquent pas l'eclosion de la rage et semble conférer l'immunité. La rage peut être transmise par l'ingestion de la matière rabique. **Comptes R. Acad. Sci.**, 93:284-285, 1881.
- GERMANO, P.M.L. Avanços na pesquisa da raiva. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, n.1, p.86-91, 1994.
- GODE, G. R.; BHIDE, N. K. Two rabies deaths after corneal grafts from one donor. **Lancet**, v.2, p.6-8, 1988.
- GONZALES,R.J.; TARLOFF, J.B. Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. **Toxicology in Vitro**, v.15, p.257-259, 2001.
- GOULD, A.R.; HYATT, A.D.; LUNT, R.A.; KATTENBELT, J.A.; HENGSTBERGER, S.; BLACKSELL, S.D. Characterization of a novel *Lyssavirus* isolated from Pteropid bats in Australia. **Virus Research**, v. 54, p.165-187, 1998.
- GREEN, R. H. Inhibition of multiplication of Influenza virus by extracts of tea. **Proceedings Society of Experimental Biology**, v.71, p.84-85, 1949.
- GREENAMYRE, J. T.; PENNEY, J.B.; D'AMATO, J.C.; YOUNG, A. B. Dementia of the Alzheimer's type: changes in hippocampal L(³H)-glutamate binding. **Journal of Neurochemistry**, v.48, p.543-551, 1987.
- HABTEMARIAM, S. Cytotoxicity of diterpenes from *Premna schimperi* and *Premna oligotricha*. **Planta Medica**, v.61, n.4, p. 368-369, 1995.
- HAMID, R.; ROTSHTEYN, Y.; RABADI, L.; PARIKH, R.; BULLOCK, P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. **Toxicology in Vitro**, v.18, p.703-710, 2004.
- HANLON, C.A.; CHILDS, J.E.; NETTLES, V.F. Article III: Rabies in wildlife. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.215, p.1612-18, 1999.
- HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; OTSULA, H.; TAKEDA, Y. Antiviral activity of 5,6,7-trimethoxyflavone and its potential of the anti-herpes activity of aciclovir. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, p.572-584, 2001.
- HATTWICK, M.A.; WEIS, T.T.; STECHSCHULTE, C.J.; BAER, G.M.; GREGG, M.B. Recovery from rabies. A case report. **Annals of Internal Medicine**, v.76, p.931-42,1972.
- HEMACHUDHA, T.; LAOTHAMATAS, J.; RUPPRECHT, C.E. Human Rabies: A disease of complex neuropathogenetics mechanisms and diagnostic challenges. **Lancet Neurology**, v.1, p. 101-109, 2002.

- HENDEKLI, C. M. Current therapies in rabies. **Arquivos of Virology**, v.150, n.6,1047-1057, 2005.
- HERNÁNDEZ-JÁUREGUI, P.; GONZÁLEZ-VEGA, D.; CRUZ-LAVÍN, E.; HERNÁNDEZ-BAUMGARTEN, E. In Vitro Effect of Isoprinosine on Rabies Virus. **American Journal of Veterinary Research**, v.41, n.9, 1475-1478, 1980.
- HOUGHTON, P. Use of a small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sources. **Phytoterapy Research**, v.14, p.419-423, 2000.
- HOUGHTON, P. J. Medicinal plants and the control of parasites: compounds with anti-HIV activity from plants. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.90, p.601-604, 1996.
- HU, J.M.; HSIUNG, G.D. Evaluation of new antiviral agents: I. In vitro perspectives. **Antiviral Research**, v.11, n.5-6, p.217-232, 1989.
- HUDSON, J. B. **Antiviral compounds from plants**. Florida:CRC, 1990. 200p.
- INSTITUTO PASTEUR. Profilaxia da Raiva Humana. 2^a edição revisada. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, 2000.
- INSTITUTO PASTEUR.Raiva Humana, Epidemiologia, Notificação, Profilaxia. Disponível em:<http://www.pasteur.saude.sp.gov.br/informacoes/informacoes_publicacoes.htm> 2005
Acesso em: 12/01/2005.
- JACKSON, A.C.; WARRELL, M.J.; RUPPRECHT, C.E. et al. Management of rabies in humans. **Clinical Infectious Diseases**, v.36, p. 60-3, 2003.
- JACKSON, A.C.; REIMER, D.L.; WUNNER, W.H. Detection of rabies virus RNA in the central nervous system of experimentally infected mice using in situ hybridization with RNA probes. **Journal of Virological Methods**, v.25, p.1-11, 1989.
- JAHN, B.; STUBEN, A.; BHAKDI, S. Colorimetric Susceptibility Testing for *Aspergillus fumigatus*: Comparison of Menadione-Augmented 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2h-Tetrazolium Bromide and Alamar Blue Tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.8, p.2039-2041,1996.
- JASSIM, S.A.A.; NAJI, M.A. Novel antiviral agents: a medicinal plant perpectives. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.412-427, 2003.
- JAVADI, M. A.; FAYAZ, A.; MIRDEHAN, S. A.; AINOLLAHI, B. Transmission of rabies by corneal graft. **Corneal**, v.15, p. 431-433, 1996.
- JOGAI, S.; RADOTRA, B.D.; BANERJEE, A.K. Immunohistochemical study of human rabies. **Neuropathology**, v.20, p.197-203, 2000
- JOHNSON, M.K.; LOO, G. Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. **Mutation Research**, v. 459, n.3, p.211-218, 2000.

- KANE, C. J.M.; MENNA, J.H.; SUNG, C. C.; YEH, Y. C. Methyl gallate, methyl-3,4,5-trihydroxy-benzoate, is a potent and highly specific inhibitor of herpes simplex virus *in vitro*. II. Antiviral activity of methyl gallate and its derivatives. **Bioscience Reports**, v.8, n.1, p.95-101, 1988.
- KAPLAN, M.M.; COHEN, D. Studies on the local treatment of wounds for the prevention of rabies. **Bulletin of World Health Organization**. p.765-75, 1962.
- KAPLAN, G.; TURNER, G.S.; WARREL, D. **Rabies: The Facts**. Second Edition. KAPLAN, G. (ed) Oxford Medical Publications, 1986, p. 8-74.
- KAPLAN, M.M. Safety precautions in handling rabies virus. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. World Health Organization, Geneva, 1996, p3-8.
- KASEMPIMOLPORN, S.; SAENGSEESOM, W.; LUMLERTDACHA, B.; STIPRIJA, V. Detection of rabies virus antigen in dog saliva using a latex agglutination test. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p. 3098-9, 2000.
- KERNAM, M. R.; SENDL, A., CHEN, J. L.; JOLAD, S. D.; BLANC, P.; MURPHY, J.T., STODDART, C. A.; NANAKORN, W. Two new lignans with activity against influenza virus from the medicinal plant *Rhinacanthus nasutus*. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 635-637, 1997.
- KING, A. Cell culture of rabies virus. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. World Health Organization, Geneva, 1996, p.114-130.
- KLOCKGETHER, T.; TURSKI, L. Excitatory amino acids and the basal ganglia: implications for the therapy of Parkinson's disease. *Trends of Neuroscience*. v. 12, p.285-6, 1989.
- KLOCKING, R.; HELBIG, B.; SCHOTZ, G.; SCHACKE, M.; WUTZLER, P. Anti-HSV-1 activity of synthetic humic acid-like polymers derived from p-diphenolic starting compounds. **Antiviral Chemistry Chemotherapy**, v.13, n.4, p.241-249, 2002.
- KODAMA, E.; SHIGETA, S.; SUZUKI, T.; DE CLERCQ, E. Application of a gastric cancer cell line (MKN-28) for anti-adenovirus screening using the MTT method. **Antiviral Research**, v.31. p.159-164, 1996.
- KOPROWSKI, H. The mouse inoculation test. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. World Health Organization, Geneva, 1996, p.80-87.
- KORZENIEWSKI, C.; CALLEWAERT, D.M. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, v.64, p.313-320, 1983.
- KOTWAL, S.; NARAYAN, K.G. Direct immunoperoxidase test in the diagnosis of rabies – an alternative to fluorescent antibody test. **International Journal of Zoonoses**, v.12, p. 80-85, 1985
- KUO, Y. H.; LI, S.Y.; HUANG, R. L., WU, M. D.; HUANG, H.C.; LEE, K. H. Schizarin B, C, D and E, four new lignans from *Kadsura matsudai* and their antihepatitis activities. **Journal of Natural Products**, v. 64, p.487-490, 2001.

- LANCZ, G.J.; HULICK, B.A.; GRASSO, R.J.; SKINNER, L. Glucocorticoid-mediates Establishment of an Antiviral State Coincident with Other Glucocorticoid-induced Biochemical Activities in L929 Cells. **The Journal of General vVirology**, v.66, p. 2249-2252, 1985.
- LENTZ, T.L.; FU, Y.; LEWIS. Rabies virus infection of IMR-32 human neuroblastoma cells and effect of neurochemical and other agents. **Antiviral Research**, v.35, p.29-39, 1997.
- LOBNER, D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? **Journal of Neuroscience Methods**, v.96, p.147-152, 2000.
- LI, B.Q.; FU, T.; DONGYAN, Y.; MIKOVITS, J.A.; RUSCETTI, F.W.; WANG, J.M. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at level of viral entry. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.276, p.534-538, 2000.
- LIKHITWITAYAWUID, K.; SRITULARAK, B.; BENCHANAK, K.; LIPIPUM, V.; MATHEW, J.; SCHINAZI, R.F. Phenolics with antiviral activity from *Millettia erythrocalyx* and *Artocarpus lakoocha*. **Natural Products Research**, v.2, p.177-82, 2005
- LIN, Y. M.; FLAVIN, M. T.; SCHURE, R.; CHEN, F. C.; SIDWELL, R., BARNARD, D. L.; HUFFMAN, J. H.; KERN, E. R. Antiviral activities of biflavonoids. **Planta Medica**, v. 65, p. 120-125, 1999.
- LIU, K.; LIN, M.T.; LEE, S.S.; CHIOU, J.F.; REN, S.; LIEN, E.J. Ativiral tannins from two *Phyllanthus* species. **Planta Medica**, v.65, p.43-46, 1999.
- LIU, Y.; PETERSON, D. A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. **Journal of Neurochemistry**, v.69, p.581-593, 1997.
- LIU, Y.; SCHUBERT, D. Cytotoxic Amyloid Peptides Inhibit Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction by Enhancing MTT Formazan Exocitosis. **Journal of Neurochemistry**, v.69, p.2285-2293, 1997.
- LOCKHART, B.P.; TSIANG, H.; CECCALDI, P.E.; GUILLEMER, S. Ketamine-mediated inhibition of rabies virus infection in vitro and in rat brain. **Antiviral Chemistry Chemotherapy**, v.2, p.9-15, 1991
- LOCKHART, B.P.; TORDO, N.; TSIANG, H. Inhibition of Rabies Virus Transcription in Rat Cortical Neurons with Dissociative Anesthetic Ketamine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.36, no.8, p.1750-1755, 1992.
- MADHUSUDANA, S.N.; NAGARAJ, D.; UDAY, M.; RATNAVALLI, E.; KUMAR, M.V. Partial recovery from rabies in a six-year-old girl. **International Journal of Infectious Disease**. v.6, p.85-6, 2002.
- MADHUSUDANA, S.N.; SHAMSUNDAR, R.; SEETHARAMAN, S. In vitro inactivation of the rabies virus by ascorbic acid. **International Journal of Infectious Diseases**, v.8, p21-25, 2004.
- MADHUSUDANA, S.N.; SARASWATI, S. Development and evaluation of a latex agglutination test for rabies antibodies. **Journal of Clinical Virology**, v.27, p.129-135, 2003.

- MARCHETI, M.; MASTROMARINO, P.; RIETI, S.; SEGANTI, L.; ORSI, N. Inhibition of herpes simplex, rabies and rubella viruses by lecithins with different specificities. **Research in Virology**, v.146, p.211-215, 1995.
- MASIHI, K.N. Immunomodulatory agents for prophylaxis and therapy of infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.14, p.181-191, 2000.
- MATSUO, M.; SASAKI, N.; SAGA, K.; KANEKO, T. Cytotoxicity of flavonoids toward culture normal human cells. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v.28, n.2, p.253-259, 2005.
- MAZUNDER, A.; WANG, S.; NEAMATI, N.; NICKLAUS, M.; SUNDER, S.; CHEN, J.; MILNE, G.M.; RICE, W.G.; BURKE, T.R.; POMIER, Y. Antiretroviral agents as inhibitors of both human immunodeficiency virus type 1 integrase and protease. **Journal of Medical Chemistry**, v.39, n.13, p.2472-81, 1996.
- McCORMICK, J. L.; McKEE, T. C.; CARDELLINA, J.H.; BOYD, M.R. HIV inhibitory natural products. 26 Quinoline alkaloids from *Euodia roxburghiana*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 469-471, 1996.
- MEERBACH A.; NEYTS J.; BALZARINI J.; HELBIG B.; DE CLERCQ E.; WUTZLER P. *In vitro* activity of polyhydroxycarboxylates against herpesviruses and HIV. **Antiviral Chemistry Chemotherapy**, v. 12, n.6, p.337-345, 2001.
- MELO, P.S.; MARIA, S.S.; VIDAL, B.C.; HAUN, M.; DURAN, N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In vitro Cellular & Developmental Biology: Animal**, v. 36, p.639-453, 2000.
- MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. 4 ed. World Health Organization, Geneva, 1996, 476p.
- MESLIN, F.X., STÖHR, K. Prospects for immunization against rabies in developing countries. In: DODER, B., MESLIN, F.X., EDS. **Rabies control in Asia**. Paris:Elsevier , 1997, p.15-18.
- MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plants flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v.52, p.673-751, 2000.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005. Epidemiologia/ Situação Doenças – Raiva humana. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/svs/epi/situacao_doencas/situacao.htm#raiva> e <http://dtr2001.saude.gov.br/svs/epi/situacao_doencas/graficos_dnc_19_08_04.pdf>
Acesso: 08/04/05.
- MIŠAK, A. Rabies after solid organ transplantation. **Canadian Medical Association Journal**, v.171, n.4, p.327, 2004.
- MONTANHA, J.A.; AMOROS, M.; BOUSTIE, J.; GIRRE, L. Anti-herpes activity of aporphine alkaloids. **Planta Medica**, v.61, p.419-424, 1995.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

- MURATA, A.; KAWAAKI, M.; MOTOMATSU, H. KATO, F. Virus inactivating effect of D-isoascorbic acid. **Journal of Nutrition Science Vitaminology**, v.32, n.6, p.559-67, 1986.
- MURPHY, F. A. The pathogenesis and pathidopy of rabies virus infection. **Annals of Virology (Inst Pasteur)**, v.136, p. 373-386, 1985.
- MURPHY, F.A.; FAUCHET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GABRIAL, S.A.; JARVIS, G.P.; MARTELLI, M.A.; SUMMERS, M.D. – **Virus Taxonomy**. – Sixth Report. Internat. Comitee Taxon. Vir., Springer – Verlagwiee, New York, p. 14-22, 1995.
- MURPHY, F.A.; HARRISON, A.K.; WINN, W.C.; BAUER, S.P. Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses. Infection of the CNS and antrifugal spread of virus to peripheral tissues. **Laboratory Investigation**, v.29, p.1-16, 1973.
- NARDONE, R. M. Toxicity testing *in vitro*. In: ROTBBLAT, G. H.; CRISTOFALO, V. J. (Ed). **Growth, nutrition and metabolism of cells in culture**. New York: Academic, 1977. p.471-495.
- NATARAJAN, M.; MOHAN, S.; MARTINEZ, B.R.; MELTZ, M.L.; HERMAN, T.S. Antioxidant compounds interfere with the 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide citotoxicity assay. **Cancer Detection and Prevention**, v.24, p.405-414, 2000.
- NIELSEN, J. Combinatorial synthesis of natural products. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.6, p297-305, 2002.
- NOGUEIRA, Y. L. Rabies in McCoy cell line. Part I- Cytopathic effect and replication. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.52, (1/2), p.9-16, 1992.
- NOGUEIRA, Y. L.; AMARAL, C.F.C.Rabies in McCoy cell line. Part II- Titration. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.52, (1/2), p.9-16, 1992.
- OW Y.Y.; STUPANS I. Gallic acid and gallic acid derivatives: effects on drug metabolizingenzymes. **Current Drug Metabolism**, v.4, n.3, p.241-248, 2003.
- PASTEUR, L. Methode pour prevenir la rage apres morsure. **C.R. Acad. Sci.**, v.101, p.165-172, 1885.
- PASTEUR, L. Nouveaux Faits Pour Servier a la Connaissance de la Rage. **C.R. Acad. Sci.**, v.95, p.1187, 1882.
- PASTEUR, L.; CHAMBERLAND, C.E.; ROUX, M. Novuelle Communication sur la Rage. **C.R. Acad. Sci.**, v. 98, p.457, 1884.
- PERRIN, P.; ROLLIN, P.E.; SUREAU, P. A rapid rabies enzyme immuno-diagnosis (RREID): a useful and simple technique for the routine diagnosis of rabies. **Journal of Biological Standartization**, v.14, p.217-22, 1986.
- PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v.63, p.1035-1042, 2000.

- PIETROPAOLO, V.; SEGANTI, L.; MARCHETTI, M.; SINIBALDI, L.; ORSI, N.; NICOLETTI, R. Effect of natural and semisynthetic polymers on rabies virus infection in CER cells. **Research in Virology**, v.144, p.151-158, 1993.
- POPSAVIN, M.; TOROVIC, L.; SPAIC, S.; STANKOV, S.; KAPOR, A.; TOMIC, Z.; POPSAVIN, V. Synthesis and biological evaluation of new pyrazole- and tetrazole-related C-nucleosides with modified sugar moieties. **Tetrahedron**, v.58, p.569-580, 2002.
- PORRAS, C.; BARBOZA, J.J.; FUENZALIDA, E.; ADAROS, H.L.; OVIEDO, A.M.; FURST, J. Recovery from rabies in man. **Annals of Internal Medicine**, v.85, p.44-8, 1976.
- REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Hygiene**, v.27, p.493-497, 1938.
- ROBIN, V.; BOUSTIE, M.; AMOROS, M.; GIRRE, L. *In vitro* antiviral activity of seven *Psiadia* species, Asteraceae: isolation of two antipoliiovirus flavonóides from *Psiadia dentate*. **Pharmaceutical Pharmacological Communications**, v.4, p-61-64, 1998.
- RUPPRECHT, C.E.; HALON, C.A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **The Lancet Infectious Disease**, v.2, p.327-43, 2002.
- SACRAMENTO, D.; BOURHY, H.; TORDO, N. PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. **Molecular and Cellular Probes**, v.5, p.229-40, 1991.
- SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. *In*: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis : Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC, 2003. 1102p., p. 615-656.
- SAVI, L. A. **Avaliação da genotoxicidade e das atividades anti-herpética e antioxidante de compostos fenólicos**. 2004. 128f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- SAVI, L.A.; LEAL, P.C.; VIEIRA, T. O.; ROSSO, R.; NUNES, R.J.; YUNES, R.A.; PASA-CRECYNSKI, T.B.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C.M.O. Evaluation of Anti-herpetic and Antioxidant Activities, and Cytotoxic and Genotoxic Effects of Synthetic Alkyl-Esters of Gallic Acid. **Arzneimittelforschung**, v.55, n.1, p.66-75, 2005.
- SAXENA, S.N.; MADHUSUDANA, S.N.; TRIPATHI, K.K.; GUPTA, P.; AHUJA, S. Evaluation of the new rapid rabies immunodiagnosis technique. **The Indian Journal of Medical Research**, v.89, p. 445-8, 1989.
- SERKEDJIEVA, J. Combined antiinfluenza virus activity of Flos verbasci infusion and amantadine derivatives. **Phytotherapy Research**, v.14, p.571-574, 2000.
- SERKEDJIEVA, J.; HAY, A. J. *In vitro* anti-influenza virus activity of a plant preparation from *Geranium sanguineum* L. **Antiviral Research**, v.37, p121-130, 1998.
- SHAHAT, A.A.; COS, P.; DE BRUYNE, APERS, S.; HAMMOUDA, F.M.; ISMAIL, S.I.; AZZAM, S.; CLAEYS, M.; GOOVAERTS, E.; PEITERS, L.; VANDEN BERGHE, D. VLIETINCK, A.J. Antiviral and antioxidant activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sianica*. **Planta Medica**, v. 68, n.6, p.539-541, 2002.

- SHOEMAKER, M.; COHEN, I.; CAMPBELL, M. Reduction of MTT by aqueous herbal extracts in the absence of cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v.93, p.381-384, 2004.
- SIDWELL, R.W. Determination of antiviral activity. **Drugs Pharmaceutical Science**, v.27, p. 433-480, 1986.
- SIEUWERTS, A.; KLIJN, J.G.M.; PETERS, H.A.; FOEKENS, J.A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures *in vitro* for the assessment of growth characteristics, IC₅₀ – values and cell survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 33, p. 813-23, 1995.
- SILVA, J.; HERRMANN, S.M.; HEUSER, V.; PERES, W.; POSSA MARRONI, N.; GONZÁLES-GALLEGO, J.; ERDTMANN, B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, p.941-947, 2002.
- SIMÕES, C. M. O.; AMOROS, M.; GIRRE, L. Mechanisms of antiviral activity of triterpenoid saponins. **Phytotherapy Research**, v. 21. p. 317-325, 1999.
- SIMÕES, C. M. O.; AMOROS, M.; GIRRE, L.; GLEYE, J.; FAUVEL, M.T.H. Antiviral activity of ternatin and meliternatin, 3-methoxyflavones from species of Rutaceae. **Journal of Natural Products**, v.53, p.989-992, 1990.
- SMÂNIA JR, A.; MARQUES, C. J. S.; ZANETTI, C. R.; CAROBREZ, S. G.; TRAMONTE, R.; LOGUERCIO-LEITE, C. Toxicity and antiviral activity of cinnarabin obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Phytotherapy Research**, v. 17. p.317-325, 2003.
- SMEE, D. F.; MORRISON, A.C.; BARNARD, D.L.; SIDWELL, R.W. Comparison of colorimetric, fluorimetric, and visual methods for determining anti-influenza (H1N1 and H3N2) virus activities and toxicities of compounds. **Journal of Virological Methods**, v.106, p.71-79, 2002.
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**. 3.ed. New York: W.H. Freeman, 1995. 850p.
- SOKOL, F.; STANCEK, D.; KOPROWSKI, H. Structural proteins of rabies virus, **Journal of Virology**, v. 7, p. 241-9, 1971.
- SRINIVASAN, A.; BURTON, E.C.; KUEHNERT, M. J.; RUPPRECHET, C.; SUTKER, W.L.; KIAZEK, T.G. et al. Transmission of Rabies Virus from an Organ Donor to Four Transplant Recipients. **The New England Journal of Medicine**, v.352, p.1103-1111, 2005.
- STANTIC- PAVLINIC, M.; BANIC, S.; MARIN, J.; KLAMENC, P. Vitamin C- A challenge in the management of rabies. **Swiss Medical Weekly**, v.134, p.326-7, 2004.
- STEELE, J.H.; FERNANDEZ, P.J. History of Rabies and Global Aspects. In: BAER, G. M. **The Natural History of Rabies**, 2nd Edition, New York, Academic Press, 1991. p.1-24.
- STREISSLE, G.; SCHWOBEL, W.; HEWLETT, G. Evaluation of antiviral compounds in cell cultures with acute or persistent virus infection. **Advanced Cell Culture**, v. 1, p. 67-90, 1981.
- SUDO, K.; KONNO, K.; YOKOTA, T.; SHIGETA, S. A sensitive assay system for screening antiviral compounds against herpes simplex virus type 1 and type 2. **Journal of Virological Methods**, v.49. p.169-178, 1994.

- TAKEUCHI, H.; BABA, M.; SHIGETA, S. An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. **Journal of Virological Methods**, v. 33, p. 61-71, 1991.
- TILLEKERATNE, L.M.V.; SHERETTE, A.; FULMER, J.A.; HUPE, L.; HUPE, D.; GABARRA, S.; PELISKA, J.A.; HUDSON, R.A. Differential Inhibition of Polimerase and Strand-Transfer Activities of HIV-1 Reverse Transcriptase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v.12, p.525-528, 2002.
- TOYOKUNI S.; TANAKA T.; KAWAGUCHI W.; FANG N.R.; OZEKI M.; AKATSUKA S.; HIAI H.; ARUOMA O.I.; BAHORUN T. Effects of the phenolic contents of Mauritian endemic plant extracts on promoter activities of antioxidant enzymes. **Free Radical Research**, v.37, n.11 p.1215-1224, 2003.
- TORDO, N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. World Health Organization, Geneva, 1996, 28-51.
- TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G. Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies virus genome; segmented homology with VSV. **Nucleic Acids Research**, v.14, p. 2671-83, 1986a
- TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G.; ROUGEON, F. Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polimerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA-viruses, **Virology**, v. 165, p.565-76, 1988.
- TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G.; ROUGEON, F. Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remmant gene? **Proceedings of the National Academy Sciences (USA)**. v.83, p.3914-8, 1986b.
- TSIANG; H.; CECCALDI, PE.; ERMINE, A.; LOCKHART, B.; GUILLEMER, S. Inhibition of Rabies Virus Infection in Cultured Rat Cortical Neurons by N-Methyl-D-Aspartate Noncompetitive Antagonist, MK-801. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.35, n.3, p.572-574, 1991.
- TURAN, K.; NAGATA, K.; KURU, A. Antiviral effect of Sanicula europaea L. leaves extract on Influenza virus-infected cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.225, p.22-26, 1996.
- UBOL, S.; HIRIOTE, W.; ANUNTAGOOL, N.; UTAISINCHAROEN, P. A radical form of nitric oxid suppresses RNA synthesis of rabies virus. **Virus Research**, v. 81, p.125-132, 2001
- UNTCH, M.; SEVIN, B.U.; PERRAS, J.P.; ANGIOL, R.; UNTCH, A., HIGHTOWER, R.D.; KOECHLI, O., AVERETE, H.E. Evaluation of paclitaxel (taxol), cisplatin, and the combination paclitaxel-cisplatin in ovarian cancer in vitro with the ATP cell viability assay. **Gynecology Oncology**, v.53, n.1, p.44-49, 1994.
- VANDEN BERGUE, D.A.; VLIETNCK, A.J.; VAN HOOFF, L. Plant products as potential antiviral agents. **Bulletin de l'Institut Pasteur**, v.84, p.101-105, 1986.

- VANDEN BERGUE, D.A.; VLIETNCK, A.J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. (eds) **Methods in Plant Biochemistry**. v.6 – Assays for bioactivity. London: Academic, 1991. p.47-69.
- VAN DER HEIJDEN C.A.; JANSSEN P.J.; STRIK J.J. Toxicology of gallates: a review and evaluation. **Food and Chemical Toxicology**, v.24, n.10-11, p.1067-1070, 1986.
- VIERA, S.; HOSSNE, W.S. Capítulo 1 um pouco de história. In: **Pesquisa médica: A ética e a metodologia**. Op. Cit., Refs. 6, 7, 8, 9. Pioneira, São Paulo, 1998. p.10-13.
- VISTICA, D. T.; SKEHAN, P.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; PITTMAN, A.; BOYD, M.R. Tetrazolium-based Assays for Cellular Viability: A Critical Examination of Selected Parameters Affecting Formazan Production. **Cancer Research**, v.51, p.2515-2520, 1991.
- VLIETINCK, A. J.; DE BRUYNE, T.; VANDEN BERGUE, D. A. Plant substances as antiviral agents. **Current Organic Chemistry**, v. 1, p. 307-344, 1997.
- VLIETINCK, A. J.; VANDEN BERGUER, D. A. Can ethnopharmacology contribute to the development of antiviral drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v.32, p. 141-53, 1991
- WARNER, C.K.; WHITFIELD,, S.G.; FEKADU, M.; HO. H. Procedures for reproducible detection of rabies virus antigen mRNA and genomic in situ in formalin-fixed tissues. **Journal of Virological Methods**, v. 67, p.5-12, 1997
- WARRELL, M.J.; WARRELL, D.A. Rabies and other lyssavirus diseases. **The Lancet**, v.363, p.959-69, 2004.
- WEBSTER, W.A.; CASEY, G.A. Virus isolation in neuroblastoma cell culture. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. 4 ed. World Health Organization, Geneva, 1996, 96-104.
- WHITE, D.O.; FENNER, F.J. **Medical Virology**. 4 ed. San Diego: Academic, 1994
- WHITFIELD, S.G.; FEKADU, M.; SHADDOCK, J.H.; NIEZGODA, M.; WARNER, C.K., MESSENGER, S.L. A comparative study of the fluorescent antibody test for rabies diagnosis in fresh and formalin-fixed brain tissue specimens. **Journal of Virological Methods**, v. 95, p145-51, 2001.
- WIKTOR, T.J.; GYORGY, E., SCHLUMBERGER, H.D.; SOKOL, F., KOPROWSKI, H. Antigenic properties of rabies virus components. **Journal of Immunology**, v.110, p.269-276, 1973.
- WILDE, H.; CHOOMKASIEN, P.; HEMACHUDHA, T.; SUPICH, C.; CHUTIVONGSE, S. Failure of rabies post-exposure treatment in Thailand. **Vaccine**, v.7, p.49-52, 1989.
- WILKINSON, L. History. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**. New York, Academic Press, 2002, 1: 23-77.
- WILSON, A.P. Cytotoxicity and viability assays. In: MASTERS, J. R. W. **Animal Cell Culture**. 3rd. ed. Oxford University, 2000. p. 175-219.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Expert Committee on Rabies. VII report. Technical Report Series 824, WHO, Geneva, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Suggestions for development of a research project for the field evaluation of several vaccine-bat delivery techniques to vaccinate dogs orally against rabies. Switzerland, WHO technical Report Series, World Health Organization, p.1-39, 1994

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005. Rabies Incidence. Disponível em : <<http://www.who.int/rabies/epidemiology/en/>> Acesso em: 12/01/05.

WUNNER, W. H. Rabies Virus. In: JACKSON, A . C. & WUNNER,H. – **Rabies**. New York, Academic Press, 1: 1-22, 2002.

WUNNER, W. H.; PALLATRONI,C.; CURTIS, P.J. Selection of genetic inhibitors of rabies virus. **Archives of Virology**, v.149, p.1653-1662, 2004.

YAMAMOTO, K.; KITANO, T.; ARAI, Y. T.; YOSHII, K. HASOBE, M.; SANEYOSHI, M. Inhibitory effect a new antibiotic, guanine 7 - N – oxide, on the replication of several RNA viruses. **Antiviral Research**, v.14, p.173-178, 1990.

YOSHIDA, T.; ITO, H.; HATANO, T.; KURATA, M.; NAKANISHI, T.; INADA, A.; MURATA, H.; INATOMI, H. New hydrolysable tannins, shephagenins A and B, from *Shepherdia argentea* as HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** (Tokyo), v.44, p.1436-1439, 1996.

ZANETTI, C. R. **Avaliação da imunidade celular anti-rábica, induzida pela vacinação, através da dosagem de interleucina-2**, 1994, 151p.Tese. (Doutorado em Ciências) Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

ZENEBE W, PECHANOVA O. Effects of red wine polyphenolic compounds on the cardiovascular system. **Bratisl Lek Listy**, v.103, n.4-5, p.159-165, 2002.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.) **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis : Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC, 2003. 1102p., p. 577-614.