

IMUNOGENICIDADE DA CEPA AVIRULENTE RV194-2 DO VÍRUS RÁBICO EM CAMUNDONGOS

Rugimar Marcovistz, Eduardo Chaves Leal, Denise Cristina S. de Matos,
Humberto Pinheiro de Araújo e Henri Tsiang

O vírus rábico RV194-2, uma variante avirulenta da cepa CVS (Challenge Virus Standard), produz uma infecção inaparente quando inoculado intracerebralmente em camundongos adultos. Sugerindo que a resposta imunológica do hospedeiro permite a eliminação do vírus do sistema nervoso central. Por esta razão foram estudadas a indução de interferon e a resposta imune humoral em camundongos BALB/c inoculados com vírus RV194-2. Durante a infecção, estes camundongos apresentaram elevados níveis de interferon no plasma e no cérebro com altos títulos de anticorpos neutralizantes anti-rábicos. A 2-5A sintetase, um marcador da ação dos interferons, foi também analisada no cérebro destes animais. Sua atividade, aumentou, paralelamente, à produção de interferon, demonstrando que este interferon é bioquimicamente ativo. O vírus RV194-2 também induziu, 45 dias após sua inoculação, proteção aos animais quando desafiados com a cepa virulenta CVS. Estes resultados demonstram que a cepa RV194-2 possui um alto nível imunogênico.

Palavras-chaves: Vírus rábico. Interferon. Imunogenicidade.

Durante muito tempo, com base em testes imunológicos convencionais, todas as cepas de vírus rábico eram consideradas antigênicamente semelhantes²⁵. Contudo, diferenças antigênicas entre as cepas de vírus fixo e as cepas de vírus de rua ou selvagem foram facilmente detectadas, utilizando anticorpos monoclonais contra a glicoproteína do vírus rábico^{10,26}.

O emprego destes anticorpos monoclonais antiglicoproteína possibilitou a seleção *in vitro* de cepas avirulentas variantes do vírus fixo CVS¹⁸. Dentre estas cepas variantes avirulentas, uma demonstrou ser incapaz de reagir com dois anticorpos monoclonais antiglicoproteína do CVS (anticorpos nº 248-8 e 194-2), sendo então, denominada de RV194-2. Sua avirulência foi caracterizada pela ausência de mortalidade de camundongos Suíços, quando inoculados por via intracerebral.

Dietzschold e col⁸ estudando a molécula da glicoproteína do vírus RV194-2 observou que a

simples substituição de um aminoácido na posição 333 (Arg → Ile ou Gln) era essencial para a integridade de um determinante antigênico e responsável pela capacidade do vírus de produzir infecção não letal em camundongos. Posteriormente, Tuffereau e col²⁴ confirmaram que a substituição da arginina, na posição 333, na molécula da glicoproteína de variantes avirulentas derivadas dos vírus CVS e ERA, era fundamental para a avirulência dessas cepas.

Vários autores tem utilizado essas variantes, como uma ferramenta no estudo das características biológicas envolvidas na neurovirulência do vírus rábico^{7,18}. Recentemente, Jackson¹⁷ demonstrou que os vírus CVS e sua variante avirulenta RV194-2 disseminam-se igualmente no SNC de camundongos, entretanto, o CVS era capaz de infectar um número maior de neurônios do que o RV194-2.

Nosso trabalho teve como objetivo estudar a imunogenicidade do vírus RV194-2 em camundongos BALB/c através da indução de interferon, da produção de anticorpos neutralizantes anti-rábicos e da proteção destes animais contra a cepa parental virulenta (CVS) usada como desafio.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais. Utilizamos camundongos BALB/c (idade de 6 semanas), fornecidos pelo Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz.

Departamento de Imunologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. Service Rage, Institut Pasteur, Paris, França.

Financiado pelo CNPq e Commission of European (contrato no. TS2 190).

Endereço para correspondência: Dra. Rugimar Marcovistz, Serviço de Controle de Qualidade, Instituto Butantan. Av. Brasil 1500, Butantan 05503-900, São Paulo, Brasil.

Recebido para publicação em 01/09/95.

Células. As linhagens de células empregadas foram: L-929 (células epiteliais murinas), BHK21 (baby hamster kidney) e CER (chick embryo-related), cultivadas em meio mínimo de Eagle (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB).

Vírus. Foram utilizadas duas cepas de vírus rábico: a cepa de vírus fixo, CVS, adaptada em camundongos e em células BHK21 e sua variante, avirulenta RV194-2, adaptada em células BHK21. As amostras originais destas cepas foram fornecidas pelo Serviço de raiva do Instituto Pasteur de Paris, França.

A cepa de vírus da encefalomiocardite murina (EMC) adaptada em células L929 foi fornecida pela Dra. Claire Kubelka (Dept^o de Virologia, Instituto Oswaldo Cruz).

Dosagem de anticorpos anti-rálicos. Os camundongos foram sangrados através de punção no plexo retroorbital, as amostras de sangue foram colocadas em tubos contendo heparina (100U/ml) e o plasma separado por centrifugação. O método de inibição do foco de fluorescência, em cultura de células BHK21, foi utilizado para a dosagem de anticorpos anti-rálicos²³.

Diluições seriadas do plasma (1:2 a 1:1024) foram feitas em microplacas de 96 orifícios. A cada 25µl das diluições do plasma foi adicionado igual volume de uma suspensão de vírus CVS (adaptado em células BHK21 e previamente titulado) e 80µl de diluente (MEM com 5% de SFB). Após incubação de 1 hora a 36°C, em ambiente de CO₂ (5%), 50µl de uma suspensão de células BHK21 (10⁶cel/ml) foram adicionados. Um volume de 10µl da mistura plasma, vírus e células foi transferido para placa de Terasaki. Após incubação a 36°C durante 24 horas, as células foram lavadas com solução salina tamponada (PBS contendo Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺) e fixadas em acetona (80%) durante 1/2 hora a 4°C. Em seguida, o conjugado antinucleocapsídeo rábico (5µl/orifício), marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Diagnostic Pasteur, França), foi adicionado e após incubação por 30 minutos a 37°C e as células foram lavadas duas vezes com PBS. As placas secas foram examinadas ao microscópio de fluorescência.

Em paralelo, foi também titulado um soro de referência contendo 350 UI, fornecido pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS-FIOCRUZ). Os títulos de anticorpos,

expressos em unidades internacionais, foram determinados a partir do inverso das diluições de plasmas capazes de inibir 50% da replicação viral nas células BHK.

Extrato cerebral. Cérebros congelados foram macerados e homogeneizados em 2ml de uma solução tampão hipotônica, contendo 10mM de HEPES (pH 7,6), 10mM de KCl, 2mM de Mg(OAc)₂, 7mM de 2-β-mercaptoetanol e aprotinina a 100 U/ml. Estes homogenatos foram deixados por 15 minutos a 4°C antes da adição de NP40 na concentração final de 0,5%. Cada suspensão foi, então, sonicada por 10 segundos e centrifugada a 1500g por 20 minutos¹³. Os extratos dos cérebros foram guardados a -70°C para posterior avaliação da atividade da 2-5A sintetase.

Atividade de 2-5A sintetase. Os extratos de cérebro (200µl) foram colocados para reagir com 400l de uma solução tampão hipotônica, contendo 20mM de HEPES (pH 7,6), 50mM de KCl, 25mM de Mg(OAc)₂, 7mM de 2-β-mercaptoetanol, 5mM de ATP, 10mM de fostato de creatinina, 0,16mg/ml de creatina kinase, 0,1mg/ml de poly(I).poly(C) e 20µl de 3H-ATP (0,1mCi/ml) (Amershan, Inglaterra). A mistura foi incubada a 30°C por 90 minutos e em seguida por 5 minutos a 80/90°C. As moléculas de 2-5A resultantes da ativação da 2-5A sintetase, foram purificadas por cromatografia em colunas de DEA-celulose e as amostras colocadas em frascos contendo líquido de cintilação. A contagem em cpm foi feita em analisador (Beta) de líquido de cintilação (PACKARD, Modelo: 1600 TRI-CARB) e a taxa de 2-5A sintetase foi expressa em nmol de AMP, incorporado na molécula de 2-5A por mg de proteína por 60 minutos.

Titulação de interferon. A atividade interferogênica no plasma e no cérebro (extrato cerebral sem NP40 e 2-β-mercaptoetanol) foi medida pela inibição do efeito citopático do vírus EMC sobre as células L-929¹³.

Microplacas de 96 orifícios, contendo diluições seriadas (1:2 a 1:1024) do plasma ou extrato cerebral foram expostas à luz ultra violeta, por 30 minutos. Em seguida, a cada diluição foi adicionado igual volume de uma suspensão de células L-929 (5,0 x 10⁴ cél/orifício) e as microplacas incubadas por 24 horas a 37°C em ambiente de CO₂ (5%). Após esse período, as células foram infectadas com

100 TCID₅₀ do vírus EMC e reincubadas a 37°C em ambiente de CO₂ (5%) por mais 24 horas.

O título do interferon foi dado pelo inverso da diluição das amostras testadas que apresentaram 50% de efeito citopático causado pelo EMC.

Dosagem de proteínas. As proteínas dos extratos de cérebros foram dosadas com base na diferença de absorvância a 235 e 280nm²⁸.

Efeito protetor. Três grupos de 24 camundongos BALB/c foram inoculados com 50µl de uma suspensão do vírus RV194-2, por via intracerebral, nas concentrações de 100, 1.000, 10.000 PFU. Um outro grupo também com 24 camundongos, foi inoculado com PBS (50µl/animal), por via intracerebral. Duas semanas após a inoculação, cada um dos grupos citados foi subdividido em dois grupos de 12 animais e desafiados, intracerebralmente, com a cepa CVS nas concentrações de 30 e 100 DL₅₀, respectivamente. Os animais foram observados, quanto o aparecimento de sintomas da raiva, durante 30 dias após o desafio.

RESULTADOS

Título de anticorpos anti-rábicos, indução de interferon e atividade da 2-5 A sintetase. A Tabela 1 mostra os resultados do título de anticorpos neutralizantes anti-rábicos, da presença de interferon no plasma e no cérebro, assim como, a atividade da 2-5 A sintetase no cérebro de camundongos inoculados com o vírus RV194-2.

Tabela 1 - Título de anticorpos anti-rábicos, indução de interferon e atividade da 2-5A sintetase no plasma e no cérebro de camundongos inoculados com vírus RV194-2.

Dias após inoculação	Plasma		Cérebro	
	AcN U/ml	IFN U/ml	IFN U/mg de ptn	2-5A nmol/mg/h
C	0	≤ 40	≤ 40	0,30
2	0,67	2560	2560	1,10
4	2,67	2560	≥ 5120	2,00
8	68,13	1280	640	1,15
12	204,00	320	320	1,00
16	204,00	≤ 40	≤ 40	0

Um grupo de 15 camundongos BALB/c foi inoculado com o vírus RV194-2 por via intracerebral (100 PFU/animal). Cada resultado representa a média aritmética de três animais; AcN = anticorpos neutralizantes; IFN = interferon; C = indica os valores obtidos a partir de animais inoculados somente com PBS (controle).

Os anticorpos neutralizantes circulantes foram detectados a partir do 2º dia após a inoculação do vírus e o título aumentou progressivamente até o 12º dia, mantendo-se a seguir constante até o dia 16, quando o experimento foi encerrado.

A presença de interferon no plasma e no cérebro aumentou a partir do 2º dia, decrescendo a partir do 8º dia.

A indução da 2-5 A sintetase ocorreu em paralelo à produção de interferon no cérebro, mostrando um pico máximo de sua atividade no 4º dia após a inoculação do vírus, com uma queda gradativa a partir do dia 8.

Efeito protetor. A Tabela 2 mostra o efeito do vírus rábico RV194-2 na indução da resistência de camundongos BALB/c quando desafiados com a cepa CVS.

Tabela 2 - Efeito protetor do vírus RV194-2 em camundongos BALB/c.

Concentração do vírus RV194-2	Taxa de sobrevivência (%)	
	Vírus desafio (CVS)	
	30 DL ₅₀	100 DL ₅₀
0	2/12 (16,7)	0/12 (0)
100	12/12 (100)	12/12 (100)
1.000	12/12 (100)	12/12 (100)
10.000	12/12 (100)	12/12 (100)

Três grupos de 24 camundongos BALB/c foram inoculados com 50µg de uma suspensão do vírus RV194-2 por via intracerebral nas concentrações de 100, 1.000, 10.000 PFU. Duas semanas após a inoculação, cada um dos três grupos foi subdividido em dois grupos de 12 animais e desafiados intracerebralmente com a cepa CVS nas concentrações de 30 e 100 DL₅₀, respectivamente. Os animais foram observados durante 30 dias após o desafio. 0 = Representa o grupo de animais inoculados com PBS e desafiados com o vírus CVS.

Os três grupos de camundongos inoculados com diferentes concentrações (100, 1.000 e 10.000 PFU) de vírus foram 100% protegidos quando desafiados com 30 e 100 DL₅₀ de vírus CVS por via intracerebral.

O grupo de animais controle inoculados somente com 30 e 100 DL₅₀ de vírus CVS (desafio) tiveram uma mortalidade de 83,7 e 100%, respectivamente.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que os camundongos BALB/c, inoculados por via intracerebral com o vírus avirulento RV194-2, apresentaram altos títulos de interferon e de anticorpos anti-rábicos neutralizantes, além da proteção contra o vírus parental virulento, CVS.

A produção de interferon é uma das primeiras defesas do organismo consequente de uma infecção viral^{11 14 15 21} e a importância de seu papel, em diferentes modelos animais infectados com vírus rábico tem sido bem documentada¹⁹. Em concordância com esses dados, também encontramos altas taxas de interferon no plasma e no cérebro dos animais

inoculados com o vírus RV194-2. Além disso, a 2-5A sintetase, um dos marcadores da presença e ação do interferon em um organismo e em culturas de tecidos^{3 13}, aumentou sua taxa paralelamente à do interferon produzido no cérebro dos animais inoculados com o vírus RV194-2. Esses resultados evidenciam que o interferon produzido nos animais infectados com o vírus RV194-2 é tão ativo quanto o produzido em resposta à infecções por cepas virulentas²⁰.

Estudo imunohistoquímico realizado por Dietzschold e col⁹ mostrou que o vírus CVS disseminou mais rápido do córtex para o cerebelo e infectou mais neurônios do que o vírus RV194-2, no SNC dos animais. Posteriormente, resultados semelhantes mostrando reduzida capacidade da replicação do vírus RV194-2 no SNC dos animais. Posteriormente, resultados semelhantes mostrando a capacidade da replicação do vírus RV194-2 no SNC de camundongos, quando comparada com a cepa CVS, também foram observados por outros pesquisadores^{7 16 17 18}. Essa menor eficiência da disseminação do vírus RV194-2 no SNC, provavelmente, permite um maior tempo de exposição das partículas virais ou antígenos virais às células do sistema imune, e em parte, explicaria os altos títulos de anticorpos anti-rábicos encontrados no plasma dos camundongos BALB/c inoculados com o vírus RV194-2.

Por outro lado, o vírus RV194-2 mostrou-se altamente imunogênico, induzindo proteção aos camundongos quando desafiados com o vírus CVS. Esta proteção, certamente, foi devida aos altos níveis de anticorpos e de interferon encontrados nos animais inoculados com o vírus RV194-2. É importante notar que vários autores têm demonstrado a importância dos interferons como imunomoduladores na evolução da infecção rábica^{21 22}, e na eficácia de vacinas anti-rábicas^{1 2}.

Os resultados aqui apresentados sugerem que a cepa RV194-2 pode ser um excelente instrumento para os estudos sobre a interação dos sistemas nervoso e imunitário, e talvez uma promissora candidata para estudos de novas vacinas.

SUMMARY

RV194-2 rabies virus, an avirulent mutant of CVS strain, induces an inapparent infection limited

to the central nervous system (CNS) in adult mice inoculated intracerebrally. This fact suggest that immune response of the host is able to eliminate the virus in CNS. For this reason, we have studied the induction of interferon and the humoral immune responses in BALB/c mice after RV194-2 inoculation. These mice presented high levels of interferon in the plasma and in the brain, with elevated levels of neutralizing antirabies antibodies. The 2-5A synthetase, an enzyme marker of interferon action, was analyzed in the brain of inoculated animals. Its enhancement in parallel to the interferon production in the brain, showed biochemical evidence that this interferon is active. Forty five days after RV194-2 virus inoculation, mice were protected against a challenge with the CVS virulent strain. The results presented herein show that RV194-2 strain has a high level of immunogenicity.

Key-words: Rabies virus. Interferon. Immunogenicity.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Atanasiu P. Role de l'interferon dans l'immunité antirabique. *Compendium of Immunology and Microbiology of Infectious Diseases*. 5:123-127, 1982.
2. Baer GM, Yager PA. A mouse model for rabies post-exposure rabies prophylaxis. Comparative efficacy of vaccine and the antiserum administration. *Journal of General Virology* 36:51-57, 1977.
3. Buffet-Janvresse C, Magared H, Robert N, Hovanessian AG. Assay and levels of 2-5A synthetase in lymphocytes of patients with viral, bacterial and auto immune diseases. *Annales de Immunologie (Institut Pasteur)* 134D:247-258, 1983.
4. Coulon P, Derbin C, Kucera P La Fay F, Prehaud C, Flamand A. Invasion of the peripheral nervous system of adult mice by the CVS strain of rabies virus and avirulent derivative AQV01. *Journal of Virology* 63:3550-3554, 1989.
5. Coulon P, Rollin P, Aubert M, Flamand A. Molecular basis of rabies virulence. I. Selection of avirulent mutants of the CVS strain of rabies virus with anti-G monoclonal antibodies. *Journal of General Virology* 61:97-100, 1982a.
6. Coulon P, Rollin P, Blancou J, Flamand A. Avirulent mutant of CVS strain of rabies virus. *Compendium of Immunology and Microbiology Infectious Disease* 5:117-122, 1982b.

7. Coulon P, Rollin P, Flamand A. Molecular basis of rabies virulence. II. Identification of a site on the CVS glycoprotein associated with virulence. *Journal of General Virology* 64:693-696, 1983.
8. Dietzschold B, Wiktor TJ, Trojanowski JQ, Macfarlan RI, Wunner WH, Torres-Angel MJ, Koprowski H. Differences in cell-to-cell spread of pathogenic and apathogenic rabies virus *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Virology* 56:12-18, 1985.
9. Dietzschold B, Wunner WH, Wiktor TJ, Lopes AD, Lafon M, Smith CL, Koprowski H. Characterization of an antigenic determinant of glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. *Proceedings of National Academy of Sciences* 80:70-74, 1983.
10. Flamand A, Wiktor TJ, Koprowski H. Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies related virus protein. II. The glycoprotein. *Journal of General Virology* 48:105-109, 1980.
11. Galabru J, Robert N, Buffet-Janvresse C, Rivière YL, Hovanessian AG. Continuous production of interferon in normal mice: Effect of anti interferon globulin, sex, age, strain and environment on the levels of 2-5A synthetase and pG7k kinase. *Journal of General Virology* 66:711-718, 1985.
12. Hillman MR. Interferon induction and utilization. *Journal of Cell Physiology* 71:43-60, 1968.
13. Hovanessian AG, Rivière Y. Interferon-mediated induction of 2-5A synthetase and protein in the liver and spleen of mice infected with New Castle disease virus as injected with poly (D). poly (C). *Annales de Virologie (Institut Pasteur)* 131E:501-516, 1980.
14. Isaacs A, Burke DC. Viral interference and interferon. *Virology* 15:185-188, 1959.
15. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. the interferon. II. Some properties of interferon. *Proceedings of Royal Society of Medicine* 147B:258-267, 1957.
16. Jackson AC. Biological basis of rabies virus neurovirulence in mice: Comparative pathogenesis study using the immunoperoxidase technique. *Journal of Virology* 65:537-540, 1991.
17. Jackson AC, Reimer DL. Pathogenesis of experimental rabies in mice: an immunohistochemical study. *Acta Neuropathologica* 78:159-165, 1989.
18. Kucera P, Dolivo M, Coulon P, Flamand A. Pathways of the early propagation of virulent and avirulent rabies strain from the eye to the brain. *Journal of Virology* 55:158-162, 1985.
19. Lodmell DL, Wildbrink DL, Ewalt LC. Interferon induced within the central nervous system during infection is consequential as a mechanism responsible for murine resistance to street rabies virus. *Journal of General Virology* 70:473-478, 1989.
20. Marcovitz R, Galabru J, Tsiang H, Hovanessian AG. Neutralization of interferon produced early during rabies virus infection in mice. *Journal of General Virology* 67:387-390, 1986.
21. Marcovitz R, Germano PML, Tsiang H, Hovanessian AG. The effect of interferon treatment in rabies prophylaxis in immunocompetent, immunosuppressed and immunodeficient mice. *Journal of Interferon Research* 7:17-27, 1987.
22. Marcovitz R, Tsiang H, Hovanessian AG. Production and action of interferon in mice infected with rabies virus. *Annales de Virologie (Institut Pasteur)* 135E:19-33, 1984.
23. Reagan KJ, Wunner WH, Wiktor TJ, Koprowski H. Anti-idiotypic antibodies induce neutralizing antibodies to rabies virus glycoprotein. *Journal of Virology* 48:660-666, 1983.
24. Tuffereau C, Lebois H, Benejean J, Coulon P, Lafay F, Flamand A. Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice. *Virology* 172:206-212, 1989.
25. Wiktor TJ, Clark HF. Comparison of rabies virus strains by means of plaque reduction test. *Annales de Microbiologie (Institut Pasteur)* 124A:283-287, 1973.
26. Wiktor TJ, Koprowski H. Monoclonal antibody against rabies virus produced by somatic cell hybridization: Detection of antigenic variants. *Proceedings of National Academy of Sciences (USA)*. 75:3938-3942, 1978.
27. Wiktor TJ, Koprowski H. Antigenic variants of rabies virus. *Journal of Experimental Medicine* 152:99-112, 1980.
28. Witaker RJ, Granun PE. An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. *Annals of Biochemistry* 109:156-159, 1980.