

[25,26]. Experimentos in vitro demonstraram que a superexpressão de TIMP-1 tem propriedades antineoplásicas, por exemplo, em hepatocarcinoma [27] e melanomas [28]. Além disso a utilização de modelos in vivo demonstrou que níveis elevados de TIMP-1 exógeno inibem crescimento celular e angiogênese em tumores de aloenxerto de murino [29]. Aresu et al. (2011) [12] avaliaram a expressão gênica de TIMP-1 em tumores de mama de cadelas e também encontraram que a alta expressão de TIMP-1 teve um discreto efeito protetivo. Adicionalmente, as expressões imunohistoquímicas nos mastócitos e leucócitos polimorfonucleares apresentaram correlação positiva para todos os marcadores testados (MMP-2,  $P=0,0435$ ; MMP-9,  $P=0,0003$ ; TIMP-2,  $P=0,0281$ ; TIMP-1,  $P<0,0001$ ). É provável que essas células possam colaborar na remodelação do estroma, mas estudos futuros são necessários para a confirmação desta hipótese e elucidação da razão para essa correlação, bem como, para determinar se os mastócitos neoplásicos podem estimular ou aumentar a produção estromal de MMPs e TIMPs, contribuindo para a progressão do tumor.

Foi constatado que as expressões de MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 não são bons indicadores prognósticos para sobrevida e mortalidade relacionada à doença. Finalmente, os resultados obtidos sugerem o envolvimento de TIMP-1 na progressão do MCT, corroborando a idéia de um "efeito protetor" desta proteína [29,30,31]. **Conclusão:** O TIMP-1 apresenta expressão significativamente mais elevada em animais com maior sobrevida, o que sugere um papel desta molécula em prevenir a progressão tumoral. No entanto, não foi observada qualquer associação entre o TIMP-1 e graus histopatológicos. A avaliação desta proteína pode representar um fator prognóstico independente para os mastocitomas caninos. É provável que o TIMP-1 possa inibir diretamente a MMP-9 e/ou outras enzimas, assim como antagonizar a angiogênese e/ou iniciar a apoptose de células malignas, o que conduz a um bom resultado nos pacientes com mastocitoma cutâneo. Futuros estudos são necessários para a elucidação de tais questões e, eventualmente, encontrar novos alvos terapêuticos para esta importante neoplasia canina. **Apoio financeiro:** Este estudo teve auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processos 2010/05094-5 e 2013/13252-8).

## Referências

- [1] BOSTOCK, D. E. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. *J. Small Anim. Pract.*, Oxford, v. 14, n. 1, p. 27-41, Jan. 1973.
- [2] PATNAIK, A. K.; EHLER, W. J.; MACEWEN, E. G. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet. Pathol.*, Basel, v. 21, n. 5, p. 469-474, Sept. 1984.
- [3] SIMÕES, J. P.; SCHONING, P.; BUTINE M. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. *Vet. Pathol.*, Basel, v. 31, n. 6, p. 637-647, Nov. 1994.
- [4] STREFEZZI, R. F. et al. Nuclear morphometry in cytopathology: a prognostic indicator for canine cutaneous mast cell tumors. *J. Vet. Diagn. Invest.*, Columbia, v. 21, n. 6, p. 821-825, Nov. 2009.
- [5] KIUPEL, M. et al. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Vet. Pathol.*, Thousand Oaks, v. 48, n. 1, p. 147-155, Jan. 2011.
- [6] CURRAN, S.; MURRAY, G. I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *J. Pathol.*, London, v. 189, n. 3, p. 300-308, Nov. 1999.
- [7] ITOH, Y.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases in cancer. *Essays Biochem.*, London, v. 38, p. 21-36, 2002.
- [8] PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, London, v. 8, n. 3, p. 221-233, Mar. 2007.
- [9] DOCHERTY, A. J. et al. The matrix metalloproteinases and their natural inhibitors: prospects for treating degenerative tissue disease. *Trends Biotechnol.*, Amsterdam, v. 10, n. 6, p. 200-207, June 1992.
- [10] VISSÉ, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.*, Baltimore, v. 92, n. 8, p. 827-839, May 2003.
- [11] BREW, K.; DINAKARPANDIAN, D.; NAGASE, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 1477, n. 1-2, p. 267-283, Mar. 2000.
- [12] ARESU, A. et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in canine mammary tumors. *BMC Vet. Res.*, London, v. 7, p. 33-43, July 2011.
- [13] GIANTIN, M. et al. Expression of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and vascular endothelial growth factor in canine mast cell tumours. *J. Comp. Pathol.*, Liverpool, v. 147, n. 4, p. 419-429, Nov. 2012.
- [14] NAKAICHI, M. et al. Activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in canine oronasal tumors. *Res. Vet. Sci.*, Oxford, v. 82, n. 2, p. 271-279, Apr. 2007.
- [15] PAPPARELLA, S. et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and the activator membrane type 1 (MT1-MMP) in canine mammary carcinomas. *J. Comp. Pathol.*, Liverpool, v. 126, n. 4, p. 271-276, May 2002.
- [16] FIELDING, L. P.; HENSON, D. E. Multiple prognostic factors and outcome analysis in patients with cancer. *Cancer*, New York, v. 71, n. 7, p. 2426-2429, Apr. 1993.
- [17] RUNDHAUG, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J. Cell Mol. Med.*, Oxford, v. 9, n. 2, p. 267-285, Apr.-June 2005.
- [18] SHAMAMIAN, P. et al. Activation of progelatinase A (MMP-2) by neutrophil elastase, cathepsin G, and proteinase-3: A role for inflammatory cells in tumor invasion and angiogenesis. *J. Cell. Physiol.*, New York, v. 189, n. 2, p. 197-206, Nov. 2001.
- [19] DEL CASAR, J. M. et al. Comparative analysis and clinical value of the expression of metalloproteinases and their inhibitors by intratumor stromal fibroblasts and those at the invasive front of breast carcinomas. *Breast Cancer Res. Treat.*, The Hague, Boston, v. 116, n. 1, p. 39-52, July 2009.
- [20] VIZOSO, F. J. et al. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *Br. J. Cancer*, London, v. 96, n. 6, p. 903-11, Mar. 2007.
- [21] BERGAMASCHI, A. et al. Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. *J. Pathol.*, London, v. 214, n. 3, p. 357-367, Feb. 2008.
- [22] ZHANG, B. et al. Tumor-derived matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) correlates with poor prognoses of invasive breast cancer. *BMC Cancer*, London, v. 8, p. 83, Mar. 2008.
- [23] ROWE, R. G.; WEISS, S. J. Navigating ECM barriers at the invasive front: the cancer cell-stroma interface. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, Palo Alto, CA, v. 25, p. 567-595, 2009.
- [24] KESSENBRÖCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, Cambridge, v. 141, n. 1, p. 52-67, Apr. 2010.
- [25] TSUCHIYA, Y. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 is a negative regulator of the metastatic ability of a human gastric cancer cell line, KKLS, in the chick embryo. *Cancer Res.*, Chicago, v. 53, n. 6, p.1397-1402, Mar. 1993.
- [26] HILSKA, M. et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinases-1, -2, -7 and -13 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1, -2, -3 and -4 in colorectal cancer. *Int. J. Cancer*, New York, v. 121, n. 4, p. 714-723, Aug. 2007.
- [27] MARTIN, D. C. et al. Inhibition of SV40 T antigen-induced hepatocellular carcinoma in TIMP-1 transgenic mice. *Oncogene*, Basingstoke, v. 13, n. 3, p. 569-76, Aug. 1996.
- [28] KHOKHA, R. Suppression of the tumorigenic and metastatic abilities of murine B16-F10 melanoma cells in vivo by the overexpression of the tissue inhibitor of the metalloproteinases-1. *J. Natl. Cancer Inst.*, Bethesda, MD, v. 86, n. 4, p. 299-304, Feb. 1994.
- [29] IKENAKA, Y. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) inhibits tumor growth and angiogenesis in the TIMP-1 transgenic mouse model. *Int. J. Cancer*, New York, v. 105, n. 3, p. 340-346, June 2003.
- [30] KHOKHA, R. et al. Suppression of invasion by inducible expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in B16-F10 melanoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, Bethesda, MD, v. 84, n. 13, p.1017-1022, July 1992.
- [31] HILSKA, M. et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinases-1,-2,-7 and-13 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1,-2,-3 and-4 in colorectal cancer. *Int. J. Cancer*, New York, v. 121, n. 4, p. 714-723, Aug. 2007.

## CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA RAIVA ISOLADOS DE CANÍDEOS PROCEDENTES DA REGIÃO NORTE E NORDESTE DO BRASIL

SOUZA, DÉBORA NUNES DE<sup>1</sup>; OLIVEIRA, RAFAEL DE NOVAES<sup>2</sup>; MACEDO, CARLA ISABEL<sup>2</sup>; RUTHNER, HELENA BEATRIZ DE CARVALHO<sup>2</sup>; PEREIRA, PATRÍCIA MARIANO DA CRUZ<sup>2</sup>; FERNANDES, MARCÉLIA EMANUELE SAD<sup>3</sup>; SOUZA, TATIANE DE CÁSSIA PARDO DE<sup>2</sup>; CARNIELI JÚNIOR, PEDRO<sup>2</sup>; CASTILHO, JULIANA GALERA<sup>2</sup>

1. Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD), São Paulo, SP, Brasil
2. Instituto Pasteur, São Paulo, SP, Brasil
3. Universidade Federal do ABC, Santo André, SP, Brasil

**Introdução e Objetivos:** A raiva ainda é um grave problema de saúde pública e mesmo com o aumento da eficiência das vacinas e medidas profiláticas estima-se que aproximadamente 70 mil pessoas morram

anualmente por esta doença [1]. O cão (*Canis familiaris*) é considerado um dos principais reservatórios do vírus da raiva (RABV), pois é responsável por 95% dos casos de raiva humana relatados mundialmente [1]. No Brasil os casos de raiva humana se concentram nas regiões Norte e Nordeste, onde as campanhas anuais de vacinação de animais domésticos não atingem as metas previstas. Como consequência no período de 2006 a 2012, aproximadamente 92% dos casos de raiva canina ocorreram nestas regiões. [2, 3].

A incidência de raiva em canídeos silvestres, principalmente da espécie *Cercopithecus thomasi* na região Nordeste, também tem gerado a ocorrência de casos de raiva humana [4]. Além disso, têm sido demonstrada a possibilidade da transmissão da infecção do RABV entre canídeos domésticos e silvestres, fato que possibilitaria a reintrodução da raiva em áreas urbanas nas quais a doença está controlada [5, 6].

O presente trabalho foi delineado para realizar a caracterização molecular do RABV de isolados obtidos de canídeos domésticos e silvestres, identificando as linhagens do RABV circulantes nessas regiões no período de 2006 a 2012 e comparando com as linhagens já caracterizadas anteriormente no período de 2002 a 2005 visando um estudo de epidemiologia molecular para um controle mais eficaz da doença. **Materiais e Métodos:** Foram utilizadas 102 amostras de Sistema Nervoso Central de camundongos previamente inoculados com o RABV provenientes de cães (n=57) e canídeos silvestres (n=45) coletadas no período de 2006 a 2012, de diversos estados das regiões Norte e Nordeste do Brasil. A caracterização molecular foi realizada com o emprego da técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), primers 21G e 304, para a amplificação do segmento do gene da nucleoproteína [6], sequenciamento do DNA e análise filogenética. Para a construção da árvore filogenética as sequências de DNA foram alinhadas com outras 67 sequências homólogas recuperadas do GenBank pelo método de alinhamento múltiplo CLUSTAL/W utilizando o programa Bioedit 7.0.0.

A reconstrução filogenética dos isolados do RABV foi realizada pelo método de distância com o algoritmo *Neighbor-Joining* e o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros e com 1000 repetições de bootstrap com o programa Mega 6.

**Resultados e Discussões:** A topologia da árvore filogenética do gene N gerada com sequências genéticas com 1.367 nucleotídeos (nt), identificou subpopulações do RABV (Clusters, Subclusters e Grupos Filogenéticos), além de 13 casos de infecção interespecífica entre canídeos domésticos e silvestres e um caso de canídeo doméstico infectado com linhagem do RABV de morcego hematófago *Desmodus rotundus* (Figura 1). Dois grandes clusters evidenciados na árvore filogenética são: um de isolados de RABV circulantes entre canídeos e outro de isolados de RABV circulantes entre *D. rotundus*. No cluster de canídeos foram gerados dois subclusters: um de isolado de RABV circulantes entre canídeos domésticos e outro entre canídeos silvestres. Além disso, nota-se que cada subcluster apresenta a formação de grupos filogenéticos. O subcluster de RABV circulante entre canídeos silvestre foi dividido em oito agrupamentos (Grupos 1 a 8) enquanto que o subcluster de RABV circulantes entre canídeos domésticos gerou cinco agrupamentos (Grupos 9 a 13) (Figuras 1 e 2). O resultado acima descrito utilizou sequências do RABV obtidas durante o período de 2002 a 2012, nas regiões Norte e Nordeste, exceto o grupo 9 que possui isolados da região Sudeste e Centro-oeste no período de 1987 a 1999 (Figura 1).

Os resultados obtidos mostraram a existência de uma clara divisiva na árvore filogenética entre os isolados de canídeos e morcegos e, ainda, o cluster dos canídeos evidenciou a formação de dois subclusters, um de canídeos domésticos e outro de canídeos silvestres como descrito em outros estudos [5, 6, 7].

A análise dos agrupamentos formados em cada subcluster de canídeos permite a formação de 13 grupos filogenéticos, enquanto que Carnieli et al

2008 constataram a formação de nove grupos. O aumento do número de grupos filogenéticos formados ocorreu provavelmente pelo aumento do número de isolados de RABV, uma maior área geográfica abrangida e um maior intervalo de tempo. Assim como relatado por Carnieli et al 2008 [5], os isolados foram agrupados de acordo com a regionalidade. A formação desses grupos demonstra a diversidade de sublinhagens do RABV que circulam na região Norte e Nordeste. Um fato que poderia ter gerado a formação de novas populações virais seria o isolamento geográfico entre as diferentes populações de um mesmo reservatório e que ocorre principalmente em espécies que exploram diferentes nichos ecológicos como, por exemplo, os canídeos. A emergência da raiva nestas populações pode ocasionar mudanças genéticas do vírus original no processo de adaptação e estabelecimento nestes hospedeiros [8]. No presente trabalho foi registrada a ocorrência de transmissão da infecção do RABV entre canídeos domésticos e silvestres mostrando que a proximidade interespecífica, poderia resultar na reintrodução do RABV em canídeos domésticos. A necessidade do estabelecimento de uma maior vigilância epidemiológica entre os canídeos silvestres, têm sido ressaltada, pois com o desmatamento e o aumento da urbanização os canídeos silvestres estão cada vez mais próximos dos humanos [4, 5 e 6].

Uma alternativa para diminuir a raiva em canídeos silvestres, seria desenvolver um método para realizar a vacinação oral nesses animais. Um exemplo deste tipo de vacinação oral para animais silvestres ocorre na Europa desde 1978 e, atualmente, a raiva está praticamente erradicada no Oeste Europeu e nos países da Europa Central [9, 10]. Portanto, a vacinação oral em canídeos silvestres, aliada a educação em saúde com relação a raiva e a constância na realização de investigações de epidemiologia molecular são essenciais para evitar o surgimento de surtos do RABV e consequentemente a reintrodução da zoonose em regiões em que havia sido controlada.

**Conclusões:** A árvore filogenética obtida com o sequenciamento parcial do gene N mostrou a presença de duas linhagens distintas do RABV (canídeos e morcegos) circulando na região Norte e Nordeste. Ainda, dentro do cluster dos isolados de canídeos foram evidenciadas duas sublinhagens distintas circulando entre canídeos domésticos e silvestres. Além disso, dentro dos isolados de canídeos a foi constatada a presença de 13 grupos filogenéticos relacionados à região geográfica e 14 casos de infecções interespecíficas.

Fica demonstrado que a epidemiologia molecular realizada de uma forma constante possibilita a compreensão da circulação do RABV, nas diferentes regiões geográficas e que possibilita o aprimoramento das medidas de controle e prevenção da doença.

**Apoio financeiro:** O presente estudo teve auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e do Instituto Pasteur.

## Referências

- [1] OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Rabies Portal. 2014. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/rabies-portal/>>. Acesso em: 26 ago. 2015.
- [2] WADA, M. S.; ROCHA, A.; MAIA-ELKHOURY, A. N. S. Situação da Raiva no Brasil de 2000 a 2009. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, v. 20, n. 4, p. 509-518, out.-dez. 2011.
- [3] BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Brasília, 2014. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/saude>>. Acesso em: 26 ago. 2015.
- [4] KOTAIT, I. et al. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. *BEPA*, São Paulo, v. 4, n. 40, p. 4-10, abr. 2007.
- [5] CARNIELI, P. et al. Characterization of Rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. *Virus Res.*, Amsterdam, v. 131, n. 1, p. 33-46, Jan. 2008.

[6] KOBAYASHI, Y. et al. Phylogenetic characterization of rabies virus isolates from Carni in Brazil. *J. Vet. Med. Sci.*, Tokyo, v. 69, n. 7, p. 691-696, July 2007.

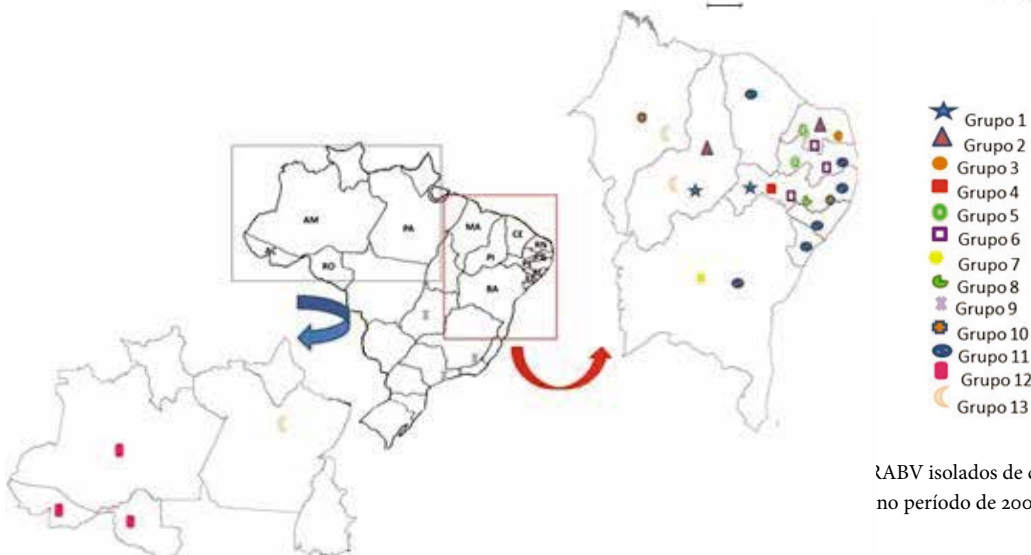
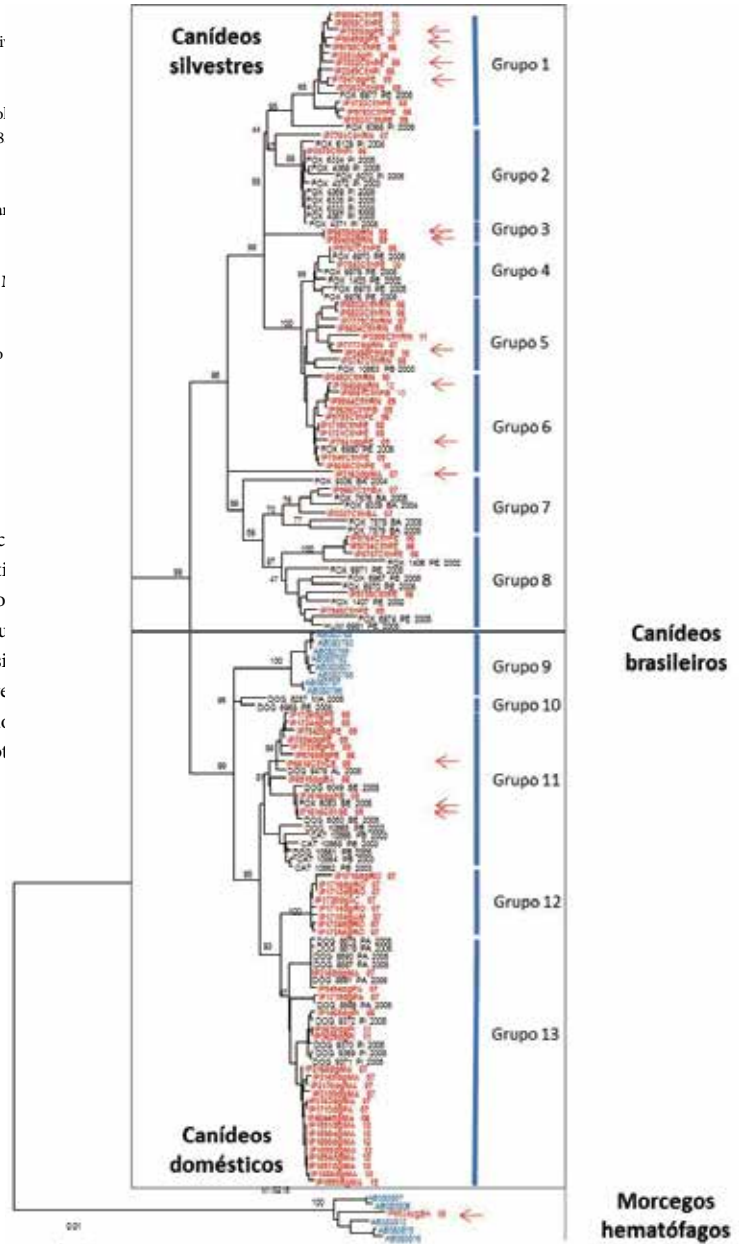
[7] ITO, M. et al. Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus iso in Brazil: identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. *Virology*, New York, v. 28 2, p. 214-222, June, 2001.

[8] RUPPRECHT, C. E.; HANLON, C. A.; HEMACHUDA, T. Rabies re-examined. *La Infect. Dis.*, New York, v. 2, n. 6, p. 327-343, June 2002.

[9] STAHL, J. P. et al. Update on human rabies in a dog and fox-rabies-free country. *Méd. l Infect.*, Paris, v. 44, n. 7, p. 292-301, July 2014.

[10] WHO. Rabies Boletim Europe. Disponível em: <http://www.rbe.fli.bund.de>. Acesso 17 ago. 2015.

**Figura 1** - Árvore filogenética do gene N do RABV com 153 isolados de c domésticos, canídeos silvestres, morcegos hematófagos e amostra fixa uti o método de Distância *Neighbor-joining* (NJ). Nessa figura, nota-se a fo de dois grandes grupos; um grande grupo dos canídeos brasileiros qe divididos em dois grandes subgrupos: canídeos domésticos e canídeos si com 13 agrupamentos. Os valores em cada nó da árvore filogenética repr os resultados de 1000 repetições de *bootstrap*. Em vermelho estão destacad os isolados do presente trabalho e em azul e em preto todos os isolados obti GenBank. As setas vermelhas representam as infecções interespecíes.



RABV isolados de canídeos domésticos e silvestres no período de 2006 a 2012