

PT.108**EFFECTS OF AMPHIBIAN SKIN SECRETION MOLECULES ON RABIES VIRUS INFECTION IN MAMMALIAN CELLS**

VIGERELLI H^{1,2}, Sciani JM¹, Jared C³, Antoniazzi MM³, Caporale GMM², Silva ACR², Pimenta DC¹ – ¹Instituto Butantan – Laboratório de Bioquímica e Biofísica, ²Instituto Pasteur – Laboratório de Sorologia, ³Instituto Butantan – Laboratório de Biología Celular

Rabies is an acute infectious disease caused by a virus that affects the central nervous system, which mechanism of infection is associated to the cell penetration via the nicotinic acetylcholine receptor. The genus *Bufo*, recently split into *Bufo* in the Old World and *Rhinella* in the New World, contain a large number of alkaloids and steroids in their skin secretion. The aim of this study was to assay molecules extracted from the skin of amphibians as possible interfering agents in the process of infection of the rabies virus in mammalian cells. *Bufo* (*Rhinella jimi*) skin secretions were collected through mechanical stimulation. A liquid-liquid partition (H₂O-CH₂Cl₂) was performed and the two resulting solutions were purified by RP-HPLC, in a C₁₈ column. Structural characterization was performed by mass spectrometry. Cytotoxic tests of the isolated compounds were performed over BHK-21 cells. Briefly, 96-well microtiter plates containing the cells were incubated for 24h in the media containing different dilutions of the purified molecules. For the virologic test, fixed strain PV (Pasteur Virus) was used on fluorescence inhibition test and fluorescent foci inhibition test, with both simultaneous and time course treatment of the cells with the virus and the fractions.

Sixteen fractions were obtained by RP-HPLC. The cytotoxic tests revealed that 9 fractions were toxic to BHK-21 cells. On the virologic test, fraction 2 showed a lasting effect, independent from the simultaneous and time course treatments in both tests.

Mass spectrometric analyses showed that this fraction contains a steroid named hellebrigenin. Fraction 14 was able to reduce rabies virus infection in both tests, apparently showing competition effects. Mass spectrometric analyses showed that this fraction contains two indole alkaloids, N',N'-dimethyl 5-hydroxytryptamine (bufotenine) and N',N',N'-trimethyl 5-hydroxytryptamine (5-HTQ), which are currently undergoing purification. The two individual components will be retested for biological activity in order to evaluate which retains the biological effect so that more in depth assays can be performed.

Financial Support: Instituto Butantan, Instituto Pasteur, FAPESP, CNPq

PT.109**USO DE YODURO DE PROPIDIO COMO COLORANTE DE CONTRASTE CELULAR EN LA TECNICA DE INMUNOFUORESCENCIA DIRECTA PARA EL DIAGNOSTICO DEL VIRUS DE LA RABIA**

Iguala-Vidales M¹ – ¹InDRE – Virología

La rabia continúa siendo una de las zoonosis más importantes en el mundo, y representa un problema serio en muchos países. Dentro de las herramientas de diagnóstico la técnica de inmunofluorescencia directa con anticuerpos fluorescentes (IFD) constituye un método rápido y sensible para diagnosticar la infección rábica en animales y en seres humanos (1, 3). La prueba se basa en el examen microscópico, bajo luz ultravioleta, de impresiones, frotis de muestras de tejido del hipocampo (asta de Ammon), del cerebelo y la medula o secciones de tejido; los anticuerpos monoclonales (IgG) utilizados en el conjugado permiten la coloración específica y uniforme sin interferencia del fondo.

En biología celular el yoduro de propidio se utiliza como colorante de contraste que permite diferenciar el núcleo celular del citoplasma (se intercala en el DNA) (4), existen evidencias de su utilización en tinciones para identificación de Herpes Simple tipo 1(5).

Objetivo: Implementar el uso de Yoduro de Propidio dentro del diagnóstico del virus de la rabia por Inmunofluorescencia directa.

Materiales y metodos: Se seleccionaron 70 muestras: 50 encéfalos: (25 muestras positivas de diferentes grados de positividad (1+ a 4+) y 25 muestras negativas) y 20 aislamientos del virus de la rabia en célula de mieloblastoma de ratón (15 muestras positivas de diferentes grados de positividad (1+ a 4+) y 5 muestras negativas) del banco de muestras del laboratorio de rabia. Se aplico la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD) según lo indica el proveedor Anti-Rabies Monoclonal Globulin (FDI, FUJIREBIO. DIAGNÓSTICS, Inc.), al término de la técnica, se adiciono 20 µL de la solución de yoduro de propidio a una concentración final de 0.3 µg/mL (en cada impronta de encéfalo o pozo con células de cultivo) y se incubo a temperatura ambiente durante 5 minutos, se elimino lavando con PBS pH 7.4, se dejó secar al aire y se agrego una gota de glicerina tamponada pH 8.4; se realizo la lectura en un microscopio de epifluorescencia con el objetivo 10X y 40X. Se evaluó la lectura para 4 personas; 2 expertos en diagnóstico de rabia y 2 personas en proceso de aprendizaje.

Resultados y conclusion: De las 50 muestras de encéfalo se obtuvieron los siguientes resultados; 25 muestras positivas de diferentes grados de positividad (1+ a 4+) y 25 muestras negativas y de los 20 aislamientos del virus de la rabia en célula de mieloblastoma de ratón (15 muestras positivas de diferentes grados de positividad (1+ a 4+) y 5 muestras negativas; todas las muestras coincidieron con los resultados anteriormente reportados. Todo el personal involucrado en la lectura coincidió en la facilidad de identificar los núcleos celulares, tanto en improntas de encéfalo así como en las laminillas de cultivo celular. Debido a que el yoduro de propidio se intercala en el DNA, se observaron los núcleos de las células de color rojo-naranja; así mismo se facilito la identificación de la infección en el citoplasma celular (en los casos positivos) por el contraste de color verde manzana fluorescente debido al fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) que esta marcando a los anticuerpos monoclonales dirigidos a la proteína del virus de la rabia. Por lo anterior se concluye que el uso del yoduro de propidio no interfiere en la técnica de IFD ya que se obtienen resultados idénticos a los que se reportaron en las muestras probadas; el uso del yoduro de propidio es de ayuda principalmente para personal técnico que no tiene la experiencia en identificar las células en improntas y en cultivos celulares; el uso del yoduro de propidio permite un contraste que facilita la identificación de la fluorescencia propia del virus de la rabia.

Agradecimientos: A todo el personal del laboratorio de rabia del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), al Dr. Luis Leucona representante de USDA/APHIS/IS México, por el apoyo recibido.