**POLYANA ATALIBA VASCONCELOS
MEDEIROS DE SOUSA**

UTILIZAÇÃO DO SISTEMA SFV EM MACRÓFAGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT, para obtenção de Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2015

**POLYANA ATALIBA VASCONCELOS MEDEIROS DE
SOUSA**

UTILIZAÇÃO DO SISTEMA SFV EM MACRÓFAGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT, para obtenção de Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Soraia Attie Calil Jorge

Versão Original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Sousa, Polyana Ataliba Vasconcelos Medeiros de.
Utilização do sistemaSFV em macrófagos / Polyana Ataliba
Vasconcelos Medeiros de Sousa. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Soraia Attie Calil Jorge.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração:
Biotecnologia. Linha de pesquisa: Sistema SFV, cultura de células de
macrófagos.

Versão do título para o inglês: Utilization of the SFV system in
macrophages.

1. Sistema SFV 2. Macrófagos 3. Transdução 4. Expressão de
RVGP 5. Expressão de GFP I. Jorge, Profa. Dra. Soraia Attie Calil
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB050/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Polyana Ataliba Vasconcelos Medeiros de Sousa.

Título da Dissertação: Utilização do sistema SFV em macrófagos.

Orientador(a): Profa. Dra. Soraia Attie Calil Jorge.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN
(CEUAIB)

Ofício CEUAIB nº 65/2014

São Paulo, 24 de março de 2014.

Dra. Soraia Attie Calil Jorge
Laboratório de Imunologia Viral
Instituto Butantan

Referente Protocolo CEUAIB nº 648/09

Projeto de Pesquisa:

Estudo da imunogenicidade de glicoproteína do vírus da raiva (GPV) e de proteínas não estruturais do vírus da hepatite C (HCVNS3). Estudo da expressão gênica empregando pseudopartículas virais.

Prezada Pesquisadora,

A CEUAIB certifica que os alunos de pós-graduação e os respectivos projetos listados abaixo têm a autorização para utilizar material biológico obtido do protocolo nº791/11 "Desenvolvimento de bioprocessos com células S2 para produção e purificação da glicoproteína recombinante do vírus da raiva (RVGP) e estudo da sua antigenicidade" cedido pelos responsáveis Carlos Augusto Pereira, Renato Mancini Astray e Daniella Cristina Ventini.

- Alexandre Gonçalves de Rezende, sub-projeto intitulado "Avaliação da expressão gênica em células de mamíferos utilizando o Semliki Forest Vírus".
- Juliana Fontes Beltran Paschoal, sub-projeto intitulado "Estudo da Expressão Gênica empregando pseudopartículas virais em Células de Mamíferos (HEK 293T e Huh 7) em diferentes Meios de Cultura Livre de Soro".
- Polyana Ataliba Vasconcelos-Medeiros de Souza, sub-projeto intitulado "Expressão da glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) em macrófagos (IC21) através do sistema genético derivado de Semliki Forest Vírus".
- Sandra Fernanda Suarez Patiño, sub-projeto intitulado "Estudo da adaptação de células de mamíferos em meios de cultura livre de soro para otimizar a produção de proteínas recombinantes".
- Thaissa Bernardino, sub-projeto intitulado "Estudo da expressão da glicoproteína rábica utilizando pseudopartículas virais".

Atenciosamente,

Dr. Marcelo Larami Santoro
Coordenador da CEUAIB

DEDICATÓRIAS

Aos meus avós, Francisco Ataliba (*in memorian*) e Eridan Ataliba e meus pais, Juarez Vasconcelos e Virgínia Ataliba pela correta transmissão de conduta ilibada e idoneidade moral;

Ao meu marido Arthur Sousa com quem posso compartilhar todos os momentos da vida e quem me faz acreditar que posso tudo se eu dedicar tempo, paciência e dispuser de muita determinação;

As minhas filhas, Luiza e Laura, que mesmo desconhecendo a incansável busca pela titulação acadêmica são minhas fontes de inspiração, doçura e alegria.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o Senhor da minha vida, quem sempre me guiou e traçou meus caminhos.

Aos meus avós Ataliba (*in memoriam*) e Eridan pelo amor incondicional, força, segurança e paciência doadas desde sempre e para sempre.

Aos meus pais Juarez e Virgínia pelo amor e por me proporcionarem uma boa educação e estarem sempre dispostos a apoiar e lutar pelos meus projetos e planos.

Ao meu marido e companheiro Arthur Sousa, por toda confiança, respeito, amor, e por sempre acreditar na minha capacidade mesmo quando eu duvidava.

As minhas filhas Luiza, cujo sorriso no rosto é sempre a meta de qualquer projeto que inicio e Laura, que mesmo sem ter nascido ainda já se torna presente em todas as decisões e metas por mim tomadas.

Aos meus irmãos Priscila e Bruno, pelo apoio sempre que possíveis, e pela princesinha Bruna, que enche a todos de alegria.

A minha orientadora Soraia, por me proporcionar essa incrível oportunidade, pelos intermináveis questionamentos sanados com a máxima paciência e pelos conhecimentos transmitidos com a maior calma e boa vontade.

Aos Doutores Renato, Carlos Augusto e Marcos, por todas as sugestões e conselhos passados no decorrer do projeto que se tornaram essenciais para o desenvolvimento do mesmo.

Aos amigos Alexandre, Sandra, Thaissa, Vera, Ana Lia, Juliana, Lucia, Daniela, Rose, Mayra e Nayara, pela agradável e harmoniosa convivência, além da infinita cooperação e importante troca de conhecimentos.

Ao Instituto Butantan e Laboratório de Imunologia Viral, por assegurar uma adequada estrutura e funcionários competentes para o bom desenvolvimento do trabalho.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia da USP pelos serviços prestados.

A CNPq pelo apoio financeiro, sem o qual o projeto não seria possível.

"Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende".

Guimarães Rosa

RESUMO

SOUSA, P. A. V. M. **Utilização do sistema SFV em macrófagos**. 2015 72 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A raiva é uma antroponose e causa a morte de 55 mil pessoas anualmente no mundo. Frente a essa realidade, é importante o desenvolvimento de novos métodos eficazes e de baixo custo para obtenção de vacinas contra o vírus da raiva. Neste trabalho foi utilizado um sistema genético derivado do Vírus da Floresta de Semliki (SFV) carregando RNA para expressão gênica da glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) e da proteína verde fluorescente de água viva (GFP), a título de controle do experimento. Para isso, lotes de partículas virais de SFV-RVGP e SFV-GFP foram obtidos em células BHK-21 e quantificados através de qRT-PCR. Posteriormente, foram realizados ensaios de infecção avaliando diferentes relações partícula viral:célula tanto com vírus ativado e não ativado em duas linhagens de macrófagos murinos IC-21 e J774A-1. A expressão da proteína RVGP foi avaliada pelo teste de Imunofluorescência Indireta (IFI) cujos resultados apresentaram positividade em ambas as linhagens infectadas tanto com o vírus ativado como não ativado, incluindo os controles negativos, sugerindo uma autofluorescência natural dessas células, sendo confirmados posteriormente por Citometria de Fluxo, corroborando com a hipótese de autofluorescência destas linhagens. Já a expressão da proteína GFP foi analisada por microscopia de fluorescência e posteriormente analisada por Citometria de Fluxo em ambas as linhagens, onde também nos deparamos com resultados inconclusivos devido a fluorescência natural destas células. Sabe-se que a entrada do vírus SFV em células de mamíferos ocorre após 2 horas da infecção com o vírus. Com a dificuldade técnica em detectar a expressão das proteínas nos macrófagos, devido a sua autofluorescência, realizamos então um experimento onde o vírus no sobrenadante celular foi quantificado após a infecção. Neste experimento os vírus SFV-RVGP e SFV-GFP foram titulados por PCR quantitativa em diferentes momentos após a infecção. Após extraído o RNA viral do sobrenadante celular, os títulos virais foram estabelecidos e indicaram que até as 72 horas pós infecção a titulação viral se manteve com o mesmo valor inicial, sugerindo que não houve entrada dos vírus na célula por transdução ou por fagocitose.

Palavras-chaves: Sistema SFV. Macrófagos. Transdução. Expressão de RVGP. Expressão de GFP.

ABSTRACT

SOUSA, P. A. V. M. **Utilization of SFV system of macrophages**. 2015 72 p. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Rabies is a anthropozoonosis and causes the death of 55,000 people worldwide each year. Facing this reality, it is important to develop effective new methods and inexpensive to obtain vaccines against the rabies virus. In this work we used a genetic system derived from the Semliki forest virus (SFV) carrying RNA for gene expression of the rabies virus glycoprotein (RVGP) and green fluorescent protein of living water (GFP), by way of experiment control. For this reason, lots of virus particles SFV-RVGP and SFV-GFP were obtained in BHK-21 cells and quantified by qRT-PCR. Subsequently, infection tests were conducted to evaluate different ratios viral particle:cell, both with activated and not activated virus strains in two murine macrophages IC-21 and J774A-1. The expression of RVGP protein was assessed by indirect immunofluorescence test (IFI) and the results were positive in both strains infected with both activated as disabled viruses, including negative controls, suggesting a natural autofluorescence of these cells, and later confirmed by Cytometry Flow, supporting the hypothesis autofluorescence of these strains. But the expression of GFP protein was analyzed by fluorescence microscopy and subsequently analyzed by Flow Cytometry in both strains, which also faced with inconclusive results due to natural fluorescence of these cells. It is known that the input of the SFV virus in mammalian cells occurs after 2 hours of infection with the virus. With the technical difficulty of detecting the expression of proteins in macrophages, due to its autofluorescence, then conducted an experiment where the virus in cell supernatant was quantitated after infection. In this experiment, the RVGP-SFV-GFP virus and SFV were titered by quantitative PCR at different times after infection. After viral RNA extracted from the cell supernatant viral titers were established and indicate that by 72 hours post-infection viral titer remained at the same initial value, suggesting that there was no entry of virus into the cell by transduction or by phagocytosis.

Keywords: SFV system. Macrophages. Transduction. RVGP expression. GFP expression.

Lista de Figuras

Figura 1- Distribuição mundial da raiva. (WHO, 2008)	21
Figura 2- Esquema do vírus da raiva e suas proteínas (Modificado de SCHNELL, 2010).....	23
Figura 3- Representação esquemática do sistema SFV de expressão recombinante.....	29
Figura 4- Esquema de expressão do sistema SFV.....	30
Figura 5- Mapa dos vetores plasmidiais.....	34
Figura 6- Análise de densidade e viabilidade celular.....	43
Figura 7 - Análise da velocidade máxima de crescimento celular das linhagens IC-21 e J774A.144	
Figura 8- Análise de consumo/produção de glicose e lactato.	45
Figura 9- Análise de consumo/produção de glutamina e glutamato.	46
Figura 10- Linearização dos vetores e transcrição in vitro.....	48
Figura 11- Curva padrão e de dissociação obtidas da qRT-PCR.	50
Figura 12- Imagens da IFI do vírus SFV-RVGP.....	51
Figura 13- Imagens de Microscopia de Fluorescência com 500ms de exposição.....	54
Figura 14- Gráficos da Citometria de Fluxo.	57
Figura 15 - Gráficos da quantificação dos vírus SFV em diferentes condições e tempo.	59

Lista de Tabelas

Tabela 1- Condições de eletroporação	36
Tabela 2- Características dos oligonucleotídeos usados como primers.....	38

Lista de Abreviaturas e Siglas

µg – Micrograma

µl - Microlitro

µm - Micrometro

ATCC – Coleção de cultura de padrão americano (American Type Culture Collection)

BHK-21 – linhagem celular derivada de rim de hamster bebê (Baby hamster kidney)

cDNA - DNA complementar

CMI – Imunidade mediada por células

DMEM – Meio Eagle Modificado da Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

dNTPs - Desoxirribonucleotídeo trifosfatos (Deoxyribonucleotide Triphosphates)

E2 e E1 - Proteínas do envelope viral do SFV

ELISA – Ensaio imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

FITC - Isotiocianato de fluoresceína (Fluorescein Isothiocyanate)

g - Força centrífuga relativa

GFP – Proteína Verde Fluorescente (Green fluorescent protein)

HEK-293T - Linhagem celular derivada de rim embrionário humano (Human Embryonic Kidney)

Huh-7 - Linhagem celular derivada de carcinoma hepatocelular humano (Human Hepato Cellular Carcinoma)

IFI - Imunofluorescência Indireta

IgG-D1 - Imunoglobulina policlonal contra a glicoproteína rábica

IMDM - Meio de Dulbecco Modificado por Iscove (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)

Kb – Quilobases

kDa - Quilodalton

L929 - Linhagem celular derivada do tecido aureolar subcutâneo e adiposo de camundongo

LB - meio Luria-Bertani

mg - Miligramas

ml - Mililitro

MOI – Multiplicidade de infecção (Multiplicity of infection)

MS - Ministério da Saúde

ng - Nanograma

nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4 - Proteínas não estruturais do SFV

ORFs – Quadros de leitura aberta (Open Reading Frames)

OriC - Origem de replicação bacteriana

PBS - Salina tamponada com fosfato (Phosphate buffered saline)

PBS-EDTA - Salina tamponada com fosfato, com ácido etileno-diamina-tetra-acético (*ethylene-diamine-tetraacetic acid*)

pSFV-GFP – plasmídeo contendo o gene para as proteínas não estruturais do SFV e da GFP

pSFV-Helper – plasmídeo contendo as proteínas estruturais do SFV

pSFV-RVGP – plasmídeo contendo o gene para as proteínas não estruturais do SFV e da RVGP

qPCR – Reação em cadeia de polimerase quantitativa (Quantitative Polymerase Chain Reaction)

qRT-PCR - qPCR da transcrição reversa (Reverse Transcription)

RNA - Ácido Ribonucléico

RNAses - Ribonuclease

RT – Transcrição reversa (Reverse Transcription)

RVGP - Glicoproteína do vírus rábico

Sf9 - Linhagem celular derivada de *Spodoptera frugiperda*

SFB – Soro Fetal Bovino

SFV – Vírus da floresta Semliki (Semliki Forest vírus)

SFV-26 s - Promotor subgenômico do SFV

SFV-RNA – RNA correspondente ao SFV

SFV-RVGP – Sistema de expressão de RVGP, baseado no SFV

T_m - Temperatura de fusão (Melting)

Tween 20 - Monolaurato de Sorbitan Etoxilado 20

v - Volt

Vero - Linhagem celular derivada de rim de macaco verde (Green Monkey Kidney)

WHO – Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)

αIgG-D1 – Anti-coelho conjugado com peroxidase (Anti-rabbit)

Sumário

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Macrófagos	17
2.1.1	<i>Macrófagos IC-21 e J774A.1</i>	18
2.2	Resposta imune celular	18
2.3	Resposta imune humoral	19
2.4	Doença Raiva	20
2.5	Vírus da Raiva e a Glicoproteína G	23
2.6	GFP	25
2.7	Vetores de expressão	26
2.7.1	<i>Vetores não virais</i>	26
2.7.2	<i>Vetores virais</i>	27
2.8	Organização genômica do Semliki Forest Virus (SFV)	27
2.9	Semliki Forest Virus como vetor de expressão	28
3	OBJETIVO	31
3.1	Objetivos específicos	31
4	MATERIAL E METODOS	31
4.1	Linhagens celulares	31
4.2	Manutenção das células	32
4.3	Preservação das células	32
4.4	Análise de densidade, viabilidade celular e velocidade de crescimento	32
4.5	Análise de metabólitos	33
4.6	Obtenção do Semliki Forest Virus recombinante (SFV-RVGP e SFV-GFP)	34
4.6.1	<i>Amplificação dos vetores</i>	35
4.6.2	<i>Transcrição in vitro</i>	35
4.6.3	<i>Transfecção por eletroporação</i>	35
4.7	Deteção e quantificação viral	36
4.8	PCR e Semi-Nested PCR	37
4.8.1	<i>qRT-PCR para titulação dos SFV recombinantes</i>	38

4.9	Infecção com SFV recombinantes	39
4.10	Análise da expressão da RVGP	40
4.10.1	<i>Imunofluorescência Indireta</i>	40
4.11	Análise da expressão da GFP	41
4.11.1	<i>Microscopia de fluorescência</i>	41
4.11.2	<i>Citometria de Fluxo</i>	41
4.12	Ensaio de infecção para avaliar o potencial de transdução das partículas de SFV...41	
5	RESULTADOS	42
5.1	Análises de densidade, viabilidade celular e metabólitos.....	42
5.1.1	<i>Análise de densidade e viabilidade celular</i>	42
5.1.2	<i>Cinética do consumo/produção de Glicose e Lactato das linhagens IC-21 e J774A.1</i>	45
5.1.3	<i>Cinética de consumo/produção de Glutamina e Glutamato das linhagens IC-21 e J774A.1</i>	46
5.2	Obtenção dos SFVs	47
5.2.1	<i>Transcrição in vitro</i>	47
5.2.2	<i>Transfecção por Eletroporação</i>	49
5.2.3	<i>Quantificação de SFV-RVGP recombinantes por qRT-PCR</i>	49
5.3	Análise da expressão da RVGP	51
5.4	Análise da expressão da GFP	54
5.4.1	<i>Microscopia de Fluorescência</i>	54
5.4.2	<i>Citometria de Fluxo</i>	56
5.5	Ensaio de infecção para avaliar o potencial de transdução das partículas de SFV ..57	
6	DISCUSSÃO	60
7	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

O laboratório de Imunologia Viral localizado no Instituto Butantan possui um extenso e importante histórico em estudos para o desenvolvimento de vacinas contra o vírus da raiva e consequentemente de sua doença, capaz de dizimar milhares de pessoas mundialmente e ser responsável por enormes gastos econômicos. Por isso diversos projetos foram ali desenhados a fim de desenvolver um método eficaz e de baixo custo.

Um dos estudos elaborado e realizado com tal intuito teve por principal objetivo avaliar o sistema SFV, um sistema genético capaz de gerar partículas virais que carregam o RNA contendo a informação da proteína que se quer expressar, nesse caso a glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) como vetor de imunização contra raiva e proteína verde fluorescente (GFP), a título de controle de experimento. Através de injeções intraperitoneais, camundongos foram eficientemente imunizados contra o vírus da raiva (ASTRAY, R. et al., 2014). Constatação possível após o desafio desses animais. Assim, para responder à questão sobre qual linhagem celular do organismo fora responsável pela eficiente imunização, macrófagos murinos foram infectados *ex-vivo* por SFV-GFP. Os resultados demonstraram que não houve fluorescência desses macrófagos nos ensaios.

O Semliki Forest Virus é um eficiente veículo de entrega gênica tanto *in vitro* como *in vivo*, e por esse fato ele é amplamente utilizado como um vetor. Tem como grande vantagem o fato dos mesmos estoques de partículas de vírus-deficientes utilizados para infectar as linhagens de células em cultura *in vitro* pode também ser aplicada *in vivo*, sem qualquer purificação ou concentração adicional (LUNDSTROM, K., 2001). Esse sistema é capaz de alcançar bons níveis de expressão e seu principal ponto positivo é sua versatilidade, pois pode expressar proteínas diversas em linhagens que sejam específicas para cada uma.

A desvantagem da aplicação do sistema baseado no SFV, especialmente para a produção em larga escala, é que a produção de estoque de vírus é relativamente cara. Os custos elevados estão relacionados com o processo de transcrição *in vitro*. Sendo que tentativas para facilitar e reduzir os custos de produção desses vírus são introduzidos constantemente através do desenvolvimento de novos sistemas baseados no SFV (POLO et al., 1999). Outra preocupação tem sido a segurança relacionada ao SFV, especialmente para a produção em larga escala, que obviamente requer grandes volumes de vírus. Mas com abordagem atual utilizada para o SFV, os riscos são bastante baixos, ainda mais se comparado a outros sistemas semelhantes.

Esse sistema tem sido testado em várias linhagens celulares e também em camundongos. Nestes animais imunizados com SFV recombinantes carregando o gene da glicoproteína rábica (RVGP) apresentaram produção de anticorpos anti-RVGP (ASTRAY, R. et al., 2014). Dessa forma, pretendemos testar o sistema SFV-RVGP em macrófagos *in vitro*, mimetizando o que possivelmente ocorreria nos animais imunizados. É ainda nossa expectativa observar como as partículas virais são internalizadas nessas culturas, se através de um processo de transdução ou de fagocitose.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Macrófagos

Macrófagos são células efetoras circulantes capazes de fagocitar e destruir eficientemente micróbios e secretar citocinas que estimulam inflamação (ABBAS et al., 2008). Estão presentes em tecidos linfoides e não linfoides. Estas células exercem diversas funções na resposta imune como regulação da homeostase, apresentação de antígenos aos linfócitos e produção de fatores de crescimento (GEISSMANN et al., 2010; GORDON, 2002).

De modo geral, os macrófagos identificam e reagem a diferentes tipos de moléculas, patógenos e antígenos, além disso, também respondem a diferentes tipos de desequilíbrios fisiológicos que podem ser desde uma injúria tecidual até uma infecção (LIDDIARD et al., 2011). Macrófagos são dotados de diversos tipos de receptores de reconhecimento de padrão (lectinas, TLRs, etc.), que ao reconhecerem algum tipo de patógeno são ativados e produzem diversos tipos de quimiocinas e citocinas, que irão iniciar a resposta imune inata (LIDDIARD et al., 2011; MURRAY; WYNN, 2011).

A morfologia e propriedades cinéticas e funcionais dos macrófagos foram caracterizadas através do isolamento *in situ* dessas linhagens celulares presentes na cavidade peritoneal, fígado e pulmão de camundongos (VAN FURTH; COHN, 1968). Foi determinado a partir desse estudo que populações de macrófagos são renovadas mesmo nos estados estacionários, característica de essencial importância conhecida por plasticidade. Essa propriedade das células mononucleares, em resposta a estímulos externos, torna-as fenotipicamente diferentes, ora monócitos, ora macrófagos, ou mesmo células dendríticas, desempenhando funções específicas nos diversos tecidos e estados de inflamação (BISWAS; MANTOVANI, 2010; GEISSMANN et al., 2010).

2.1.1 Macrófagos IC-21 e J774A.1

A linhagem IC-21 é derivada da transformação de macrófagos peritoneais de camundongo *Mus musculus* normal C57BL/6 imortalizados com SV40 (vírus símio 40).

Macrófagos peritoneais de camundongos constituem um sistema celular interessante, porque estas células podem ser mantidas durante vários meses, quando explantadas *in vitro*, embora a sua taxa de multiplicação seja extremamente baixa (BENNET, B., 1966; JACOBY, F., 1965). No entanto, os macrófagos podem ser induzidos a replicar e sintetizar DNA quando são incubados com outras células ou em meio condicionado por fibroblastos da mesma espécie (MAUEL J.; DEFENDI, V., 1971; VIROLAINEN M.; DEFENDI V., 1967). Assim, culturas de macrófagos constituem um sistema modelo em que o crescimento celular é dependente de interação com uma população de células diferente (MAUEL, J.; DEFENDI, V., 1971).

Essa linhagem tem valor potencial como um modelo para as funções imunológicas dependentes de macrófagos. Estas células possuem a capacidade de lisar e fagocitar eritrócitos de galinha apenas na presença de anti-soros específicos (WALKER, W. S.; DEMUS, A., 1975). Além disso, as suas funções fagocíticas e citolíticas são a) independentes do sistema complemento, b) dependentes da presença de receptores Fc intactos e c) requerem células metabolicamente ativas (WALKER, W. S., 1976).

A linhagem J774A.1, também murina, tem sua origem do sarcoma de células reticuladas (tecido de ascite), derivada de camundongos *Mus musculus*. Sua duplicação ocorre em cerca de 17 horas (ATCC).

Células J774A.1 são ativas na fagocitose anticorpo-dependente (RALPH, P.; NAKOINZ I., 1975). O seu crescimento é inibido por sulfato de dextran, PPD (derivado proteico purificado) e LPS (lipopolissacarídeo) (RALPH, P.; NAKOINZ I. 1977). Elas sintetizam grandes quantidades de lisozima e exibe citólise, embora menor e são especialistas em fagocitose predominantemente dependente de anticorpos. A interleucina 1 beta (IL1B) é sintetizada continuamente por esta linhagem. (ATCC).

A linhagem J774A.1 foi aqui utilizada como comparativa, no caso de obtermos resultados divergentes.

2.2 Resposta imune celular

A imunidade mediada por células (CMI) é a função efetora dos linfócitos T, e serve como mecanismo de defesa contra microrganismos que sobrevivem e se replicam dentro de

fagócitos ou células não fagocíticas. A fase efetora da imunidade humoral é desencadeada pelo reconhecimento do antígeno por anticorpos secretados; desse modo, a imunidade humoral neutraliza e elimina microrganismos extracelulares e toxinas que são acessíveis a anticorpos, mas não é eficaz contra microrganismos dentro de células infectadas. Em contraste, na CMI, a fase efetora é iniciada pelo reconhecimento do antígeno por células T. Os linfócitos T reconhecem antígenos proteicos de microrganismos intracelulares que são apresentados na superfície de células infectadas com peptídeos ligados a moléculas próprias do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Defeitos na CMI resultam em susceptibilidade aumentada a infecções por vírus e bactérias intracelulares (ABBAS et al., 2008).

A rápida resposta imune inata envolve o recrutamento e ativação de células fagocíticas da imunidade inata, incluindo os macrófagos (KAUFMAN, S. H. E. et al., 2004). Classicamente os macrófagos ativados são envolvidos em resposta inflamatória aguda e produção de proteínas e componentes antimicrobianos, citocinas e quimiocinas e antígenos presentes (ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A., 1984 ; FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K., 2005).

A resposta imunológica adquirida a microrganismos que infectam e se replicam no citoplasma de vários tipos celulares, incluindo células não fagocíticas, é mediada por linfócitos T citolíticos CD8⁺ (CTLs), os quais eliminam células infectadas e os reservatórios da infecção. Se as células infectadas não têm a capacidade de eliminar microrganismos, a infecção pode ser erradicada somente pela destruição dessas células. A morte mediada por CTL é também um mecanismo para eliminar microrganismos que são capturados por fagócitos, mas escapam dos fagossomos para dentro do citosol, onde eles não são suscetíveis à atividade microbida dos fagócitos (ABBAS et al., 2008).

O sistema imune natural também possui um ramo celular, mediado pelas células *natural killer* (NK), as quais protegem contra vírus e outros micróbios intracelulares. As células NK destroem as células infectadas precocemente na infecção (ABBAS et al., 2008).

2.3 Resposta imune humoral

A imunidade humoral é mediada por anticorpos secretados, e sua função fisiológica é a defesa contra microrganismos extracelulares e toxinas microbianas. Os tipos de microrganismos que são combatidos pela imunidade humoral são bactérias extracelulares, fungos e mesmo microrganismos intracelulares obrigatórios tais como os vírus, os quais são

alvos de anticorpos antes de infectarem as células ou quando são liberados de células infectadas (ABBAS et al., 2008).

Anticorpos de mucosas desempenham um papel importante na prevenção da adesão a membrana e a adsorção de antígenos e patógenos na parede epitelial, na neutralização de microrganismos intracelulares dentro de células epiteliais e na ligação e remoção destes agentes estranhos para limitar a exposição sistêmica e propagação (KAETZEL, C. S. et al., 1991; MAZANEC, M. B. et al., 1992; UNDERDOWN, B. J.; SCHIFF, J. M., 1986).

As principais funções dos anticorpos são a neutralização e a eliminação de microrganismos infecciosos e toxinas microbianas. Os anticorpos são produzidos por linfócitos B e plasmócitos nos órgãos linfoides e na medula óssea, mas os anticorpos desempenham suas funções efetoras em locais distantes daqueles nos quais foram produzidos (ABBAS et al., 2008).

2.4 Doença Raiva

A raiva é uma doença mortal, uma antropozoonose, distribuída por todo o mundo, e por séculos tem afetado a humanidade, representando um sério problema de saúde pública em países em desenvolvimento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998; FRAZATTI-GALLINA et al., 2004). É transmitida através da mordedura de animais contaminados, pois o vírus está presente na saliva do animal (LACKAY et al., 2008; WHO, 2004; BAHLOUL et al., 1998; SCHNEIDER, 1991; SEIF et al, 1985). A apresentação clínica da raiva se dá inicialmente com febre, cefaleia, respostas emocionais exageradas (ansiedade e agressividade), desânimo, insônia e uma sensação profunda de mal-estar. Após o início dos sintomas, apenas 2 casos de sobrevivência humana foram registrados na literatura até hoje (BAHLOUL et al., 1998; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; REBUHN, 2000; WILLOUGHBY et al., 2005;).

A raiva causa um grande impacto econômico, se considerados os gastos com tratamentos profiláticos pré e pós-exposição, campanhas de vacinação em cães e gatos e a perda de gado. É estimado que os gastos globais anuais ultrapassem 1 bilhão de dólares (WHO, 2010). A raiva está presente em todos os continentes, exceto Antártida, e em alguns países como Inglaterra, Irlanda, Japão e Países Escandinavos (CFIS, 2010). Dietzschold et al. (2008) relatam que ocorrem aproximadamente 70.000 óbitos humanos por raiva no mundo, porém a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010) estima que ocorram aproximadamente 55.000 óbitos por raiva anualmente no mundo, principalmente nos continentes africano e asiático (WHO, 2008) (**Figura 1**).

Entre os anos de 1986 a 2009 no Brasil, foram notificados 763 óbitos por raiva humana. Destes, 518 casos tiveram o cão como principal agente transmissor e 135 casos por quirópteros. No período de 1990 a 2009 foram registrados 573 casos de raiva humana, sendo que 82% destes ocorreram no norte e nordeste do país. Já em 2004 e 2005 foram 74 óbitos ocorridos nessas regiões, tendo como principal transmissor o morcego hematófago. A partir de 2006 houve um decréscimo nos casos. No ano de 2008, dos três casos que foram relatados, um recebeu o tratamento baseado no protocolo de Milwaukee (WILLOUGHBY et al., 2005), que consiste no tratamento com antivirais e indução do coma no paciente. Esse foi o primeiro caso de cura de paciente no Brasil.

Figura 1- Distribuição mundial da raiva. (WHO, 2008)

A vacina utilizada na tentativa de controle da doença tem apresentado uma crescente evolução desde a primeira tentativa feita por Pasteur no ano 1885, tendo a sua imunogenicidade e segurança como principais aspectos. Ao longo dessa evolução foram desenvolvidas três tipos de vacinas: de primeira, segunda e terceira geração.

O pioneiro das três gerações da vacina, Louis Pasteur, em 1885, produziu a vacina a partir de sucessivas passagens do vírus da raiva em cérebro de coelhos e administrada em seguida (PASTEUR, 1885). Este tipo de vacina causava acidentes neurológicos em virtude da presença de mielina no cérebro de animais adultos (SELLERS, 1947). Fuenzalida e Palácios (1955) desenvolveram uma vacina produzida pela propagação do vírus em cérebro de

camundongos recém-nascidos, uma vez que o cérebro ainda não apresenta níveis elevados de mielina, o que reduziu o número de reações secundárias. Estas foram denominadas vacinas de primeira geração.

A vacina de segunda geração foi desenvolvida paralelamente à de primeira geração e veio com Koprowski e Cox (1948) que mostraram as primeiras vacinas baseadas em ovos embrionados (usadas atualmente em alguns países), e consistem de um vírus inativado após a propagação em ovos embrionados ou em células de mamíferos cultivadas *in vitro* (MENDONÇA et al., 1993). Estas vacinas ainda são baseadas na inativação do vírus, razão pela qual ainda tem alto risco de apresentar reações adversas no organismo a ser imunizado. Também apresentam alto risco na etapa de produção devido à manipulação de grandes quantidades de material infeccioso (COSTA et al., 2000).

Já as vacinas de terceira geração, produzidas a partir da propagação do vírus da raiva em cultura de células, surge de um conceito inovador e radical das outras gerações de vacinas. Nessas vacinas, emprega-se a informação genética do patógeno responsável pela codificação de proteínas que representem antígenos relevantes para a proteção (DINIZ; FERREIRA, 2010). Desta forma, a vacina é baseada em proteínas recombinantes e não na partícula viral, fundamentada no fato de que apenas uma simples proteína viral, no caso do vírus da raiva a proteína G, seja suficiente para produzir resposta imune (SAKAMOTO et al., 1999). As vacinas recombinantes tendem a não causar patogenicidade residual causada pela raiva, porque elas contêm apenas produtos gênicos não virulentos. O laboratório Merial já possui no mercado 1 vacina recombinante: Purevax para gatos (EMA, 2010). Outras duas vacinas contendo o gene da glicoproteína da cepa ERA (Evelyn-Rotkitniki-Abelseth) do vírus da raiva se encontram em testes preliminares em animais silvestres. Uma é chamada de Raboral V-RGH, também da Merial (usa como vetor o vírus Vaccinia vivo) (FOLLMANN et al., 2011); e a outra é ONRABH, da Artemis Technologies Inc., Guelph, Ontário, Canadá (usa como vetor o adenovírus humano tipo 5) (FEHLNER-GARDINER et al., 2012).

O Brasil necessita de uma grande demanda de vacina anti-rábica devido à grande população humana e animal, principalmente caninos e bovinos. Além disso, há a exportação desta tecnologia para alguns países da América do Sul e Ásia. A produção desta vacina encontra-se principalmente em centros de pesquisa como o Instituto Butantan que tem a seu cargo a vacina humana e o Instituto de Tecnologia do Paraná que é o maior produtor da vacina para uso veterinário, com uma produção anual de mais de 30 milhões de doses distribuídas pelo Programa Nacional de Profilaxia da Raiva, do Ministério de Saúde (VOSS,

2008). Os dois institutos produzem a vacina a partir da cultura de células Vero (Rim de macaco verde africano), mantendo um alto padrão tecnológico de produção (MENDONÇA et al., 1993). Apesar desse panorama favorável, ainda se utiliza o vírus inativado como vacina. O advento de novas tecnologias torna necessária a busca de alternativas de produção mais eficientes, seguras e de baixo custo da vacina anti-rábica para que sua distribuição seja cada vez mais ampliada, ultrapassando os possíveis obstáculos de segurança e financeiros.

2.5 Vírus da Raiva e a Glicoproteína G

A doença raiva é causada por um vírus do gênero *Lyssavirus* e família *Rhabdoviridae* que afeta o sistema nervoso central. Sua morfologia é baciliforme, semelhante à “bala de revólver” com uma extremidade plana e outra arredondada (KAPLAN, 1986). O vírus possui uma fita única de RNA de polaridade negativa, linear e não segmentado, de cerca de 12kb (*GenBank: M13215*). Seu genoma foi completamente sequenciado (TORDO et al., 1986, 1988), e codifica para cinco proteínas: uma nucleoproteína (N), uma fosfoproteína (NS), uma RNA polimerase (L), a proteína de matriz (M) e a glicoproteína de superfície (G) ou RVGP (do inglês: *rabies virus glycoprotein*) (YANG et al., 1998) como será referida neste trabalho (Figura 2).

Figura 2- Esquema do vírus da raiva e suas proteínas (Modificado de SCHNELL, 2010).

A RVGP é uma proteína N-glicosilada classe I, que se encontra ancorada na membrana viral através do domínio transmembrânico. Esta proteína também possui um ectodomínio que por sua vez se encontra organizado como um trímero (3×65 kDa), essa conformação trimérica é requerida para o reconhecimento e ligação do vírus nas células infectadas (SISSO F et al., 2005). Esta tem um papel importante na patogênese da raiva por ser mediadora na adesão aos receptores celulares e também na entrada na célula hospedeira. A ligação da glicoproteína G aos receptores é realizada através da ligação hidrofóbica do vírus com a membrana da célula, mediante a interação de um grande número de moléculas de RVGP em um ambiente de pH ácido. A RVGP apresenta três estados conformacionais possíveis e intercambiáveis: Um estado inativo necessário para seu transporte pelo complexo de Golgi, um estado nativo hidrofóbico, presente no vírus circulante e um estado ativo presente no pH ligeiramente ácido a que é exposto logo após a adesão à célula hospedeira e internalização mediada por endocitose, o que leva à fusão do vírus com a membrana do endossomo (GAUDIN et al., 1991, 1999; HALON et al., 2001; LENTZ et al., 1982, 1984; MORIMOTO et al., 1998; THOULOZE et al., 1998; WUNNER, 2007).

Além da RVGP ter um papel importante na adesão às células hospedeiras, ela também é altamente imunogênica, sendo fundamental para a resposta imune contra o vírus da raiva, induzindo a proteção de anticorpos neutralizantes, ativação de linfócitos T auxiliares e citotóxicos e atuar na patogênese da doença (GAUDIN et al. 1992; PERRIN et al., 1985; WUNNER, 2007). Os anticorpos anti-RVGP também são responsáveis pela proteção de animais contra o desafio subsequente com vírus da raiva (RAMYA et al., 2011; WIKTOR et al., 1984; YOKOMIZO et al., 2007). Por causa da sua atividade protetiva, a RVGP tem sido estudada em diferentes sistemas de expressão como bactérias, leveduras, células de inseto, plantas e células de mamíferos, tornando-a uma forte candidata na produção de uma vacina recombinante.

A RVGP expressa em bactérias falhou na proteção após o desafio, provavelmente pelo fato de seres procariotos não serem capazes de realizar glicosilação adequadamente, essas modificações pós-traducionais são fundamentais para a antigenicidade da proteína (YELVERTON et al., 1983).

Klepfer et al. (1993) expressaram a RVGP em leveduras utilizando um vetor de expressão sob controle de um promotor indutível (metalotioneína) e um promotor constitutivo (triose desidrogenase). A glicoproteína foi glicosilada e encontrou-se associada à membrana

das leveduras. Extratos de levedura contendo a glicoproteína G embora tenham protegidos os animais em desafio intramuscular, falhou no desafio intracerebral em camundongos.

Em 2004, Prehaud et al. (2004), utilizaram o sistema baculovírus em células Sf21 para expressão da RVGP e demonstraram que esta manteve as características estruturais e imunogênicas nessas culturas. Lemos et al. (2009) e Ventini et al. (2010) selecionaram populações de células S2 de *Drosophila* que obtiveram uma satisfatória síntese da RVGP, no entanto, o processo para a obtenção dessas células altamente produtivas demandou períodos de tempo extensos.

Na tentativa de produzir uma proteína com a conformação mais próxima à selvagem, células de mamíferos também foram testadas. Morimoto et al. (1992), construíram um vetor derivado de retrovírus contendo o gene da RVGP. Esse vetor permitiu a expressão de RVGP em células de neuroblastoma e células de rim de hamster (BHK-21). A proteína produzida foi corretamente glicosilada apenas em células BHK-21, sugerindo que as alterações pós-traducionais dependem também das condições celulares sob as quais a proteína é metabolizada. Mochizuki et al. (1998), utilizaram vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1) defectivo e também observaram produção de RVGP em células humanas HEK-293T.

Estes experimentos conseguiram resultados variáveis, o qual não é surpreendente considerando a complexidade estrutural da glicoproteína do vírus da raiva (ERTL, 2009), sendo ocasionalmente necessária a utilização de gene repórter, como é o caso do GFP, a fim de monitorar a eficiência dos sistemas de expressão.

2.6 GFP

A proteína verde fluorescente (GFP) na forma selvagem, extraída da *Aequorea victoria*, tem como característica a produção de uma luz verde brilhante fluorescente quando excitada com a luz ultravioleta (UV) (WARD et al., 1998). Sua utilidade como marcador biológico é devido a facilidade de sua utilização, uma vez que não há necessidade de um co-fator para constatar presença de fluorescência, o que a torna uma molécula usada como um indicador de localização da proteína dentro da célula, permitindo o estudo da dinâmica celular e o processo de desenvolvimento em tecidos intactos.

Devido ao seu amplo impacto em pesquisa básica, a GFP tem sido aplicada na avaliação de vetores virais em terapia gênica (CHALFIE et al., 2006), e também como

marcador de expressão gênica em células de insetos, mamíferos e plantas (PLAUTZ, J. D., 1996).

Sua utilização como marcador de expressão genica, foi avaliada em um estudo em que células VERO foram infectadas em diferentes relações de partículas virais para cada célula por um adenovírus recombinante expressando GFP (Ad.CMV-GFP) e avaliado por citometria de fluxo, e foi observado um aumento proporcional de fluorescência e partícula viral:célula. Assim, a expressão de GFP pode ser analisada em uma população de células por citometria de fluxo, sendo um marcador gênico confiável (SOBOLESKI, 2005).

Sua análise qualitativa pode ser realizada por microscopia de fluorescência ou por observação em lâmpada UV de comprimento de onda entre 365 - 395 nm (CHIARINI et al., 2003). Por outro lado, sua análise quantitativa pode ser realizada por fluorimetria e citometria de fluxo.

2.7 Vetores de expressão

Foram desenvolvidos diversos tipos de vetores, virais e não virais, para transferência de genes heterólogos a células de animais e plantas. A escolha do vetor depende diretamente da aplicação, da célula hospedeira, da quantidade ou qualidade do produto pretendido, e segurança.

2.7.1 Vetores não virais

Os vetores não virais são bastante usados nas transfecções transientes. Os elementos que constituem esses vetores são: um promotor constitutivo ou indutível, sinal de parada de transcrição, e sequências procarióticas com a origem de replicação e marcador de seleção para a amplificação em bactéria. Os promotores gênicos de origem viral usados em transfecções transientes geralmente incluem o promotor do Citomegalovírus (CMV) e do Vírus de Símio 40 (SV40) (BALDI et al., 2007; UCHIDA, 2002;).

Esses vetores podem algumas vezes apresentar baixa eficiência de transfecção por haver várias barreiras físicas e químicas nas células até sua chegada ao núcleo: o contato entre o DNA e a membrana celular, o trânsito de todo o DNA através da membrana celular, o escape dos compartimentos endossomais ou lisossomais, o transporte através do citoplasma e a entrada no núcleo, além de possuírem uma maior flexibilidade no número e tamanho de

genes a serem transferidos, bem como pouco risco em questões de biossegurança (BALDI et al, 2007; UCHIDA, 2002).

2.7.2 Vetores virais

Partículas virais, naturalmente, são agentes infecciosos capazes de expressar sua informação genética nas células por eles infectadas. O ciclo vital de um vírus se divide em duas etapas: a infecção, representando o momento de introdução do genoma viral na célula hospedeira, e a replicação do mesmo. Para ambas as fases são necessários grupos de genes cuja expressão é regulada temporalmente, sendo os genes de função regulatória os primeiros a serem expressos, seguidos pelos genes estruturais. A produção de vírus recombinantes envolve a adição de elementos relacionados ao cassete de expressão do transgene (KAY, 2001)

De acordo com a natureza do ácido nucléico que os compõe, os vetores virais são classificados em vírus de DNA, de RNA ou quimeras. Nesses sistemas, a sequência de interesse é inserida de tal modo que, geralmente, substituirá algum gene ou região do genoma viral, de forma que o controle de sua transcrição fique a cargo de elementos de expressão viral. Se o material genético do vetor viral possuir um capsídeo, o vetor entrará na célula pelo mecanismo denominado infecção, o qual na maioria dos casos, apresenta elevada eficiência (BOLLATTI-FOGOLIN et al, 2008).

Entre os vetores derivados de vírus de DNA temos vírus SV-40 e o políoma, pertencentes a família dos poliomavírus, o adenovírus, os vírus adeno-associados (VAA), o vírus Epstein-Barr (EBV), o vírus do herpes simplex (HSV), o vírus da varíola atenuado (vaccinia) e os poxvírus recombinantes. Entre os vetores virais derivados de vírus de RNA temos os retrovírus, o coronavírus e na família Togaviridae, o gênero alphavírus possui dois representantes que se destacam no emprego como vetores de expressão para fins biotecnológicos: o vírus Sindbis e o Semliki Forest Virus.

2.8 Organização genômica do *Semliki Forest Virus* (SFV)

O SFV é um vírus envelopado de RNA positivo simples fita, pertencente ao gênero *Alphavirus* da família Togaviridae. Os vírus pertencentes a essa família caracterizam-se por possuir um genoma de RNA simples fita não segmentado, que funciona como RNA

mensageiro. Essa fita de RNA positivo é encapsidada por um único tipo de proteína, arranjada em configuração icosaédrica. Essa fita simples, de cerca de 12kb, é dividida em duas ORF's (*open reading frames*), sendo que o primeiro codifica quatro proteínas não estruturais, denominadas nsP1 a nsP4 que são responsáveis pela transcrição e replicação do RNA viral. Na região nsP2 situa-se o sinal de empacotamento do RNA viral. O segundo ORF, sob o controle do promotor subgenômico 26S, codifica as proteínas estruturais, necessárias para a encapsidação do genoma viral, ou seja, a proteína do capsídio (C) e três proteínas do envelope (p62, que é precursora da E2, E3 e E1). As proteínas estruturais não são necessárias para a replicação do genoma viral, mas são essenciais para a propagação do vírus (RHÊME et al., 2005).

O envelope viral contém 240 heterotrímeros das glicoproteínas E1, E2 e E3 que são responsáveis pela interação com receptores e entrada do vírus nas células alvo. A entrada viral ocorre através de endocitose seguida pela fusão do envelope viral com a membrana do endossomo, dissolução do núcleocapsídeo e liberação do RNA viral no citoplasma. Todo ciclo de replicação do SFV ocorre no citoplasma da célula infectada. O RNA genômico contém algumas características típicas do mRNA celular, como o CAP na região 5' e a cauda poliadenosina na região 3' (QUETGLAS, 2010).

2.9 Semliki Forest Virus como vetor de expressão

O SFV tem sido usado como vetor de expressão de uma ampla variedade de genes em células eucarióticas. Sua eficiente replicação genômica, no citosol, mediada por polimerases tornou-o uma alternativa atrativa para a rápida e eficiente entrega de genes, permitindo a expressão de diferentes proteínas em uma ampla gama de células hospedeiras de mamíferos (LUNDSTROM, 2001).

Para o desenvolvimento do vetor de expressão, o cDNA correspondente a seu genoma foi cortado e inserido em dois plasmídeos diferentes: O plasmídeo de expressão, que contém o gene das proteínas não estruturais do SFV (nsP1-4) e o promotor forte subgenômico SFV 26S localizado antes de uma região de policlonagem destinada à introdução do gene de interesse; e um plasmídeo auxiliar que contém os genes das proteínas estruturais do envelope viral (LILJESTROM et al., 1991; LILJESTROM; GAROFF, 1991). (Figura 3).

Figura 3- Representação esquemática do sistema SFV de expressão recombinante.

Genoma do SFV selvagem, (A). Vetor de expressão em que os genes das proteínas estruturais foram substituídos por um sítio de policlonagem, em que é inserido o gene de interesse (B). Vetor auxiliar necessário para a formação de partículas virais na célula hospedeira (C). Adaptado de Riezebos-Brilman, 2006.

Após a realização da linearização e transcrição *in vitro* de ambos os plasmídeos, os RNAs são co-transfectados em células de mamífero (geralmente BHK-21). O RNA positivo do vetor de expressão funciona como um RNA mensageiro da célula hospedeira, com um códon AUG situado a 59 nucleotídeos do sítio 5' cap. A tradução é encerrada antes do promotor 26S pela presença de um códon de parada. A poliproteína não estrutural gerada é então clivada em diversos complexos associados ou em partes individuais. Esses polipeptídeos não estruturais então catalisam as atividades de replicação e de transcrição: atuam como RNA polimerase RNA-dependente e sintetizam uma fita negativa do RNA completo, que serve como molde para dois transcritos, um RNA + de tamanho total contendo o sinal de encapsidação e um RNA + subgenômico a partir do promotor 26S que dará origem às proteínas estruturais. Quando uma quantidade suficiente de proteína de capsídeo viral está disponível, o RNA + de expressão liga-se a ela formando o nucleocapsídeo viral. O estágio final ocorre principalmente na membrana plasmática de células animais, quando o nucleocapsídeo interage com o domínio citoplasmático da glicoproteína E2, iniciando o processo de brotamento (SCHELESINGER; SCHELESINGER et al., 1991). Dessa forma, o sistema SFV gera partículas virais que carregam o RNA contendo a informação da proteína

que se quer expressar, nesse caso a RVGP e GFP, utilizada posteriormente para infecção de células ou organismos, conforme figura 4A e 4B:

Figura 4- Esquema de expressão do sistema SFV.

(A) Esquema da produção dos vírus rSFV; (B) Esquema de infecção de macrófagos.

As partículas de SFV recombinantes têm apresentado uma eficiente entrega de genes em células de neurônios primários em cultura, alcançando taxa de infecção de 75 a 95%, sendo que essas células permanecem intactas por vários dias pós-infecção. Ao comparar o SFV recombinante com outros vetores virais como adenovírus, adenovírus associados e lentivírus, ele é o preferido para uma expressão gênica rápida, de alto nível e neurônio específica (LUNDSTROM, 2001).

Essas partículas são capazes de infectar uma ampla gama de células animais, notadamente as células de mamíferos. Entretanto, devido à ausência do sinal de encapsidação

no RNA codificante para as proteínas estruturais, apenas o RNA contendo o gene de interesse é empacotado, constituindo o único RNA presente na partícula viral, o que na prática faz com que essas partículas sejam infecciosas, mas não replicativas (LILJESTROM et al., 1991; LILJESTROM; GAROFF, 1991;). Em uma abordagem de engenharia genética posterior, visando aumentar a segurança do sistema, a proteína do envelope viral E2 foi mutada de forma que o vírus apenas pode realizar a fusão com a membrana plasmática da célula a ser infectada, quando previamente tratado com α -quimiotripsina (BERGLUND et al., 1993).

3 OBJETIVO

Avaliar a capacidade do vetor viral SFV-RVGP e SFV-GFP em promover entrega gênica a macrófagos *in vitro*.

3.1 Objetivos específicos

- Obtenção das partículas virais SFV-RVGP
- Avaliação *in vitro* da eficiência de entrega gênica (RVGP) a macrófagos;
- Avaliação da citotoxicidade das partículas virais nas culturas de macrófagos

4 MATERIAL E METODOS

4.1 Linhagens celulares

A linhagem celular de macrófagos IC-21 (TIB-186TM) foi obtido da ATCC[®]. É derivada da transformação de macrófagos peritoneais de camundongo *Mus musculus* normal C57BL/6 imortalizados com SV40 (vírus símio 40). Esta linhagem tem como característica a adesão ao substrato, aparência de fibroblasto e possui propriedades fagocíticas e citolíticas, podendo lisar alvo tumoral *in vitro* (ATCC, 2014).

A linhagem de macrófagos J774A.1 foi gentilmente doada já em cultivo pela Dra. Rita de Cássia Ruiz, do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan. Estas células têm a característica de também serem aderentes, mais arredondadas e de crescimento mais acelerado se comparado às IC-21. Sua origem é de tecido de ascite, também derivada de camundongos *Mus musculus*.

O meio de cultivo utilizado em ambas as linhagens foi o RPMI-1640 (Gibco[®] by Life Technologies) suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino).

4.2 Manutenção das células

As células IC-21 e J774A.1 foram cultivadas em frascos T de 75 cm² com volume de trabalho de 12 mL a 37 °C em incubadora contendo 5% de CO₂, sendo repicadas (redução do número de células + troca de meio) 2-3 vezes por semana.

4.3 Preservação das células

Foi montado um banco das duas linhagens de macrófagos. Para o congelamento, o meio de preparo consistia em 95% de meio novo e 5% de DMSO. As células foram primeiramente mantidas a -80 °C por 24 horas após a técnica de congelamento e posteriormente foram transferidas e mantidas em nitrogênio líquido a -196 °C até uso.

4.4 Análise de densidade, viabilidade celular e velocidade de crescimento

Para a análise de viabilidade e densidade celular foi utilizado o método de exclusão do corante Azul de Tripan em hemacitômetro (DOYLE; GRIFFITHS, 1998). Foram contados 16 quadrantes (8 quadrantes/câmara) para diminuir os erros de contagem. A média e o desvio padrão das medidas de densidade e viabilidade celular foram determinados considerando 4 eventos de contagem, sendo cada evento representado pela contagem de 4 quadrantes.

Foram retiradas alíquotas de 90 µL do recipiente em questão e, em seguida, foi acrescentado 10 µL de uma solução etílica 0,4% (m/v) azul de Tripan preparado previamente.

A densidade celular total é dada pelo somatório do número de células não coradas (viáveis) somado com o número de células coradas (não viáveis), multiplicado pelo fator de diluição e pelo volume de um quadrante da câmara de Neubauer, como mostra a seguinte equação:

$$(n_v + n_d) \times FD \times V_c = X \text{ (Células} \cdot \text{mL}^{-1}\text{)}$$

A densidade de células viáveis é dada pelo número de células viáveis, multiplicado pelo fator de diluição e pelo volume de um quadrante da câmara de Neubauer, de acordo com a equação a seguir:

$$n_v \times FD \times V_c = X \text{ (células} \cdot \text{mL}^{-1}\text{)}$$

Já a viabilidade celular é dada pela razão entre o número de células viáveis e o número de células total no meio (células viáveis e inviáveis), multiplicados por 100, como mostrado na equação:

$$\frac{n_v}{n_v + n_d} \times 100 = \% \text{ de células viáveis}$$

Onde n_v é o número total de células viáveis, n_d é o número total de células mortas, X é a densidade celular, V_c é o volume de um quadrante da câmara de Neubauer e FD é o fator de diluição da suspensão de células. O volume de um quadrante da câmara de contagem é de 10^{-4} mL.

O modelo cinético mais utilizado para representar o crescimento dos microrganismos em um sistema contínuo é o Modelo de Monod (1949 e 1950), onde a velocidade específica de crescimento celular é representada pelo símbolo “ μ ” e a máxima desta velocidade por “ $\mu_{\max}$ ” (ZAIAT, M. 2003).

A taxa específica de crescimento máxima é a taxa máxima de crescimento obtida para condições não limitantes. A constante de Monod (K_s) é a concentração do nutriente limitante para a qual a taxa de crescimento é metade da taxa de crescimento máxima. Representa a afinidade do organismo para o nutriente.

Os valores de μ_m e K_s dependem do organismo do nutriente limitante do meio de fermentação e de factores como temperatura e pH. Os cálculos do $\mu_{\max}$ são feitos a partir da equação abaixo:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_m S}{K_s + S} X$$

Onde, μ_m é a taxa específica de crescimento máxima, K_s é a constante de saturação ou de Monod e S a concentração do substrato limitante.

4.5 Análise de metabólitos

Foram retiradas diariamente amostras de 100 μL de sobrenadante da cultura celular e armazenado a -20°C até o momento da análise. Os substratos glicose, glutamina e glutamato

e o metabólito lactato das diferentes culturas foram analisados enzimaticamente no *Biochemistry Analyser Model 2700 Select* (YSI Inc., Yellow Springs, Ohio, EUA).

4.6 Obtenção do Semliki Forest Virus recombinante (SFV-RVGP e SFV-GFP)

O sistema de expressão gênica derivado do vírus *Semliki Forest* consiste do uso de dois plasmídeos (gerados a partir do genoma do SFV). O plasmídeo de expressão (pSFV-RVGP; pSFV-GFP) que contém os genes não estruturais do SFV e o promotor subgenômico SFV26S, além de uma região de policlonagem para inserção do gene de interesse (RVGP ou GFP). O outro plasmídeo, denominado como “auxiliar” ou Helper (pSFV-Helper), contém a informação genética para as proteínas estruturais do vírus (Figura 5). Ambos os plasmídeos possuem como sinais de seleção bacteriana, o gene de resistência à ampicilina. O plasmídeo de expressão possui ainda um sinal de encapsidação, ausente no plasmídeo “auxiliar”, tendo essa sequência, a função de permitir que o plasmídeo/RNA que a possui seja incorporado pela partícula viral recém gerada. Estes vetores foram gentilmente cedidos pelo Dr Renaud Wagner, do laboratório de Receptores de Proteínas Membranárias da Universidade de Strasbourg, França.

Figura 5- Mapa dos vetores plasmidiais.

SP6 – Promotor para RNA polimerase; nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4 – Proteínas não estruturais do SFV; Amp – Gene de resistência à ampicilina; 26S – Promotor subgenômico viral; OriC – Origem de replicação bacteriana; RVGP – Glicoproteína do vírus da raiva.

4.6.1 Amplificação dos vetores

Os vetores foram amplificados mediante a transformação de bactérias competentes da cepa *Escherichia coli* DH5 α crescidas em meio LB com antibiótico (Ampicilina 100 mg/mL).

O DNA plasmidial foi extraído e purificado com o kit *Maxiprep Plasmid* (Qiagen, Valencia, CA., U.S.A.), conforme instruções do fabricante, cujo método é baseado na técnica de lise alcalina (BIRNBOIM e DOLY, 1979). A quantificação do DNA foi determinada por fluorimetria através do equipamento Qubit (Invitrogen, Carlsbad, CA., U.S.A), e a presença do plasmídeo foi confirmada por análise de padrões de restrição e eletroforese em gel de agarose.

4.6.2 Transcrição *in vitro*

Primeiramente, os plasmídeos pSFV-RVGP ou pSFV-GFP e pSFV-Helper foram linearizados com as enzimas *Nru* I e *Spe* I, respectivamente. Uma eletroforese em gel de agarose 0,8% foi realizada para confirmar a linearização. Após esse passo, estes DNAs linearizados foram usados como molde para geração de RNA, através de um processo de transcrição *in vitro*, usando o kit *MAXIScript SP6* (Life Technologies, Carlsbad, U.S.A.), conforme instruções do fabricante com algumas modificações, como a temperatura de incubação de 40 °C, além da adição dos reagentes *CAPanalog* (Invitrogen, Carlsbad, USA.) e *Ribolock* (Thermo Scientific, Vilnius, Lituânia). A eficiência da transcrição foi verificada usando eletroforese em gel de agarose 0,8%.

4.6.3 Transfecção por eletroporação

O protocolo de eletroporação foi baseado em Karlsson e Liljestrom (2003), com algumas modificações. Assim, células BHK-21 aderentes foram coletadas na fase exponencial e foi calculada a concentração celular. O volume de células correspondente a uma concentração de 8×10^6 cels/mL, foi submetido a centrifugação a 715 g por 5 minutos, o pellet foi então ressuspenso em meio de cultura fresco. Esta suspensão foi transferida para um tubo contendo os RNAs obtidos da transcrição, sempre na proporção de 2:1 (RNA-RVGP ou RNA-GFP: RNA-Helper), e a mistura foi transferida para a cubeta de eletroporação (0,4 cm). A eletroporação foi feita utilizando o aparelho GenePulser II (Biorad, Hercules, CA., U.S.A.). As condições de eletroporação se encontram resumidas na Tabela 1. As células recém

eletroporadas foram distribuídas em placa de cultura de 6 poços com 1,5 mL de meio fresco por cada poço, e incubadas a 37 °C, com 5% de CO₂ por 24 horas. Após esse período, o sobrenadante das células foi coletado e centrifugado a 12.000 g (4 °C), por 30 minutos. O sobrenadante da centrifugação, contendo os vírus, foi então aliquoteado e armazenado a -80 °C.

Tabela 1- Condições de eletroporação

Parâmetro	Valor
Voltagem (V)	850
Capacitância (µF)	25
Resistência (Ω)	∞
Pulsos	2
Intervalo entre pulsos (seg)	1
Cubeta (cm)	0,4

4.7 Detecção e quantificação viral

Para determinar o título viral e, conseqüentemente, a quantidade de vírus a ser utilizada no processo de infecção, utilizou-se um protocolo de extração do RNA viral seguido de uma etapa de transcrição reversa, de forma que o cDNA obtido fosse então quantificado por qRT-PCR.

a) *Extração de RNA:* O sobrenadante contendo as partículas virais foi submetido a um processo de extração do RNA viral, através do kit QIAmp Viral RNA (Qiagen), conforme instruções do fabricante.

b) *Tratamento com DNase:* O RNA obtido foi submetido a uma etapa de tratamento com a enzima DNase I (Promega, Madison, WI., U.S.A), para eliminar possíveis DNAs contaminantes que possam existir na solução. Após a adição de 3 unidades da enzima para cada 3 microgramas do material, a solução é incubada a 37 °C por 30 minutos. Terminado esse período, adicionou-se 2 µL de um inibidor enzimático à base de EGTA (*Stop Solution* -

Promega), e a reação foi incubada por 10 minutos a 65 °C. Este passo visa à inativação da enzima, para que não haja ação da mesma no cDNA viral que será obtido posteriormente. O RNA tratado foi imediatamente submetido a uma reação de transcrição reversa.

c) *Síntese do cDNA*: A síntese do cDNA correspondente ao material genético viral para sua posterior quantificação no aparelho de qRT-PCR é feita por um processo de transcrição reversa *in vitro* (RT). Para essa etapa, foi utilizado o *primer* R-E-2 (Tabela 2), específico para a região nsP3 do vírus do SFV. Cada amostra de RNA extraído foi então submetida à reação de transcrição reversa com a enzima M-MLV (Life Technologies). Primeiramente, o RNA tratado com DNase foi incubado a 65 °C durante 5 minutos, juntamente com 1 µM de oligonucleotídeos anti-senso específico, 0,5 mM de dNTPs e água livre de DNase e RNase. Em seguida, a mistura foi resfriada rapidamente no gelo e adicionados o tampão, o DTT 0,1M e 200 U de M-MLV, em um volume total de 20 µL. A reação foi incubada a 37 °C durante 50 min para a síntese do cDNA. A reação foi interrompida pela incubação a 70 °C durante 15 minutos. As amostras foram então armazenadas a -20 °C até a análise.

4.8 PCR e Semi-Nested PCR

Durante a padronização dos protocolos, as preparações de RNA tratadas com DNase foram testadas em reações de *semi-nested* PCR, utilizando os pares de *primers* (RVGP5 e RVGPr1) (Tabela 2), para avaliar a eficácia da digestão do DNA contaminante. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi desenvolvida com o kit comercial *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen), seguindo recomendações do fabricante. Foram adicionados 5 µL de amostra, para 1 µL de cada *primer* com uma concentração de 5 µM, 1 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 0,5 µL dNTP (10 mM), 2,5 µL de Buffer 10x, 0,2 µL de enzima (1 U) e água para um volume final de 20 µL. A reação foi realizada no termociclador PTC-200 (MJ Research, St Bruno, Quebec, Canada) com o seguinte ciclo de amplificação: 94 °C / 3 minutos, (94 °C/ 15 segundos, 53 °C/ 30 segundos, 72 °C/ 30 segundos) × 34, e 72 °C/ 10 minutos. As mesmas condições foram utilizadas na reação de *semi-nested* PCR, sendo as amostras provenientes da primeira PCR. Os fragmentos amplificados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1,5 %.

Tabela 2- Características dos oligonucleotídeos usados como primers.

Nome	Uso	Sequencia	TM (°C)	%GC
F-I-2	qRT-PCR	ACA GAC TGT CAC TGA GCA G	52	53
R-I-2	qRT-PCR	TCT CTG CAG TAG ATG GTC AC	54	50
R-E-2	RT	CTC AAT GAT GAC GTG GAG CT	54	50
RVGP5	PCRc*	AGACAAGCTTGGTCCCTGG	57,2	57,8
RVGPr1	PCRc	TGTAATCGTGGTTAGTGGAGC	54,5	47,6

*PCRc: PCR convencional.

4.8.1 qRT-PCR para titulação dos SFV recombinantes

Para realizar a quantificação do RNA genômico das partículas virais, foi construída uma curva-padrão, a partir do vetor de expressão (pSFV-RVGP ou pSFV-GFP). O vetor foi submetido à linearização através da digestão com a enzima *Nru* I (Thermo Scientific), que foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose 0,8 %. Posteriormente, foi quantificado através de método de fluorimetria (Qubit - Invitrogen) e diluído em TE pH 8 (1 mM), para a obtenção de diversas quantidades de cópias (6×10^7 , 6×10^6 , 6×10^5 , 6×10^4 , 6×10^3 , 6×10^2 e 60 cópias). Os padrões diluídos e aliquotados foram armazenados a -20°C até o momento do uso. Diversas amplificações da curva padrão foram realizadas por qRT-PCR para determinar sua reprodutibilidade, os experimentos foram realizados em triplicatas para cada padrão (PUGLIA, A. et al, 2014). O par de *primers* usados para a quantificação por qRT-PCR foram o R-I-2 / F-I-2 (Tabela 2).

A qRT-PCR foi realizada no equipamento *StepOne Real Time PCR System* (Applied Biosystem, Foster City, CA, U.S.A.). Utilizou-se o kit *Power Sybr Green* (Life Technologies), que contém uma mistura de dNTPs, MgCl_2 , Taq DNA polimerase e reagente intercalante de bases fluorescente (*Sybr Green*) em tampão próprio. Na solução contendo o mix, foram adicionados 0,65 μL de cada *primer* (R-I-2 / F-I-2, a 5 μM) e água para um volume final de 12 μL . A solução era então distribuída na placa *MicroAmp* (Applied Biosystems), adicionando-se posteriormente 3 μL de amostra, totalizando 15 μL de volume final. A placa era então vedada e brevemente centrifugada (300 g/ 5s).

O ciclo de amplificação utilizado foi: $95^\circ\text{C}/10\text{ min}$, ($95^\circ\text{C}/15\text{ segundos}$, $53^\circ\text{C}/15\text{ segundos}$, $60^\circ\text{C}/15\text{ segundos}$) $\times 40$. A curva de dissociação foi lida entre $63-90^\circ\text{C}$ com leitura a cada $0,3^\circ\text{C}$ de elevação, para verificar a especificidade da reação, sendo que o fragmento amplificado (145 bp) apresentou dissociação à temperatura de $83^\circ\text{C} \pm 0,3^\circ\text{C}$.

O aplicativo *StepOne Software v2.2.2* (Applied Biosystems) foi utilizado para realizar a análise de dados obtidos durante a reação de qRT-PCR.

Para determinação do título viral, foram realizados alguns cálculos com base na equação da curva de quantificação. Sendo que, o número de cópias do RNA-SFV foi determinado multiplicando-se o resultado fornecido pela qRT-PCR por um valor obtido com base nas diluições efetuadas e pelo rendimento do processo de extração.

$$\text{SFV} = A \times B / C \times D / E$$

Onde:

SFV= número de cópias de vírus por μl

A= resultado obtido pela qRT-PCR

B= volume total da RT

C= volume da amostra usada na qRT-PCR

D= volume de eluição da coluna de extração

E= volume utilizado após tratamento com DNase para fazer RT

4.9 Infecção com SFV recombinantes

Uma vez quantificados, os vírus recombinantes foram utilizados para infecção de células IC-21, J774A.1 e BHK-21 aderente como controle positivo. Os vírus são obtidos na forma inativa devido a uma mutação na proteína estrutural E2, necessitando assim de uma incubação com α -quimiotripsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) usando uma concentração de 1,6 mg / mL de vírus por 30 minutos à temperatura ambiente (TA), para a ativação viral. Posteriormente, um tratamento com aprotinina (Thermo Scientific, Vantaa, Finlândia) (1 mg/ mL de vírus) por 5 minutos à TA foi realizado para inativar a α -quimiotripsina.

Após esse processo, as partículas ativadas e não ativadas foram utilizadas para infecção. As linhagens IC-21 e J774A.1 foram inoculadas em placas de 6 poços, com 4×10^5 células/poço, e as células BHK-21 com inoculo inicial de $1,5 \times 10^5$ células/poço um dia antes da infecção. Para o processo de infecção foi retirado o meio de cultura de cada poço, após foi adicionado o vírus na quantidade desejada, previamente diluído em 0,5 mL de meio fresco sem soro. As placas permaneceram com este volume durante uma hora enquanto eram agitadas. Após esse tempo, foi adicionado meio fresco para um volume final de 1,5 mL/poço e os cultivos foram colocados a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂.

Após 24 horas, as células foram coletadas por fluxo-refluxo, após centrifugação a 715 g por 5 minutos, o sobrenadante de cada poço e o pellet foram coletados e armazenados a -20 °C para posterior avaliação quanto à presença da proteína correspondente.

4.10 Análise da expressão da RVGP

4.10.1 *Imunofluorescência Indireta*

Células infectadas com SFV-RVGP foram avaliadas através de um microscópio de fluorescência invertido após 24 horas de infecção utilizando os seguintes reagentes e soluções:

- Anticorpo primário: monoclonal C75 – Anti RVGP produzido em camundongo
- Anticorpo secundário: α IgG-D1 – Anti-mouse conjugado com FITC.
- Azul de Evans
- Paraformaldeído (4%)
- Tampão PBS – pH 7,0
- Tampão PBS-Tween – pH 7,0: PBS + 0,05% Tween 20

No dia anterior ao procedimento, foi realizada uma infecção com SFV-RVGP em todas as linhagens estudadas, em placas de 6 poços com lamínulas, com as relações partículas virais:célula correspondentes (1, 10 e 100). Após 24 horas, o meio de cultura foi retirado, e cada poço foi lavado sem homogeneização brusca, 3 vezes com PBS (1x).

Para a fixação das células na lamínula, foram adicionados 0,5 mL de paraformaldeído (4%) em cada poço, sendo as placas incubadas sobre o gelo, 20 min. Passado esse tempo, cada poço foi novamente lavado 3 vezes com PBS (1x). O anticorpo primário (C75) foi adicionado com diluição 1:400 (200 uL), através de gotejamento sobre a lamínula, e as placas incubada a TA, 1 h. Três novos procedimentos de lavagem foram realizados, utilizando 1 mL da solução de PBS-Tween. Para a adição do anticorpo secundário (α IgGD1), o mesmo foi diluído em solução de Azul de Evans, sendo adicionado 200 uL por poço, e as placas incubadas a TA, 1 h, no escuro. Após esse tempo, cada poço foi novamente lavado 3 vezes com PBS (1x).

As lamínulas foram então retiradas de cada poço, e colocadas em lâminas, que já haviam recebido 8 uL de *SlowFade Gold*[®] (Invitrogen), um reagente que preserva a fluorescência por

um período maior de tempo, e que contem ainda o DAPI, um marcador de núcleo celular. A visualização foi feita em microscópio de fluorescência BX51 (Olympus, Tóquio, Japão), com auxílio do sistema de captação de imagem DP73 (Olympus), e do software CellSens Standard.

4.11 Análise da expressão da GFP

4.11.1 *Microscopia de fluorescência*

Após a infecção das células IC-21, J774A.1 e BHK-21 com vírus SFV-GFP, os cultivos foram incubados em uma câmara de CO₂ (MIU-IBC) acoplada a um microscópio de fluorescência (IX81, Olympus) para aquisição das imagens. O desenvolvimento de fluorescência, correspondente à expressão da GFP foi acompanhado durante 72h, para as linhagens de macrófagos e 24h após a infecção para as BHK-21 com auxílio do aplicativo OV100 in vivo Imagine System.

4.11.2 *Citometria de Fluxo*

Para a análise de expressão por citometria de fluxo 24 horas após infecção com SFV-GFP, as células IC-21 e BHK-21 foram desprendidas das placas utilizando a enzima Tripsina diluída 1:3 e 1:1 em PBS respectivamente. Já as J774A.1 foram soltas por fluxo/refluxo, e todas foram centrifugadas (750 g / 5 min) e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em solução de PBS e armazenadas ao abrigo da luz para posterior leitura. A análise da proporção de células fluorescentes e da mediana de fluorescência foram realizadas no aparelho FACS Calibur (Becton Dickinson), a partir da contagem de 10.000 eventos para cada amostra. A proteína GFP quando excitada pelo raio laser do FACS emite luz que é detectada pelo filtro de 530 nm (FL1), capaz de detectar, portanto, a fluorescência verde da proteína.

4.12 Ensaio de infecção para avaliar o potencial de transdução das partículas de SFV

Para analisar a entrada dos vírus SFV nas células IC-21, J774A.1 e BHK-21, foi realizado um experimento de Quantificação da Titulação Viral SFV-RVGP e SFV-GFP a 0 h da infecção, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 24 h, 48 h e 72 horas pós infecção com vírus ativado e não ativado para percepção se a titulação viral diminuía, sugerindo assim a entrada do vírus ou se permanecia com o mesmo valor, indicando que o vírus permanecia no sobrenadante e não

entrava nas linhagens em questão. Sabendo-se que os os vírus SFV recombinantes infectam em pouco tempo a linhagem BHK-21, esta foi utilizada como controle positivo do experimento.

5 RESULTADOS

5.1 Análises de densidade, viabilidade celular e metabólitos

Os ensaios foram realizados a 37 °C, em placa de cultura de 6 poços, com um volume de trabalho de 2 mL e uma concentração inicial de 4×10^5 céls/mL em duplicata. O crescimento das duas linhagens celulares (IC-21 e J774A.1) foi acompanhado por 120 horas e amostras foram retiradas diariamente para determinação da concentração celular e para posterior análise de metabólitos.

5.1.1 Análise de densidade e viabilidade celular

A linhagem IC-21 apresentou uma dificuldade relevante na etapa de desprendimento celular para posterior análise de viabilidade, pois comumente a tripsina é utilizada para soltar o tapete de células de mamíferos, mas é tóxica para estas linhagens de macrófagos, e por isso recorremos ao uso do “Cell Scraper” para este fim e posterior fluxo/refluxo para soltar os grumos formados por este utensílio. A linhagem J774A.1 não apresentou dificuldade no desprendimento do substrato, bastando apenas um leve fluxo/refluxo para que soltasse o tapete celular. É possível a análise da densidade celular conforme mostrado na figura 6:

Figura 6- Análise de densidade e viabilidade celular.

Linha tracejada indicando a viabilidade celular em porcentagem. Linha contínua indicando a concentração/densidade celular por células/mL. A análise da dispersão das amostras foi tratada com Desvio Padrão.

Através da observação visual, percebemos diferenças quanto a velocidade no crescimento celular das linhagens de macrófagos. As células IC-21 são mais lentas que as J774A.1. A linhagem J774A.1 teve sua concentração máxima de $1,26 \times 10^6$ cel/mL em 72 horas e a partir desse momento apresentou uma constante queda até as 120 h e a IC-21 teve a sua máxima de $1,25 \times 10^6$ cel/mL em 120 horas até onde foi possível acompanhar não tendo como indicar quando se deu início a queda na concentração celular uma vez que ainda estava em plena divisão celular ao final do experimento.

Porém, a partir dos dados obtidos para análise de viabilidade celular, foi possível calcular a velocidade máxima de crescimento celular tanto da linhagem IC-21 quanto das J774A.1, conforme apresentado na figura 7. Os valores calculados são semelhantes. É possível notar que o $\mu_{\max}$ das células IC-21 foi de 0,0302 e de 0,0265 nas J774A.1.

As células IC-21 começam a sua fase exponencial a partir das 24 horas do repique – subcultivo da cultura celular em novo substrato – já as células J774A.1 marcam o início de sua fase log a partir do momento do repique, ou seja, esta segunda linhagem começa a se dividir no mesmo momento do subcultivo, indicando assim que não há uma fase de adaptação

ao novo substrato como parece acontecer com as células IC-21, embora as duas apresentem o tempo de duplicação muito semelhante, de 23 horas nas IC-21 e 26 horas nas J774A.1.

Relativo à viabilidade celular, os resultados indicaram um padrão semelhante entre as duas linhagens. Foi possível observar que ao final do experimento, ambas as linhagens apresentaram entre 59% e 65% de células viáveis.

Figura 7 - Análise da velocidade máxima de crescimento celular das linhagens IC-21 e J774A.1

(A) Gráfico representando em linha azul o crescimento celular das células IC-21 e (B) apontando em vermelho a análise do crescimento celular da linhagem J774A.1.

5.1.2 Cinética do consumo/produção de Glicose e Lactato das linhagens IC-21 e J774A.1

As amostras de sobrenadante da cultura dessas células foram submetidas à leitura no analisador bioquímico “YSI Model 2700 SELECT” e os valores obtidos estão apresentados no gráfico abaixo:

Figura 8- Análise de consumo/produção de glicose e lactato.

O consumo de glicose está representado pela linha contínua e a produção de lactato pela linha tracejada em células IC-21 (em azul) e J774A.1 (em verde).

Um dos maiores problemas em cultura *in vitro* é a formação de lactato e amônio decorrente do metabolismo celular. Quando excedem determinada concentração, possuem efeitos tóxicos e inibitórios para as células. (ALTAMIRANO et al., 2008, 2013).

O cultivo das duas linhagens testadas foram finalizados com 2,5 g/L de glicose nas IC-21 e com 2,65 g/L de glicose nas J774A.1. A produção de lactato, bem como no consumo da glicose, apresentaram resultados semelhantes, indicando assim que referente a análise de metabólitos estas duas linhagens são bastante semelhantes. A produção de lactato ao término do cultivo foi de 2,7 g/L em células IC-21 e de 2,9 g/L nas J774A.1.

É necessária uma concentração de lactato de 3,5g/L para que este metabólito cause efeitos visíveis no crescimento celular (GÓDIA F. E CAIRÓ J. 2006) e esses valores não foram observados nos nossos cultivos.

5.1.3 Cinética de consumo/produção de Glutamina e Glutamato das linhagens IC-21 e J774A.1

A partir da mesma amostra de sobrenadante dos cultivos retirada a cada 24h durante cinco dias foi possível também realizar a dosagem de glutamina e glutamato nas amostras de macrófagos.

Figura 9- Análise de consumo/produção de glutamina e glutamato.

O consumo de glutamina está representada pela linha contínua, e a produção de glutamato pela linha tracejada, em células IC-21 (em azul) e J774A.1 (em verde).

As amostras apresentaram um mesmo padrão no consumo de glutamina, dentro do esperado por se tratar de células de mamíferos, chegando próximo a zero em 72 horas de cultivo em ambas as linhagens. Já a produção de glutamato, em ambas ao final do cultivo chegaram a 92 mg/L, embora as células J774A.1 houve uma crescente até 96 horas de cultivo e uma pequena queda é apresentada em 120 horas.

A glutamina em sistemas de cultura celular suporta o crescimento de células que têm altas exigências de energia sendo uma fonte de energia alternativa para as células que se dividem rapidamente ou células que usam a glicose de forma ineficiente (ALTAMIRANO *et al.*, 2008, 2013).

A glutamina é um aminoácido não essencial que é degradado para formação do glutamato e amônia, com o decorrer do metabolismo a concentração de glutamina decai, uma vez que este aminoácido é utilizado nas reações do ciclo do ácido tricaboxílico, transformando-se em glutamato pela perda da amônia. Em sua forma desaminada, o glutamato pode estar envolvido no ciclo do ácido tricarboxílico, na gliconeogênese, síntese proteica, entre outros (ALTAMIRANO *et al.*, 2008, 2013).

5.2 Obtenção dos SFVs

5.2.1 *Transcrição in vitro*

Para a obtenção dos RNAs correspondentes aos vetores plasmidiais, se faz necessário a realização de duas etapas anteriores: a linearização dos vetores e a transcrição *in vitro*. Após cada etapa, uma eletroforese em gel de agarose foi realizada para confirmar o sucesso do procedimento, conforme figura abaixo:

Figura 10- Linearização dos vetores e transcrição in vitro.

(A) Vetores linearizados; 1 – pSFV-GFP circular; 2 – pSFV-GFP linearizado; 3 – pSFV-RVGP circular; 4 – pSFV-RVGP linearizado; 5 – pSFV-Helper circular; 6 – pSFV-Helper linearizado; (B) RNA RVGP obtido pela transcrição in vitro; 1 – pSFV-RVGP linearizado; 2 – RNA- RVGP; 3 – pSFV-Helper linearizado; 4 – RNA-Helper; (C) RNA GFP obtido pela transcrição in vitro 1 – pSFV-GFP linearizado; 2 – RNA- GFP; 3 – pSFV-Helper linearizado; 4 – RNA-Helper.

No gel correspondente à linearização dos vetores, pode-se verificar que a banda correspondente ao vetor linearizado, se encontra entre as bandas do vetor circular (normal e *supercoiled*). Sendo o tamanho do pSFV-Helper linearizado de aproximadamente 8194 bp, e do pSFV-RVGP, de 11582 bp, que correspondem ao tamanho original dos vetores. Já com relação aos géis com o produto da transcrição *in vitro*, tanto para SFV-RVGP e SFV-GFP, é possível verificar a banda do RNA gerado bem abaixo das correspondentes aos vetores linearizados, fato esperado devido ao menor tamanho e pela conformação espacial do RNA.

5.2.2 *Transfecção por Eletroporação*

Puglia, A. et al, 2013 realizaram testes prévios comparando os resultados da transfecção por eletroporação e por kit *transmessenger* (Qiagen) no laboratório de Imunologia Viral – Instituto Butantan e evidenciaram uma melhor eficiência na utilização do método da eletroporação.

Portanto, o método de transfecção utilizado em nosso trabalho foi por eletroporação em células BHK-21 para produção de partículas virais de SFV-RVGP, SFV-GFP e SFV-Helper para posterior infecção dos macrófagos murinos e BHK-21 aqui utilizada como controle.

5.2.3 *Quantificação de SFV-RVGP recombinantes por qRT-PCR*

Os partículas virais produzidas foram submetidas à extração do RNA e posterior síntese de cDNA para quantificação por qRT-PCR. Antes da qRT-PCR, as amostras correspondentes ao cDNA originados da extração dos vírus, foram amplificadas por PCR convencional e *seminested*-PCR, para analisar a eficiência do tratamento com DNase na eliminação de possíveis contaminantes presentes. Confirmada a presença do material genético e ausência de material contaminante, foi realizada a etapa de quantificação pelo método de qRT-PCR conforme mostrado na figura 11:

Figura 11- Curva padrão e de dissociação obtidas da qRT-PCR.

A Figura 11 apresenta a curva padrão e curva de dissociação obtida no equipamento de qRT-PCR. Nela podemos observar um *slope* de -3,3, uma eficiência de 99% e um valor de R^2 de 0.99, condições necessárias para ela ser usada na quantificação dos SFV recombinantes (PUGLIA et al., 2013). Podemos verificar na curva de dissociação que todos os fragmentos

são dissociados na mesma temperatura (84,4 °C), confirmando a especificidade da reação. Os títulos virais (cópias RNA/ μ L) apresentaram valores de 5E5 cópias virais/ μ L para SFV-RVGP e 2,2E5 cópias virais/ μ L para SFV-GFP.

5.3 Análise da expressão da RVGP

Para analisar a expressão da RVGP foi realizada uma Imunofluorescência Indireta com os anticorpos primário monoclonal C75 (anti-RVGP) e secundário anti-camundongo conjugado com FITC. O procedimento foi realizado após 24 horas do momento da infecção.

Devido ao aparecimento da fluorescência em todos os poços, inclusive no controle negativo (figuras 12A, 12B), foi também realizado um teste com o bloqueador Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block) em células J774A.1 (figura 12C).

Figura 12- Imagens da IFI do vírus SFV-RVGP.

B

J774A.1

Controle Negativo (Anticorpos primário e secundário)

J774A.1

SFV-RVGP ATIVADO (MOI 1, 10, 100)

(A) SFV-RVGP ativado e não ativado em células IC-21. Com exceção da primeira imagem que está em 20x, todas as outras estão em 40x de aumento. (B) SFV-RVGP ativado em células J774A.1. (C) SFV-RVGP ativado e não ativado em células J774A.1 tratadas com bloqueador Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block).

A partir da IFI para detecção da proteína RVGP em ambas as linhagens de macrófagos, conforme visto nas imagens acima, em princípio pensou-se que a proteína se encontrara nas membranas das células infectadas pelo vírus, fato já esperado por ser a RVGP uma proteína transmembrânica. Após analisado os controles negativos - realizados em duplicata e um destes em placa separada para descartar qualquer tipo de contaminação viral - desconfiamos se tratar de ligação inespecífica do anticorpo primário – uma vez que utilizamos apenas o anticorpo secundário em um dos controles negativos em células IC-21 e não houve sinal de fluorescência – com algum receptor de membrana inespecífico. Assim, os nossos dados sugerem que os macrófagos estudados apresentam autofluorescência. Apesar disso, quando essas células são tratadas apenas com anticorpo secundário não apresentam essa

característica. O bloqueio em células J774A.1 não foi eficaz, visto que até os controles negativos apresentaram sinais de fluorescência.

5.4 Análise da expressão da GFP

5.4.1 Microscopia de Fluorescência

Após infecção com SFV-GFP ativado e não ativado em ambas as linhagens de macrófagos, as células foram incubadas em câmara de CO₂ e com o auxílio do aplicativo já descrito em Material e Métodos, a cada trinta minutos era capturada uma imagem durante 96h posteriores à infecção e estas passaram por uma triagem para seleção das melhores, conforme figuras 13A e 13B. Como controle positivo foi utilizada a linhagem BHK-21 infectada com SFV-GFP em 24 e 48 horas após infecção, de acordo com figura 13C.

Figura 13- Imagens de Microscopia de Fluorescência com 500 ms de exposição.

(A) SFV-GFP ativado e não ativado em células IC-21. (B) SFV-GFP ativado e não ativado em células J774A.1. (C) SFV-GFP ativado em relação partícula viral:célula de 10 em células BHK-21 para controle positivo do experimento (imagens cedidas por Puglia A. L. 2013).

As imagens foram capturadas com 500 milisegundos de exposição. Foi utilizado uma relação de partícula viral:célula de 10 em todas as situações e filtro fluorocromo FITC no microscópio para captação de onda verde.

A autofluorescência destas linhagens celulares fica evidente quando o controle negativo já apresenta um forte sinal em verde, bem como o próprio meio de cultura, RPMI Modificado com 10% de soro fetal bovino, apresenta um sinal menos intenso também em verde no microscópio de fluorescência, tornando impossível a distinção do resultado positivo do negativo, fato esse já observado por Carvalho, L. F., (2007) que assim como nesse trabalho, teve diversas dificuldades devido a autofluorescência de macrófagos.

A linhagem BHK-21 foi utilizada como controle positivo, confirmando a eficácia das partículas virais obtidas em laboratório.

5.4.2 *Citometria de Fluxo*

Visando um ensaio em que pudéssemos subtrair a autofluorescência natural das células de macrófagos da fluorescência gerada pela expressão da proteína GFP, utilizamos estas células infectadas com SFV-GFP e as submetemos a análise por citometria de fluxo.

Para o teste no citômetro, a linhagem IC-21 foi desprendida do substrato por meio do uso de tripsina.

As células J774A.1 foram soltas pela técnica de fluxo/refluxo com facilidade do substrato de cultivo. Foram analisadas infecções do SFV-GFP ativado e não ativado nas linhagens de macrófagos murinos em relação partícula viral:célula de 10, em duplicata. Após 24 h da infecção para detecção de uma infecção bem sucedida pelo SFV e 72h após infecção para avaliar uma possível fagocitose pelos macrófagos e em todas as situações foram analisados 10.000 eventos.

Figura 14- Gráficos da Citometria de Fluxo.

Infecção por SFV-GFP em todas as linhagens (exceto controle) com vírus ativado em 24 horas após infecção. Comparativo de gráficos emitidos pelo aparelho FACS Calibur quando a proteína GFP é excitada pelo raio laser em diferentes linhagens celulares.

Nas células de macrófagos, até às 72 horas da infecção com SFV-GFP ativado, conforme figura acima, e não ativado (dados não apresentados por possuírem o mesmo padrão no resultado) em nenhuma das condições realizadas observamos sinal de fluorescência, enquanto que testes realizados em células BHK-21 (PUGLIA A. L., 2013) demonstraram fluorescência indicando a infecção em 24 horas do momento da infecção.

5.5 Ensaio de infecção para avaliar o potencial de transdução das partículas de SFV

Diante dos dados obtidos por citometria de fluxo, podemos inferir que além da autofluorescência destas linhagens celulares poderem subestimar a expressão da GFP, ainda

podemos não ter expressão das proteínas heterólogas, pelo fato de os vírus não conseguirem entrar nas células. Assim, realizamos um experimento em que as partículas virais encontradas no sobrenadante celular foram quantificadas após 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48 e 72 h do momento da infecção (figuras 14A e 14B).

Células BHK-21 foram utilizadas como controle positivo, uma vez que sua susceptibilidade à infecção ao SFV já foi amplamente testada em laboratório, inclusive em fotos de microscopia de fluorescência e citometria de fluxo com o GFP nesse trabalho. Vírus SFV-RVGP e SFV-GFP foram colocados apenas ao meio de cultura RPMI 1640 sem a presença de células, a fim de monitorar uma possível degradação do vírus através de uma redução na quantificação viral.

Figura 15 - Gráficos da quantificação dos vírus SFV em diferentes condições e tempo.

(A) Vírus SFV-RVGP e SFV-GFP ativados em seis condições diferentes para titulação viral de 0 a 72h após infecção. (B) Vírus SFV-RVGP e SFV-GFP não ativados em seis condições diferentes para titulação viral de 0 a 72h após infecção.

De acordo com as figuras 15A e 15B, podemos perceber que a titulação viral dos SFV no sobrenadante celular permaneceu alta, indicando que não houve entrada dos vírus nas células em nenhuma das condições pré-estabelecidas. Já no controle, com células BHK-21, é possível notar que a infecção com o vírus SFV-RVGP ativado até às 24 h do início do experimento teve uma queda considerável na titulação viral, fato este já esperado, uma vez que a permissividade dessa linhagem aos SFV já é amplamente conhecida e reproduzida em

laboratórios. Entre 24 e 72 horas houve um aumento na quantificação viral, sugerindo que houve a lise celular, provavelmente por apoptose, decorrente dos efeitos citopáticos do SFV, liberando dessa forma o RNA viral, o qual se replicou após a infecção celular ficando no sobrenadante.

Quando incubados os vírus apenas em meio RPMI na ausência de células, houve uma baixa taxa de degradação a partir das 24 h, decaindo apenas um logaritmo como indicado no gráfico, resultado bem diferente quando colocados os vírus em contato com as células controle, BHK-21.

Já na imagem 15B, podemos observar os resultados dos experimentos quando utilizados os vírus não ativados para infecção destas linhagens. A partir desses resultados nota-se que não houve um decréscimo considerável na titulação viral no sobrenadante celular analisado, indicando também que não houve entrada dos vírus nas células em nenhuma condição pré-estabelecida.

Além disso, uma análise visual mostra que não houve alterações na morfologia das duas linhagens de macrófagos murinos testadas (análise qualitativa através dos tópicos 5.3 e 5.4.1) indicando ausência da transdução ou fagocitose corroborando com os resultados das análises obtidas.

6 DISCUSSÃO

Por ser a raiva uma doença mortal, distribuída por todo o mundo, capaz de causar tantos óbitos anualmente, mais precisamente nos continentes africano e asiático (WHO, 2005), diversos esforços estão sendo direcionados à prevenção e novos métodos eficazes e de baixo custo para obtenção de vacinas contra o vírus da raiva.

Alguns vírus têm um alto potencial de infectividade e afinidade tanto com células de mamíferos (BERGLUND et al., 1997; SMITH et al., 1997), insetos (PETTIGREW, M.; O'NEILL S. L., 1999) e culturas primárias de células (LUNDSTROM, K., 2001). Um exemplo desses é o Semliki Forest Virus, do gênero Alfavírus. Os Alfavírus são pequenos e esféricos com um nucleocapsídeo contendo um genoma de RNA positivo (KUHN, R. J., 2007).

Assim, foi desenvolvido em nosso laboratório em parceria com um laboratório na França, um trabalho utilizando o sistema SFV para expressar a glicoproteína do vírus da raiva

(RVGP) em células de mamíferos (ASTRAY, 2009). Diferentes culturas celulares têm sido testadas neste sistema. O vírus SFV-RVGP também foi testado em camundongos que geraram resposta imunológica. Era nossa expectativa que a resposta imunológica tenha sido gerada através dos macrófagos murinos. Sendo assim, neste trabalho, propusemos o estudo da interação das partículas virais de SFV-RVGP e SFV-GFP obtidas em nosso laboratório com macrófagos IC-21 e J774A.1. Porém, de acordo com os nossos resultados do ensaio de quantificação do vírus para análise da entrada nas células, podemos afirmar que não houve infecção direta ou fagocitose dos SFV em ambas as linhagens de macrófagos murinos testadas em laboratório, sugerindo que outras células possam estar envolvidas na resposta imunológica observada em camundongos.

Uma hipótese da incapacidade de entrada do vírus no macrófago pode ser a ausência de clatrina nos macrófagos murinos, um receptor de membrana necessário para endocitose do vírus SFV (KIELIAN, M. et al., 2010; KUHN, R. J., 2007; ROSE, P. P., 2011). Outra ideia de entrada dos SFV em macrófagos seria via fagocitose, uma vez que os macrófagos são especialistas neste processo. Porém, como visto nas figuras 15A e 15B, até as 72 horas não houve entrada viral. Uma possibilidade da incapacidade do macrófago em fagocitar os SFV seja devido ao pequeno tamanho dos vírus, entre 50 e 70nm de diâmetro. A endocitose é dividida por pinocitose e fagocitose. A pinocitose é responsável pela ingestão de fluidos ou partículas pequenas. Os macrófagos são células especializadas na ingestão de microrganismos e debris celulares iguais ou maiores a 250 nm de diâmetro (BRANDENBERGER, C. et al., 2011; CONNER, S. D. et al., 2003; HILLAIRESAU, H. et al., 2009; ROTHENRUTISHAUSER, B.; SCHÜRCH et al, 2007; UNFRIED, K et al, 2007) e são capazes de ingerir por volta de 25% do seu volume por hora (ROBERT, A., 2001). Dessa forma, as partículas virais de SFV podem não apresentar um tamanho suficiente para fagocitose realizada por estas células.

Como já é sabido que os vírus SFV infectam a partir de 2 horas do momento da incubação, até o final de nossos experimentos presumivelmente já seria tempo suficiente para analisarmos que houve alteração no padrão morfológico pelo efeito citopático causado pelos vírus SFV recombinantes.

Como dito anteriormente, este trabalho se originou do desafio em responder à questão sobre qual linhagem celular do organismo fora responsável pela eficiente imunização dos animais contra o vírus da raiva, fato esse constatado após o desafio realizado (ASTRAY, 2014). Neste experimento supôs-se que as células responsáveis pela resposta foram os

macrófagos, uma vez que grande parte do peritônio é formada por estas células. Porém, Barbeiro, D. F. (2009) descreveu outra linhagem celular que poderia ser facilmente apontada como uma possível responsável pela imunização, que são as células B-1. Estas células são encontradas em cavidades peritoneal e pleural de camundongos e sua origem e função ainda não são completamente conhecidas. Elas apresentam marcadores de superfície de linhagem mielóide e linfóide e migram para focos inflamatórios comportando-se como macrófagos.

Células B-1 são um subgrupo dos linfócitos B que se diferem dos linfócitos B convencionais por apresentarem marcadores de linhagem mielóide e linfóide (CHEVALLIER, N. et al., 1998; HAYAKAWA, R. et al., 1986). Em camundongos neonatos, essas células se originam no fígado fetal e, em uma proporção menor, na medula óssea. Já em animais adultos são encontradas em grande número do peritônio, como uma população que se auto-renova e secretam anticorpos IgM espontaneamente (KANTOR, A. B., 1993).

Kantor, A. B. (1993) e Popi, A. F. (2004) demonstraram que as células B-1 migram para focos inflamatórios não específicos e diferenciam-se em células fenotipicamente semelhantes a macrófagos e secretam IgM.

Uma possibilidade é que estas células B-1 forneçam uma fonte de produção rápida de anticorpos contra microorganismos presentes em sítios particulares, como o peritônio (ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H., 2005; HARDY, R. R. et al., 1983; 1984; HAYAKAWA, K. et al., 1984). Popi e colaboradores (2004) sugerem atividade modulatória dessas células sobre a atividade efetora de outras células, tais como macrófagos.

Assim como ocorre em vários países, um elevado número de grupos de pesquisa têm direcionado seus esforços para produção de novos métodos de vacinação e prevenção contra o vírus da raiva, tal como no Instituto Butantan que tem realizado inúmeros experimentos e mais precisamente no laboratório de Imunologia Viral (LIV) a fim de entender o mecanismo de entrada do SFV como vetor de imunização em diversas linhagens celulares.

Embora na literatura alguns estudos afirmem que células de insetos e mamíferos são passíveis de serem infectadas por SFV, foi avaliada a expressão de GFP em células de inseto Sf-21 (PUGLIA A. L. 2013), porém não apresentaram fluorescência, sugerindo que não são permissíveis ao SFV, corroborando com os ensaios realizados por Pettigrew et al (1999), em que as células S2 e Sf-9 foram incapazes de serem infectadas com SFV. Neste mesmo estudo, as linhagens de insetos Aa23T, C6/36, MOS55 e MOS20 foram infectadas com SFV utilizando MOI 3 e apresentaram sinais de fluorescência observados por microscopia.

O fato destas linhagens não apresentarem bons resultados nesse trabalho, não a descartam como substrato para utilização do sistema SFV, pois novos trabalhos com diferentes proteínas e diferentes metodologias podem reverter esse quadro. Estas linhagens são de grande importância para a comunidade acadêmica, pois participam primária e ativamente nas respostas imunes.

7 CONCLUSÕES

- Partículas de SFV-GFP e SFV-RVGP foram obtidas com sucesso a partir de células BHK-21.
- As partículas SFV-GFP quando utilizadas para a infecção de células BHK-21, foram capazes de desenvolver altos níveis de fluorescência, visíveis por microscopia e analisados por citometria de fluxo, o que não aconteceu nos testes com células de macrófagos murinos IC-21 e J774A.1;
- Células BHK-21 quando infectadas com SFV-RVGP foram capazes de gerar altos níveis de expressão como visto no ensaio de infecção para avaliar o potencial de transdução das partículas de SFV;
- De acordo com os estudos realizados, os macrófagos aparentam possuir uma elevada autofluorescência se comparados a outras linhagens de mamíferos, como por exemplo a BHK-21;
- Testes realizados até 72 horas após infecção indicaram a incapacidade dos macrófagos realizarem o processo da fagocitose dessas partículas.
- A avaliação da citotoxicidade das partículas virais nas culturas de células não foi possível ser analisada, uma vez que os experimentos indicaram que não houve entrada do vírus, sendo inviável a detecção do efeito citopático a partir dos SFV nas culturas de macrófagos.

REFERÊNCIAS*

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 564 p.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology** – 6^a ed. Amsterdam: Elsevier, 2008. 600 p.

ADAMS, D. O., HAMILTON, T. A. The cell biology of macrophage activation. **Annual Review of Immunology**. v.2, p. 283-318, 1984.

ALTAMIRANO, C.; BERRIOS, J.; VERGARA, M.; BECERRA, S. Advances in improving mammalian cells metabolism for recombinant protein production. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n.3, p. 1-14, 2013.

ALTAMIRANO, C.; GÒDIA, F.; CAIRÓ, J. J. Metabolismo de células de mamíferos cultivadas *In Vitro*. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia de cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica**. 1. Ed. São Paulo: Roca, 2008. cap. 4, p. 81-104.

ASTRAY, R. et al. Rabies virus glycoprotein and immune response pattern using recombinant protein or recombinant RNA viral vectors. **Vaccine**, v. 32, p. 2829–2832, 2014.

ASTRAY, R. M. **Expressão da glicoproteína recombinante do vírus rábico em sistemas *Drosophila melanogaster* (S2) e Semliki Forest Virus (SFV)**. 2009. 161 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009

BAHLOUL, C. et al. DNA-based immunization for exploring the enlargement of immunological cross-reactivity against lyssavirus. **Vaccine**. v. 16, n. 4, p. 417-425, 1998.

BALDI, L. et al. Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 677-684, 2007.

BARBEIRO, D. F. **Participação da célula B-1 na resposta inflamatória ao lipopolissacáride**. 2009. 63 f. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Clínica Médica.

BENNET, B. 1966. Isolation and cultivation in vitro of macrophages from various sources in the mouse. **American Journal of Pathology**. v. 48, p. 165-181, 1966.

BERGLUND, P., Quesada-Rolander, M., Putkonen, P., Biberfeld, G., Thorstensson, R. and Liljestrom, P. Outcome of immunization of cynomolgus monkeys with recombinant Semliki Forest virus encoding human immunodeficiency virus type 1 envelope protein and challenge

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

with a high dose of SHIV-4 virus. **AIDS Research Human Retroviruses**, v 13, p. 1487-1495, 1997.

BISWAS, S.K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nature Immunology**, v.11, p. 889 – 896, 2010.

BOLLATI-FOGOLIN M.; COMINI M. A. Clonagem e expressão de proteínas heterólogas em células animais In: MORAES A. M.; AUGUSTO, E.F. P; CASTILHO L. R. **Tecnologia do Cultivos de Células Animais de Biofármacos a Terapia Gênica**. 1 ed. São Paulo: Roca, 2008. cap. 3. p. 48-52.

BRANDENBERGER, C.; Mühlfeld, C.; Ali, Z.; Lenz, A.-G.; Schmid, O.; Parak, W. J.; Gehr, P.; Rothen-Rutishauser, **B. Small**, v. 6, p. 1669–1678. doi:10.1002/smll.201000528. 2010

CARVALHO, L. F. **Adaptação de técnicas de imunohistologia e de um novo modelo animal ao estudo de infecções por microbactérias**. 2007. Dissertação de mestrado em Engenharia Biológica pela Universidade do Algarve. Disponível em <http://hdl.handle.net/10400.1/274>. Acessado em 16 de novembro de 2014.

CHALFIE, M. **Green fluorescent protein: properties, applications and protocols**. 2nd Ed., Hoboken: Wiley-Interscience, 2006. 443 p.

CHEVALLIER, N. et al., B-1 like cells exist in sheep. Characterization of their phenotype and behaviour. **Immunology**, v. 95, n. 2, p. 178-184, 1998.

CHIARINI, Eb; PENNA, Thereza Christina Vessoni. Extração, purificação e caracterização físico-química da proteína verde fluorescente recombinante (GFPuv) expressa em Escherichia coli. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 39, n. 4, Dec. 2003.

CONNER, S. D.; Schmid, S. L. **Nature** 2003, v. 422, p. 37–44. doi:10.1038/nature01451

COSTA, W. A. et al. **Manual Técnico do Instituto Pasteur: profilaxia da raiva humana**. 2. Ed. São Paulo: Instituto Pasteur, 2000. 33 p.

DIETZSCHOLD, B.; LI, L.; FABER, M.; SCHNELL, M. Concepts in the pathogenesis of rabies. **Future Virology**, v. 3, n. 5, p. 481-490, 2008.

DINIZ, M e FERREIRA, LC. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. **Estudos Avançados**, v. 24, n.70, p. 19-30, 2010

ERTL, H. C. J. Novel Vaccines to Human Rabies. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 3, n. 9, p. 515, 2009.

FEHLNER-GARDINER, C. et al. Comparing ONRAB® AND RABORAL V-RG® oral rabies vaccine field performance in raccoons and striped skunks, New Brunswick, Canada, and Maine, USA. **Journal of Wildlife Disease**, v. 48, p. 157-167, 2012

FOLLMANN, E. et al. Preliminary Evaluation of Raboral V-RGH Oral Rabies Vaccine in Arctic Foxes (*Vulpes lagopus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 47, p. 1032–1035, 2011.

FRAZATTI-GALLINA, N.M. et al. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free médium. **Vaccine**, v. 23, p. 511-517, 2004.

FUENZALIDA, E.; PALACIOS, R. Un método mejorado en la preparación de la vacuna antirrábica. **Boletín Instituto Bacteriológico**, p. 3-10, 1955.

FUJIWARA, N., KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. Current drug targets. **Inflammation and Allergy**, v. 4, p. 281-286, 2005.

GAUDIN, Y. et al. Reversible conformational changes and fusion activity of rabies virus glycoprotein. **Journal of Virology**, v. 65, n. 9, p. 4853-4859, 1991.

GAUDIN, Y. et al. Rabies virus glycoprotein is a trimer. **Virology**, v. 187, n. 2, p. 627-632, 1992.

GAUDIN, Y. et al. Soluble ectodomain of rabies virus glycoprotein expressed in eukaryotic cells folds in a monomeric conformation that is antigenically distinct from the native state of the complete, membrane-anchored glycoprotein. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 1647-1656, 1999.

GEISSMAN F. et al. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. **Science**, v. 327, n. 5966, p. 656-661, 2010

GORDON S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. **Cell**, v.111, n. 7, p. 927-930, 2002.

GÓDIA, F.; CAIRÓ, J. J. Cell metabolism. In: OZTURK, S. S.; HU, W. S. **Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies**. Boca Raton: CRC Pres, 2006, cap. 4, p. 81-112.

HALAN, C.A.; ORCIARI, L.A. **Rabies virus**. [S. L.]: Encyclopedia of life science, 2001. p. 1-8.

HARDY, R.R., et al., Demonstration of B-cell maturation in X-linked immunodeficient mice by simultaneous three-colour immunofluorescence. **Nature**, v. 306, n.5940, p. 270-272, 1983

HARDY, R.R., et al., Murine B cell differentiation lineages. **Journal of Experimental Medicine**, v.159, n. 4, p. 1169-1188, 1984.

HAYAKAWA, K., et al., Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. **Procedings National Academy of Science USA**, v. 81, n. 8, p. 2494-2498, 1984.

HAYAKAWA, K., HARDY R.R., and HERZENBERG L.A.. Peritoneal Ly-1 B cells: genetic control autoantibody production, increased lambda light chain expression. **European Journal of Immunology**, v.16, n 4, p. 450-456, 1986.

HILLAIREAU, H.; Couvreur, P. **Cellular Molecular of Life Science**, v. 66, p. 2873–2896, 2009. doi:10.1007/s00018-009-0053-z

HOFFMANN, B. et al. A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. **Veterinary Microbiology**, v. 139, n. 1-2, p. 1–23, 2009

JACOBY, F.. Macrophages. In: WILLMER, E. M. (Ed.) **Cells and Tissues in Culture**. London: Academic Press, Inc., 1965. v. 2, p. 1.

LACKAY, S. N.; KUANG, Y.; FU, Z.F. Rabies in small animals. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 38, p. 851-861, 2008.

LEMOS, M.A.N. et al. Rabies virus glycoprotein expression in Drosophila S2 cells. I: Design of expression/selection vectors, subpopulations selection and influence of sodium butyrate and culture medium on protein expression. **Journal of Biotechnology**, v. 143, p. 103–110, 2009.

LENTZ, T.L et al. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? **Science**, v. 215, p. 182-184, 1982.

LENTZ, T.L. et al. Amino acid sequence similary between rabies vírus glycoprotein and snake venom curaremimetic neurotoxins. **Science**, v. 226, p. 847-848, 1984.

LIDDIARD K, Rosas M, DAVIES LC, JONES SA, TAYLOR PR. Macrophage heterogeneity and acute inflammation. **European Journal of Immunology**, v.41, n. 9, p. 2503-2508, 2011

LILJESTROM P, GARROF H. A new generation of animal cell expression vectors based on the SemlikiFores Virus replicon. **Biotechnology**, v.9, n.12, p. 1356-1361, 1991.

LILJESTROM, P. et al. In vitro mutagenesis of a full-length cDNA clone of Semliki Forest virus: the small 6,000-molecular-weight membrane protein modulates virus release. **Journal of Virology**, v. 65, n. 8, p. 4107-4113, 1991.

LUNDSTROM K, et al. Semliki Forest virus vectors: efficient vehicles for in vitro and in vivo gene delivery. **FEBS Letters**, v. 504, n. 3, p. 99-103, 2001.

KAETZEL CS, ROBINSON JK, CHINTALACHARUVU KR, VAERMAN JP, LAMM ME. The polymeric immunoglobulin receptor (secretory component) mediates transport of immune complexes across epithelial cells: a local defense function IgA. **Procedings National Academy of Science USA**, v. 88, p. 8796-800, 1991.

KANTOR, A.B. and HERZENBERG L.A. Origin of murine B cell lineages. **Annual Review of Immunology**, v.11, p. 501-538, 1993.

KAPLAN, G.; TURNER, G.S.; WARREL, D. **Rabies: the facts**. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 1986. p. 8-74.

KAUFMANN, S. H. E., MEDZHITOV, R., GORDON, S. **The innate immune response to infection**. Washington: American Society of Microbiology Press, 2004. [300 p.]

KAY MA, et al. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. **Nature Medicine**, v.7, p. 33-40, 2001.

KLEPFER, S.R. et al. Characterization of rabies glycoprotein expressed in yeast. **Archives of Virology**. v. 128, n. 3-4, p. 269-286, 1993.

KOPROWSKI, H.; COX, H.R. Studies on chick embryo adapted rabies virus; culture characteristics and pathogenicity. **Journal of Immunology**, v. 60, n. 4, p. 533-554, 1948

KUHN, R. J. Togaviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. **Fields Virology**. Fifth ed. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams and Wilkins. 2007. p. 1001–1022.

MAUEL J, DEFENDI V. Infection and transformation of mouse peritoneal macrophages by Simian Virus 40. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 134, n. 2, p.335-350, 1971.

MAUEL, J., AND V. DEFENDI.. Regulation of DNA synthesis in mouse macrophages, I and II. **Experimental of Cell Research**, 1971 [In press]

MAZANEC MB et al. Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies. **Proceedings National Academy of Science USA**, v.89, p. 6901-6905, 1992

MENDONÇA, R. Z. et al. Preparation of human rabies vaccine in VERO cell cultures using a microcarrier system. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 26, p. 1305–1317, 1993.

MORIMOTO, K.; KAWAI, A.; MIFUNE, K. Comparison of rabies virus g proteins produced by cdntransfected animal cells that display either inducible or constitutive expression of the gene. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 335-345, 1992.

MORIMOTO, K. et al. Rabies vírus quasispecies: implications for pathogenesis. **Proceedings National Academy of Science USA**, v. 95, p. 3152-3156, 1998.

MURRAY PJ, WYNN TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Review of Immunology**, v. 11, n. 11, p. 723-737, 2011

NANCY B. RAY et al. Rabies Virus Replication in Primary Murine Bone Marrow Macrophages and in Human and Murine Macrophage-Like Cell Lines: Implications for Viral Persistence. **Journal of Virology**, Feb. 1995, p. 764–772 Vol. 69, No. 2, 1995

PERRIN, P.; THIBODEAU, L.; SUREAU, P. Rabies immunosome (subunit vaccine) structure and immunogenicity. Pre- and post-exposure protection studies. **Vaccine**. v. 3, n. 3, p. 325-332, 1985.

PETTIGREW MM, O'NEILL SL. Semliki Forest virus as an expression vector in insect cell lines. **Insect Molecular Biology**, v. 8, n. 3, p. 409-414, 2006.

PLAUTZ JD, et al. Green fluorescent protein and its derivatives as versatile markers for gene expression in living *Drosophila melanogaster*, plant and mammalian cells. **Gene**, v. 173, n. 1, p. 83-87, 1996.

POLO JM, Belli BA, Driver DA, Frolov I, Sherril S, Hariharan MJ, et al. Stable alphavirus packaging cell lines for Sindbis virus and Semliki Forest virus-derived vectors. **Proceedings National Academy of Science USA**, ; v. 96, n. 8, p. 4598-4603, 1999.

POPI, A.F., LOPES J.D. and MARIANO M. Interleukin-10 secreted by B-1 cells modulates the phagocytic activity of murine macrophages in vitro. **Immunology**, v. 113, n. 3, p. 348-354, 2004.

PUGLIA, A. L. P. **Obtenção e utilização do vetor viral SFV expressando GFP**. 2013. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT.

PREHAUD, C. et al. Characterization of a new temperature-sensitive and avirulent mutant of the rabies virus. **Journal General of Virology**. v. 70, p. 133-143, 1989.

QUETGLAS JI, et al. Alphavirus vectors for cancer therapy. **Virus Research**, v. 153, n. 2, p. 179-196. 2010.

RALPH P, NAKOINZ I. Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line. **Nature**, v. 257, n. 5525, p. 393-394, 1975.

RALPH P, NAKOINZ I. Direct toxic effects of immunopotentiators on monocytic, myelomonocytic, and histiocytic or macrophage tumor cells in culture. **Cancer Research**, v.37, n. 2, p. 546-550, 1977.

RAMYA, R. et al. Expression and solubilization of insect cell-based rabies virus glycoprotein and assessment of its immunogenicity and protective efficacy in mice. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 10, p. 1673–1679, 2011.

REBUHN, W.C. **Doenças do gado leiteiro**. 1. Ed. São Paulo: Roca, 2000. 642 p.

RHÊME C, EHRENGRUBER MU, GRANDGIRARD D. Alphaviral cytotoxicity and its implication in vector development. **Experimental Physiology**, v. 90, n. 1, p. 45-52, 2005

ROBERT A. Freitas Jr., “**How Nanorobots Can Avoid Phagocytosis by White Cells - Part I,**” Foresight Update No. 45, 30 June 2001, p. 10-12.

ROSE PP, HANNA SL, SPIRIDIGLIOZZI A, WANNISSORN N, BEITING DP, et al. (2011) Natural resistance-associated macrophage protein is a cellular receptor for sindbis virus in both insect and mammalian hosts. **Cell Host Microbe** v. 10, p. 97–104.

ROTHEN-RUTISHAUSER, B.; Schürch, S.; Gehr, P. Interaction of Particles with Membranes. In DONALDSON, K.; BORM, P. (Eds.) **Particle Toxicology**. Boca Raton: CRC Press, 2007.

SAKAMOTO, S. et al. Studies on the structures and antigenic properties of rabies virus glycoprotein analogues produced in yeast cells. **Vaccine**, v. 17, n. 3, p. 205-218, 1999.

SCHLESINGER, S., SCHELESINGER, M. J. Replication of Togaviridae and Flaviridae. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MARTIN, S. H.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B. (Eds.) **Fundamental Virology**. 2nd Ed. New York: Raven Press; 1991. p. 453-467.

SCHNEIDER, L.G. Spread of virus within the central nervous system. In: BAER, G.M. **The natural history of rabies**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 199-216

SCHNELL, M.J. ; McGETTIGAN, J.P.; WIRBLICH, C.; PAPANERI, C. The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. **Nature Review Microbiology**, v. 8, p. 51-61, 2010.

SEIF, I. et al. Rabies Virulence: Effect on pathogenicity na sequence characterization of rabies virus mutation effecting antigenic site III of glycoprotein. **Journal of Virology**. v. 53, n. 3, p. 926-934, 1985.

SISSOËFF, L. et al. Stable trimerization of recombinant rabies virus glycoprotein ectodomain is required for interaction with the p75NTR receptor. **Journal General of Virology**, v. 86, p. 2543–2552, 2005.

SMITH, S.M., MALDARELLI, F.; JEANG, K.T. Efficient expression by an alphavirus replicon of a functional ribozyme targeted to human immunodeficiency virus type 1. **Journal of Virology**, v. 71, p. 9713-9721, 1997.

SOBOLESKI, M. R et al. Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 3, p. 440-442, 2005.

THOULOZE, M.I. The neural cell adhesion molecule is a receptor for a rabies virus. **Journal of Virology**, v. 72, p. 7181-7190, 1998.

TORDO, N. et al. Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA viruses. **Virology**, v. 165, n. 2, p. 565-576, 1988.

TORDO, N. et al. Walking along the rabies genome: Is the large G-L intergenic region a remnant gene? **Proceedings National Academy of Science USA**, v. 83, p. 3914-3918, 1986.

UNDERDOWN BJ, SCHIFF JM. Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. **Annual Review of Immunology**; v.4, p. 389-417, 1986

UNFRIED, K.; Albrecht, C.; Klotz, L.-O.; von Mikecz, A.; Grether-Beck, S.; Schins, R. P. F. **Nanotoxicology** 2007, 1, 52–71. doi:10.1080/00222930701314932

VAN FURTH R.; COHN Z.A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 128, n. 3, p. 415–435, 1968.

VENTINI, D. C. et al. Recombinant rabies virus glycoprotein synthesis in bioreactor by transfected *Drosophila melanogaster* S2 cells carrying a constitutive or an inducible promoter. **Journal of Biotechnology**, v. 146, 169-172, 2010.

VIROLAINEN M, DEFENDI V. Dependence of macrophage growth in vitro upon interaction with other cell types. **Wistar Institute Symposium Monograph**, v.7, n.67, p. 85, 1967.

WARD, W. W. Biochemical and Physical Properties of Green Fluorescent Protein. In: CHALFIE, M., KAIN, S., (eds.) **Green Fluorescent Protein: properties, applications and protocols**. New York: Wiley-Liss, 1998. p.45 – 75.

WIKTOR, T. J. Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. **Proceedings National Academy of Science USA**, v.81, p. 7194-7198, 1984.

WHO- World Health Organization. World survey of Rabies. Consultation on Rabies, **Technical report series**, n. 34, 2000.

WHO- World Health Organization. Rabies prevention and control. Consultation on Rabies, **Technical report series**, n. 931, 2004.

WHO- World Health Organization. Expert consultation on rabies. **Technical report series** n. 931, 2005.

WHO- World Health Organization. Rabies vaccines: **WHO Position Paper**, v.85, n. 32, p. 309–320, 2010.

WALKER W. S. Separate Fc-receptors for immunoglobulins IgG2a and IgG2b on an established cell line of mouse macrophages. **The Journal of Immunology**, v.116, n. 4, 1976

WILLOUGHBY, R.E.Jr. et al. Survival after treatment of rabies with induction of coma. **New England Journal of Medicine**. v. 352, n. 24, p. 2508-14, 2005.

WU X, SMITH TG, RUPPRECHT CE. From brain passage to cell adaptation: the road of human rabies vaccine development. **Expert Review Vaccines**. v. 10, n.11, p. 1597-1608, 2011

WUNNER, W.H. **Rabies virus: rabies**. London: Academic Press, 2007.

YANG, J. et al. The specificity of rabies virus RNA encapsidation by nucleoprotein. **Virology**, v. 242, p. 107-117, 1998.

YELVERTON, E. et al. Rabies virus glycoprotein analogs: biosynthesis in *Escherichia coli*. **Science**. v. 219, p. 614–619, 1983.

YOKOMIZO, A. Y. et al. Rabies virus glycoprotein expression in *Drosophila* S2 cells. I. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line. **Biotechnology Journal**, v. 2, p. 102–109, 2007.

ZAIAT, M. **Desenvolvimento e análise de biorreatores anaeróbios contend células imobilizadas para o tratamento de águas residuárias: reator anaeróbio horizontal de leito fixo e reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais**. 2003. 122 f. (Livre docência em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, USP, São Carlos, 2003.