THAISSA CONSONI BERNARDINO

**EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA RÁBICA UTILIZANDO
PSEUDOPARTÍCULAS VIRAIS**

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

São Paulo
2015

THAISSA CONSONI BERNARDINO

**EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA RÁBICA UTILIZANDO
PSEUDOPARTÍCULAS VIRAIS**

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Soraia Attie Calil Jorge

Versão Corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB quanto na biblioteca digital de teses e dissertações da USP (BDTD).

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

Bernardino, Thaissa Consoni.

Expressão da glicoproteína rábica utilizando pseudopartículas virais /
Thaissa Consoni Bernardino. -- 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: Expressão de proteína.

Versão do título para o inglês: Rabies glycoprotein expression using
virus pseudoparticles.

1. Glicoproteína do vírus da raiva 2. Pseudopartículas virais 3. RT-
PCR quantitativa 4. Vacina da raiva 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/SBIB033/2015

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

Candidato(a): Thaissa Consoni Bernardino.

Título da Dissertação: Expressão da glicoproteína rábica utilizando
pseudopartículas virais.

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 bioprocesso 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

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Desenvolvimento de bioprocessos com células S2 para produção e purificação da glicoproteína recombinante do vírus da raiva (RVGP) e estudo da sua antigenicidade" protocolo nº 791/11, sob a responsabilidade de Carlos Augusto Pereira, Renato Mancini Astray e Daniella Cristina Ventini, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 10/03/2011.

We certify that the research entitled "Development of a S2 cells bioprocess for the production and purification of rabies virus glycoprotein (RVGP) and antigenicity studies", protocol nº 791/11, under the responsibility of Carlos Augusto Pereira, Renato Mancini Astray and Daniella Cristina Ventini, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 03/10/2011.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
03/2011 – 03/2014	
Laboratório de Imunologia Viral	100 camundongos Balb/c Machos

São Paulo, 17 de março de 2011.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

Aos meus pais Paulo Bernardino e Maria Antônia Bernardino, meus exemplos de força e dedicação, sem seus ensinamentos e cuidados eu nada teria conseguido.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

“Nenhum de nós é tão bom quanto todos nós juntos!”

A todas as pessoas, a seu modo, tem uma participação na minha vida, e com certeza contribuíram de alguma maneira não só no desenvolvimento deste trabalho, mas na minha formação como pessoa, tornando meu mundo lugar mais prazeroso de se viver.

Primeiramente quero agradecer à Deus e a todos os anjos pelos caminhos que Ele me proporcionou ao longo da minha vida, pelas conquistas, pelos tropeços que me fizeram mais fortes e por me dar força interior para seguir em frente.

Aos meus pais, Maria Antonia Consoni Bernardino e Paulo David Bernardino pela paciência, pelo amor incondicional, carinho, respeito, incentivo e suporte. Por me ensinarem que é necessário batalhar e correr atrás dos nossos sonhos, sem esses valores e educação eu nada seria.

À minha irmã, Leticia Consoni Bernardino, pelo companheirismo, respeito e incentivo.

Às minhas cachorras, Vida e Sandy (*in memoriam*) por tornarem meus dias mais leves e alegres. Sem dúvida anjo da guarda tem quatro patas.

À minha segunda família, Sandra Bernardino, Ana Carolina, Celso Junior e Celso, por todo amor, carinho, paciência, risadas, conselhos, incentivos.

À Dra. Soraia Attie Calil Jorge pela oportunidade, ensinamentos e orientação, sempre auxiliando nas incontáveis dúvidas que surgiram durante a realização desse trabalho. Agradeço também pela amizade e pelos conselhos que levarei para toda vida.

Ao Dr. Renato Mancini Astray que sempre se mostrou disposto a me auxiliar quando tive dúvidas, por toda a sua paciência e ensinamentos.

Ao Dr. Carlos Pereira pela oportunidade e pelas contribuições feitas.

Aos colaboradores do Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (iBET), principalmente à Dra. Ana Sofia Coroadinha pelo auxílio nas análises de *Western Blotting*.

À Sandra Fernanda Suárez Patiño, amiga e companheira, por estar presente em todos os momentos que eu precisava, por todos os ensinamentos, carinho e disposição nos momentos finais desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Viral Roselane Paiva, Ana Lia Puglia, Daniella Ventini, Nayara Luiz, Mayra Rocca, Vera Boldorini, Lúcia Gomes, Marcos Lemos, Alexandre Rezende, Polyana Ataliba, Juliana Fontes, Alessandra Lupi, Julia Ricioli e Silvana

Silveira pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário. Muito obrigada pelo carinho, risadas, broncas, conselhos. Mas o mais importante e totalmente indispensável pela amizade de todos vocês.

Ao Instituto Butantan e ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia.

À CNPq e à FAPESP pela bolsa de mestrado e pelos auxílios de projetos de pesquisas, respectivamente.

À todos vocês meu sincero MUITO OBRIGADA!

“Existem hipóteses em ciência que estão erradas.
Isso é perfeitamente aceitável, elas são aberturas
para achar as que estão certas”.

Carl Sagan

RESUMO

BERNARDINO, T. C. **Expressão da glicoproteína rábica utilizando pseudopartículas virais.** 2015. 97 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A raiva é uma doença zoonótica antiga e ainda hoje causa a morte de mais de 60.000 pessoas em todo o mundo a cada ano. A glicoproteína (RVGP) é a única proteína exposta na superfície da partícula viral e é mediadora da adesão e entrada do vírus na célula hospedeira. A RVGP tem sido reconhecida como o antígeno capaz de induzir anticorpos neutralizantes, resultando no seu interesse de expressá-la em vários sistemas de expressão. Recentemente novas estratégias surgiram para a expressão gênica, como as pseudopartículas virais (pps) que são constituídas de proteínas de diferentes vírus. A proteína de cápside Gag do vírus da leucemia murina (MLV) é utilizada para formar as pps juntamente com uma grande variedade de proteínas de membrana, como é o caso das glicoproteínas de membrana E1 e E2 do vírus da hepatite C (HCV). Estas proteínas são essenciais para a adesão e a penetração desse vírus em sua célula hospedeira. Este estudo buscou estabelecer um sistema de produção de pps, contendo as glicoproteínas E1 e E2 do HCV e Gag do MLV que fosse capaz de transportar o RNA da RVGP (ppHCV-RVGP). Para gerar ppHCV-RVGP, células HEK293-T foram co-transfectadas com 3 vetores, utilizando dois métodos de co-transfecção, lipofectamina e eletroporação. As pps liberadas no sobrenadante de cultura foram coletadas 48 h após a co-transfecção e usados para ensaios de infecção. A quantificação de pps foi realizada por RT-PCR quantitativa (qRT-PCR). Células Huh 7 foram utilizadas para os ensaios de infecção e a expressão da RVGP foi analisada após 48 horas por ELISA e imunofluorescência indireta (IFI). Além disso, realizamos *western blotting* para analisar a expressão das proteínas necessárias para a formação das ppHCV. A presença do RNA-RVGP foi confirmada por RT-PCR convencional e pelo método qRT-PCR. A quantidade média de ppHCV-RVGP obtida foi de 3×10^2 cópias de RNA-RVGP/ μL , para ambos os métodos de co-transfecção. Foram detectadas em média 10 ng de proteína RVGP/ 10^6 células, também foi observada a expressão da proteína RVGP em células Huh 7 por IFI, estes imunoenaios mostraram a baixa expressão da proteína RVGP pelo sistema de ppHCV-RVGP. Outros ensaios de qRT-PCR para detectar a adesão e entrada da ppHCV-RVGP foram realizados e verificou-se que a adesão e entrada das ppHCV-RVGP foi ineficiente. Ensaios de *western blotting* mostraram que a produção da proteína Gag e de proteínas de membrana foram eficientes, porém a glicoproteína E2 não estava sendo incorporada eficientemente na membrana da ppHCV. Concluímos que o sistema de pseudopartículas virais foi eficiente para transportar o RNA-RVGP, porém não foi capaz de infectar eficientemente células Huh 7.

Palavras-chave: Glicoproteína do vírus da raiva. Pseudopartículas virais. RT-PCR quantitativa. Vacina contra raiva.

ABSTRACT

BERNARDINO, T. C. **Rabies Glycoprotein Expression Using Virus Pseudoparticles.** 2015. 97 p. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Rabies is a zoonotic disease responsible for more than 60.000 deaths each year. Glycoprotein (RVGP) is the only protein exposed on the virus surface, interacting with cellular receptors and promoting viral entry in host cells. The RVGP is able to induce neutralizing antibodies that makes it interesting to be expressed in many systems. New strategies for gene expression have emerged recently, as virus pseudoparticles (pps), which are composed of proteins from different viruses. The capsid protein Gag of leukemia murine virus (MLV) is used to form the together with a variety of glycoproteins, such as glycoproteins E1 and E2 of hepatitis C virus (HCV). These proteins are essential to adhesion and entry of virus on host cell. The aim of this study was to establish a system for the production of pps, containing the glycoproteins E1 and E2 of HCV and the protein Gag of MLV, and carrying the RNA of RVGP (ppHCV-RVGP). To produce ppHCV-RVGP, HEK293-T cells were co-transfected with 3 vectors, using two co-transfection methods, lipofectamine and electroporation. The pps were harvested from the supernatant 48 h p.t. and used in infection assays. The quantification of ppHCV-RVGP was realized by quantitative RT-PCR (qRT-PCR). Huh 7 cells were used for infection assays and RVGP expression was analyzed 48 hours after by ELISA and indirect immunofluorescence (IFI) assays. Moreover, we performed western blotting assays to analyze the proteins required to form the ppHCV. The presence of RNA-RVGP into the pps was confirmed by conventional RT-PCR and qRT-PCR methods. The quantification of ppHCV-RVGP resulted in about 3×10^2 copies of RNA-RVGP/ μL , for both methods of co-transfection. Infected cells produced around 10 ng RVGP protein / 10^6 cells. The expression was also visualized by in Huh 7 cells by IFI. These immunoassays showed a low expression of RVGP by ppHCV-RVGP system. Others assays of qRT-PCR conducted to detect the adhesion and entry of ppHCV-RVGP showed that this process was inefficient. Western blotting assays that the production of Gag protein and incorporation of glycoproteins were successful, however E2 glycoprotein has not been incorporated efficiently on ppHCV membrane. In conclusion, the system of virus pseudoparticles was efficient in carrying the RNA-RVGP, although was not able to efficiently infect Huh 7 cells.

Key-words: Rabies virus glycoprotein. Virus pseudoparticles. RT-PCR quantitative. Rabies vaccine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa das áreas de risco para o vírus da raiva no mundo	21
Figura 2 - Raiva Humana no Brasil	22
Figura 3 - Vírus da raiva e suas proteínas	24
Figura 4 - Produção de ppHCV para ensaios de infecção	35
Figura 5 - Entrada do vírus HCV em hepatócitos	37
Figura 6 - Representação esquemática do trabalho para produção de ppHCV-RVGP e infecção em células Huh 7.....	42
Figura 7 - Representação esquemática dos três vetores para a produção das ppHCV-RVGP	43
Figura 8 - Representação das posições de anelamento dos iniciadores específicos para a região da RVGP.....	50
Figura 9 - Expressão da RVGP (ng/ 10 ⁶ cel) em células Huh 7 infectadas com as ppHCV-RVGP obtidas pela co-transfecção com lipofectamina	58
Figura 10 - Linearização do pCMV-RVGP	63
Figura 11 - Gráfico da curva padrão em número de cópias/ µL por Ct	64
Figura 12 - Análise em eletroforese em gel de agarose 1,5% dos fragmentos gerados por PCR convencional das amostras das ppHCV-RVGP	65
Figura 13 - Expressão da RVGP (ng/ 10 ⁶ cel) em células infectadas com as ppHCV-RVGP 48 horas pós- infecção	66
Figura 14 - Imunofluorescência Indireta em células Huh 7 após infecção com ppHCV-RVGP com lote viral 4	68
Figura 15 - Imunofluorescência Indireta em células Huh 7 após infecção com ppHCV-RVGP com lote viral 2	69
Figura 16 - Ensaio de detecção da entrada das ppHCV-RVGP em células Huh 7, HEK293-T e BHK-21.....	71
Figura 17 - Análise da expressão das proteínas E1E2 do HCV, Gag do MLV e G do VSV ..	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Expressão da RVGP em diferentes hospedeiros celulares	26
Tabela 2 - Classificação dos retrovírus.....	32
Tabela 3 - Caracterização e a principal função das moléculas de superfície celular requeridas para a entrada do HCV	36
Tabela 4 - Padronização co-transfecção com Lipofectamina	46
Tabela 5 - Padronização das condições de eletroporação em células HEK293-T.....	47
Tabela 6 - Característica dos oligonucleotídeos desenhados.....	49
Tabela 7 - Experimentos de co-transfecção em células HEK293-T.....	52
Tabela 8 - Relação de anticorpos utilizados para o <i>Western Blotting</i>	53
Tabela 4 - Padronização co-transfecção com Lipofectamina	57
Tabela 9 - Quantificação das ppHCV-RVGP por qRT-PCR obtidas pela co-transfecção com lipofectamina	59
Tabela 10 - Quantificação das ppHCV-RVGP por qRT-PCR para padronização do método de coleta.....	60
Tabela 11 - Padronização das condições de eletroporação em células HEK293-T.....	61
Tabela 12 - Quantificação das ppHCV-RVGP por qRT-PCR para padronização da eletroporação	62
Tabela 13 - Títulos virais determinados por qRT-PCR.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ApoE	Apoliproteína do tipo E
BHK-21	Célula de rim de hamster
CD81	<i>Cluster</i> de diferenciação 81
CLDN	Claudina-1
CMV	Promotor do Citomegalovírus
COS	Célula de fibroblasto derivada de tecido de rim de macaco
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
E1	Glicoproteína E1 do vírus da Hepatite C
E2	Glicoproteína E2 do vírus da Hepatite C
EGFR	Fator de crescimento epidérmico
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
Env	Proteína de envelope do vírus da leucemia murina
EphA2	Receptor de efrina A2
Gag	Proteína de cápside do vírus da leucemia murina
GAGs	Glicosaminoglicanos
GFP	Proteína verde fluorescente da água vida
HEK293-T	Células de rim de embrião humano
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana 1
Huh 7	Células de hepatocarcinoma humano
LDL-R	Receptor de lipoproteína de baixa densidade
Luc	Proteína luciferase
M	Proteína de matriz do vírus da raiva
MLV	Vírus da leucemia murina
N	Nucleoproteína do vírus da raiva
NPC1L1	Molécula de colesterol transportadora Niemann-Pick do tipo C1- 1
NS	Proteínas não estruturais

OCLN	Ocludina
ORF	Quadro de leitura aberta (do inglês- <i>open read frame</i>)
P	Fosfoproteína do vírus da raiva
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês <i>phosphate buffered saline</i>)
pH	Potencial de hidrogênio
p.i	Pós-infecção
Pol	Transcriptase e integrase do vírus da leucemia murina
Pps	Pseudopartículas virais
ppHCV	Pseudopartículas do vírus da Hepatite C
Pro	Protease do vírus da leucemia murina
p.t	Pós-transfecção
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RdRp	RNA polimerase RNA-dependente do vírus da raiva
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
RVGP	Glicoproteína do vírus da raiva
SFB	Soro fetal bovino
Sf9	Células de <i>Spodoptera frugiperda</i>
SR-BI	Receptor <i>scavenger</i> tipo I de classe B
SV40	Vírus de Símio 40
TfR1	Receptor de transferrina
Vero	Célula de rim de macaco verde africano
VSVG	Glicoproteína do vírus da estomatite vesicular

SUMÁRIO

1 Introdução	19
2 Revisão Bibliográfica.....	21
2.1 Doença Raiva	21
2.2 Vírus da Raiva e a Glicoproteína G	23
2.3 Expressão da glicoproteína recombinante do vírus da raiva (RVGP).....	25
2.4 Transfecção em células de mamíferos	27
2.4.1 Vetores de expressão.....	29
2.5 Pseudopartículas virais	30
2.5.1 Pseudopartículas virais derivadas de retrovírus.....	31
2.5.2 Pseudopartículas virais derivadas do vírus da leucemia murina e do vírus da hepatite C	33
2.6 Mecanismo de entrada do vírus da Hepatite C	35
3 Objetivos.....	41
3.1 Objetivo Geral	41
3.2 Objetivos Específicos.....	41
4 Materiais e Métodos	42
4.1 Vetores	43
4.2 Transformação bacteriana por choque de temperatura (Heat- Shock)	43
4.3 Extração do DNA Plasmidial	44
4.4 Cultura de células HEK293-T e Huh 7	44
4.5 Produção das ppHCV-RVGP	45

4.5.1 Padronização da co-transfecção com agente lipossômico.....	45
4.5.2 Padronização da co-transfecção com eletroporação	46
4.6 Extração do RNA viral, tratamento com DNase e transcrição reversa.....	47
4.7 Reação em cadeia da polimerase	48
4.8 Construção da curva padrão da qRT-PCR para a titulação da RVGP	49
4.8.1 qRT-PCR	50
4.9 Ensaio de Western Blotting para detecção das proteínas Gag/Pol e E1E2.....	50
4.10 Ensaio de infecção em células Huh 7	53
5 Resultados.....	57
5.1 Purificação de DNA plasmidial obtido pela técnica de MaxiPrep	57
5.2 Padronização da produção das ppHCV-RVGP pelo método de lipofecção	57
5.3 Padronização da produção das ppHCV-RVGP pelo método de eletroporação	60
5.4 Padronização da qRT-PCR	62
5.5 Detecção e Titulação Viral.....	64
5.6 Detecção da RVGP por ELISA	66
5.7 Detecção da RVGP por IFI	67
5.8 Detecção da entrada das ppHCV-RVGP nas células Huh 7, HEK293-T e BHK-21	70
5.9 Detecção das proteínas componentes das ppHCV por Western Blotting	71
6 Discussão	75
7 Conclusões	81
REFERÊNCIAS*	82
APÊNDICE – Imagem	95

A. I – Células HEK293-T eletroporadas sob a condição 1 em cubeta de 0,2 cm com o plasmídeo pCMV-GFP	96
A. II - Células HEK293-T eletroporadas sob a condição 2 em cubeta de 0,2 cm com o plasmídeo pCMV-GFP	96
A. III - Células HEK293-T eletroporadas sob a condição 3 em cubeta de 0,4 cm com o plasmídeo pCMV-GFP	97
A. IV - Células HEK293-T eletroporadas sob a condição 4 em cubeta de 0,4 cm com o plasmídeo pCMV-GFP	97
A. V - Detalhamento sobre a concentração e viabilidade celular da padronização da eletroporação em células HEK293-T	98

1 Introdução

Apesar da disponibilidade de vacinas efetivas e seguras para a proteção de humanos e animais, a raiva continua sendo uma doença bastante difundida no mundo, sendo transmitida por animais domésticos e silvestres. A raiva ainda é responsável pela morte de aproximadamente 60 mil pessoas por ano no mundo e a maior parte dos óbitos acontece em países que ainda não têm condições de produção de vacinas modernas ou utilizam vacinas menos eficazes. Isto se deve ao alto custo e sofisticação da tecnologia de produção de vacinas mais seguras, produzidas em culturas celulares (aproximadamente 95% dos acidentes acontecem na Ásia e na África) (WHO, 2014).

A glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) é o principal antígeno capaz de conferir resposta imunológica neutralizante contra uma infecção pelo vírus da raiva. Essa proteína é uma glicoproteína transmembrânica, trimérica, que depende de modificações pós-traducionais para preservação de sua imunogenicidade.

Diferentes sistemas de expressão já foram avaliados para a expressão da glicoproteína do vírus da raiva, incluindo leveduras (SAKAMOTO et al., 1999), células de mamíferos BHK-21 (BENMAAMAR et al., 2009), células de tabaco (ASHRAF et al., 2005), células de inseto Sf9 com baculovírus (RAMYA et al., 2011). Recentemente têm surgido novas estratégias de expressão gênica que utilizam-se de diferentes vírus para a produção de partículas semelhantes a vírus (TAN, 2006). Esse sistema de pseudopartículas virais (pps) vem recebendo considerável atenção há mais de duas décadas e tem sido utilizado para diferentes aplicações, como: vacinas, apresentação de antígenos e transporte de ácidos nucleicos e biomoléculas (PALUCHA et al., 2005).

O sistema de pps utiliza-se de genes estruturais de diferentes vírus, grande parte dos trabalhos nessa área se utilizam dos retrovírus. Neste projeto foi utilizada a proteína de cápside do vírus da leucemia murina (Gag) que possui a capacidade de gerar pseudopartículas virais, além de incorporar diferentes proteínas de membrana, como as E1 e E2 do vírus da hepatite C, por conta disso, o sistema foi denominado ppHCV.

Trabalhos referentes ao uso desta tecnologia para a expressão transiente são bem estabelecidos para proteínas repórteres, como a proteína verde fluorescente ou luciferase em

células de hepatocarcinoma humano. Entretanto, há uma escassez de trabalhos referentes à expressão de proteínas heterólogas, como a RVGP, sendo, portanto, uma estratégia nova na produção da proteína viral RVGP. Deste modo, neste trabalho foram avaliados os comportamentos para a produção de pseudopartículas virais derivadas do vírus da hepatite C capazes de encapsidar e transportar a glicoproteína do vírus da raiva (ppHCV-RVGP), assim como para a expressão transiente da proteína em células de hepatocarcinoma humano infectadas com as ppHCV-RVGP.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Doença Raiva

A raiva é uma antropozoonose distribuída mundialmente, que por séculos tem afetado a humanidade e representa um sério problema de saúde pública em países em desenvolvimento (WHO, 2010), em virtude de limitações financeiras e problemas de infraestrutura.

A raiva está presente em todos os continentes, exceto Antártida (Figura 1) e causa um grande impacto econômico, levando em consideração os gastos com tratamentos profiláticos pré e pós-exposição, campanhas de vacinação em cães e gatos e a perda de gado. Estima-se que os gastos globais anuais excedam 1 bilhão de dólares (WHO, 2010).

Figura 1 - Mapa das áreas de risco para o vírus da raiva no mundo

Sem risco: Não há risco de infecção pelo vírus da raiva; Risco baixo: É recomendada a imunização pré-exposição para pessoas que podem ter contato com morcegos; Risco médio: É recomendada a imunização pré-exposição para pessoas que podem ter contato com morcegos e animais silvestres; Risco Alto: É recomendada a imunização pré-exposição para pessoas que podem ter contato com animais domésticos, principalmente cachorros. Adaptado de WHO (2008).

A transmissão da raiva se dá pela penetração do vírus contido na saliva do animal infectado, principalmente pela mordedura (BAHLOUL et al., 1998; LACKAY; KUANG; FU, 2008; MORATO; IKUTA; ITO, 2011; SEIF et al., 1985). É uma enfermidade infectocontagiosa que afeta mamíferos domésticos e selvagens, apresentada como principal característica o comprometimento do sistema nervoso central, causando encefalite, com sinais nervosos representados por agressividade, paresia e paralisia. A mortalidade em pacientes sintomáticos é de quase 100%. No mundo, apenas 3 casos de sobrevivência humana foram registrados na literatura. (BABONI; MODULO, 2011; MORATO; IKUTA; ITO, 2011; NETO; RODRIGUES; CARVALHO, 2014). Aproximadamente, 60.000 pessoas morrem desta doença anualmente, principalmente na África e na Ásia (WHO, 2014).

No Brasil, de 1990 até 2001, foram notificados 455 casos de raiva humana, aproximadamente 74% transmitidos por cães e 11% por morcegos (BRAZUNA; TEIXEIRA; VAN ONSELEN, 2006). No ano de 2004 houve a inversão do modo de transmissão da raiva, sendo relatados 22 casos transmitidos por morcegos e apenas 5 por cães (DA ROSA et al., 2006; SCHNEIDER et al., 2005). Em 2005, ocorreram 44 casos de raiva humana, sendo o principal agente de transmissão o morcego. Em 2006 e em 2008 foram relatados 2 casos, em cada ano, transmitidos por morcego (CARNEIRO, 2010) (Figura 2).

Figura 2 - Raiva Humana no Brasil

Representação do grau de relevância na transmissão da raiva para humanos no período de 1990 a 2008.

As regiões do Norte e Nordeste do Brasil foram as regiões com maior registro de casos de raiva humana entre os anos de 1986 e 2009, as condições de pobreza e dificuldades de acesso à informação e ao sistema de saúde são alguns dos fatores determinantes da maior vulnerabilidade dessas populações (GONÇALVES; SÁ-NETO; BRAZIL, 2002).

A vacina para tentar controlar essa doença tem evoluído desde a primeira tentativa feita por Pasteur no ano 1885, principalmente em relação a sua imunogenicidade e segurança. A vacina contra a raiva é classificada em três gerações. As de primeira geração foram produzidas a partir de sucessivas passagens do vírus da raiva em cérebro de coelhos (PÉREZ; PAOLAZZI, 1997). Este tipo de vacina causava acidentes neurológicos em virtude da presença de mielina no cérebro de animais adultos (SELLERS, 1947). As vacinas de segunda geração são produzidas em culturas celulares como células Vero, células diploides humanas e células de embrião de galinha e apresentam-se na forma inativada (FRAZATTI-GALLINA et al., 2004). Atualmente, produz-se no Brasil, a vacina rábica em células Vero, livre de soro fetal bovino, o que reduz o risco de transmissão de zoonoses e príons. Todas as vacinas contra a raiva hoje existentes, de uso humano, são inativadas, ou seja, não apresentam vírus vivos. Porém as vacinas de cultivo celular são as que apresentam menos riscos de efeitos colaterais (WHO, 2014). Há ainda vacinas de terceira geração, vacinas recombinantes, porém essas são utilizadas somente em animais para vacinação oral da fauna silvestre (FEHLNER-GARDINER et al., 2012; LAWSON; CRAWLEY, 1972; MAINGUY et al., 2013).

O Brasil requer uma demanda grande de vacina anti-rábica, devido à grande população humana e animal, principalmente de caninos e bovinos. A produção desta vacina encontra-se principalmente em centros de pesquisa como o Instituto Butantan que tem a seu encargo 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 (SWIECH et al., 2008a). Os dois institutos produzem a vacina a partir da cultura de células, sendo para uso humano produzida em células Vero (Rim de macaco verde africano) e para uso veterinário produzida em células BHK-21 (Célula de rim de hamster), 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 para a vacina anti-rábica.

2.2 *Vírus da Raiva e a Glicoproteína G*

O vírus da raiva pertence ao gênero *Lyssavirus* da família Rhabdoviridae. Seu comprimento médio é de 180 nm e a média do diâmetro é 75 nm, sua morfologia é baciliforme, semelhante à “bala de revólver” com uma extremidade plana e outra arredondada (KAPLAN, 1977; KING et al., 2012). Seu genoma é um filamento único de RNA negativo não segmentado de aproximadamente 12 kb de comprimento e codifica 5 proteínas: a nucleoproteína (N), a fosfoproteína (P), a proteína de matriz (M), a RNA polimerase RNA-dependente (RdRp) e a glicoproteína (RVGP) (JACKSON, 2013) (Figura 3).

Figura 3 - Vírus da raiva e suas proteínas

O genoma de RNA de cadeia negativa, encapsulado dentro da nucleoproteína (amarelo). A polimerase viral (azul) e fosfoproteína (laranja), que formam o núcleo interno ou cápside. A cápside é englobada pela membrana derivada da célula, que está associada com duas proteínas virais adicionais: a proteína de matriz (verde), que funciona como uma ponte entre a cápside e a membrana do vírion, e a única glicoproteína transmembrana, o qual está organizado como um trímero (roxo). Adaptado de SCHNELL et al. (2010).

A RVGP é a única proteína do envelope viral. É uma proteína transmembrânica e se projeta para o exterior com espículas glicosiladas triméricas (GAUDIN et al., 1992; WUNNER et al., 1985). A estrutura da glicoproteína é composta por quatro domínios distintos, o domínio peptídico sinal, o ectodomínio, o domínio transmembrana e o domínio citoplasmático (GUPTA et al., 2005). A RVGP madura, sem o peptídeo sinal, tem massa

molecular de aproximadamente 65 kDa, na forma trimérica é de 195 kDa. Esta tem um papel importante na patogênese da raiva por ser mediadora na adesão aos receptores celulares e também na entrada do vírus 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 o vírus 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; LENTZ et al., 1982, 1984; MORIMOTO et al., 1998; THOULOZE et al., 1998).

Além de a 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 atuando na patogênese da doença (GAUDIN et al., 1992; JACKSON, 2013; PERRIN; THIBODEAU; SUREAU, 1985). 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.

2.3 Expressão da glicoproteína recombinante do vírus da raiva (RVGP)

Como foi dito, a RVGP tem sido reconhecida como um antígeno capaz de induzir anticorpos neutralizantes do vírus, conferindo imunidade protetora contra raiva, resultando no interesse de produzi-la nos mais diversos sistemas de expressão conhecidos. Por esta razão a expressão do gene da RVGP tem sido estudada em diversos sistemas de expressão como: células de inseto infectadas com baculovírus recombinante, leveduras, plantas transgênicas, bactérias, entre outros. Na tabela 1 pode ser encontrado um resumo com alguns dos sistemas de expressão que têm sido usados para expressão da RVGP.

Tabela 1 - Expressão da RVGP em diferentes hospedeiros celulares

Sistema de Expressão	Célula	Produção de RVGP	Conclusões	Referência
Planta	<i>Nicotiana tabaccum</i>	0,001-0,38% do total protéico das folhas	100% de sobrevivência após desafio com o vírus da raiva.	ASHRAF et al., 2005.
Cel. Mamíferos (Transfecção estável)	BHK-21	n.d.	Mudança conformacional da RVGP em função do pH alterando o reconhecimento pelo anticorpo.	KANKANAMGE et al., 2013.
Bactérias	<i>Escherichia coli</i>	n.d.	A proteína expressa falhou na proteção de camundongos após desafio	YELVERTON, 1983.
Leveduras	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30-40 ng.mL ⁻¹	RVGP não foi corretamente produzida, com baixa imunogenicidade.	SAKAMOTO et al., 1999.
Cel. Mamíferos (Infecção vírus)	BHK-21	n.d.	Expressão apenas do ectodomínio da RVGP leva a mudanças conformacionais e formação de monômeros.	MAILLARD e GAUDIN, 2002.
Cel. Mamíferos (Transfecção estável)	BHK-21	10-50% de células fluorescentes	Adição de butirato de sódio e propionato de sódio auxiliam na correta maturação da proteína e aumentam a expressão.	SAKAI et al., 2004.
Cel. Mamíferos (Transfecção estável)	CHO-K1	n.d.	Expressão satisfatória de RVGP secretada com adequada imunogenicidade.	WOJCZYK et al., 1998.
Cel. Inseto Baculovírus	Sf9	n.d.	RVGP pode ser produzida neste sistema com alta imunogenicidade.	DRINGS et al., 1999; TUCHIYA et al., 1992; RAMYA et al., 2011.
Cel. Inseto (transfecção estável)	S2 (pAcRVGP2K)	136ng.mL ⁻¹	Estratégias utilizadas para controlar o crescimento celular propiciaram aumento na produção de RVGP.	SWIECH et al., 2008b.
Cel. Inseto (transfecção estável)	S2 (pMtRVGPHY)	Até 5,5µg/10 ⁷ cel	Estratégias usando diferentes vetores, e uma nova pressão seletiva.	LEMONS et al., 2009.
Cel. Inseto (transfecção estável)	S2 (pAcRVGP2K)	300-400 ng/10 ⁷ cel	Cultivo em biorreator de 2L: Biostat MD System	GALESI et al., 2008.
Cel. Inseto (transfecção estável)	S2 (pMtRVGPHY)	1,5-2µg/10 ⁷ cel	Cultivo em biorreator de 1L: BioFlo 110	VENTINI et al., 2010.
SFV Semliki Forest Virus	BHK-21	1,8-2,2µg/10 ⁶ cel	Sistema altamente produtivo, estável e reproduzível.	BENMAAMAR et al., 2009

Legenda: n.d.- não definido. Adaptado de PATIÑO (2011).

A proteína expressa em bactérias não foi capaz de proteger camundongos após desafio, provavelmente porque procariotos não são capazes de realizar a glicosilação de proteínas, modificações pós-traducionais que seriam fundamentais para a antigenicidade da RVGP (YELVERTON et al., 1983). MORIMOTO, KAWAI e MIFUNE (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) defeitivo e também observaram produção de RVGP em células de rim de embrião humano (HEK293-T). Em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, KLEPFER et al. (1993), expressaram a proteína G do vírus da raiva 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, porém extratos de levedura contendo a proteína G protegeram animais em desafio intramuscular, mas não no desafio intracerebral em camundongos.

Estudos da expressão da RVGP em células de inseto *Spodoptera frugiperda* (Sf9) utilizando um baculovírus recombinante foram realizados por diferentes grupos de pesquisa. PRÉHAUD et al. (1989), demonstraram através da construção de um baculovírus recombinante com o gene da RVGP sob comando do promotor da poliedrina que a RVGP expressa manteve as características estruturais e imunogênicas nessas culturas. TUCHIYA et al. (1992), verificaram que a RVGP produzida por baculovírus recombinante é capaz de se fundir formando complexos em condições de pH abaixo de 6.

Estes experimentos conseguiram resultados variáveis, o que não é surpreendente considerando a complexidade estrutural da glicoproteína do vírus da raiva (ERTL, 2009).

2.4 Transfecção em células de mamíferos

O desenvolvimento de diferentes sistemas de expressão de proteínas recombinantes compreende hoje uma incrível variedade de organismos, incluindo algas (unicelulares) e

plantas, diversas leveduras, bactérias, células de inseto, células de mamíferos, células tronco, entre outros (LANGER, 2009). Sistemas de expressão em células eucariotas são candidatos ideais para a análise funcional de proteínas ou preparação de vacinas que compreendem proteínas complexas com modificações pós-traducionais (YIN et al., 2007).

A expressão de proteínas recombinantes é possível a partir da introdução de material genético heterólogo em uma célula hospedeira. Este processo pode ser feito em células procariotas recebendo o nome de transformação e, em células eucariotas recebendo o nome de transfecção (MULLER, 2005; NARDI; TEIXEIRA; SILVA, 2002).

Uma vez que o DNA codificando a proteína de interesse é inserido na célula, ele pode ser expresso de forma transiente ou estável. A transfecção é considerada estável quando o DNA é integrado randomicamente dentro do genoma hospedeiro, a informação genética para a transcrição e tradução da proteína de interesse fica no cromossomo da célula e desta maneira a informação é herdada pelas células filhas (WURM, 2004). As células, então são selecionadas geneticamente através de marcadores de seleção, a linhagem celular contendo o fenótipo desejado para expressão de proteína e crescimento celular é utilizada para a produção da proteína (WULHFARD, 2009).

O sistema de expressão transiente de gene não requer a integração estável ao genoma. Depois que o DNA entra no núcleo da célula, a transcrição do gene começa e a síntese de proteína é iniciada. As células expressam o gene exógeno por um curto período de tempo, permitindo obter quantidades razoáveis de proteína de maneira rápida (semanas) (BOLLATI-FOGOLIN; COMINI, 2007; MULLER, 2005; SMITH, 2013). Embora os níveis de expressão de células transfectadas transientemente estejam em torno de dezenas de miligramas por litro de meio e o curto período de tempo, faz esta abordagem muito atraente (ARICESCU; LU; JONES, 2006; LEE; FUSCO; SAPHIRE, 2009; NETTLESHIP; RAHMAN-HUQ; OWENS, 2009; NETTLESHIP et al., 2010).

Apesar deste sistema não precisar do processo de seleção de clones, é importante, quando não se tem muita informação sobre porcentagens de eficiência na transfecção, o uso dos marcadores repórter, cujo gene codifica para uma proteína que pode ser monitorada por métodos simples e sensíveis. Este método é de grande utilidade para otimizar e monitorar os veículos de transfecção de DNA. Dentre estes genes repórter, a proteína verde fluorescente da água viva (GFP- do inglês *green fluorescent protein*) e a luciferase (Luc), têm sido utilizadas

na produção de pseudopartículas virais do vírus da hepatite C (ppHCV) (BARTOSCH; COSSET, 2006; CASTET; MORADPOUR, 2003; FARAG, 2013; LU et al., 2013; YU et al., 2014).

Os componentes fundamentais requeridos para a produção de proteínas por transfecção transiente incluem seleção da linhagem celular, meio de cultura adequado, vetor de expressão para dirigir a biossíntese da proteína de interesse e o veículo para introduzir o vetor de expressão nas células. Sistemas de expressão transiente têm sido explorados principalmente para a síntese de pequenas quantidades de proteínas recombinantes usando diferentes linhagens celulares como COS, HEK-293, BHK entre outras linhagens (GEISSE, 2009; PHAM; KAMEN; DUROCHER, 2006).

2.4.1 Vetores de expressão

Diferentes vetores de expressão, tanto virais como não virais, têm sido desenhados para transferir genes exógenos para dentro de células eucarióticas. A seleção do vetor depende da aplicação, da célula hospedeira, do nível de produto desejado e da segurança desejada (BALDI et al., 2007).

a) Vetores virais: Neste sistema de expressão, a transferência do DNA para dentro da célula é baseada num processo biológico mediado por um vírus (infecção viral mediada por receptores) (BOLLATI-FOGOLIN; COMINI, 2007).

Um dos sistemas virais usados amplamente para transfecção transiente é o *Semliki Forest Virus*, que foi usado para a produção em larga escala de um receptor acoplado à proteína G, em células de mamífero cultivadas em suspensão em biorreator ou frasco de cultura tipo “*spinner*” (BLASEY et al., 2000; HASSAINE et al., 2006). Os métodos baseados em vírus, embora sejam mais eficientes, compreendem mais passos, sendo mais complicados e demandam mais tempo que os baseados em vetores plasmidiais. Além disso, a natureza do processo de infecção requer receptores vírus-específicos na célula hospedeira para que ocorra a penetração viral, restringindo substancialmente o espectro das linhagens celulares a serem utilizadas (BOLLATI-FOGOLIN; COMINI, 2007).

b) Vetores não virais: Os vetores não virais são bastante usados nas transfecções transientes relatadas em larga escala (FLIEDL; KAISERMAYER, 2011; GEISSE; HENKE, 2005; PHAM; KAMEN; DUROCHER, 2006). Esses tipos de vetores têm uma maior flexibilidade no número e tamanho de genes a serem transferidos, bem como pouco risco em questões de biossegurança. Porém, podem apresentar baixa eficiência de transfecção, devido à existência de várias barreiras físicas e químicas nas células (CHAN; JANS, 2002; HONG; SHERLEY; LAUFFENBURGER, 2001; LECHARDEUR et al., 1999; WIETHOFF; MIDDGAUGH, 2003) que incluem 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 (MULLER, 2005).

2.5 *Pseudopartículas virais*

Pseudopartículas virais (pps), também conhecidas como *virus-like particles*, referem-se a partículas semelhantes a vírus que contém um genoma viral de um vírus e uma parte (ou a totalidade) das proteínas virais de um vírus diferente (HU; PATHAK, 2000). Podem ser utilizadas tanto como uma vacina própria para uma doença específica, como a vacina da hepatite B que utiliza a proteína de cápside e as glicoproteínas do próprio vírus, ou como transportador de proteínas ou epítomos heterólogos geneticamente fusionado a uma proteína de cápside de um outro vírus (quimera, grupo que se inclui as pps) (GERDTS et al., 2013).

As pps são formadas por proteínas virais estruturais que têm uma propriedade inerente de auto-montagem e mimetizam a morfologia do patógeno. Em contraste com o vírus vivo, as pps não são infecciosas e não replicantes, uma vez que são essencialmente desprovidas de material genético infeccioso (KUSHNIR; STREATFIELD; YUSIBOV, 2012). A diversidade das pps as torna estrutural e funcionalmente versáteis (LUA et al., 2014; ROY; NOAD, 2008). Elas podem ser classificadas em envelopadas ou não-envelopadas. As não-envelopadas são estruturalmente simples e são compostas de uma única proteína de cápside. Por serem mais simples, podem ser produzidas em sistemas de expressão de eucariotos ou procariotos. Já as envelopadas consistem em proteínas de matriz envolvidas por uma membrana lipídica derivada da célula hospedeira com glicoproteínas incorporadas na membrana lipídica (LUA et

al., 2014). Essa categoria de pps é mal caracterizada biofisicamente pelo fato de serem estruturalmente menos uniformes do que as não-envelopadas (KANG; KIM; COMPANS, 2012).

Estudos imunogênicos com pps mostraram que as mesmas apresentam alta imunogenicidade, sendo capazes de estimular respostas humoral e celular do sistema imunitário (GRGACIC; ANDERSON, 2006; KUSHNIR; STREATFIELD; YUSIBOV, 2012; LUA et al., 2014; MIYANOHARA et al., 1986; TAN, 2006). Todas as quatro vacinas recombinantes que estão no mercado, a Engerix® (GlaxoSmithKline (GSK) - Rixensart, Bélgica, US) (vírus da hepatite B), Cervarix® (papilomavírus humano) (GSK), Recombivax HB® (MERCK & CO., INC., Whitehouse Station, USA) (vírus da hepatite B) e Gardasil® (MERCK & CO., INC.) (papilomavírus humano), são baseadas em pps altamente purificadas. Além disso, um número de candidatos a vacinas à base de pps, incluindo vacina anti-malária da GSK, estão em desenvolvimento clínico, enquanto muitos outros, visando patógenos, como vírus da gripe, rotavírus e HIV, são submetidos a avaliação pré-clínica (KUSHNIR; STREATFIELD; YUSIBOV, 2012). Além destas, algumas vacinas para uso veterinário também estão em desenvolvimento, como: rotavírus bovino, doença da língua azul (febre catarral ovina- do inglês *bluetongue*), doença de *Newcastle* e gripe aviária (GERDTS et al., 2013).

O fato de a expressão de proteínas da cápside levar a formação de partículas que são semelhantes ao vírus levou o desenvolvimento das pps para diferentes aplicações. Diferentes vírus têm sido utilizados para a produção de pps, não só para o desenvolvimento de potenciais vacinas, mas também como ferramenta para estudar a biologia de alguns vírus (NOAD; ROY, 2003). A dificuldade de se multiplicar o vírus da Hepatite C (HCV) em culturas celulares, estimulou o desenvolvimento de estratégias para estudá-lo. Uma dessas abordagens foi o desenvolvimento de pseudopartículas do vírus da Hepatite C (ppHCV), o qual permitiu verificar o processo de entrada viral à célula hospedeira (ASHFAQ et al., 2011).

2.5.1 Pseudopartículas virais derivadas de retrovírus

Os vírus da família Retroviridae são vírus com envelope lipídico que possuem duas cópias lineares de RNA de 7-11 Kb (CARTER; SAUNDERS, 2007) e possuem diâmetro que variam de 70 a 140 nm (COROADINHA et al., 2010). Baseado na sua estrutura genômica, os retrovírus podem ser classificados em simples e complexos (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação dos retrovírus

Retrovírus Simples		Retrovírus Complexos	
Gênero	Exemplo	Gênero	Exemplo
<i>Alpharetrovirus</i>	Vírus do sarcoma de Rous	<i>Deltaretrovirus</i>	Vírus T-linfotrópico humano
<i>Betaretrovirus</i>	Vírus do tumor mamário de rato	<i>Epsilonretrovirus</i>	Vírus do sarcoma dérmico Walleye
<i>Gamaretrovirus</i>	Vírus da leucemia murina	<i>Lentivirus</i>	Vírus da imunodeficiência humana
	Vírus da leucemia murina	<i>Spumavirus</i>	<i>Chimpanzee foamy virus</i>

Fonte: Adaptado de CARTER e SAUNDERS (2007).

Os dois grupos expressam os genes: gag, pro, pol e env que codificam para as proteínas da cápside, protease, transcriptase reversa e integrase e proteínas do envelope, respectivamente. Os retrovírus complexos além de todas estas proteínas também possuem genes que codificam para proteínas com funções acessórias (CARTER; SAUNDERS, 2007; HU; PATHAK, 2000).

A expressão da proteína Gag (proteína p30 de $\approx$ 30kDa) (SATTERFIELD et al., 2011) do vírus da leucemia murina (MLV) é suficiente para a montagem e liberação de pseudopartículas virais semelhantes aos retrovírus a partir da cultura celular de eucariotos superiores, mesmo quando expressa na ausência de todas as outras proteínas do vírus (GHEYSEN et al., 1989; MURIAUX et al., 2001). Estas moléculas estão associadas a uma bicamada lipídica, derivada da membrana plasmática da célula produtora e as proteínas de envelope de um vírus que se projetam através da bicamada (MURIAUX et al., 2001). O sistema de pseudopartículas à base de retrovírus é relativamente seguro para trabalhar uma vez que o genoma do vírus defeituoso não pode se replicar no interior da célula infectada (RYCHLOWSKA; SZEWCZYK, 2007).

Os retrovírus são vetores adequados para construção de pseudopartículas virais, pois possuem uma habilidade natural de incorporar proteínas celulares no interior da partícula viral, e toleram grandes inserções de marcadores genéticos. Os vírus mais utilizados no sistema de pseudopartículas de HCV são o MLV e o HIV, por serem vírus extensamente estudados (RYCHLOWSKA; SZEWCZYK, 2007).

Para a criação das pps a utilização de retrovírus simples apresentam algumas vantagens em relação à utilização de retrovírus complexos, sendo por isso o MLV um dos vírus mais utilizados. Algumas dessas vantagens são: o MLV possui um genoma bem estudado, portanto acessível à engenharia genética; uma imunogenicidade relativamente baixa, quando comparado a outros vetores virais e a capacidade única de incorporar proteínas de envelope de uma ampla variedade de vírus heterólogos, permitindo a apresentação de antígenos heterólogos e fornecendo um meio de reconhecimento e ligação a células específicas (DALBA et al., 2007). Um dos casos para o qual existem muitos estudos e que apresenta relevância para este trabalho é a incorporação das glicoproteínas de membrana (E1 e E2) do vírus da hepatite C a estas pps (ALMEIDA, 2012).

2.5.2 Pseudopartículas virais derivadas do vírus da leucemia murina e do vírus da hepatite C

Durante alguns anos tem se tentado desenvolver um modelo para estudar o mecanismo de infecção do HCV (ANDRAWISS et al., 2003; GARRONE et al., 2011; SEGURA et al., 2008), um importante avanço foi o desenvolvimento do sistema de pseudopartículas de HCV (ppHCV) (BARTOSCH; DUBUISSON; COSSET, 2003; DRUMMER; MAERZ; POUMBOURIOS, 2003). O sistema de ppHCV baseia-se na incorporação das glicoproteínas de envelope do HCV, numa estrutura retroviral, contendo um gene que codifica uma proteína repórter.

As pseudopartículas foram projetadas para conter no seu interior um gene repórter, tal como GFP ou Luc. Após a infecção o gene repórter é liberado na célula-alvo, resultando na expressão gênica (BARTOSCH; DUBUISSON; COSSET, 2003). Além disso, estas foram geradas com os componentes virais de replicação deficiente, este procedimento permitiu a

avaliação da infecciosidade específica das pseudopartículas virais uma única vez (BARTOSCH et al., 2003).

As ppHCV são produzidas em células HEK293-T após a co-transfecção de 3 plasmídeos independentes contendo: 1- os genes da Gag e Pol do MLV; 2- o gene repórter (GFP ou Luc), que possui um sinal de encapsidação; 3- o gene para as glicoproteínas E1 e E2 do HCV. Todos os plasmídeos contêm o promotor do citomegalovírus (pCMV). Após a formação, as ppHCV são liberadas para o meio de cultura e são posteriormente utilizadas para infectar células de hepatocarcinoma humano 7 (Huh 7) (Figura 4) (BARTOSCH; DUBUISSON; COSSET, 2003).

A infectividade das ppHCV está restrita principalmente a hepatócitos humanos e linhagens celulares derivadas de hepatócitos, comprovando a especificidade do sistema e o papel das glicoproteínas E1 e E2 na entrada do vírus HCV (BARTOSCH; DUBUISSON; COSSET, 2003).

Figura 4 - Produção de ppHCV para ensaios de infecção

Células HEK293-T co-transfectadas com os três vetores de expressão independentes codificando para: Glicoproteínas E1 e E2 do HCV; proteínas Gag e Pol do MLV; gene repórter GFP/Luc. O sobrenadante da cultura celular contendo as ppHCV é utilizado para vacinar animais e para infectar as células Huh 7. Fonte: Adaptado de RYCHLOWSKA; SZEWCZYK (2007).

2.6 Mecanismo de entrada do vírus da Hepatite C

O vírus da Hepatite C é envelopado, um genoma de RNA positivo e fita simples. O HCV possui um único quadro de leitura aberta (ORF – do inglês *open read frame*) que codifica uma poliproteína precursora que é co e pós traducionalmente processada por proteases endógenas e virais que produzem proteínas estruturais (Core, E1, E2 e p7) e não estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (POPESCU; DUBUISSON, 2010).

O mecanismo de entrada do HCV na célula ainda não é totalmente conhecido, mas há evidências de que esse processo de entrada em hepatócitos humano requer inúmeras proteínas do hospedeiro, incluindo dois fatores de ligação: glicosaminoglicanos (GAGs) (BARTH et al., 2003; KOUTSOUDAKIS et al., 2006) e o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL-

R) (AGNELLO et al., 1999; MONAZAHIAN et al., 1999); quatro tipos de receptores: receptor *scavenger* tipo I de classe B (SR-BI), *cluster* de diferenciação 81(CD81), proteínas de junção de oclusão (do inglês - *tight junctions*), claudina-1 (CLDN) e ocludina (OCLN) (EVANS et al., 2007; PILERI et al., 1998; PLOSS et al., 2009; SCARSELLI et al., 2002); e muitos fatores de entrada incluindo: fator de crescimento epidérmico (EGFR), receptor efrina A2 (EphA2), receptor de transferrina 1 (TfR1) e a molécula de colesterol transportadora Niemann-Pick do tipo C1- 1 (NPC1L1) (LUPBERGER et al., 2011; MARTIN; UPRICHARD, 2013; SAINZ et al., 2012). As funções de cada um deles estão descritas na tabela 3.

Tabela 3 - Caracterização e a principal função das moléculas de superfície celular requeridas para a entrada do HCV

	Caracterização	Principal função na entrada do HCV
GAGs	Fator de ligação	Ligação a glicoproteína E1 do HCV e a apoliproteína E
LDL-R	Fator de ligação	Ligação do vírus-associado à lipoproteína
SR-BI	Receptor	Ligação do vírus-associado à lipoproteína; ligação com a região super variável da E2.
CD81	Receptor	Interação com E2; ativação da via de sinalização que promove a remodelação da actina
CLDN1	Receptor	Interação com o complexo CD81-HCV
OCLN	Receptor	Função no estágio tardio da entrada do HCV
EGFR e EphA2	Fator de entrada	Ativação da via de sinalização que leva a formação do complexo CD81-CLDN1
TfR1	Fator de entrada	Possivelmente envolvido na internalização do vírus
NPC1L1	Fator de entrada	Possivelmente envolvido na fusão endossomal

Fonte: Adaptado de ZHU et al. (2014).

O processo de entrada do vírus na célula se dá em três fases: ligação viral aos hepatócitos, endocitose e fusão endossomal. Após a ligação inicial à superfície da célula hospedeira, o vírus interage com receptores e outros fatores de entrada específicos, que levam ao rearranjo molecular na membrana plasmática e resulta na internalização do vírus (Figura 5) (ZHU et al., 2014).

Figura 5 - Entrada do vírus HCV em hepatócitos

1 – HCV associado à apolipoproteína do tipo E (ApoE) se liga a GAGs e ao LDL-R, que possuem alta afinidade por ApoE. O SR-BI desempenha um papel importante nas etapas de ligação e pós-ligação, por meio da interação com o vírion associado a apolipoproteína e com a E2 do HCV. 2 – A ligação das partículas de HCV ao SR-BI permite a exposição dos sítios de ligação CD81 com E2 e ocorre a transferência da partícula viral para o CD81. Após a interação com a E2, CD81 ativa os membros da família Rho GTPase que promovem a remodelação da actina, permitindo, assim, o contato do complexo E2-CD81 com CLDN1. O EGFR e o EphA2 facilitam a formação do complexo CD81-CLDN1 pelo EGFR ativados. 3 - O vírion é preparado pela atividade de fusão de baixo pH de CD81 e CLDN1 e transloca-se para as junções oclusão de modo a ser endocitado. A internalização viral é dependente de endocitose mediada por clatrina. Ocludina pode contribuir para este processo. TfR1 desempenha um papel importante na infecção por HCV no nível de entrada mediada por glicoproteína, atua depois de CD81, e possivelmente está envolvido na internalização da partícula. No entanto, os mecanismos ainda não estão muito bem investigados. 4 - Após internalização, ocorre a fusão nos endossomos precoces. 5 - Um ambiente com pH baixo e vírion associado ao colesterol são necessários para o processo de fusão. NPC1L1 pode desempenhar um papel no processo de transporte do colesterol. 6- Após a fusão entre o envelope viral e a membrana endossomal, o genoma viral é liberado para o citosol e replicação é efetuada. Fonte: Adaptado de ZHU et al. (2014) e WONG-STAAL; SYDER; MCKELVY (2010).

Dentre as proteínas do HCV, as glicoproteínas E1 e E2 são de grande importância para o desenvolvimento deste projeto, pois têm um papel importante para a adesão e entrada do vírus na célula hospedeira (BRAZZOLI et al., 2005; DELEERSNYDER et al., 1997; PATEL et al., 2000; WAKITA et al., 2005).

A proteína E1 apresenta aproximadamente metade do tamanho da E2, e embora sua função não esteja clara, muitos estudos têm mostrado que a E1 coopera com a E2 na formação de um complexo funcional de glicoproteínas que é essencial para o processo de invasão viral. Estas glicoproteínas são classificadas como proteínas transmembrana integrais do tipo I com um ectodomínio N-terminal glicosilado e um domínio âncora hidrofóbico C-terminal (GOFFARD; DUBUISSON, 2003; LAVIE; GOFFARD; DUBUISSON, 2007).

A maturação e o *folding* das glicoproteínas são processos complexos que envolvem a maquinaria de chaperone do retículo endoplasmático (RE) e depende da formação de uma ligação dissulfeto, bem como a glicosilação (MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007). Mudanças pós-traducionais nas proteínas de envelope do HCV incluem a ligação de glicanos e a formação de pontes de dissulfeto (GOFFARD et al., 2005; LAVIE; GOFFARD; DUBUISSON, 2007). A ligação de glicanos as proteínas de envelope do HCV mostraram-se ser moduladores da entrada do vírus modificando sua afinidade de ligação ou a atividade de fusão, além de estarem envolvidas no *folding* da proteína e desempenharem um papel importante na evasão imune (GOFFARD et al., 2005; HELLE et al., 2007; MEUNIER et al., 1999).

Ambas as glicoproteínas, E1 e E2, são altamente glicosiladas e apresentam massas moleculares de 30 e 70 kDa, respectivamente. Há relatos de que a E1 tenha de 4 a 5 sítios de N-glicosilação e a E2 mais de 11 sítios de N-glicosilação (GOFFARD; DUBUISSON, 2003; GOFFARD et al., 2005; HELLE et al., 2007; POPESCU; DUBUISSON, 2010; SLATER-HANDSHY et al., 2004). Análises de espectrometria de massa da E2 revelaram que esta proteína é altamente modificada por um tipo de alta manose (contém um número variável de manose e raramente glicose) e tipos mais complexos de glicanos são observados em apenas dois sítios de glicosilação dentro da E2 (IACOB et al., 2008). Já a glicoproteína E1, acredita-se que tenha somente modificações por alta manose (GOFFARD; DUBUISSON, 2003). Entretanto, tipos complexos de glicosilações geralmente ocorrem no compartimento *in cis* do complexo de Golgi, onde de fato tem sido detectado uma pequena quantidade de glicoproteína

E2 por imunofluorescência (MARTIRE et al., 2001). Por outro lado, a ligação do complexo de glicano pode acontecer durante a liberação das partículas virais através da via exocítica que envolve o aparato de Golgi. Devido a diferenças no processo de formação, VIEYRES; DUBUISSON e PIETSCHMANN (2014) observaram que as ppHCV poderiam apresentar glicoproteínas maduras contendo glicanos de tipo complexo quando comparadas as partículas de HCV derivada de cultura celular (ccHCV).

Mudanças nos padrões de glicosilação das glicoproteínas do HCV tem um grande impacto sobre a formação das partículas virais, entrada e imunogenicidade, afetando assim a patogênese e virulência do vírus (GOFFARD et al., 2005; HUNDT; LI; LIU, 2013; SLATER-HANDSHY et al., 2004). Mutações nos sítios de glicosilação N1 e N4 na glicoproteína E1 do HCV, bem como mutações na N8 e N10 da glicoproteína E2 do HCV interfere fortemente na incorporação de ambas as glicoproteínas nas ppHCV, sugerindo a importância destes sítios para o *folding* da proteína e a heterodimerização da E1E2 (GOFFARD et al., 2005; HELLE et al., 2010). Além disso, mutações nos sítios de glicosilação N2 ou N4 da glicoproteína E2 levam a redução da infecciosidade das ppHCV (GOFFARD et al., 2005). Assim como, glicanos nas posições N1, N6 e N11 da glicoproteína E2 tem mostrado uma redução na afinidade de ligação da E2 ao receptor CD81 (HELLE et al., 2007).

Além da N-glicosilação, há pouca informação sobre O-glicosilação das glicoproteínas E1 e E2 do HCV. Supostamente, há 1 potencial sítio de O-glicosilação dentro da E1 e 4 sítios potenciais de O-glicosilação na E2. Até o momento, 3 sítios de O-glicosilação na E2 têm se mostrados importantes para a entrada do vírus HCV, sem dois deles, aparentemente, diminui a afinidade de ligação da E2 ao receptor CD81 (FALKOWSKA et al., 2007). A conformação apropriado da glicoproteína E1 é dependente da co-expressão de E2 e vice-versa (BRAZZOLI et al., 2005; MICHALAK et al., 1997).

Em resumo, mudanças pós-traducionais das glicoproteínas do HCV, por glicosilação e pela formação de pontes de dissulfeto, podem ter um forte impacto em várias etapas do ciclo de vida viral, mais especificamente na entrada, na fusão da membrana viral com a membrana endossomal da célula hospedeira e no brotamento (HUNDT; LI; LIU, 2013).

Assim, este trabalho prevê a utilização das proteínas Gag/Pol do MLV e as glicoproteínas E1 e E2 do HCV a fim de estabelecer uma metodologia e avaliar a expressão

de uma proteína heteróloga através de pseudopartículas virais que em seu genoma carreguem um RNA, como o da glicoproteína do vírus da raiva.

3 Objetivos

3.1 *Objetivo Geral*

- ✓ Avaliar um sistema de produção de pseudopartículas virais, contendo as proteínas E1 e E2 do vírus da Hepatite C (HCV), as proteínas GAG e POL do vírus da leucemia murina (MLV) e um RNA codificando para a glicoproteína do vírus rábico (RVGP).

3.2 *Objetivos Específicos*

- ✓ Padronizar os métodos de co-transfecção com agente lipossomal e eletroporação;
- ✓ Padronizar a qRT-PCR para a titulação do RNA da RVGP transportado pela ppHCV-RVGP;
- ✓ Padronizar as condições de infecção de células Huh 7 com as ppHCV-RVGP;
- ✓ Utilizar a qRT-PCR para estudo da cinética de produção do RNA que codifica a glicoproteína (RVGP).

4 Materiais e Métodos

Células HEK293-T foram co-transfectadas com três vetores de expressão independentes codificando para: Glicoproteínas E1 e E2 do HCV; proteínas Gag e Pol do MLV e o gene da RVGP. O sobrenadante da cultura celular contendo as ppHCV-RVGP foi coletado e utilizado para infectar as células Huh 7. Na figura 6 há uma representação esquemática do plano de trabalho seguido neste projeto.

Figura 6 - Representação esquemática do trabalho para produção de ppHCV-RVGP e infecção em células Huh 7

Células HEK293-T co-transfectadas com os três vetores de expressão independentes codificando para: Glicoproteínas E1 e E2 do HCV; proteínas Gag e Pol do MLV; gene de interesse RVGP. O sobrenadante da cultura celular contendo as ppHCV-RVGP foi utilizado para infectar as células Huh 7. Adaptado de RYCHLOWSKA; SZEWCZYK, 2007; TELLINGHUISEN et al., 2007.

4.1 Vetores

Os vetores pCMV-Gag/Pol, pCMV-E1E2 e pCMV-GFP foram gentilmente cedido pelo Dr. François-Loïc Cosset INSERM/França. No qual o pCMV-GFP foi utilizado para a construção do pCMV-RVGP no laboratório de imunologia viral, no Instituto Butantan, conforme figura 7, no qual CMV corresponde ao promotor do citomegalovírus, poli A ao sítio de poliadenilação, gag e pol aos genes das proteínas gag e pol do MLV, LTR a sequências de repetição, RVGP ao gene da glicoproteína do vírus da raiva e E1 e E2 aos genes das glicoproteínas de membrana do vírus da hepatite C. Além disso, o pCMV-RVGP possui o fator ψ de encapsidação.

Figura 7 - Representação esquemática dos três vetores para a produção das ppHCV-RVGP

pCMV-Gag/Pol contendo os genes para as proteínas gag e pol do MLV; pCMV-RVGP contendo o gene para a glicoproteína do vírus da raiva; pCMV-E1E2 contendo os genes das glicoproteínas E1 e E2 do HCV. As regiões de origem de replicação bacteriana e o gene de resistência à ampicilina não estão representadas nestes plasmídeos, mas ocorrem nos 3 vetores utilizados.

4.2 Transformação bacteriana por choque de temperatura (Heat- Shock)

Alíquotas de *Escherichia coli* DH5α competentes foram descongeladas e a cada uma delas foram adicionados os vetores pCMV-Gag/Pol ou pCMV-E1E2 ou pCMV-RVGP (100

ng de DNA plasmidial para 30 μ L de bactérias competentes). As misturas foram mantidas por 30 minutos no gelo e em seguida foram incubadas a 42 °C por 2 minutos e imediatamente foram colocadas novamente no gelo por 5 minutos. Foi realizado o plaqueamento de todo o volume de preparação bacteriana em meio LB-ágar com antibiótico (ampicilina) e incubado 20 horas a 37 °C.

4.3 Extração do DNA Plasmidial

A extração do DNA plasmidial foi feita usando o Qiagen® Plasmid Maxi Kit (São Paulo, Brasil), que é baseado na técnica de lise alcalina (BIRNBOIM; DOLY, 1979), seguida pela ligação do DNA a uma resina de troca aniônica. O DNA foi eluído dessa coluna com um tampão com alto conteúdo de sal, e depois concentrado e dessanilizado por precipitação com isopropanol. Finalmente o DNA foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em tampão para DNA (TE:Tris-EDTA). A quantificação foi feita através do Qubit® Fluorometer (Invitrogen™- Carlsbad, Califórnia, EUA), e a presença do plasmídeo esperado foi verificada por análise de padrões de restrição e eletroforese em gel de agarose 0,8%.

4.4 Cultura de células HEK293-T e Huh 7

Células HEK293-T e Huh 7 foram cultivadas em frascos de 25 cm² com volume de trabalho de 5 mL e em frascos de 75 cm² com volume de trabalho de 12 mL, ambas em meio DMEM (Life Technologies, Carlsbad, California, EUA) suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino) a 37 °C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. Os repiques das células foram feitos duas vezes por semana, sendo necessária a lavagem com PBS para a retirada do SFB e em seguida adição de tripsina para a dissociação das células.

A concentração celular foi determinada pela contagem em hemacitômetro. A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão com azul de Trypan 0,2%, em que é identificada a diferença entre células vivas e mortas.

4.5 *Produção das ppHCV-RVGP*

A produção das pseudopartículas virais foi realizada por dois métodos de co-transfecção, lipofecção e eletroporação. Os dois métodos foram padronizados no Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan e são mostrados nos itens 4.5.1 e 4.5.2. Após a co-transfecção, as ppHCV-RVGP foram quantificadas por qRT-PCR e alguns lotes contendo as pseudopartículas virais foram concentrados com Vivaspin 2 com corte molecular de 30 kDa (GE Healthcare®, Uppsala, Suécia), segundo orientações do fabricante.

4.5.1 Padronização da co-transfecção com agente lipossômico

Foram utilizadas células HEK293-T cultivadas em frascos de 75 cm² em meio DMEM suplementado com 10% de SFB com 80% de confluência. O Meio DMEM suplementado com 10% SFB foi substituído por DMEM sem SFB três horas antes de iniciar a co-transfecção, uma vez que os componentes do soro fetal bovino podem interferir na co-transfecção. Os plasmídeos pCMV-Gag/Pol, pCMV-E1E2 e pCMV-RVGP foram incubados com o Lipofectamine® Transfection Reagent (Life Technologies™) por 20 minutos. Em seguida, os 2 mL do mix de co-transfecção foram gotejados sobre a cultura celular e foi então incubado no agitador à temperatura ambiente por 2 horas, depois foram adicionados 10 mL de DMEM com SFB e incubado a 37 °C por 48 horas.

Tabela 4 - Padronização co-transfecção com Lipofectamina

	pCMV-E1E2	pCMV-Gag/Pol	pCMV-RVGP	Lipofectamina	DNA: Lipofectamina (Massa:volume)
Experimento 1*	2,7 µg	8 µg	8,1 µg	20 µl	1:1
Experimento 2	2,1 µg	4 µg	4 µg	15 µl	1:1,5
Experimento 3	9,8 µg	8,4 µg	9 µg	20 µl	1:1,3

*Experimento 1 foi descrito por BARTOSCH; DUBUISSON; COSSET (2003).

Foram realizados 3 experimentos com diferentes proporções de DNA: Lipofectamina como descritos na tabela 4, afim de otimizar a melhor condição. O experimento 1 é um protocolo descrito na literatura por BARTOSCH; DUBUISSON; COSSET (2003), no qual utilizavam como agente de co-transfecção o fosfato de cálcio. Porém, devido a disponibilidade em nosso laboratório modificamos o agente de co-transfecção. Os experimentos 2 e 3 são otimizações do mesmo protocolo.

Após 48 horas de incubação, o sobrenadante contendo ppHCV-RVGP foi filtrado em 0,22 e 0,45 µm, afim de diminuir a presença de debris celulares no sobrenadante e as alíquotas foram armazenadas à -80 °C.

4.5.2 Padronização da co-transfecção com eletroporação

O método de eletroporação foi realizado segundo KARLSSON e LILJESTRÖM (2003), com algumas modificações feitas em nosso laboratório. Essa técnica foi utilizada como um comparativo ao agente lipossômico.

Primeiramente, para padronização, eletroporamos 8×10^6 células HEK293-T com 15 µg do vetor de pCMV-GFP, para isso utilizamos diferentes condições de pulsos como descrito na tabela 5, sendo que uma das condições já era pré configurada pelo próprio Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad – Hercules, Califórnia, USA). Foram utilizados dois modelos de cubetas com dois tamanhos diferentes, 0,2 cm e 0,4 cm de distância entre os eletrodos, isto permite uma distribuição ideal do pulso elétrico nas células HEK293-T afim de garantir uma melhor produção de ppHCV-RVGP.

Tabela 5 - Padronização das condições de eletroporação em células HEK293-T

	Cubeta (cm)	Resistência (Ω)	Pulsos	Voltagem (V)	Capacitância (μ F)
Condição 1*	0,2	∞ ohms	2 pulsos	110 V	75 uF
Condição 2	0,2	∞ ohms	2 pulsos	280 V	75 uF
Condição 3	0,4	∞ ohms	2 pulsos	480 V	25 uF
Condição 4	0,4	∞ ohms	2 pulsos	650 V	25 uF

* configuração prévia do Gene Pulser Xcell™

Depois de avaliar a melhor condição, eletroporamos 8×10^6 células HEK293-T juntamente com os três vetores: pCMV-Gag/Pol, pCMV-RVGP e pCMV-E1E2. Após a eletroporação, as células transfectadas foram transferidas para um frasco de 75 cm² contendo 12 mL de DMEM com SFB, e incubadas em estufa de CO₂ a 37 °C por 48 horas. Pelo fato de haver células soltas no sobrenadante realizamos duas formas de coleta, filtrando a suspensão com membrana de 0,45 μ m ou centrifugando (15.557 g por 30 minutos), posteriormente foram armazenadas a -80 °C.

4.6 Extração do RNA viral, tratamento com DNase e transcrição reversa

Para realizar a titulação do RNA-RVGP, o RNA viral foi purificado a partir de 140 μ L do sobrenadante contendo as pseudopartículas virais juntamente com 5,6 μ g de RNA carregador, utilizando o QIAmp Viral RNA Kit (QIAGEN™) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. As partículas virais foram lisadas por adição da solução de lise e o RNA viral foi precipitado com etanol, posteriormente essa solução foi passada nas colunas de sílica que possuem alta afinidade por ácidos nucleicos. Após lavagem, o RNA foi eluído utilizando 80 μ L de água destilada livre de RNase.

Para eliminar possíveis DNAs contaminantes, para cada 40 μ L de amostra de RNA extraído foi tratado com 5 U de enzima DNase I (Promega™ - Madison, WI, USA) durante 30 minutos a 37 °C. Em seguida foram adicionados 5 μ L de EGTA (*Stop Solution*) e a reação foi incubada a 65 °C por 10 minutos para inativação enzimática, em um volume total de 55 μ L.

O RNA tratado foi imediatamente submetido a uma reação de transcrição reversa com a enzima M-MLV *Reverse Transcriptase* (Life Technologies). Primeiramente, 10 µL de RNA tratados com DNase foram incubados a 65 °C durante 5 minutos, juntamente com 1 µM de iniciadores anti-senso específico RVGPr3 (Tabela 6), 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, DTT 0,1 M e 200 U de M-MLV, em um volume total de 20 µL. A reação foi incubada a 37 °C durante 50 minutos para a síntese do cDNA da RVGP. A reação foi interrompida pela incubação a 70 °C durante 15 minutos. As amostras foram então armazenadas -20 °C até a análise por PCR convencional e qRT-PCR.

4.7 Reação em cadeia da polimerase

Uma vez obtido o cDNA, as amostras foram amplificadas por PCR convencional, para verificação do tratamento com DNase e da síntese do cDNA. Foram utilizados iniciadores específicos para a amplificação da região da RVGP (Tabela 6). As reações foram realizadas com volume final de 25 µL nas seguintes condições: 5 µL de amostra, para 1 µL de cada iniciador (RVGP5 e RVGPr1 a 5µM), 1 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 1 µL dNTP (10 mM), 2,5 µL de Buffer 10x, 0,2 µL de enzima (1 U) e 13,3 µL água. A reação foi realizada no termociclador PTC-200 (MJ Research, St Bruno, Quebec, Canada) com o seguinte ciclo de amplificação: 94 °C/3 minutos, 34 ciclos de 94 °C/ 30s, 53 °C/30s, 72 °C/ 30s, 72 °C/ 10 minutos.

Os fragmentos amplificados puderam ser visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo 7,5 µL de Sybr Safe (InvitrogenTM) e revelação em transiluminador (TFX-20M, Life Technologies) sob luz ultravioleta e captura de imagem através de sistema de fotodocumentador com câmera DC290 (Kodak, Rochester, NY, Estados Unidos) e análise com aplicativo *Alpha DigiDoc*.

Somente após a confirmação da remoção do DNA contaminante, o cDNA de cada amostra viral foi submetido a PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) simultaneamente com os padrões da curva padrão.

Tabela 6 - Característica dos oligonucleotídeos desenhados

Nome	Tamanho (Bases)	GC (%)	Tm (°C)	Sequência
RVGP5	19	57.8	57.2	AGACAAGCTTGGTCCCTGG
RVGP9	19	57.8	55.2	CTGACTACCACTGGCTTCG
RVGPr1	21	47.6	54.5	TGTAATCGTGGTTAGTGGAGC
RVGPr3	19	63.1	59.9	AGCCGCAAGTCTCACTCCC

RVGP 5 e RVGP 1 iniciadores *sense* e RVGPr1 e RVGPr3 iniciadores *anti-sense*. O iniciador RVGPr3 foi utilizado para transcrição reversa; o par de iniciadores RVGPr1 e RVGP5 foram utilizados para PCR convencional; o par de iniciadores RVGPr1 e RVGP9 foram utilizados para PCR quantitativa. Fonte: ASTRAY (2009).

4.8 Construção da curva padrão da qRT-PCR para a titulação da RVGP

Para a construção da curva padrão para a quantificação da RVGP foi utilizado o plasmídeo pCMV-RVGP. Uma quantidade determinada de plasmídeo foi submetida à digestão com a enzima *Age* I (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituânia) para linearização, que foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Posteriormente, foi quantificado através de método fluorimétrico (Qubit- Invitrogen), e diluído em tampão (TE DNase RNase-free), para a obtenção de diversas quantidades de cópias em um mesmo volume de 3 µL (6×10^7 , 6×10^6 , 6×10^5 , 6×10^4 , 6×10^3 , 6×10^2 e 60 cópias). A curva de quantificação foi testada em quatro repetições, sendo que cada diluição foi analisada em triplicata. Foi utilizado par de iniciadores RVGP9 e RVGPr1 (Tabela 6). A figura 8 representa as posições de anelamento dos iniciadores desenhados por ASTRAY (2009) baseados na região da RVGP.

Figura 8 - Representação das posições de anelamento dos iniciadores específicos para a região da RVGP

RVGP 5 e RVGP 1 iniciadores *sense* e RVGPr1 e RVGPr3 iniciadores *anti-sense*. O iniciador RVGPr3 foi utilizado para transcrição reversa; o par de iniciadores RVGPr1 e RVGP5 foram utilizados para PCR convencional; o par de iniciadores RVGPr1 e RVGP9 foram utilizados para PCR em tempo real.

4.8.1 qRT-PCR

A quantificação dos vírus foi feita no equipamento StepOne Real Time PCR System – Applied Biosystems® (Carlsbad, Califórnia, USA). Para isso, utilizou-se o kit Kapa Sybr® Fast qPCR (Biosystems) contendo uma mistura de dNTPs, MgCl₂, TaqDNA polimerase e reagente intercalante de bases e fluorescente Syber Green ou Kapa Green, em tampão próprio para uso. A esse mix foi adicionado o par de iniciadores RVGPr1 e RVGP9 na concentração de 5 µM e, posteriormente 12 µL dessa mistura foram distribuídos em cada poço da placa MicroAmp™ (Applied Biosystems®) juntamente com 3 µL dos padrões da curva ou amostras de cDNA, todos em triplicatas. A placa foi selada e brevemente centrifugada para unir todo volume no fundo do recipiente. A qRT-PCR foi realizada utilizando o seguinte ciclo de amplificação: 95 °C/10 minutos, 40 x (95 °C /15 s, 53 °C /10 s, 60 °C /15 s), sendo a leitura da fluorescência realizada à temperatura de 60 °C. Após a amplificação foi efetuada a análise da curva de dissociação (70 °C a 95 °C) de todas as amostras para verificar a especificidade da reação.

Para determinação do título viral, foram realizados alguns cálculos com base na equação da curva de quantificação. O número de cópias da ppHCV-RVGP foi determinado

multiplicando-se o resultado fornecido pela qRT-PCR por um valor obtido com base nas diluições efetuadas:

$$\text{ppHCV-RVGP} = A \times B / C \times D / E$$

No qual:

ppHCV-RVGP = 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 Ensaaios de Western Blotting para detecção das proteínas Gag/Pol e E1E2

Estes experimentos foram realizados em parceria com a Dra. Ana Sofia Coroadinha do Instituto de Experimentos e Tecnologia (iBET) em Portugal, seguindo os protocolos pré estabelecidos pelo laboratório.

As proteínas Gag/Pol, E1 e E2 e G do VSV foram detectadas pelo método de *Western Blotting* a partir das pps purificadas do sobrenadante celular, assim como do extrato celular no qual as pps foram produzidas. Foram realizados 7 experimentos que estão descritos na tabela 7.

Tabela 7 - Experimentos de co-transfecção em células HEK293-T

Experimentos	Tipo de amostras	Plasmídeos	Agente de Co-Transfecção
1	pps purificadas	Gag/Pol + E1E2 + GFP	PEI
2	pps purificadas	Gag/Pol + VSVG + GFP	PEI
3	Extrato de células HEK293-T com expressão estável de Gag e E1E2	-----	-----
4	pps purificadas	Gag/Pol	PEI
5	Extrato de células HEK293-T transfectadas	Gag/Pol + E1E2 + GFP	PEI
6	Extrato de células HEK293-T transfectadas	Gag/Pol + VSVG + GFP	PEI
7	Extrato de células HEK293-T	C -	----

Para a detecção das proteínas em extrato celular, 2×10^6 células foram centrifugadas a 300 g por 10 minutos a 4 °C. O *pellet* foi lisado com a adição de 0,2 mL de tampão de lise (I-PER Insect Cell Protein Extraction Reagent, Thermo Fisher Scientific) seguindo o protocolo do fabricante. Foi aplicado ≈ 20 μ g de proteína por linha e para a detecção em pps aplicado diretamente 4 μ L da solução contendo as pps purificadas.

As amostras foram preparadas de acordo com o protocolo de eletroforeses Novex® NuPAGE® SDS-PAGE Gel System, Life Technologies, assim como o tampão de corrida. Cada poço foi carregado com as amostras e a corrida em gel de acrilamida foi realizada a uma voltagem constante de 185 V por 45 minutos.

Posteriormente as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare), utilizando o sistema Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BioRad, Califórnia, USA) nas condições de 25 V por 40 minutos. As membranas foram incubadas 20 horas a temperatura ambiente, com os respectivos anticorpos primários (Tabela 8), diluídos 1:1000. No dia seguinte as membranas foram lavadas 3 $\times$ por 10 minutos com T-TBS (TBS+Tween 20%), posteriormente estas foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados com peroxidase (diluição 1:1000). A membrana foi revelada por quimioluminescência (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare).

Tabela 8 - Relação de anticorpos utilizados para o *Western Blotting*

Proteína	Anticorpo Primário	Empresa
Gag do MLV	R187 – poliproteína Gag do MLV	ATCC® CRL-1912™ (Barcelona, Espanha)
E1 do HCV	Anti- E1 do HCV (Monoclonal)	Acris Antibodies (San Diego, CA, USA)
E2 do HCV	Anti-E2 do HCV (Monoclonal)	Austral Biologicals (San Ramon, CA, USA)
VSVG do HCV	Anti- VSV-G (Policlonal)	Sigma-Aldrich (Colorado, EUA)

4.10 Ensaios de infecção em células Huh 7

Foram realizados diferentes ensaios de infecção com ppHCV-RVGP em células Huh 7, para padronizar a melhor condição de infecção. Os primeiros ensaios foram utilizando um volume fixo do sobrenadante contendo ppHCV-RVGP.

a-) Quantificação de ppHCV-RVGP restante no sobrenadante após infecção

Para este ensaio avaliamos a capacidade das ppHCV-RVGP infectar diferentes linhagens celulares: Huh 7, HEK293-T e BHK-21, assim como realizado por BARTOSCH; DUBUISSON; COSSET (2003). Seguindo o mesmo princípio de BARTOSCH; DUBUISSON; COSSET (2003) no dia da infecção, as linhagens celulares HEK293-T e BHK-21 receberam a proporção 1:10 (número de células: ppHCV-RVGP), e para a linhagem celular Huh 7 utilizamos duas proporções 1:10 e 1:50. Além disso, utilizamos o volume fixo do sobrenadante contendo as ppHCV-RVGP de 54,95 µL, esse volume é correspondente ao volume utilizado para a proporção de 1:10, para avaliar as ppHCV-RVGP eram degradadas durante o experimento.

Os poços com o cultivo celular foram lavados com PBS 1 × estéril e em seguida foi adicionado ppHCV-RVGP juntamente com meio DMEM sem SFB para completar o volume de 300 µL, as placas foram homogeneizadas a cada 15 minutos por 2 horas e mantidas em

estufa à 37 °C contendo 5% de CO₂ por 2 horas, em seguida foram adicionados 2 mL de meio DMEM suplementado com soro fetal bovino.

O experimento foi realizado em duplicata e a coleta do sobrenadante da infecção foi feito de 2 em 2 horas até 10 e 24 horas pós-infecção. As alíquotas foram armazenadas -20 °C para posterior análise das ppHCV-RVGP presentes no sobrenadante e, portanto, que não entraram nas células.

b-) Ensaio de infecção para detecção da expressão da RVGP por ELISA

Um dia antes da infecção, inoculamos 2×10^5 células Huh 7/ poço em placas de 6 poços. No dia da infecção, utilizamos as proporções 1:2,5; 1:3,5; 1:7 e 1:10 número de células: ppHCV-RVGP.

Os poços com o cultivo celular foram lavados com PBS 1× estéril e em seguida foi adicionado ppHCV-RVGP juntamente com meio DMEM sem SFB para completar o volume de 1 mL. A placa foi centrifugada em 400 g por 1 hora e mantidas em estufa a 37 °C contendo 5% de CO₂ por 2 horas, em seguida foram adicionados 2 mL de meio DMEM suplementado com soro fetal bovino.

Após 48 horas as células foram descoladas com PBS-EDTA (5 mM) e centrifugadas 800 g/ 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi armazenado a -20 °C para análise da RVGP. A preferência pelo uso de PBS-EDTA se deve ao fato de que a utilização de tripsina diminui a concentração de RVGP presente (BENMAAMAR et al., 2009).

A produção de RVGP foi avaliada pelo método de ELISA utilizando o kit “*Rabies Glycoprotein Enzyme Immunoassay*” (Instituto Pasteur, Paris) segundo padronizações realizações anteriormente em nosso laboratório (ASTRAY et al., 2008). Nesse imunoensaio foi utilizado o anticorpo IgG monoclonal anti-RVGP (D1-25N°I-1805:Imunoglobulina anti-sítio III da glicoproteína rábica) e anticorpos monoclonais conjugados com peroxidase (IgG-D1-Po:Imunoglobulina idêntica à utilizada para a sensibilização das placas, conjugada com peroxidase).

O anticorpo primário anti-RVGP, de sensibilização da placa, foi diluído na proporção de 1:2000 em tampão carbonato e distribuído 200 µL por poço da placa de 96 poços. Em

seguida a placa foi selada e incubada 20 horas a 4 °C. Após o descarte do anticorpo de sensibilização, a placa foi bloqueada com 300 µL por poço de solução de bloqueio a temperatura ambiente por 30 minutos.

No momento da análise, as amostras (foi utilizado somente o *pellet* celular, uma vez que as amostras de sobrenadante não mostraram marcação anti-RVGP) foram descongeladas e ressuspensas com 500 µL de tampão T4 (25 mM Tris, 25 mM NaCl e MgCL 5 mM) e misturadas no vórtex por 10 segundos. Em seguida foi adicionado 500 µL de tampão T4 Lise (25 mM Tris, 25 mM NaCl, MgCL 5 mM e Igepal 0,4%) e misturadas no vórtex por 10 segundos e foram mantidas a 4 °C por 1 hora, sendo homogeneizadas a cada 15 minutos. Após a lise as amostras foram centrifugadas a 10.600 g a 4 °C por 10 minutos para retirada dos debris celulares, sendo analisado apenas o sobrenadante obtido após a centrifugação.

A placa sensibilizada foi lavada 5 vezes em tampão PBS-Tween e invertida em papel absorvente. Para o branco foi utilizado o tampão PBS-Tween-BSA. O antígeno de referência diluído em tampão PBS-Tween-BSA foi distribuído na placa em duplicata (200 µL), assim como as amostras previamente preparadas. A placa foi coberta com filme e incubada por 1 hora a 37 °C. Após incubação a placa foi lavada 5 vezes com tampão PBS-Tween e foram adicionados 200 µL por poço do anticorpo marcado com peroxidase diluído em tampão PBS-Tween-BSA. Após 1 hora a 37 °C a placa foi lavada 6 vezes com PBS-Tween. Foi adicionada então a solução com substrato cromógeno. Após 30 minutos de incubação em ambiente escuro a reação foi bloqueada com 50 µL de solução de bloqueio. A densidade óptica de cada amostra foi analisada no leitor de ELISA (Multiskan EX, MJLabsystems) a 492 nm. A determinação da concentração de RVGP em cada amostra foi realizada com base na comparação das absorbâncias das amostras com a curva padrão.

c-) Reação de Imunofluorescência Indireta

O processo de infecção para o imunoensaio de IFI foi feito em placa de 6 poços com inóculo inicial de 1×10^5 células Huh 7/ por poço, esse inóculo foi feito sobre uma lamínula para posterior observação em microscópio de fluorescência. Após 48 horas pós-infecção removemos o meio de cultura dos poços das placas e lavamos $3 \times$ com 1mL PBS $1 \times$, sem homogeneização brusca para evitar que as células se soltem. Para fixar as células utilizamos

0,5 mL paraformaldeído a 4% e colocamos a placa sobre o gelo por 40 minutos. Lavamos novamente com PBS 1 × por 3 ×. Em seguida adicionamos 200 µL do anticorpo primário monoclonal anti-RVGP, diluído 1:400, incubamos por 1 hora a temperatura ambiente. Após esse período lavamos por 3 × com 1 mL de PBS Tween 0,05% e em seguida, adicionamos o anticorpo secundário FITC, diluído 1:500, e incubamos por 1 hora no escuro. Lavamos 3 × com 1 mL PBS 1 ×. Retiramos as lamínulas dos poços, adicionamos 8 µL de SlowFade – Gold antifade reagent® na lâmina e depositamos a lamínula sobre o reagente. A visualização foi feita em microscópio de fluorescência BX51 (Olympus- Center Valley, Pensilvânia, USA), com auxílio do sistema de captação de imagem DP73 (Olympus) e do software CellSens Standard.

5 Resultados

5.1 Purificação de DNA plasmidial obtido pela técnica de MaxiPrep

Com o intuito de determinar as melhores condições para a co-transfecção transiente em células HEK293-T diferentes métodos de co-transfecção foram estudados. Os vetores pCMV-Gag/Pol, pCMV-E1E2 e pCMV-RVGP foram amplificados em bactérias DH5 α e a integridade dos mesmos foi confirmada pela análise dos padrões de restrição observados em eletroforese em gel de agarose (Dados não mostrados). Esses plasmídeos foram usados para os experimentos de co-transfecção.

5.2 Padronização da produção das ppHCV-RVGP pelo método de lipofecção

Para a avaliação da produção de ppHCV-RVGP pelas células HEK293-T foram utilizados dois agentes de transfecção: lipofectamina e eletroporação.

A primeira padronização foi feita com o método de lipofecção. Foram realizados 3 experimentos descritos na tabela 4.

Tabela 9 - Padronização co-transfecção com Lipofectamina

	pCMV-E1E2	pCMV-Gag/Pol	pCMV-RVGP	Lipofectamina	DNA: Lipofectamina (Massa:volume)
Experimento 1*	2,7 μ g	8 μ g	8,1 μ g	20 μ l	1:1
Experimento 2	2,1 μ g	4 μ g	4 μ g	15 μ l	1:1,5
Experimento 3	9,8 μ g	8,4 μ g	9 μ g	20 μ l	1:1,3

*Experimento 1 foi descrito por BARTOSCH; DUBUISSON; COSSET (2003).

A produção de ppHCV-RVGP destes 3 lotes experimentais foi analisada pela dosagem de expressão da proteína RVGP em células Huh 7 infectadas. Optamos preliminarmente em utilizar um volume fixo de 1 mL do sobrenadante contendo as ppHCV-RVGP, pelo fato de que até aquele momento não havíamos padronizado a qRT-PCR. A expressão da proteína RVGP nas células Huh 7 infectadas foi feita pelo método ELISA (Figura 9). Este experimento foi realizado em duplicata.

Figura 9 - Expressão da RVGP (ng/ 10^6 cel) em células Huh 7 infectadas com as ppHCV-RVGP obtidas pela co-transfecção com lipofectamina

Análise da expressão da RVGP por ELISA, 24 e 48 horas pós-infecção. Os experimentos 1, 2 e 3 foram descritos na tabela 4 - item 4.5.1. As barras correspondem ao desvio padrão.

A expressão da RVGP nas células Huh 7 apresentou uma maior expressão 48 horas após a infecção, com expressão de 17,5 ng/ 10^6 células para o experimento 1, 27,2 ng/ 10^6 células para o experimento 2 e 22,9 ng/ 10^6 células para o experimento 3, sendo que a proteína nos três experimentos somente foi detectada no lisado celular, como esperado. Podemos observar que 24 horas após a infecção não há expressão de RVGP no experimento 1, mas valores de 1,1 ng/ 10^6 e 6,9 ng/ 10^6 células, foram encontrados no lisado celular dos experimentos 2 e 3, respectivamente. Curiosamente, houve a detecção de proteína RVGP no

sobrenadante celular ($< 5 \text{ ng}/10^6 \text{ cel}$), provavelmente devido a proteína presente em fragmentos de membrana celular, resultante de lise de células por apoptose e/ou necrose.

Posteriormente, esses lotes puderam ser quantificados pela qRT-PCR (Tabela 9). O experimento 2 se mostrou melhor para a produção de ppHCV-RVGP, chegando a produzir $1,90 \times 10^2$ cópias de mRNA-RVGP/ μL , seguidos dos experimentos 1 e 3 com $1,6 \times 10^2$ cópias mRNA-RVGP/ μL e $0,9 \times 10^2$ cópias mRNA-RVGP/ μL , respectivamente. Calculando a proporção ppHCV-RVGP: número de células, chegamos às relações de: 0,2; 0,3 e 0,1 para os experimentos 1, 2 e 3, respectivamente. Na expectativa de repetir esta expressão, lotes novos desses 3 experimentos foram produzidos. A quantificação foi semelhante à descrita na tabela 9. O processo de infecção foi repetido e a expressão da proteína RVGP em células infectadas foi analisada por ELISA. Nestes experimentos não foi detectada a expressão da RVGP pelo método de ELISA. Assim optamos por aumentar a proporção ppHCV-RVGP: células na expectativa de detectar a expressão da proteína RVGP em células Huh 7 infectadas.

Tabela 10 - Quantificação das ppHCV-RVGP por qRT-PCR obtidas pela co-transfecção com lipofectamina

Nome	Quantificação
Experimento 1	$1,6 \times 10^2$ cópias RNA-RVGP/ μL
Experimento 2	$1,9 \times 10^2$ cópias RNA-RVGP / μL
Experimento 3	$0,9 \times 10^2$ cópias RNA-RVGP / μL

Apesar da baixa expressão da proteína RVGP os resultados mostrados na figura 9 e na tabela 9 nos permitiram analisar as melhores condições para a produção da ppHCV-RVGP e expressão da proteína RVGP. Assim optamos pelo método usado no experimento 2 (2 μg pCMV-E1E2, 4 μg pCMV-Gag/Pol e 4 μg pCMV-RVGP) para produzir novas ppHCV-RVGP, uma vez que este mostrou maior expressão da proteína de interesse e também maior produção de pseudopartículas virais.

Para os novos lotes de ppHCV-RVGP produzidos, seguindo a metodologia do experimento 2, foi realizada uma análise quanto ao método de coleta. Para isso, a partir de um mesmo lote viral foram realizadas coletas com dois filtros, 0,22 μm e 0,45 μm (Tabela 10).

Tabela 11 - Quantificação das ppHCV-RVGP por qRT-PCR para padronização do método de coleta

Nome	Quantificação
Vírus coletado com filtro 0,22 μm	$1,71 \times 10^2$ cópias RNA-RVGP/ μL
Vírus coletado com filtro 0,45 μm	$4,64 \times 10^2$ cópias RNA-RVGP/ μL

Pudemos ver que o rendimento das ppHCV-RVGP quando filtradas em 0,22 μm foi $\approx 3\times$ menor do que quando filtradas em 0,45 μm , $1,71 \times 10^2$ cópias RNA-RVGP/ μL e $4,64 \times 10^2$ cópias RNA-RVGP/ μL , respectivamente, confirmando a heterogeneidade das ppHCV-RVGP produzidas.

5.3 Padronização da produção das ppHCV-RVGP pelo método de eletroporação

Para a padronização da eletroporação utilizamos como gene repórter a proteína verde fluorescente da água viva (GFP) presente no vetor pCMV-GFP. Assim, células HEK293-T foram transfectadas apenas com o vetor pCMV-GFP e a expressão da proteína GFP foi confirmada por microscopia de fluorescência (Apêndice I, II, III e IV), para podermos inferir a eficiência de transfecção.

Todas as condições da eletroporação foram descritas na tabela 11, no qual foram medidas a viabilidade e a concentração das células HEK293-T (Apêndice V). Esses resultados nos permitiram prever as condições C1 e C2 foram melhores quando utilizamos cubetas de 0,2 cm para eletroporar e as condições C3 e C4 foram melhores para cubeta de 0,4 cm.

Tabela 12 - Padronização das condições de eletroporação em células HEK293-T

	Cubeta (cm)	Resistência (Ω)	Pulsos	Voltagem (V)	Capacitância (μ F)
Condição 1*	0,2	∞ ohms	2 pulsos	110 V	75 uF
Condição 2	0,2	∞ ohms	2 pulsos	280 V	75 uF
Condição 3	0,4	∞ ohms	2 pulsos	480 V	25 uF
Condição 4	0,4	∞ ohms	2 pulsos	650 V	25 uF

* configuração prévia do Gene Pulser Xcell™

A porcentagem de células fluorescentes foi estimada por contagem visual em microscopia de fluorescência. Para a cubeta de 0,2 cm a condição 2 apresentou melhor resultado de expressão de GFP em relação a condição 1, sendo que não houve uma diferença visual entre 24 e 48 horas pós transfecção. A condição 3 apresentou uma maior quantidade de células fluorescentes em 24 horas e em 48 horas apresentou maior intensidade de fluorescência, uma vez que esta proteína continua sendo expressa. Com relação à condição 4, 24 horas após a transfecção as células estavam soltas e apresentavam pouca fluorescência (dados não mostrados) e após 48 horas as células apresentaram fluorescência com maior intensidade, porém as células não estavam aderidas e formaram grumos. Devido à dificuldade de interpretação dos resultados observados, optamos pela produção das ppHCV-RVGP para cada uma das condições descritas na tabela 11, afim de esclarecer qual condição é a mais viável para produção de ppHCV-RVGP.

Assim eletroporamos células HEK293-T com os três vetores para a produção de ppHCV-RVGP (Tabela 12).

Pelo fato de haver muitas células soltas no sobrenadante na condição C4, uma vez que a voltagem é alta, realizamos duas formas de coleta, filtro 0,45 μ m e centrifugação, não utilizamos filtro 0,22 μ m pelo fato de já ter sido visto que este diminuiu a recuperação das ppHCV-RVGP.

Nesse ensaio produzimos um lote viral para cada condição de eletroporação e método de coleta. A partir da quantificação direta das ppHCV-RVGP por qRT-PCR, pudemos verificar que as condições C2 e C4, ambas coletadas com filtro 0,45 μ m, apresentaram números de cópias de ppHCV-RVGP mais elevados que as demais condições: $4,78 \times 10^2$ cópias RNA-RVGP/ μ L e $3,10 \times 10^2$ cópias RNA-RVGP/ μ L, respectivamente. As condições

C1 e C3, em ambos os métodos de coleta, se mostraram inferiores às demais em relação à produção de pseudopartículas. Assim, escolhemos a condição C2 para produção de ppHCV-RVGP através do método de eletroporação.

Tabela 13 - Quantificação das ppHCV-RVGP por qRT-PCR para padronização da eletroporação

Eletroporação	Método de Coleta	Quantificação
Cubeta de 0,2 cm- C1	Centrifugação 15.557 g/30'	$1,14 \times 10^2$ cópias RNA-RVGP/ μ L
Cubeta de 0,2 cm- C1	Filtro 0,45 μ m	$0,902 \times 10^2$ cópias RNA-RVGP/ μ L
Cubeta de 0,2 cm- C2	Centrifugação 15.557 g/30'	$0,992 \times 10^2$ cópias RNA-RVGP/ μ L
Cubeta de 0,2 cm- C2	Filtro 0,45 μ m	$4,78 \times 10^2$ cópias RNA-RVGP/ μ L
Cubeta de 0,4 cm- C3	Centrifugação 15.557 g/30'	$0,232 \times 10^2$ cópias RNA-RVGP/ μ L
Cubeta de 0,4 cm- C3	Filtro 0,45 μ m	$1,37 \times 10^2$ cópias RNA-RVGP/ μ L
Cubeta de 0,4 cm- C4	Centrifugação 15.557 g/30'	$0,463 \times 10^2$ cópias RNA-RVGP/ μ L
Cubeta de 0,4 cm- C4	Filtro 0,45 μ m	$3,10 \times 10^2$ cópias RNA-RVGP/ μ L

5.4 Padronização da qRT-PCR

Para adequarmos a quantificação das ppHCV-RVGP, obtivemos uma curva padrão com diferentes diluições do vetor pCMV-RVGP. Assim, após a linearização do pCMV-RVGP confirmamos a digestão enzimática em gel de agarose 0,8% (Figura 10). No qual obtivemos um fragmento com o tamanho de 7.687 bp como era esperado.

Figura 10 - Linearização do pCMV-RVGP

1- Marcador de peso Molecular Lambda Hind III; 2- pCMV-RVGP circular; 3- pCMV-RVGP linear.

Com a confirmação da digestão, foram feitas sete diluições do plasmídeo linearizado, para a construção da curva padrão da qRT-PCR. Foi utilizado o par de iniciadores RVGP9 e RVGPr1 (Figura 10), que amplificam uma região de 177 bp da RVGP. A reação foi realizada no aparelho *Step One Real Time PCR System* (Life Technologies) com o seguinte ciclo de amplificação: 95 °C/ 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C/ 15 s, 53 °C/ 15 s, 60 °C/ 30 s e a curva de dissociação ou *melting* foi lida da temperatura de 75 °C variando até o grau máximo de 95 °C.

Observamos que com esse par de iniciadores, o Ct apresentou uma boa curva padrão (Figura 11), com um valor elevado de R^2 e uma eficiência de 92%. A amplificação do primeiro ponto da curva, contendo 6×10^7 cópias RNA-RVGP/ μ L, foi detectado no 12º ciclo e houve reprodutibilidade entre as triplicatas. Além disso, houve a amplificação de todos os pontos da curva padrão e todos os pontos se dissociaram à temperatura de $81 \text{ } ^\circ\text{C} \pm 0.3 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Dois novos experimentos com o par de iniciadores escolhidos foram realizados em dias diferentes, para verificar a reprodutibilidade da curva padrão da qRT-PCR, deste modo este par de iniciadores se mostraram eficientes para a quantificação dos lotes virais baseados na RVGP.

Valores de Cts muito próximos entre as curvas produzidas em dois dias diferentes resultaram em valores praticamente iguais de R^2 e inclinação das curvas, o que comprova a reprodutibilidade da mesma e a estabilidade dos iniciadores e padrões.

Figura 11 - Gráfico da curva padrão em número de cópias/ μL por Ct

Curva padrão obtida por qRT-PCR pelo par de iniciadores RVGP9 e RVGPr1. Ct – corresponde ao primeiro valor de fluorescência acima do valor basal.

5.5 Detecção e Titulação Viral

Primeiramente foram extraídos os materiais genéticos contidos no sobrenadante das células HEK293-T co-transfectadas, em seguida, essas amostras foram tratadas com DNase e então submetidas à síntese de cDNA por transcrição reversa. Após a síntese do cDNA, realizamos a amplificação por PCR, do tratamento com DNase e da RT, com os lotes produzidos pelos diferentes métodos de co-transfecção, lipofectamina e eletroporação, apresentados na tabela 13. Foram utilizados o par de iniciadores RVGP 5 e RVGPr1 (Tabela

6) e então foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1,5% (Figura 12) para analisar as amplificações obtidas das partículas e de seus tratamentos.

Figura 12 - Análise em eletroforese em gel de agarose 1,5% dos fragmentos gerados por PCR convencional das amostras das ppHCV-RVGP

M- Marcador 100 bp; RNA extraído das partículas virais (2 – Lote 1; 3 - Lote 2; 4- Lote 3; 5 – Lote 4); RNA extraído tratado com DNase (6 – Lote 1; 7 - Lote 2; 8 - Lote 3; 9 – Lote 4); amplificação da RT-PCR (10 – Lote 1; 11 - Lote 2; 12- Lote 3; 13 – Lote 4); 14 - pCMV-RVGP (Controle positivo); 15 - Controle negativo (H₂O DEPC).

A partir da observação dos fragmentos obtidos por PCR convencional das amostras dos diferentes lotes, podemos observar que houve eficiência no tratamento com DNase, assim o tratamento com DNase e RT se mostraram os mais adequados para a detecção do RNA contido nas partículas formadas (Tabela 13).

Com base nos resultados das padronizações das co-transfecções lotes virais (Tabela 13) foram produzidos e utilizados para ensaios de infecção em células Huh 7, HEK293-T e BHK-21.

Tabela 14 - Títulos virais determinados por qRT-PCR

Lote	Título (Cópias RNA-RVGP/ μ L)	Métodos de transfecção
Lote 1	$0,05 \times 10^4$	Eletroporação
Lote 2*	$8,40 \times 10^4$	Eletroporação
Lote 3	$0,04 \times 10^4$	Lipofectamina
Lote 4*	$36,50 \times 10^4$	Lipofectamina
Lote 5*	$3,64 \times 10^4$	Lipofectamina
Lote 6*	$36,00 \times 10^4$	Lipofectamina

Lotes 1 e 3 não foram concentrados com a coluna Vivaspin 2. Os Lotes 2*, 4*, 5* e 6* foram concentrados com a coluna Vivaspin 2.

5.6 Detecção da RVGP por ELISA

A detecção quantitativa da RVGP em células Huh 7 foi obtida através de ELISA. Neste trabalho estão apresentados os resultados de infecções feitas com os lotes ppHCV-RVGP 3 e 4 (Tabela 13). Foram realizadas infecções com os lotes 1 e 2, porém não houve a detecção da expressão da proteína RVGP (Dados não mostrados).

A figura 13 mostra a expressão da RVGP em células Huh 7, 48 horas pós-infecção. Não houve diferença na expressão da proteína entre a relação 2,5 ppHCV-RVGP:célula nos lotes 3 e 4, mostrando que a concentração das ppHCV-RVGP pela coluna VivaSpin 2 não afetou a infecção das ppHCV-RVGP. Ambos os lotes mostraram uma expressão de $10 \text{ ng} / 10^6$ células. As relações 3,5 e 7 apresentaram menor expressão da proteína, em ambas a expressão foi abaixo de $5 \text{ ng} / 10^6$ células. Porém, na relação de 10 ppHC-RVGP para cada célula a expressão chegou a $\approx 10 \text{ ng} / 10^6$ células. Já em uma relação de 25 ppHCV-RVGP para cada célula há um decaimento na expressão de RVGP $< 5 \text{ ng} / 10^6$ células. Para a relação 10 e 25 ppHCV-RVGP para cada célula não foi possível realizar o ensaio em duplicata, uma vez que o volume de ppHCV-RVGP não foi suficiente para essas proporções, por este motivo não calculamos o desvio padrão das amostras.

Figura 13 - Expressão da RVGP ($\text{ng} / 10^6 \text{ cel}$) em células infectadas com as ppHCV-RVGP 48 horas pós- infecção

A proporção 2,5* representa a infecção com o lote 3 (ppHCV-RVGP não concentrada com a coluna Vivaspin 2). As demais proporções 2,5; 3,5; 7; 10 e 25 representam as infecções com o lote 4 (ppHCV-RVGP concentrada com a coluna Vivaspin 2). As barras correspondem ao desvio padrão das medidas.

Uma vez que existem variações intrínsecas do próprio teste de ELISA e que nossos dados de expressão estão entre 5 e 10 ng/ 10^6 células (valores muito baixos), os dados encontrados neste trabalho, sugerem que não há diferenças entre as várias relações ppHCV-RVGP:números de células Huh 7 que utilizamos.

5.7 Detecção da RVGP por IFI

Os lotes 2 e 4 também foram utilizados para realização de imunoensaios com diferentes relações ppHCV-RVGP: números de células Huh 7. Na figura 14 observamos células Huh 7 infectadas com o lote viral 4 (Tabela 13). É possível observar através da marcação com o anticorpo anti-RVGP que há pouca expressão da proteína RVGP nas células Huh 7 infectadas. O mesmo se aplica para o experimento da figura 15, na qual células Huh 7 foram infectadas com o lote viral 2. Há a marcação da proteína, entretanto poucas células estão expressando. Esses resultados nos permitem avaliar a expressão da proteína RVGP qualitativamente, porém existe uma correlação entre a IFI e o ELISA no qual ambos mostram a baixa expressão da RVGP em células Huh 7.

Figura 14 - Imunofluorescência Indireta em células Huh 7 após infecção com ppHCV-RVGP com lote viral 4

As numerações (1;2,5; 3,5; 7 e 10) são referentes aos números de partículas virais por número de células, todas as imagens foram capturadas no aumento de 40x, com exceção do controle negativo (C-) 20x. Marcação feita com anticorpo- monoclonal IgG anti-RVGP conjugados com FITC e contraste com azul de Evans (A) e sem azul de Evans (B).

Figura 15 - Imunofluorescência Indireta em células Huh 7 após infecção com ppHCV-RVGP com lote viral 2

As numerações (1;2,5; 3,5; 7 e 10) são referentes aos números de partículas virais por número de células, todas as imagens foram tiradas no aumento de 40x, com exceção do controle negativo (C-) 20x. Marcação feita com anticorpo- monoclonal IgG anti-RVGP conjugados com FITC e contraste com azul de Evans (A) e sem azul de Evans (B).

5.8 Detecção da entrada das ppHCV-RVGP nas células Huh 7, HEK293-T e BHK-21

Os resultados obtidos pelos métodos de ELISA e IFI não foram conclusivos na detecção da expressão da RVGP em células Huh 7, uma vez que os dados de expressão foram baixos quando comparados a outros sistemas de expressão como demonstrado na tabela 1.

Um das hipóteses sugeridas por esses dados é que as ppHCV-RVGP não estejam infectando efetivamente as células Huh 7. Deste modo, para testarmos esta hipótese realizamos a infecção das ppHCV-RVGP nas linhagens celulares HEK293-T, BHK-21 e Huh 7. Avaliamos após diferentes tempos de infecção, a presença das ppHCV-RVGP no sobrenadante, o que indicaria o fracasso da infecção. E também avaliamos se as ppHCV-RVGP eram degradadas com o tempo. Para este ensaio foram utilizados os lotes 5 e 6 descritos na tabela 13, ambos os lotes foram produzidos pelo método de co-transfecção por lipofectamina, por ter uma padronização bem estabelecida no laboratório.

Na figura 16 podemos observar que, independente da linhagem celular, a quantificação de ppHCV-RVGP no sobrenadante da infecção é bem semelhante entre eles, sendo que há uma variação mínima entre os tempos de coletas.

Neste ensaio, em todas as linhagens estudadas as quantificações foram de $\approx 10^4$ cópias de RNA-RVGP/ μL , o que podemos presumir que as ppHCV-RVGP não foram capazes de aderir e entrar nas diferentes linhagens celulares Huh 7, HEK293-T e BHK-21. O mesmo resultado foi obtido para o experimento que possuía somente as ppHCV-RVGP, a quantificação obtida foi de $\approx 10^4$ cópias de RNA-RVGP/ μL , com este resultado podemos notar que as ppHCV-RVGP não degradaram depois de armazenadas -80°C e nem durante o tempo de infecção, o que pode indicar que essas mantêm as características do vírus em preservar o RNA, porém, perderam a capacidade infectante.

Figura 16 - Ensaio de detecção da entrada das ppHCV-RVGP em células Huh 7, HEK293-T e BHK-21.

Gráfico de detecção da entrada das ppHCV-RVGP em células Huh 7, HEK293-T e BHK-21 na proporção de 1: 10 e nas células Huh 7* 1: 50, além de avaliar a degradação das ppHCV-RVGP pelo tempo.

5.9 Detecção das proteínas componentes das ppHCV por Westen Blotting

Uma vez que percebemos a baixa eficiência das ppHCV-RVGP infectarem as células Huh 7, voltamos a atenção para a análise das proteínas necessárias para a formação das ppHCV (proteína Gag do MLV e glicoproteínas E1 e E2 do HCV), além de utilizar a glicoproteína G do vírus da estomatite vesicular (VSVG (peso molecular $\approx$ 69 kDa) (TONEGUZZO; GHOSH, 1978). Esta proteína foi utilizada para avaliar se a proteína Gag teria a capacidade de incorporar proteínas de membrana. Também foi utilizada a proteína GFP como repórter para detecção de expressão em ensaios de infecção. Esse experimento foi realizado em parceria com a Dra. Ana Sofia Coroadinha do Instituto de Experimentos e Tecnologia (iBET) em Portugal, seguindo os protocolos pré estabelecidos pelo laboratório português. Na tabela 14 estão descritos os diferentes experimentos de co-transfecção realizados por essa parceria iBET- Laboratório de Imunologia Viral.

Tabela 15 - Experimentos de co-transfecção em células HEK293-T

Experimentos	Tipo de amostras	Plasmídeos	Agente de Co-Transfecção
1	pps purificadas	Gag/Pol + E1E2 + GFP	PEI
2	pps purificadas	Gag/Pol + VSVG + GFP	PEI
3	Extrato de células HEK293-T com expressão estável de Gag e E1E2	-----	-----
4	pps purificadas	Gag/Pol	PEI
5	Extrato de células HEK293-T transfectadas	Gag/Pol + E1E2 + GFP	PEI
6	Extrato de células HEK293-T transfectadas	Gag/Pol + VSVG + GFP	PEI
7	Extrato de células HEK293-T	C -	----

Assim, com o objetivo de verificar se as proteínas para a formação das ppHCV estavam sendo expressas corretamente, ppHCV foram produzidas em células HEK293-T e a expressão das diferentes proteínas foi analisada pelo método *Western Blotting* (Figura 17).

Nesta análise foi possível confirmar a expressão da glicoproteína E1 do HCV (Figura 17 (A)), com cerca de 30 kDa, tanto no extrato celular quanto nas ppHCV purificadas (Tabela 7, experimentos 1, 3 e 5). As bandas que aparecem nos experimentos 4, 6 e 7 podem ser devido a um extravasamento das amostras nos poços vizinhos, uma vez que não há o gene da E1 nas pps dessas amostras. Nas linhas 3 e 5 houve a formação de bandas com maior intensidade quando comparada ao experimento 1. A expressão da E2 do HCV, com cerca de 70 kDa, também foi observada por *western blotting* (Figura 17 (B)) nos experimentos 1, 3 e 5, sendo que no experimento 1 a intensidade da marcação foi menor quando comparada aos experimentos 3 e 5. No experimento 5 notamos a formação de duas bandas, devido provavelmente aos diferentes padrões de glicosilação da glicoproteína E2, que dependem do nível de sua maturação.

Quando comparada a expressão das glicoproteínas E1 e E2 nas ppHCV purificadas (experimento 1 da tabela 7), é possível notar que a marcação da glicoproteína E1 é mais intensa que E2, sugerindo que a glicoproteína E2 não está sendo incorporada às ppHCV. Além disso, notamos que a marcação, tanto da glicoproteína E1 quanto da E2 foi mais intensa

nos extratos celulares, indicando que estas glicoproteínas não estão formando o complexo heterodímero e ambas estão ficando retidas no interior celular.

Está mostrada na figura 17 (C) a presença da proteína Gag nos experimentos 1, 2, 3, 5 e 6, sendo observadas diferentes formas glicosiladas dessa proteína. Tanto no experimento 3 quanto no 5 há uma marcação fraca da Gag no extrato celular, o que nos sugere que a mesma está sendo formada e que as ppHCV estão saindo por brotamento das células HEK293-T. No experimento 4 foi realizado apenas 1 ultracentrifugação, o que poderia ter afetado o processo de purificação das ppHCV e por isso a marcação da Gag foi bem fraca. Por fim na figura 17 (D) verificamos a expressão da glicoproteína G do VSV nas linhas 2 e 6, sendo que em 2 a intensidade da banda foi maior do que em 6. O que nos sugere que a glicoproteína G do VSV é incorporada as pps.

Figura 17 - Análise da expressão das proteínas E1E2 do HCV, Gag do MLV e G do VSV

Western Blotting do extrato celular e das pps purificadas utilizando em: (A) anticorpo anti-E1. (B) anticorpo anti-E2. (C) anticorpo anti-Gag. (D) anticorpo anti-VSVG. O experimento 1 está representada ppHCV purificada, co-transfectadas com Gag/Pol, E1E2 e GFP. Experimento 2 pps purificadas, co-transfectadas com Gag/Pol, VSVG e GFP. Experimento 3 extrato de células HEK293-T com expressão estável de Gag/Pol transfectadas com E1E2 para obtenção de ppHCV. Experimento 4 pps purificadas, transfectadas com Gag/Pol. Experimento 5 extrato de células HEK293-T da co-transfecção para obtenção de ppHCV. Experimento 6 extrato de células HEK293-T da co-transfecção para obtenção de pp com a glicoproteína G do VSV. Experimento 7 extrato de células HEK293-T não transfectadas.

Assim, pudemos inferir que a baixa eficiência na expressão da proteína RVGP nas células Huh 7 infectadas com ppHCV-RVGP, se deve a dificuldade de entrada das ppHCV-RVGP nas células Huh 7 e, consequente expressão do RNA-RVGP, devido a deficiência na incorporação das glicoproteínas E1 e E2 do HCV nas pseudopartículas virais, uma vez que

estas glicoproteínas ficam retidas nas células transfectadas e são responsáveis pela adesão e entrada das ppHCV nas células Huh 7.

6 Discussão

Ao longo de três décadas pseudopartículas virais têm sido desenvolvidas como alternativas de tratamento e prevenção de uma série de doenças humanas e animais. A primeira delas foi baseada no vírus da hepatite B e a partir destas muitas outras vacinas de pseudopartículas virais foram desenvolvidas ou ainda estão em desenvolvimento. Estudo com pseudopartículas do vírus da imunodeficiência 1, do vírus da dengue, norovírus, rotavírus e influenza A, são alguns exemplos. Enquanto todas estas pps são baseadas em proteínas dos próprios vírus causadores da doença, também têm sido desenvolvidas pseudopartículas virais que atuam como carregadores de genes heterólogos, como é o caso das pseudopartículas quiméricas do rotavírus bovino. Segundo REDMOND et al. (1993), a proteína VP6 do rotavírus bovino forma pseudopartículas que são altamente imunogênicas. Embora usando as próprias glicoproteínas (VP4 e VP7), outras glicoproteínas heterólogas poderiam ser incorporadas a VP6 e utilizadas para imunização. De modo similar, pseudopartículas derivadas da proteína do *core* do vírus da hepatite B (BLANCHET; SUREAU, 2006; PUMPENS; GRENS, 2001) foram mostradas como transportadoras para proteína M2 do vírus influenza, o domínio III do envelope do vírus da dengue do tipo 2 (ARORA et al., 2012) ou os epítomos de células do tipo B e T provenientes da infecção por malária (NARDIN et al., 2004). Tipicamente, a imunização feita com pseudopartículas virais induz uma resposta imune rápida e forte (BACHMANN; ZINKERNAGEL, 1996), mostrando que este sistema semelhante a vírus tem potencial para um candidato eficiente à vacina.

Recentes avanços na bioengenharia permitiram construir pseudopartículas capazes de encapsidar proteínas, moléculas ou ácidos nucleicos, utilizando-se das propriedades de algumas proteínas da cápside viral (ASHLEY et al., 2011; KACZMARCZYK et al., 2011; RAMQVIST; ANDREASSON; DALIANIS, 2007; SEOW; WOOD, 2009). Uma proteína de cápside que vem sendo muito utilizada é a Gag do MLV, esta é suficiente para gerar as partículas virais e uma grande variedade de proteínas têm sido incorporadas com sucesso as pps, como é o caso das proteínas de membrana E1 e E2 do vírus da Hepatite C (BARTOSCH; DUBUISSON; COSSET, 2003). Como já mencionado este sistema ppHCV tem sido utilizado para estudar o mecanismo de infecção do HCV que utiliza marcadores repórter, cujo gene codifica uma proteína que pode ser monitorada por métodos simples e sensíveis. Dentre estes

genes repórter, a proteína verde fluorescente da água viva (GFP) e a luciferase (Luc), têm sido amplamente usadas em células de mamíferos (BARTOSCH; DUBUISSON; COSSET, 2003).

Assim, o presente trabalho teve como principal objetivo produzir pseudopartículas virais com as proteínas Gag e Pol do MLV e as glicoproteínas E1 e E2 do HCV e carregando o RNA da glicoproteína do vírus da raiva – ppHCV-RVGP.

Para que pudéssemos utilizar e produzir o sistema ppHVC-RVGP foram necessárias uma série de padronizações para otimizar a produção e quantificação das ppHCV-RVGP e também para a expressão da proteína RVGP.

Para a formação das pseudopartículas três vetores genéticos foram co-transfectados em células HEK293-T em diferentes ensaios (Tabela 4). Dois métodos convencionais de transfecção foram avaliados: a lipofecção, utilizando lipofectamina, e a eletroporação, utilizando diferentes condições de eletrochoques.

Atualmente, não há métodos de quantificação totais de pseudopartículas virais que não seja por estimativa (THOMPSON et al., 2013). SHARMA et al. (2011) obtiveram uma quantificação de $\approx 1,5 \times 10^4$ ppHCV/ μ L e ASHFAQ et al. (2011) $\approx 10^5$ ppHCV/ mL, porém esses trabalhos realizaram a quantificação por estimativa, dificultando a comparação com os nossos resultados. Segundo THOMPSON et al. (2013) existe uma correlação entre o ensaio de hemaglutinação e o número de pseudopartículas virais de influenza que poderia ser usado para estimar o título total das pseudopartículas virais, mas esta correlação tem algumas limitações. As hemácias têm que estarem frescas para obter resultados reprodutíveis e as suas propriedades de aglutinação diminuem ao longo do tempo, além disso, cada fornecimento de amostra de hemácia tem uma origem diferente, portanto é necessária uma padronização em cada tentativa. SUBRAMANIAN et al. (2012) quantificaram pseudopartículas virais baseadas na febre aftosa pelo método de ELISA, no qual obtiveram 30 μ g pseudopartícula da febre aftosa/ mL. Métodos baseados em antígenos são rotineiramente utilizados para a quantificação de pseudopartículas virais purificadas, contudo a quantificação de pseudopartículas virais por qRT-PCR não pode ser utilizada para esse tipo de pseudopartículas virais devido à ausência de um material genético (THOMPSON et al., 2013). Desta forma, nosso projeto tem o diferencial na quantificação das pseudopartículas virais, uma vez que elas transportam o RNA-RVGP, tornando ensaios de infecção mais precisos. A partir do momento que obtivemos sucesso na padronização da qRT-PCR quantificamos essas partículas utilizando o gene da RVGP como alvo da amplificação. Essa metodologia nos

possibilitou a titulação mais precisa destas ppHCV-RVGP, ao contrário do que temos visto descrito na literatura.

O método de titulação viral por qRT-PCR já vem sendo utilizado para titulação de partículas recombinantes de baculovírus e de SFV (HITCHMAN et al., 2007; PUGLIA et al., 2013). Esta é uma técnica precisa e que não havia sido bem estabelecida em outros trabalhos com ppHCV. Esta técnica nos permitiu estabelecer uma curva padrão com valores dentro do desejado para os principais parâmetros que foram demonstrados pelas propriedades das curvas de quantificação e de sua reprodutibilidade.

A partir da padronização da qRT-PCR, obtivemos a quantificação de: 4×10^2 cópias de RNA-RVGP/ μL na lipofecção e $4,78 \times 10^2$ cópias de RNA-RVGP/ μL na eletroporação. Assim, não pudemos observar diferenças significativas entre os dois métodos de transfecção utilizados. VON GROLL et al. (2006) observaram efeito tóxico da lipofecção sobre as células transfectadas. Em nossos experimentos, tanto a lipofecção quanto a eletroporação oferecem danos às células. No caso da lipofecção, pudemos observar que a relação DNA: agente de transfecção, é importante e que houve maior produção de ppHCV-RVGP quando essa relação foi de 1: 1,5. VON GROLL et al. (2006) precisaram aumentar em cinco vezes a dose de lipossomos recomendado pelo fabricante para que ocorresse a transfecção *in vitro*. Entre os três experimentos descritos na tabela 4, a infecção com as ppHCV-RVGP produzidas segundo a metodologia do experimento 2 não apresentaram diferenças significativas na expressão da proteína RVGP em células Huh 7, em análise por ELISA.

Assim, apesar de haver uma variação nas quantificações de ppHCV-RVGP, os métodos de co-transfecção apresentaram valores similares de cópias RNA-RVGP/ μL , mostrando que ambos os procedimentos são eficientes para a produção de ppHCV-RVGP. Além disso, observamos que a forma de coleta das ppHCV-RVGP produzidas por filtração com membrana de $0,45 \mu\text{m}$ se apresentou mais eficiente, como observado também por BARTOSCH; DUBUISSON; COSSET, 2003. HUHTI et al. (2010) sugerem que o processo de filtração resultou em ppHCV-RVGP com dimensões heterogêneas ou até mesmo fragmentadas e COROADINHA et al. (2010) descrevem variações em 90 a 140 nm no tamanho das pps derivadas da Gag do MLV. Nossos dados corroboram com os observados por esses autores, mostrando variações na titulação viral dependendo da forma como as pps são recuperadas. Além disso, a formação de partículas menores pode estar relacionada com o

tamanho do genoma de RNA, a força iônica e ao pH do meio (BERTOLOTTI-CIARLET et al., 2003).

Para analisar a expressão da RVGP em células Huh 7 infectadas com ppHCV-RVGP utilizamos, primeiramente, a técnica ELISA (um método já estabelecido pelo laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan) (ASTRAY et al., 2008).

Diferentes relações ppHCV-RVGP: células foram utilizadas nas infecções, sendo que não houve uma diferença significativa na expressão da RVGP entre as diferentes relações (Figura 8). Porém, este ensaio nos mostrou que foi possível concentrar as ppHCV-RVGP nas colunas Vivaspin e que este procedimento não interferiu no momento da infecção.

Em um segundo momento, utilizamos a técnica de IFI para detectar a RVGP da membrana das células Huh 7, a qual através de anticorpos específicos para a proteína foi possível detectá-la na membrana celular. Porém, esta é uma técnica qualitativa e mostrou que na infecção há poucas células expressando a proteína RVGP.

Outros imunoenaios, como *dot blotting* e *western blotting*, foram realizados para detectar a expressão da proteína RVGP nas células Huh 7 infectadas, utilizando anticorpos monoclonais ou policlonais, porém não houve a detecção da proteína de interesse (dados não mostrados). Este fato pode ter ocorrido pela baixa expressão da proteína nas células infectadas, cerca de 10 ng/ 10⁶ células.

Como já citado, existem alguns trabalhos publicados em que se procedeu com sucesso a expressão de proteínas repórteres, sendo que esses trabalhos utilizaram as mesmas linhagens celulares (HEK-293T e Huh 7) (BARTOSCH; DUBUISSON; COSSET, 2003). Porém nestes trabalhos, o sistema de ppHCV foi utilizado como um “sensor” para detecção de receptores celulares e anticorpos anti-HCV entre os diferentes genótipos de HCV. Dessa forma, o sistema não foi utilizado para expressão e produção quantitativa de uma proteína heteróloga, apenas análises qualitativas foram realizadas (BARTOSCH et al., 2003; BARTOSCH; COSSET, 2006; BAUMERT et al., 1998; BUONOCORE et al., 2002; CASTET; MORADPOUR, 2003; DUBUISSON; HELLE; COCQUEREL, 2008; FLINT et al., 1999; LAGGING et al., 1998; PLOSS; EVANS, 2012). Assim, para o objetivo inicial do nosso trabalho, este sistema se mostrou pouco eficiente para a expressão da glicoproteína RVGP do vírus rábico. A fim de compreender a baixa expressão, quantificamos as ppHCV-RVGP residuais no meio de cultura das células Huh 7 após diferentes tempos de infecção.

Utilizando o método de qRT-PCR foi possível detectar que durante o processo de infecção, as ppHCV-RVGP não infectavam efetivamente as células Huh 7, uma vez que não houve a diminuição na quantidade de cópias de RNA-RVGP nos diferentes tempos pós-infecção. É possível que a má formação das glicoproteínas E1E2 do HCV, nas ppHCV-RVGP impeçam estas de infectar as células hepáticas, uma vez que estas têm funções importantes na adesão e entrada do vírus na célula.

As análises por *Western Blotting* das proteínas que são necessárias para a formação das ppHCV, mostraram que as pps eram formadas pela presença da Gag do MLV e que estas eram capazes de incorporar proteínas de membrana como a G do VSV. Porém, a principal glicoproteína, E2 do HCV ficou retida no extrato celular, e somente uma pequena parte desta conseguiu ser incorporada a membrana das ppHCV e formar o heterodímero com E1. Embora sua função não esteja clara, muitos estudos têm mostrado que a E1 coopera com a E2 na formação de um complexo funcional de glicoproteínas que é essencial para o processo de invasão viral, o que pode explicar a nossa dificuldade em expressar a RVGP nesse sistema (BRAZZOLI et al., 2005; DELEERSNYDER et al., 1997; PATEL et al., 2000; WAKITA et al., 2005).

Segundo COROADINHA, 2014 (Comunicação Informal - Informação Verbal)¹, esses resultados são similares aos obtidos pelo seu grupo de pesquisa no Instituto de Biologia de Experimentos e Tecnologia em Portugal (iBET), no qual o grupo de pesquisa também encontrou dificuldades na incorporação da glicoproteína E2 nas pseudopartículas virais derivadas da Gag do MLV.

A maturação e a conformação das glicoproteínas são processos complexos que se desenvolvem no retículo endoplasmático (MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007). Mudanças pós-traducionais, como a glicosilação, são alterações necessárias para a funcionalidade das glicoproteínas E1E2 do HCV. Mudanças nos padrões de glicosilação das glicoproteínas do HCV tem um grande impacto sobre a formação das partículas virais, entrada e imunogenicidade, afetando assim a patogênese e virulência do vírus (GOFFARD et al., 2005; HUNDT; LI; LIU, 2013; SLATER-HANDSHY et al., 2004). É sabido ainda, que diferentes condições de cultura celular, como meio de cultura, nutrientes, agitação, podem alterar a eficiência da glicosilação em proteínas recombinantes (AL-RUBEAI, 2014).

¹ Informação fornecida por COROADINHA no Instituto de Biologia de Experimentos e Tecnologia (iBET), em outubro de 2014.

Deste modo, a dificuldade em expressar a E2 nas ppHCV, pode ser devido ao seu número elevado de sítios de glicosilação, o que nos sugere que a mesma pode ficar retida no interior celular ou no retículo endoplasmático e, assim não conseguir migrar para a membrana celular, nas nossas condições de cultura.

Outra hipótese é que durante o ciclo replicativo do vírus selvagem, este codifica uma poliproteína precursora que é processada por proteases endógenas e virais que produzem as proteínas estruturais e não estruturais, no caso do nosso plasmídeo de transfecção as glicoproteínas E1 e E2 estão sob ação do mesmo promotor CMV o que poderia dificultar a clivagem destas glicoproteínas e fazer com que estas não fossem processadas de forma correta para serem glicosiladas, uma alternativa seria a construção de dois vetores independentes. BEECK; COCQUEREL; DUBUISSON (2001) encontraram a mesma dificuldade para incorporar as glicoproteínas E1 e E2 do HCV nas pseudopartículas virais. Eles demonstraram que o heterodímero formado pelas glicoproteínas E1 e E2 do HCV no retículo endoplasmático ficava retido neste, sugerindo que há um sinal específico nesse complexo que é responsável por essa retenção. Entretanto, BARTOSCH; DUBUISSON; COSSET (2003) mostraram que a expressão transiente das glicoproteínas E1 e E2 do HCV em células HEK293-T a partir de um único plasmídeo levou a incorporação específica e eficiente destas glicoproteínas em pseudopartículas geradas a partir de retrovírus. Porém, os resultados de FACs, deste grupo, mostraram que uma pequena fração das glicoproteínas E1 e E2 alcançaram a superfície celular, onde ocorre o brotamento do MLV, provavelmente devido à saturação da retenção no retículo plasmático em uma superexpressão.

Assim, este trabalho permitiu mostrar a eficiência em produzir as pseudopartículas virais a partir da proteína Gag do MLV e sua capacidade de encapsidar e transportar a glicoproteína do vírus da raiva. Também foi possível detectar a expressão da proteína RVGP em baixas quantidades por dificuldades encontradas na incorporação das glicoproteínas E1E2 do HCV. No entanto, esse sistema demonstra ter resultados promissores para incorporação de outras proteínas de membrana e encapsidação de proteínas. Além disso, tem sido um sistema interessante para estudo do HCV e pode ser melhor explorado como um sistema terapêutico de tratamento.

7 Conclusões

Neste trabalho foi possível estabelecer um sistema de produção de ppHCV-RVGP, no qual conseguimos padronizar dois métodos de co-transfecção. Além disso, foi possível estabelecer a quantificação dessas ppHCV-RVGP por qRT-PCR. Porém, detectamos que as ppsHCV-RVGP não estavam sendo formadas corretamente pela ausência ou baixa quantidade da glicoproteína E2 do HCV na membrana das pseudopartículas virais, o que dificultou o processo de infecção das ppHCV-RVGP e consequentemente não conseguimos detectar altos níveis de expressão da glicoproteína da raiva.

Portanto concluímos que:

- Foi padronizado com sucesso o método de co-transfecção para obtenção de ppHCV-RVGP.
- As co-transfecções com lipofectamina e eletroporação produziram títulos virais semelhantes.
- Obtivemos êxito na quantificação dos lotes virais de ppHCV-RVGP por qRT-PCR.
- A detecção da proteína RVGP foi feita pela técnica de IFI, demonstrando que há poucas células expressando a proteína, o que explica a nossa dificuldade em detectá-la por ELISA.
- A quantificação por qRT-PCR do sobrenadante da infecção com ppHCV-RVGP das linhagens celulares HEK293-T, BHK-21 e Huh 7, nos mostrou que as ppHCV-RVGP não foram capazes de infectar estas células eficientemente.
- A detecção das glicoproteínas E1 e E2 por *western blotting* nos indicou que a glicoproteína E2 não era expressa corretamente nas ppHCV. O que explica a dificuldade em expressar a nossa proteína de interesse, RVGP, nas células Huh 7.

REFERÊNCIAS*

- AGNELLO, V. et al. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 22, p. 12766–12771, 1999.
- AL-RUBEAI, M. **Animal Cell Culture**. Dublin, Ireland: Springer, 2014. 759 p.
- ALMEIDA, A. I. M. DE. **Produção de partículas semelhantes a retrovírus como candidatas a vacina para a Hepatite C**. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Genética Molecular e Biomedicina—Portugal: Universidade Nova de Lisboa, 2012. 65 p.
- ANDRAWISS, M. et al. Murine leukemia virus particle assembly quantitated by fluorescence microscopy: role of Gag-Gag interactions and membrane association. **Journal of Virology**, v. 77, n. 21, p. 11651–11660, 2003.
- ARICESCU, A. R.; LU, W.; JONES, E. Y. A time- and cost-efficient system for high-level protein production in mammalian cells. **Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography**, v. 62, n. Pt 10, p. 1243–1250, 2006.
- ARORA, U. et al. Chimeric Hepatitis B core antigen virus-like particles displaying the envelope domain III of dengue virus type 2. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 10, n. 1, p. 30, 2012.
- ASHFAQ, U. A. et al. In-vitro model systems to study Hepatitis C Virus. **Genet Vaccines Ther**, v. 9, p. 7, 2011.
- ASHLEY, C. E. et al. Cell-specific delivery of diverse cargos by bacteriophage MS2 virus-like particles. **ACS nano**, v. 5, n. 7, p. 5729–5745, 2011.
- ASHRAF, S. et al. High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. **J Biotechnol**, v. 119, n. 1, p. 1–14, 2005.
- ASTRAY, R. M. et al. Analytical approach for the extraction of recombinant membrane viral glycoprotein from stably transfected *Drosophila melanogaster* cells. **Biotechnol J**, v. 3, n. 1, p. 98–103, 2008.
- ASTRAY, R. M. **Expressão da glicoproteína recombinante do vírus rábico em sistemas *Drosophila melanogaster* (S2) e Semliki Forest Virus (SFV)**. Thesis—São Paulo: Universidade de São Paulo, p. 142, 2009.
- BABBONI, S. D.; MODOLO, J. R. Raiva: origem, importância e aspectos históricos. **UNOPAR Cient., Ciênc. biol. saude**, v. 13, n. ESP, 2011.
- BACHMANN, M. F.; ZINKERNAGEL, R. M. The influence of virus structure on antibody responses and virus serotype formation. **Immunology Today**, v. 17, n. 12, p. 553–558, 1996.
- BAHLOUL, C. et al. DNA-based immunization for exploring the enlargement of

*De acordo com:

immunological cross-reactivity against the lyssaviruses. **Vaccine**, v. 16, n. 4, p. 417–25, 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, n. 5, p. 677–684, 2007.

BARTH, H. et al. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 42, p. 41003–41012, 2003.

BARTOSCH, B. et al. Cell entry of hepatitis c virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. **J Biol Chem**, v. 278, n. 43, p. 41624–41630, 2003.

BARTOSCH, B.; DUBUISSON, J.; COSSET, F.-L. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 5, p. 633–642, 2003.

BARTOSCH, B.; COSSET, F. Cell entry of hepatitis C virus. **Virology**, v. 348, n. 1, p. 1–12, 2006.

BAUMERT, T. et al. Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. **J Virol**, v. 72, n. 5, p. 3827–3836, 1998.

BEECK, A. O. D.; COCQUEREL, L.; DUBUISSON, J. Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. **Journal of General Virology**, v. 82, n. 11, p. 2589–2595, 2001.

BENMAAMAR, R. et al. High-level expression of rabies virus glycoprotein with the RNA-based Semliki Forest Virus expression vector. **J Biotechnol**, v. 139, n. 4, p. 283–290, 2009.

BERTOLOTTI-CIARLET, A. et al. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. **Journal of Virology**, v. 77, n. 21, p. 11603–11615, 2003.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, n. 6, p. 1513–1523, 1979.

BLANCHET, M.; SUREAU, C. Analysis of the Cytosolic Domains of the Hepatitis B Virus Envelope Proteins for Their Function in Viral Particle Assembly and Infectivity. **Journal of Virology**, v. 80, n. 24, p. 11935–11945, 2006.

BLASEY, H. D. et al. Large scale transient 5-HT₃ receptor production with the Semliki Forest Virus Expression System. **Cytotechnology**, v. 32, n. 3, p. 199–208, 2000.

BOLLATI-FOGOLIN, M.; COMINI, M. Cloning and expression of heterologous proteins in animal cells. In: **Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy**. 1. ed. Londres: Taylor and Francis, 2007. v. 1 p. 39–73.

BRAZUNA, J. C. M.; TEIXEIRA, M. A.; VAN ONSELEN, V. J. An epidemiological description of human-hazardous incidents caused by nonhematophagous bats in Brazil, 2002-2003. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 77, n. 1-2, p. 137–144, 2006.

BRAZZOLI, M. et al. Folding and dimerization of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins in stably transfected CHO cells. **Virology**, v. 332, n. 1, p. 438–453, 2005.

BUONOCORE, L. et al. Characterization of vesicular stomatitis virus recombinants that express and incorporate high levels of hepatitis C virus glycoproteins. **J Virol**, v. 76, n. 14, p. 6865–6872, 2002.

CARNEIRO, A. J. B. **Detecção molecular, filogenia e quantificação do vírus da raiva em quirópteros do estado da Bahia, Brasil**. Dissertação—Bahia: Universidade Federal da Bahia, 2010. 78 p.

CARTER, J.; SAUNDERS, V. A. **Virology: Principles and Applications**. Liverpool John Moores University, UK: 2007. 349 p.

CASTET, V.; MORADPOUR, D. A model for the study of hepatitis C virus entry. **Hepatology**, v. 38, n. 3, p. 771–774, 2003.

CHAN, C.-K.; JANS, D. A. Using nuclear targeting signals to enhance non-viral gene transfer. **Immunology and Cell Biology**, v. 80, n. 2, p. 119–130, 2002.

COROADINHA, A. S. et al. Production of retroviral vectors: review. **Current Gene Therapy**, v. 10, n. 6, p. 456–473, 2010.

DA ROSA, E. S. T. et al. Bat-transmitted Human Rabies Outbreaks, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 8, p. 1197–1202, 2006.

DALBA, C. et al. Replication-competent vectors and empty virus-like particles: new retroviral vector designs for cancer gene therapy or vaccines. **Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 15, n. 3, p. 457–466, 2007.

DELEERSNYDER, V. et al. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. **J Virol**, v. 71, n. 1, p. 697–704, 1997.

DRINGS, A. et al. Is there an advantage to including the nucleoprotein in a rabies glycoprotein subunit vaccine? **Vaccine**, v. 17, n. 11-12, p. 1549–1557, 1999.

DRUMMER, H. E.; MAERZ, A.; POUMBOURIOS, P. Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. **FEBS letters**, v. 546, n. 2-3, p. 385–390, 2003.

DUBUISSON, J.; HELLE, F.; COCQUEREL, L. Early steps of the hepatitis C virus life cycle. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 4, p. 821–7, 2008.

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

EVANS, M. J. et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. **Nature**, v. 446, n. 7137, p. 801–805, 2007.

FALKOWSKA, E. et al. Hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 glycans modulate entry, CD81 binding, and neutralization. **Journal of Virology**, v. 81, n. 15, p. 8072–8079, 2007.

FARAG, M. M. S. Activation of Dendritic Cells by Hepatitis C Virus Pseudo-Particles Containing Functional E1–E2 Envelope Protein Complexes in Vitro. **International Journal of Virology and Molecular Biology**, v. 2, n. 1, p. 7–15, 2013.

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 Diseases**, v. 48, n. 1, p. 157–167, 2012.

FLIEDL, L.; KAISERMAYER, C. Transient gene expression in HEK293 and vero cells immobilised on microcarriers. **Journal of Biotechnology**, v. 153, n. 1-2, p. 15–21, 2011.

FLINT, M. et al. Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein. **J Virol**, v. 73, n. 8, p. 6782–6790, 1999.

FRAZATTI-GALLINA, N. M. et al. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. **Vaccine**, v. 23, n. 4, p. 511–517, 2004.

GALESI, A. L. L. et al. Growth of recombinant *Drosophila melanogaster* Schneider 2 cells producing rabies virus glycoprotein in bioreactor employing serum-free medium. **Cytotechnology**, v. 57, n. 1, p. 73–81, 2008.

GARRONE, P. et al. A prime-boost strategy using virus-like particles pseudotyped for HCV proteins triggers broadly neutralizing antibodies in Macaques. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 94, p. 94ra71–94ra71, 2011.

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. **The Journal of General Virology**, v. 80 (Pt 7), p. 1647–1656, 1999.

GEISSE, S. Reflections on more than 10 years of TGE approaches. **Protein Expression and Purification**, v. 64, n. 2, p. 99–107, 2009.

GEISSE, S.; HENKE, M. Large-scale transient transfection of mammalian cells: a newly emerging attractive option for recombinant protein production. **Journal of Structural and Functional Genomics**, v. 6, n. 2-3, p. 165–170, 2005.

- GERDTS, V. et al. Carrier molecules for use in veterinary vaccines. **Vaccine**, v. 31, n. 4, p. 596–602, 2013.
- GHEYSEN, D. et al. Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. **Cell**, v. 59, n. 1, p. 103–112, 1989.
- GOFFARD, A. et al. Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins. **Journal of Virology**, v. 79, n. 13, p. 8400–8409, 2005.
- GOFFARD, A.; DUBUISSON, J. Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins. **Biochimie**, v. 85, n. 3-4, p. 295–301, 2003.
- GONÇALVES, M. A. S.; SÁ-NETO, R. J.; BRAZIL, T. K. Outbreak of aggressions and transmission of rabies in human beings by vampire bats in northeastern Brazil. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 35, n. 5, p. 461–464, 2002.
- GRGACIC, E. V. L.; ANDERSON, D. A. Virus-like particles: Passport to immune recognition. **Methods, Particle-based Vaccines**, v. 40, n. 1, p. 60–65, 006.
- GUPTA, P. K. et al. Immunogenic and antigenic properties of recombinant soluble glycoprotein of rabies virus. **Vet Microbiol**, v. 108, n. 3-4, p. 207–14, 2005.
- HASSAINE, G. et al. Semliki Forest virus vectors for overexpression of 101 G protein-coupled receptors in mammalian host cells. **Protein Expr Purif**, v. 45, n. 2, p. 343–351, 2006.
- HELLE, F. et al. The neutralizing activity of anti-hepatitis C virus antibodies is modulated by specific glycans on the E2 envelope protein. **Journal of Virology**, v. 81, n. 15, p. 8101–8111, 2007.
- HELLE, F. et al. Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope proteins incorporated into infectious virions. **Journal of Virology**, v. 84, n. 22, p. 11905–11915, 2010.
- HITCHMAN, R. B. et al. Quantitative real-time PCR for rapid and accurate titration of recombinant baculovirus particles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 4, p. 810–814, 2007.
- HONG, K.; SHERLEY, J.; LAUFFENBURGER, D. A. Methylation of episomal plasmids as a barrier to transient gene expression via a synthetic delivery vector. **Biomolecular Engineering**, v. 18, n. 4, p. 185–192, 2001.
- HU, W.-S.; PATHAK, V. K. Design of Retroviral Vectors and Helper Cells for Gene Therapy. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 493–512, 2000.
- HUHTI, L. et al. A comparison of methods for purification and concentration of norovirus GII-4 capsid virus-like particles. **Archives of Virology**, v. 155, n. 11, p. 1855–1858, 2010.

HUNDT, J.; LI, Z.; LIU, Q. Post-translational modifications of hepatitis C viral proteins and their biological significance. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 19, n. 47, p. 8929–8939, 2013.

IACOB, R. E. et al. Mass spectrometric characterization of glycosylation of Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein reveals extended microheterogeneity of N-glycans. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 19, n. 3, p. 428–444, 2008.

JACKSON, A. C. **Rabies: Scientific Basis of the Disease and Its Management**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 2013. 732 p.

KACZMARCZYK, S. J. et al. Protein delivery using engineered virus-like particles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 41, p. 16998–17003, 2011.

KANG, S.-M.; KIM, M.-C.; COMPANS, R. W. Virus-like particles as universal influenza vaccines. **Expert Review of Vaccines**, v. 11, n. 8, p. 995–1007, 2012.

KANKANAMGE, P. J. et al. **Mapping of the Low pH-Sensitive Conformational Epitope of Rabies Virus Glycoprotein Recognized by a Monoclonal Antibody**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 2013. v. 47 p. 507-519.

KAPLAN, C. Rabies: the facts. p. 116, 1977.

KARLSSON, G. B.; LILJESTRÖM, P. Live Viral Vectors. In: ROBINSON, A.; HUDSON, M. J.; CRANAGE, M. P. (Eds.). **Vaccine Protocols**. Methods in Molecular MedicineTM. [s.l.] Humana Press, 2003. p. 69–81.

KING, A. M. Q. et al. **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses : Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. [s.l.] Elsevier, 2012. 1326 p.

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

KOUTSOUDAKIS, G. et al. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. **Journal of Virology**, v. 80, n. 11, p. 5308–5320, 2006.

KUSHNIR, N.; STREATFIELD, S. J.; YUSIBOV, V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development. **Vaccine**, v. 31, n. 1, p. 58–83, 2012.

LACKAY, S. N.; KUANG, Y.; FU, Z. F. Rabies in small animals. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 38, n. 4, p. 1-11, 2008.

LAGGING, L. M. et al. Functional role of hepatitis C virus chimeric glycoproteins in the infectivity of pseudotyped virus. **J Virol**, v. 72, n. 5, p. 3539–3546, 1998.

LANGER, E. S. **On the Horizon: New Expression Systems to Become Common Industry Platforms**, 1 jun. 2009. Disponível em:

<<http://www.biopharminternational.com/biopharm/Manufacturing+Economics+Articles/On-the-Horizon-New-Expression-Systems-to-Become-Co/ArticleStandard/Article/detail/601408>>. Acesso em: 18 set. 2014

LAVIE, M.; GOFFARD, A.; DUBUISSON, J. Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 9, n. 2, p. 71–86, 2007.

LAWSON, K. F.; CRAWLEY, J. F. The ERA strain of rabies vaccine. **Canadian Journal of Comparative Medicine. Revue Canadienne De Médecine Comparée**, v. 36, n. 4, p. 339–344, 1972.

LECHARDEUR, D. et al. Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. **Gene Therapy**, v. 6, n. 4, p. 482–497, 1999.

LEE, J. E.; FUSCO, M. L.; SAPHIRE, E. O. An efficient platform for screening expression and crystallization of glycoproteins produced in human cells. **Nature Protocols**, v. 4, n. 4, p. 592–604, 2009.

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, n. 2, p. 103–110, 2009.

LENTZ, T. L. et al. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? **Science (New York, N.Y.)**, v. 215, n. 4529, p. 182–184, 1982.

LENTZ, T. L. et al. Amino acid sequence similarity between rabies virus glycoprotein and snake venom curaremimetic neurotoxins. **Science (New York, N.Y.)**, v. 226, n. 4676, p. 847–848, 1984.

LU, J. et al. A novel strategy to develop robust infectious hepatitis C virus cell culture system directly from a clinical isolate. **Journal of virology**, 2013.

LUA, L. H. L. et al. Bioengineering virus-like particles as vaccines. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 3, p. 425–440, 2014.

LUPBERGER, J. et al. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. **Nature Medicine**, v. 17, n. 5, p. 589–595, 2011.

MAILLARD, A. P.; GAUDIN, Y. Rabies virus glycoprotein can fold in two alternative, antigenically distinct conformations depending on membrane-anchor type. **The Journal of General Virology**, v. 83, n. Pt 6, p. 1465–1476, 2002.

MAINGUY, J. et al. Oral rabies vaccination in raccoons: comparison of ONRAB® and RABORAL V-RG® vaccine-bait field performance in Québec, Canada and Vermont, USA. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 49, n. 1, p. 190–193, 2013.

MARTIN, D. N.; UPRICHARD, S. L. Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis C virus entry factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 26, p. 10777–10782, 2013.

MARTIRE, G. et al. Hepatitis C Virus Structural Proteins Reside in the Endoplasmic Reticulum as Well as in the Intermediate Compartment/cis-Golgi Complex Region of Stably Transfected Cells. **Virology**, v. 280, n. 2, p. 176–182, 2001.

MENDONÇA, R. Z. et al. Preparation of human rabies vaccine in VERO cell culture using a microcarrier system. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et Al.]**, v. 26, n. 12, p. 1305–1317, 1993.

MEUNIER, J. C. et al. Analysis of the glycosylation sites of hepatitis C virus (HCV) glycoprotein E1 and the influence of E1 glycans on the formation of the HCV glycoprotein complex. **The Journal of General Virology**, v. 80 (Pt 4), p. 887–896, 1999.

MICHALAK, J. P. et al. Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. **Journal of General Virology**, v. 78, n. 9, p. 2299–2306, 1997.

MIYANOHARA, A. et al. Expression of hepatitis B virus core antigen gene in *Saccharomyces cerevisiae*: synthesis of two polypeptides translated from different initiation codons. **Journal of Virology**, v. 59, n. 1, p. 176–180, 1986.

MOCHIZUKI, H. et al. High-Titer Human Immunodeficiency Virus Type 1-Based Vector Systems for Gene Delivery into Nondividing Cells. **Journal of Virology**, v. 72, n. 11, p. 8873–8883, 1998.

MONAZAHIAN, M. et al. Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. **Journal of Medical Virology**, v. 57, n. 3, p. 223–229, 1999.

MORADPOUR, D.; PENIN, F.; RICE, C. M. Replication of hepatitis C virus. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 453–463, 2007.

MORATO, F.; IKUTA, C. Y.; ITO, F. H. Raiva: uma doença antiga, mas ainda atual. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 9, n. 3, p. 20–29, 2011.

MORIMOTO, K. et al. Rabies virus quasispecies: implications for pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 6, p. 3152–3156, 1998.

MORIMOTO, K.; KAWAI, A.; MIFUNE, K. Comparison of rabies virus G proteins produced by cDNA-transfected animal cells that display either inducible or constitutive expression of the gene. **The Journal of general virology**, v. 73 (Pt 2), p. 335–345, 1992.

MULLER, N. **Transient gene expression for rapid protein production: studies and optimizations under serum-free conditions**. Thesis—Lausanne: ÉCOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE LAUSANNE, 2005. 120 p.

MURIAUX, D. et al. RNA is a structural element in retrovirus particles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 9, p. 5246–5251, 2001.

NARDI, N. B.; TEIXEIRA, L. A. K.; SILVA, E. F. Á. DA. Gene therapy. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n. 1, p. 109–116, 2002.

NARDIN, E. H. et al. Phase I Testing of a Malaria Vaccine Composed of Hepatitis B Virus Core Particles Expressing Plasmodium falciparum Circumsporozoite Epitopes. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 11, p. 6519–6527, 2004.

NETO, A. M. S.; RODRIGUES, A. R.; CARVALHO, K. C. N. DE. Caracterização da raiva humana no Brasil no período de 2001 H 2011. **Revista Educação em Saúde**, v. 1, n. 1, 2014.

NETTLESHIP, J. E. et al. Recent advances in the production of proteins in insect and mammalian cells for structural biology. **Journal of Structural Biology**, v. 172, n. 1, p. 55–65, 2010.

NETTLESHIP, J. E.; RAHMAN-HUQ, N.; OWENS, R. J. The production of glycoproteins by transient expression in Mammalian cells. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 498, p. 245–263, 2009.

NOAD, R.; ROY, P. Virus-like particles as immunogens. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 438–444, 2003.

PALUCHA, A. et al. Virus-like particles: models for assembly studies and foreign epitope carriers. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 80, p. 135–168, 2005.

PATEL, A. H. et al. Construction and characterization of chimeric hepatitis C virus E2 glycoproteins: analysis of regions critical for glycoprotein aggregation and CD81 binding. **The Journal of General Virology**, v. 81, n. Pt 12, p. 2873–2883, 2000.

PATINHO, S. F. S. **Avaliação da expressão transiente do gene da glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) em células de inseto da linhagem Drosophila melanogaster S2**. Dissertação—São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2011. 121 p.

PÉREZ, O.; PAOLAZZI, C. C. Production methods for rabies vaccine. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 340–347, 1997.

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.

PHAM, P. L.; KAMEN, A.; DUROCHER, Y. Large-scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein. **Molecular Biotechnology**, v. 34, n. 2, p. 225–237, 2006.

PILERI, P. et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. **Science**, v. 282, n. 5390, p. 938–41, 1998.

PLOSS, A. et al. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. **Nature**, v. 457, n. 7231, p. 882–886, 2009.

PLOSS, A.; EVANS, M. J. Hepatitis C virus host cell entry. **Curr Opin Virol**, v. 2, n. 1, p. 14–19, 2012.

POPESCU, C.-I.; DUBUISSON, J. Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. **Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization**, v. 102, n. 1, p. 63–74, 2010.

PRÉHAUD, C. et al. Characterization of a New Temperature-sensitive and Avirulent Mutant of the Rabies Virus. **Journal of General Virology**, v. 70, n. 1, p. 133–143, 1989.

PUGLIA, A. L. P. et al. Quantitative RT-PCR for titration of replication-defective recombinant Semliki Forest virus. **J Virol Methods**, v. 193, n. 2, p. 647 – 652, 2013.

PUMPENS, P.; GRENS, E. HBV Core Particles as a Carrier for B Cell/T Cell Epitopes. **Intervirology**, v. 44, n. 2-3, p. 98–114, 2001.

RAMQVIST, T.; ANDREASSON, K.; DALIANIS, T. Vaccination, immune and gene therapy based on virus-like particles against viral infections and cancer. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 7, n. 7, p. 997–1007, 2007.

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.

REDMOND, M. J. et al. Assembly of recombinant rotavirus proteins into virus-like particles and assessment of vaccine potential. **Vaccine**, v. 11, n. 2, p. 273–281, 1993.

ROY; NOAD, R. Virus-like particles as a vaccine delivery system: Myths and facts. v. 4, n. 1, p. 5–8, 2008.

RYCHLOWSKA, M.; SZEWCZYK, K. B. Hepatitis C- new development in the studies of the viral life cycle. **Acta Biochimica Polonica**, v. 54, n. 4, p. 703–715, 2007.

SAINZ, B. et al. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. **Nature Medicine**, v. 18, n. 2, p. 281–285, 2012.

SAKAI, M. et al. Studies on the conditions required for structural and functional maturation of rabies virus glycoprotein (G) in G cDNA-transfected cells. **Microbiology and Immunology**, v. 48, n. 11, p. 853–864, 2004.

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.

SANDRIN, V. et al. Intracellular trafficking of Gag and Env proteins and their interactions modulate pseudotyping of retroviruses. **Journal of Virology**, v. 78, n. 13, p. 7153–7164, 2004.

SATTERFIELD, B. C. et al. Serologic and PCR testing of persons with chronic fatigue syndrome in the United States shows no association with xenotropic or polytropic murine leukemia virus-related viruses. **Retrovirology**, SHOR T R EPOR T. v. 8, n. 12, p. 1–7, 2011.

SCARSELLI, E. et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. **The EMBO journal**, v. 21, n. 19, p. 5017–5025, 2002.

SCHNEIDER, M. . et al. Epidemiologic Situation of Human Rabies in Latin America in 2004. **Health Analysis**, v. 26, n. 1, p. 51-61, 2005.

SCHNELL, M. J. et al. The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. **Nature Reviews Microbiology**, 2009.

SEGURA, M. M. et al. Identification of Host Proteins Associated with Retroviral Vector Particles by Proteomic Analysis of Highly Purified Vector Preparations. **Journal of Virology**, v. 82, n. 3, p. 1107–1117, 2008.

SEIF, I. et al. Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. **Journal of Virology**, v. 53, n. 3, p. 926–934, 1985.

SELLERS, T. F. Complications of antirabic treatment. **Journal of the Medical Association of Georgia**, v. 36, n. 1, p. 30–35, 1947.

SEOW, Y.; WOOD, M. J. Biological gene delivery vehicles: beyond viral vectors. **Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 17, n. 5, p. 767–777, 2009.

SHARMA, N. R. et al. Hepatitis C virus is primed by CD81 protein for low pH-dependent fusion. **J Biol Chem**, v. 286, n. 35, p. 30361–30376, 2011.

SLATER-HANDSHY, T. et al. HCV E2 glycoprotein: mutagenesis of N-linked glycosylation sites and its effects on E2 expression and processing. **Virology**, v. 319, n. 1, p. 36–48, 2004.

SMITH, C. **Stable vs. Transient Transfection of Eukaryotic Cells.**, 3 jan. 2013. Disponível em: <<http://www.biocompare.com/Editorial-Articles/126324-Transfection/>>. Acesso em: 18 set. 2014

SUBRAMANIAN, M. B. et al. Development of foot-and-mouth disease virus (FMDV) serotype O virus-like-particles (VLPs) vaccine and evaluation of its potency. **Antiviral Research**, v. 96, n. 3, p. 288–295, 2012.

SWIECH, K. et al. Characterization of growth and metabolism of *Drosophila melanogaster* cells transfected with the rabies-virus glycoprotein gene. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 49, n. Pt 1, p. 41–9, 2008a.

SWIECH, K. et al. Enhanced production of recombinant rabies virus glycoprotein (rRVGP) by *Drosophila melanogaster* S2 cells through control of culture conditions. **Cytotechnology**, v. 57, n. 1, p. 67–72, maio 2008b.

TAN, S.-L. **Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology**. Norfolk (UK): Horizon Bioscience, 2006.

TELLINGHUISEN, T. L. et al. Studying Hepatitis C Virus: Making the Best of a Bad Virus. **Journal of Virology**, v. 81, n. 17, p. 8853–8867, 2007.

THOMPSON, C. M. et al. Analytical technologies for influenza virus-like particle candidate vaccines: challenges and emerging approaches. **Virology Journal**, v. 10, p. 141, 2013.

THOULOZE, M. I. et al. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. **Journal of Virology**, v. 72, n. 9, p. 7181–7190, 1998.

TONEGUZZO, F.; GHOSH, H. P. In vitro synthesis of vesicular stomatitis virus membrane glycoprotein and insertion into membranes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 75, n. 2, p. 715–719, 1978.

TUCHIYA, K. et al. Characterization of rabies virus glycoprotein expressed by recombinant baculovirus. **Virus Research**, v. 25, n. 1–2, p. 1–13, 1992.

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, n. 4, p. 169–172, 2010.

VIEYRES, G.; DUBUISSON, J.; PIETSCHMANN, T. Incorporation of Hepatitis C Virus E1 and E2 Glycoproteins: The Keystones on a Peculiar Virion. **Viruses**, v. 6, n. 3, p. 1149–1187, 2014.

VON GROLL, A. et al. Linear DNA low efficiency transfection by liposome can be improved by the use of cationic lipid as charge neutralizer. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 4, p. 1220–1224, 2006.

WAKITA, T. et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. **Nature medicine**, v. 11, n. 7, p. 791–796, 2005.

WHO. **Essential rabies maps**. Disponível em: <http://www.who.int/rabies/rabies_maps/en/>. Acesso em: 11 set. 2014.

WHO. **Updated WHO position paper on rabies vaccines**. Disponível em: <http://www.who.int/immunization/Rabies_slides_Aug_2010.pdf>. Acesso em: 11 set. 2014.

WHO. **Rabies is a zoonotic viral disease which infects domestic and wild animals**. Disponível em: <<http://www.who.int/immunization/diseases/rabies/en/>>. Acesso em: 11 set. 2014.

WIETHOFF, C. M.; MIDDAUGH, C. R. Barriers to nonviral gene delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 2, p. 203–217, 2003.

WOJCZYK, B. S. et al. The role of site-specific N-glycosylation in secretion of soluble forms of rabies virus glycoprotein. **Glycobiology**, v. 8, n. 2, p. 121–130, 1998.

WONG-STAAAL, F.; SYDER, A. J.; MCKELVY, J. F. Targeting HCV Entry For Development of Therapeutics. **Viruses**, v. 2, n. 8, p. 1718–1733, 2010.

WULHFARD, S. **Transient Recombinant Protein Expression in Mammalian Cells: the Role of mRNA Level and Stability**. Thesis—Suisse: ÉCOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE LAUSANNE, 2009.

WUNNER, W. H. et al. Antigenic variants of CVS rabies virus with altered glycosylation sites. **Virology**, v. 140, n. 1, p. 1–12, 1985.

WURM, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1393–1398, 2004.

YELVERTON, E. et al. Rabies virus glycoprotein analogs: biosynthesis in *Escherichia coli*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 219, n. 4585, p. 614–620, 1983.

YIN, J. et al. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. **Journal of Biotechnology**, v. 127, n. 3, p. 335–347, 2007.

YU, W. et al. A novel challenge model to evaluate the efficacy of hepatitis C virus vaccines in mice. **Vaccine**, v. 32, n. 27, p. 3409–3416, 2014.

ZHU, Y.-Z. et al. How hepatitis C virus invades hepatocytes: The mystery of viral entry. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 20, n. 13, p. 3457–3467, 2014.

APÊNDICE – Imagem

Apêndice I – Imagem: Células HEK293-T eletroporadas sob a condição 1 em cubeta de 0,2 cm com o plasmídeo pCMV-GFP.

Apêndice II – Imagem: Células HEK293-T eletroporadas sob a condição 2 em cubeta de 0,2 cm com o plasmídeo pCMV-GFP.

Apêndice III – Imagem: Células HEK293-T eletroporadas sob a condição 3 em cubeta de 0,4 cm com o plasmídeo pCMV-GFP.

Apêndice IV – Imagem: Células HEK293-T eletroporadas sob a condição 4 em cubeta de 0,4 cm com o plasmídeo pCMV-GFP.

Apêndice V - Imagem: Detalhamento sobre a concentração e viabilidade celular da padronização da eletroporação em células HEK293-T.

A. I – Células HEK293-T eletroporadas sob a condição 1 em cubeta de 0,2 cm com o plasmídeo pCMV-GFP

Legenda: Fotos capturadas no aumento de 10× em microscópio de fluorescência invertido. Condição 1 em cubeta de 0,2 cm: A e B 24 horas pós-transfecção; C e D 48 horas pós-transfecção.

A. II - Células HEK293-T eletroporadas sob a condição 2 em cubeta de 0,2 cm com o plasmídeo pCMV-GFP

Legenda: Fotos capturadas no aumento de 10× em microscópio de fluorescência invertido. Condição 2 em cubeta de 0,2 cm: A e B 24 horas pós-transfecção; C e D 48 horas pós-transfecção.

A. III - Células HEK293-T eletroporadas sob a condição 3 em cubeta de 0,4 cm com o plasmídeo pCMV-GFP

Legenda: Fotos capturadas no aumento de 10× em microscópio de fluorescência invertido. Condição 3 em cubeta de 0,4 cm: A e B 24 horas pós-transfecção; C e D 48 horas pós-transfecção.

A. IV - Células HEK293-T eletroporadas sob a condição 4 em cubeta de 0,4 cm com o plasmídeo pCMV-GFP

Legenda: Fotos capturadas no aumento de 10× em microscópio de fluorescência invertido. Condição 4 em cubeta de 0,4 cm: A e B 48 horas pós-transfecção.

A. V - Detalhamento sobre a concentração e viabilidade celular da padronização da eletroporação em células HEK293-T

Legenda: Concentração e viabilidade celular nas diferentes condições de eletroporação em células HEK 293-T em cubetas de 0,2 cm e 0,4 cm nos tempos de 0, 24 e 48 horas pós eletroporação. A viabilidade foi calculada utilizando o corante trypan blue em hemocítômetro.