FLÁVIA FERREIRA BARBOSA

Expressão do ectodomínio da glicoproteína do vírus da raiva em células de inseto (*Drosophila melanogaster* Schneider 2)

SÃO PAULO

2018

FLÁVIA FERREIRA BARBOSA

Expressão do ectodomínio da glicoproteína do vírus da raiva em células de inseto (*Drosophila melanogaster* Schneider 2)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Drª Soraia Attie Calil Jorge

Versão Original

SÃO PAULO

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Flávia Ferreira Barbosa

Titulo da Dissertação: **Expressão do ectodomínio da glicoproteína do vírus da raiva em células de inseto (*Drosophila melanogaster* Schneider 2)**

Orientador: Drª Soraia Attie Calil Jorge

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão publica realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): .....

Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a): .....

Assinatura:.....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a):.....

Assinatura:.....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente: .....

Assinatura:.....

Nome: .....

Instituição: .....

butantan *Comissão de Ética no Uso de Animais*

São Paulo, 09 de março de 2016
CEUAx N 1039130116

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Soraia Attie Calil Jorge
Área: Imunologia Viral
Equipe envolvida: Flavia Ferreira Barbosa - executor (instituto Butantan); Soraia Attie Calil Jorge (orientador)

Título do projeto: "Expressão da glicoproteína rábica solúvel em células de inseto.".

Parecer Consubstanciado da CEUA IB

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan da Instituto Butantan, na reunião de 08/03/2016, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:
1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Jose Ricardo Jensen
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Maria Leonor Sarno de Oliveira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

À Argia Gemelli (*In memmorian*),

Pelo conforto de um lar, a suavidade das mãos e as lições de uma avó.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Márcia, por todo amor e afeto, por me dar suporte e ser o meu grande exemplo para esta conquista;

Aos meus irmãos, Juliana e Rodrigo, e meu companheiro Digori, meus pequenos não tão pequenos, que me fazem buscar todos os dias um futuro melhor e perceber o quanto é bom voltar para casa;

Ao Pedro Luiz, pela companhia nos dias mais difíceis, pelas discussões e abraços, por todos os filmes e todas as séries, mas principalmente, por ser um grande amigo.

Aos meus tios, tias, primos e primas, por todo o carinho;

Ao meu pai, Hélio, por me ensinar importantes lições, mesmo que por caminhos tortos;

À Drª Soraia Attie Calil Jorge pela orientação e auxílio durante o desenvolvimento do projeto, além da confiança no meu trabalho;

Ao Dr. Renato Mancini Astray pelos aconselhamentos e oportunidades;

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Viral por proporcionarem dias leves mesmo diante a grandes problemas. Muito obrigada pelo acolhimento desde o primeiro dia, por toda a aprendizagem, todas as histórias de vida compartilhadas, cada café, bolo e piada;

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

Ao CNPq pelo apoio financeiro e a bolsa concedida (830676/1999-6).

A todos vocês, MUITO OBRIGADA por tudo.

RESUMO

BARBOSA, F. F.**Expressão do ectodomínio da glicoproteína do vírus da raiva em células de inseto (*Drosophila melanogaster* Schneider 2)** 2018. 78f. Dissertação – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A raiva é uma doença tropical negligenciada (DTN) que acomete humanos, mamíferos silvestres e domésticos, cuja taxa de mortalidade mundial atinge aproximadamente 60.000 mortes humanas ao ano, o que a caracteriza como um sério problema de saúde pública, representando um grande impacto em populações mais vulneráveis, devido, principalmente, a fácil propagação de seu agente. O Lissavírus da raiva (RABV) sintetiza uma molécula glicoproteica, a RVGP (do inglês *Rabies Lissavirus Glycoprotein*), cuja porção exposta na superfície da membrana do vírus (chamada ectodomínio) tem função mediadora na adesão à célula hospedeira e na indução de anticorpos neutralizantes. Um controle efetivo frente a esta DTN pode ser alcançado quando abordagens em saúde pública são trabalhadas desenvolvendo, por exemplo, vacinas preventivas. Apesar do investimento, o controle da doença não tem sido o suficiente para conter sua distribuição. Desta forma, este projeto teve por objetivo otimizar a produção da molécula RVGP a partir do uso de sua porção antigênica, o ectodomínio, obtendo assim uma proteína heteróloga secretada. Para isso, foi utilizado um sistema de expressão de proteínas recombinantes baseado em células de inseto (*Drosophila melanogaster* Schneider 2 - S2), capaz de sintetizar de forma indutível esta molécula com possibilidade de desempenhar sua função biológica, contendo os epítopos antigênicos do lissavírus da raiva. A linhagem celular obtida através de transfecção com o agente Lipofectamine® 2000 foi denominada S2MTBip_RVGP-ecto e expressa o ectodomínio da glicoproteína do vírus da raiva de forma secretada em diferentes condições de indução e tempos de coleta. A proteína foi detectada por análises de *Dot blotting*, *Western blotting* e quantificada por ELISA. Os resultados mostram a presença de uma banda correspondente a massa molecular de aproximadamente 51 kDa, presentes no sobrenadante das culturas, reconhecida por anticorpos monoclonais (C75 e D1) e soro. A subclonagem da população inicial de S2MTBip_RVGP-ecto permitiram a seleção de uma subpopulação recombinante (S2MTBip_RVGP-ectoG5), capaz de produzir mais rRVGP-ecto, sugerindo que os valores obtidos da proteína recombinante ainda podem ser melhorados.

Palavras-chave: Ectodomínio, Glicoproteína, Lissavírus da Raiva, Células S2.

ABSTRACT

BARBOSA, F. F.**Expression of rabies virus glycoprotein ectodomain in insect cells (*Drosophila melanogaster* Schneider 2)** 2018.77p. Dissertation (Masters thesis in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Rabies is a neglected tropical disease (NTD) that affects humans, wild and domestic mammals, whose mortality rate reaches approximately 60,000 human deaths each year. The rabies characterizes it as a serious public health problem, representing a major impact on vulnerable populations, mainly due to the easy spread of its agent. Rabies Lissavirus (RV) synthesizes a glycoprotein, the RVGP (Rabies Lissavirus Glycoprotein), whose exposed portion on the surface of the virus membrane (called ectodomain) has mediating function in the adhesion to the host cell and in the induction of neutralizing antibodies. Effective control of this NTD can be achieved when public health approaches are assured by developing, for example, preventive vaccines. Despite the investment, the control of the disease has not been enough to contain its distribution. Thus, this project aimed to optimize the production of the RVGP molecule from the use of its antigenic portion, the ectodomain, obtaining a heterologous protein of soluble character. For this, we used a recombinant protein expression system based on insect cells (*Drosophila melanogaster* Schneider 2 - S2), able to synthesize this molecule with the possibility of performing its biological function, containing the antigenic epitopes of rabies lissavirus. The cell population obtained by transfection with the agent Lipofectamine® 2000 was named S2MTBip_RVGP-ecto and expresse the ectodomain of the rabies virus glycoprotein in soluble form under different induction conditions and sampling times. Protein was detected by Dot blotting, Western blotting and quantified by ELISA. The results revealed the presence of a molecular weight band of approximately 51 kDa, recognized by monoclonal antibodies (C75 and D1) in culture supernatant. The subpopulation selection increased the rRVGP-ecto expression in relation to the population, suggesting the possibility of optimization of the production.

Key words: Ectodomain, Glycoprotein, Rabies Lissavirus, S2 cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição (em níveis) do risco de contaminação por raiva (2013).....17
Figura 2 - Taxa de mortalidade de raiva humana por tipo de animal agressor (1986-2017). . 18
Figura 3 - Fita representativa do genoma do Lissavírus da Raiva. 24
Figura 4- Ciclo de replicação do Lissavírus da Raiva.....25
Figura 5- Esquema representativo do vírus e da glicoproteína (RVGP) da raiva. 27
Figura 6 - Representação esquemática da localização dos sítios antigênicos na glicoproteína do Lissavírus da Raiva. 27
Figura 7- Sequência sintetizada em plasmídeo comercial pela empresa Genscript®. 38
Figura 8 - Plasmídeo comercial pUC57 contendo o ectodomínio da RVGP (Genscript®). ...39
Figura 9 - Representação do vetor comercial pMT/BIP/v5/His-C (Invitrogen®). 40
Figura 10 – Esquema de diluição limitante em placa de 96 poços para obtenção de subpopulações de S2MTBip_RVGP-ecto. 49
Figura 11 - Padrão de restrição de bandas obtidas após digestão do dna das colônias obtidas após transformação da ligação de pMT/Bip/V5/His-C + ectodomínio em *E. coli* DH5A competente. 50
Figura 12 - Padrão de restrição de bandas obtidas após digestão do DNA de pMTBip_RVGP-ecto amplificado a partir da colônia 1 por maxi-preparação. 51
Figura 13 - Vetor pMTBip_RVGP-ecto. 52
Figura 14 - Microscopia das células transfectadas com pMTBip_RVGP-ecto e pCOHygro durante o processo de seleção (p.s.) Com o antibiótico hygromicin® B (300 µg/ml). 53
Figura 15 - *Dot blotting* de RVGP expressa por S2MTBip_RVGP-ecto. 54
Figura 16 - Cinética de crescimento populacional comparativo (S2MTBip_RVGP-ecto e S2 selvagem). 55
Figura 17 - Cinética de crescimento S2MTBip_RVGP-ecto sob influência de diferentes concentrações de indutor. 56
Figura 18 - Detecção da rRVGP-ecto em lisado e sobrenadante por *dot blotting*. 57
Figura 19 - Detecção de rRVGP-ecto em lisado e sobrenadante por *western blotting*. 58
Figura 20 - Quantificação de rRVGP-ecto por ELISA. 59
Figura 21 - Quantificação por ELISA de rRVGP-ecto expressa em culturas induzidas com diferentes concentrações de $CuSO_4$. 60
Figura 22 - *Dot blotting* de expressão das subpopulações obtidas por diluição limitante de S2MTBip_RVGP-ecto. 61
Figura 23 - Cinética de crescimento da subpopulação S2MTBip_RVGP-ectoG5.....62
Figura 24 - *Dot blotting* comparativo da cinética de expressão da subpopulação S2MTBip_RVGP-ectoG5com a população de origem S2MTBip_RVGP-ecto. 62
Figura 25 - *Western blotting* da subpopulação S2MTBip_RVGP-ectoG5 em diferentes condições de preparo de amostra. 63
Figura 26 - Concentração de rRVGP-ecto expressa comparativamente por S2MTBip_RVGP-ectoG5 e S2MTBip_RVGP-ecto. 64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Diagnósticos ante-mortem disponíveis para doença..... 22
TABELA 2 - Diagnósticos post-mortem disponíveis para doença raiva..... 23
TABELA 3 - Primers foward e reverse utilizados para confirmação da construção de pMTBip_RVGP-ecto por sequenciamento. 42
TABELA 4 - Condições de preparo das soluções para transfecção dos plasmídeos pMTBip_RVGP-ecto e pCoHygro em células S2. 43

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

BHK -21	Células de rim de hamster (*Baby Hamster Kidney)*
BiP	Proteína de ligação à imunoglobulina
BSA	Soro albumina bovina
CHO	Células de ovário de *hamster* chinês
$CuSO_4$	Sulfato de Cobre
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
IgG	Imunoglobulina G
mAb	Anticorpo monoclona (*monoclonal antibody)*
P.E.	Padrão do ELISA-RVGP
p.s.	Pós – Seleção
RABV	Vírus da Raiva (*Rabies Virus*)
RVGP	Glicoproteína do Lissavírus da Raiva
S2	Células de *Drosophila melanogaster* Schneider 2
S2WT	Célula de *Drosophila melanogaster* Schneider 2 selvagem
SDS	*Sodium dodecyl sulfate*
Sf-9	Células de *Spodoptera frugiperda*
SFV	*Semiliki Forest Virus*
SNC	Sistema nervosa central
SV40	Vírus símio vacuolante 40
SVS	Secretaria de vigilância sanitária
VERO	Células de rim de macaco verde africano
VLP	Partículas semelhantes a vírus
WHO	Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14

2 REVISÃO DE LITERATURA 16

2.1 Doença e epidemiologia 16

2.2 Sintomatologia e tratamento pós-exposição 20

2.2.1 Diagnósticos para a doença 22

2.3 Raiva: o vírus (RABV) e proteínas associadas 23

2.3.1 A glicoproteína do lissavírus da raiva (RVGP) 26

2.4 Vacinas contra a Raiva 28

2.4.1 Novas plataformas vacinais para a raiva 29

2.4.2 Vacinas de subunidades e Partículas Semelhante à Vírus (Virus Like Particles-VLP) 30

2.4.3 Vacinas de DNA 32

2.4.4 Vetores virais 32

2.4.5 Ectodomínio da RVGP secretada em variados sistemas de expressão 33

2.5 Sistema de expressão em células S2 33

3 OBJETIVOS 37

4 MATERIAIS E MÉTODOS 38

4.1 Construção do vetor pMTBip_RVGP-ecto 38

4.1.1 Síntese do plasmídeo contendo o gene do ectodomínio da RVGP. 38

4.1.2 Subclonagem no vetor de expressão pMT/Bip/V5/His-C (Invitrogen®) 39

4.1.3 Transformação em Escherichia coli DH5α competentes. 41

4.1.4 Extração, confirmação e amplificação do DNA plasmidial. 41

4.1.5 Sequenciamento 42

4.2 Linhagem celular *Drosophila melanogaster* Schneider 2. 42

4.3 Cotransfecção em células de *Drosophila melanogaster* Schneider (S2) 42

4.3.1Congelamento da linhagem S2MTBip_RVGP-ecto 43

4.4 Cinética de expressão darRVGP-ecto 44

4.5 Detecção de rRVGP-ecto 45

4.5.1 Anticorpos para detecção de rRVGP-ecto 45

4.5.2 Dot Blotting 46

4.5.3 Western Blotting 46

4.5.4 ELISA- RVGP 47

4.6 Seleção de subpopulações de S2MTBip_RVGP-ecto. 48

5 RESULTADOS **50**
5.1 Obtenção do vetor de expressão pMTBip_RVGP-ecto **50**
5.2 Obtenção da linhagem S2MTBip_RVGP-ecto. **52**
5.3 Expressão da rRVGP-ecto. **54**
5.3.1 Cinética de crescimento da linhagem S2MTBip_RVGP-ecto. *55*
5.3.2 Detecção da proteína rRVGP-ecto expressa por S2MTBip_RVGP-ecto. *57*
5.3.3 Quantificação da rRVGP-ecto por imunoensaio de ELISA. *59*
5.4 Seleção de subpopulações da linhagem S2MTBip_RVGP-ecto. **61**
6 DISCUSSÃO **65**
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS **69**
REFERÊNCIAS **70**
ANEXO I **77**
ANEXO II **78**

1 INTRODUÇÃO

Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) são um grupo de doenças endêmicas, cuja prevalência se dá em regiões tropicais devido a fácil disseminação e propagação de seus agentes. Essas doenças representam sérios problemas de saúde pública, com grande impacto em populações mundiais mais vulneráveis, atingindo principalmente países da África, Ásia e América Latina **(**NORRIS *et al*., 2012).

A raiva é considerada uma DTN antiga que desperta o interesse da sociedade devido à severidade de seus sintomas e sua fatalidade. Apesar de todo conhecimento acumulado e todos os avanços em torno da tentativa de contenção da doença, muito ainda precisa ser feito, visto que o contágio pelo lissavírus da raiva (RABV) atinge desde mamíferos silvestres e domésticos até humanos (60.000 mortes humanas/ano no mundo) (FAO, 2018; WALLACE *et al.*, 2017; GENZ *et al*., 2012; ERTL, 2009).

Embora as vacinas clássicas contra a raiva sejam eficientes ainda existe o interesse em se desenvolver novas tecnologias para obtenção de vacinas mais imunogênicas, aperfeiçoando o processo de produção e visando o desenvolvimento tecnológico com justificativa em fatores como biossegurança e eficiência vacinal (ZHU *et al*., 2015; SAKAMOTO *et al*., 1999).

Um controle efetivo frente a esta DTN pode ser alcançado quando abordagens em saúde pública são trabalhadas desenvolvendo, por exemplo, vacinas preventivas, opções de tratamento mais acessíveis ou até mesmo teste diagnósticos mais rápidos. O investimento científico e financeiro não tem sido suficiente para conter sua distribuição, o que destaca a necessidade de obtenção de novos produtos biotecnológicos mais seguros e de menor custo capaz suprir as demandas de países com maior taxa de mortalidade pela doença.

O lissavírus da raiva possui genoma que codifica cinco proteínas e dentre elas, a glicoproteina RVGP. Essa proteína é capaz de mediar à adesão do vírus à célula hospedeira e induzir resposta por anticorpos neutralizantes. Acredita-se que a porção da RVGP associada ao desenvolvimento dessas atividades seja o ectodomínio (região exposta na superfície da membrana viral) por conta da presença de epítopos antigênicos e também imunogênicos, quando a molécula é expressa na conformação correta (ASTRAY; JORGE; PEREIRA, 2017). Diferentes propostas de proteínas recombinantes envolvendo a glicoproteína da raiva, RVGP, já foram estudadas, na tentativa de desenvolver vacinas de subunidades (KORAKA *et al*., 2014; WUNNER *et al*., 1983), produzir partículas semelhante a vírus- VLPs (FONTANA *et al*., 2014), promover a atenuação do vírus através de modificações provindas de recombinação gênica (LI *et al*., 2015; DIETZSCHOLD; SCHNELL, 2002) ou construir quimeras utilizando

a proteína RVGP como antígeno (AMANN *et al*., 2013; CHEN *et al*., 2013). A concepção de uma RVGP secretada também já foi alvo de estudos, sendo estas obtidas a partir de diversos tipos de sistemas de expressão como leveduras (QIAN *et al*., 2013), células de mamífero (GAUDIN *et al*., 1999) e de inseto (SISSOËFF *et al*., 2005).

A equipe do Laboratório de Imunologia Viral tem estudado a expressão da RVGP em diferentes sistemas, como células de insetos e mamíferos. Por ser uma proteína de membrana, há grande dificuldade técnica em solubilizá-la e purificá-la, impedindo estudos mais aprofundados de imunogenicidade. Assim, nossa proposta neste trabalho foi otimizar a produção da molécula RVGP utilizando apenas a porção do ectodomínio, gerando uma proteína heteróloga secretada para o meio de cultura, para que projetos posteriores de caracterização, purificação e imunização possam ser realizados e facilitados. Para tal, utilizou-se um sistema de expressão de proteínas recombinantes baseado em células de inseto (*Drosophila melanogaster* Schneider 2 - S2), sintetizando tal molécula com capacidade de desempenhar sua função biológica, devido à presença dos epítopos antigênicos. O desenvolvimento de uma RVGP heteróloga secretada poderá contribuir para o avanço esperado nos processos de produção de vacinas, uma vez que contará com o uso de material recombinante em sistemas de expressão mais simples e baratos em escala industrial, reduzindo os custos de purificação e evitando os riscos biológicos da manipulação do RABV na produção da vacina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doença e epidemiologia

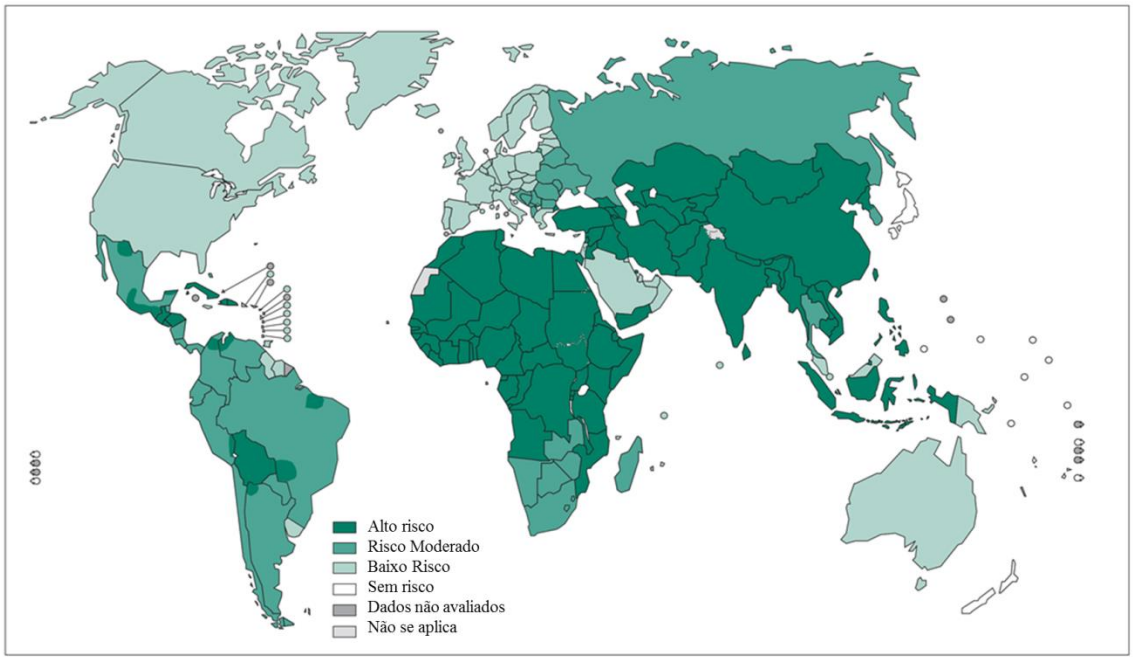
A raiva é uma encefalomielite aguda transmitida por portadores do vírus. O contágio se dá pelo contato de mucosa ou tecido ferido com fluidos já contendo o RABV, ou então, mais comumente através da mordedura de um mamífero já infectado (GENZ *et al*., 2012; ERTL, 2009).

O RABV circula por meio de dois ciclos inter-relacionados geograficamente: silvestre e urbano. Por se tratar de uma antropozoonose, o ciclo da doença inclui também os humanos, visto que a transmissão pode ocorrer de maneira interespecífica. Em mais de 99% das ocasiões, o contágio se dá por cães domésticos, atuantes como reservatórios dos patógenos. Outros importantes transmissores são os morcegos (principalmente da espécie *Desmodus rotundus*) por serem hospedeiros naturais da maioria das variantes de Lissavirus, por sua densidade populacional, e também pela atuação no ciclo rural da doença (STONER-DUNCAN, STREICKER, TEDESCHI, 2014). A ampla distribuição dos reservatórios do vírus justifica a distribuição da doença pelo território mundial, visto que primatas, raposas, gambás, lobos e gatos também atuam como transmissores, além do grupo de animais domesticáveis compostos por gado, ovelhas, cabras, camelos e burros (SINGH *et al.*, 2017). Há relatos raros de transmissão entre humanos em casos de transplantes cirúrgicos (SRINIVASAN *et al*., 2005).

Assim, a Raiva é considerada uma Doença Tropical Negligenciada (DTN) pela *World Heatlh Organization* (WHO), sendo uma antropozoonose de grande importância, comumente ligada a condições de pobreza e saneamento básico inadequado, panorama que colabora com o aparecimento dos vetores e/ou transmissores, e contribui para a manutenção dos ciclos de contágio (AAGAARD-HANSEN; CHAIGNAT, 2010).

A raiva abrange todos os continentes, com excessão à Oceania. Dá-se destaque a maior porcentagem de casos ocorridos nas regiões da África e Ásia, com 55.000 dos casos computados (**Figura 1**) (KESSELS *et al*., 2017).

Figura 1 -Distribuição (em níveis) do risco de contaminação por raiva (2013).
Fonte: Adaptado, Organização Mundial da Saúde (WHO, 2013).



O mapa acima revela a distribuição do risco de contaminação por raiva no território mundial. Diferentes níveis da possibilidade de contrair o vírus são evidenciadas por variação de cor, sendo verde escuro os locais que mais apresentam chance e branco as regiões sem probabilidade.

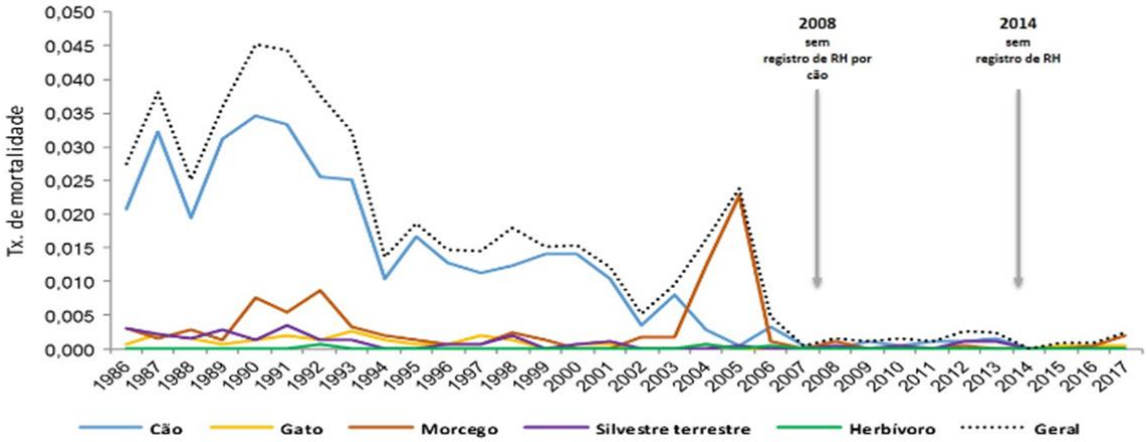
O Ministério da Saúde do Governo do Brasil estima que 6.041 casos de raiva animal foram confirmados entre os períodos de 2011 a 2017, considerando-se animais silvestres, domésticos e de criação. Para este mesmo período, foram relatados 22 casos de raiva humana, segundo a Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (SVS/MS, 2016; SVS/MS, 2017). O maior número de transmissões se dá por meio do contato com cães infectados (responsáveis por 64,4% dos casos) sendo representados em números por 384 de um total de 596 transmitidos a humanos no período de 1990 a 2017 (**Figura 2**).

Os mecanismos de ação do vírus caracterizam-na como fatal, visto que a mortalidade em pacientes sintomáticos é de quase 100%. Em literatura foram relatados apenas 14 casos de sobrevivência humana, e em sua grande maioria com graves sequelas, devido ao tropismo do vírus por células nervosas (FOOKS *et al*., 2017; SOUZA; MADHUSUDANA, 2014). Apesar da diminuição no número de casos, o ano de 2017 teve 6 mortes confirmadas (5 por contato direto com morcegos hematófagos e 1 após agressão de um gato de rua infectado com a variante 3, demonstrado a importância dos animais domésticos como transmissores secundários da raiva ("*spillover*")), e o 2º caso de sobrevivência registrado no Brasil, no estado do Amazonas (SVS/MS, 2017).

Em 2018, o número de mortes associados à doença cresceu: no primeiro semestre uma pessoa foi a óbito no Paraná após contrair a doença em Ubatuba (São Paulo). Outros 12 pessoas morreram desde o início do ano na comunidade de Melgaço, arquipélago de Marajó, no Pará, cujo IDH é o menor do Brasil. Até agora, foram 14 casos foram notificados e sete confirmados laboratorialmente pelo Instituto Evandro Chagas e pelo Instituto Pasteur.

Apesar de ser uma doença de notificação compulsória, os dados com relação à epidemiologia da raiva no Brasil ainda permanecem subestimados, uma vez que a vacinação não é obrigatória em território nacional e amostras de animais suspeitos que vieram a óbito nem sempre são enviadas para diagnóstico. Outro aspecto relevante é a escassez de órgãos públicos e gratuitos que desempenhem a função de analisar as amostras biológicas oriundas desses envios, diminuindo a requisição da população por respostas.

Figura 2 - Taxa de mortalidade de raiva humana por tipo de animal agressor (1986-2017).
Fonte: SVS/MS. Atualizado em 16/03/2018



O gráfico revela a tendência de diminuição dos casos de raiva humana no período entre 1990 e 2017. É possível verificar também um decréscimo nos casos de raiva humana no período de 1990 até 2017: Até os anos 2000, acumulava-se o número total de 437 casos de raiva humana no período de dez anos. Nos 17 anos seguintes, o número atinge 159 casos, um valor aproximadamente 2,7x menor.

São considerados como componentes para eliminação da raiva humana o controle, a prevenção e a eliminação da raiva principalmente em cães por meio da imunização maciça destes animais. Acredita-se que uma taxa de imunização de 70% desta população possibilita o controle da doença, seguida da eliminação da mesma em cães e humanos. Apesar destes dados, estima-se que países endêmicos vacinem apenas 20% da população canina, devido à falta de acesso as vacinas para estes animais (RUPPRECHT; KUZMIN; MESLIN, 2017).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2017) e os Centros de Controle de Doenças americano (*Centers for Disease Control and Prevention* (CDC)- USA) as DTNs podem ser controladas e/ou até mesmo extintas, se houver uma intervenção através de

programas efetivos que administrem medicamentos e vacinas preventivas, atuando paralelamente a ações governamentais que controlem os vetores e providenciem saneamento adequado e condições de primeira necessidade (como água potável e higiene) para as populações mais vulneráveis. Estima-se que 1,4 bilhões de pessoas (dentre estas, 500 milhões de crianças) sejam afetadas por estas DTNs (WHO, 2015).

Em um contexto de América Latina, a adesão de medidas profiláticas pré-exposição (PPE) com vacinação dos cães levou a diminuição em 90% dos casos de raiva humana nos últimos 20 anos, destacando a extinção da doença no Uruguai (1983) e a eliminação da raiva canina no Chile (WHO, 2017). Em países como Bangladesh, Camboja, Índia, Laos, Nepal e Paquistão, na Ásia, assim como na maior parte da África, no leste Mediterrâneo e em países da península arábica, são aplicados os programas de prevenção e controle da doença a partir da vacinação em massa de cães, além da realização de atividades conjuntas que auxiliem a população a identificar os sintomas e analisar o comportamento dos animais que possam ser portadores da doença, protegendo os humanos (WHO, 2017). Países da Europa, Estados Unidos, Canadá, Japão já eliminaram a raiva canina, no entanto, não estão livres da doença, visto que ela apresenta também um ciclo disseminado por meio de animais silvestres (WHO, 2013).

Globalmente, estima-se uma perda economica de 8,6 bilhões de dólares ao ano em consequencia dos casos da doença. Estes gastos consideram a renda perdida e as viagens necessárias para tratamento, os programas destinados à vigilância da doença, vacinação e controle da população de cães, perda pecuária e, principalmente, perda de produtividade devido à morte prematura (representando 54% do valor anual) (WHO, 2018).

No Brasil, estima-se que a subnotificação de casos de raiva em herbívoros seja decorrente da precariedade de órgãos publicos responsáveis por realizar as análises de material coletado de maneira gratuita, bem como pelo receio dos donos em vacinar os rebanhos (BATISTA; ROEHE, 2007). Até o mês de abril de 2018, foram notificados 651 casos em herbívoros, sendo 555 destes em bovinos (MS/SVS, 2018).

A raiva está no planejamento da WHO para controle e eliminação de doenças, sendo considerada uma enfermidade de alto custo, com seus valores atribuídos à mortalidade e perda de produtividade. A estratégia utilizada pelos governos incide na tentativa de conter a propagação do RABV nos principais reservatórios, os cães, já que este tipo de vacinação é mais lógico do que o modelo pós-exposição exigido para o tratamento (WHO, 2013).

Espera-se que, com a melhoria na plataforma vacinal, no armazenamento das vacinas e soros e nas metodologias empregadas para profilaxias pré e pós exposição seja possível

diminuir os gastos com a doença. Um programa que priorize a vacinação em massa dos hospedeiros principais, possibilita estimar a eliminação da doença na América Latina em 5 anos, na Ásia em 10 anos, e na África até 2030, como preconiza a proposta da WHO (RUPPRECHT; KUZMIN; MESLIN, 2017).

Essa abordagem está intimamente associada à proposta de Saúde Única- "*One Health*", na qual apenas a observação, o cuidado e o diagnóstico de setores conjuntos como o da saúde pública, o da saùde animal e as questões ambientais permitirãoa contenção e eliminação das doenças (WHO, 2017).

2.2 Sintomatologia e tratamento pós-exposição

A contaminação pelo RABV pode ocorrer através de mordeduras, arranhões e lambidas em pele não íntegra, ou até mesmo pelo contato de saliva de animais contaminados com a mucosa de outro animal sadio. Outras formas mais raras de transmissão são os transplantes (SRINIVASAN *et al*., 2005) e a transmissão via aerossol (FOOKS *et al*., 2017).

Após exposição, o período de incubação do lissavírus da raiva pode variar entre 20 e 90 dias (com casos de incubação de poucos dias a anos). Seguido deste estágio, o indivíduo passa a apresentar sintomas como perda de apetite, fadiga, dores de cabeça, insônia e como consequência destes, irritabilidade e ansiedade. Após dez dias do aparecimento dos sintomas, nota-se também febre (JACKSON, 2016).

A patologia compromete principalmente o sistema nervoso central (SNC), causando encefalite, e podendo se manifestar de duas diferentes formas: a raiva encefálica ou a raiva paralítica. Na primeira os sintomas desenvolvidos são hipersalivação, suor contínuo e os arrepios, causados possivelmente, pela infecção direta do sistema nervoso central autônomo. A hidrofobia e a aerofobia também são reações. A segunda forma da doença envolve o cordão espinhal, as rotas enervadas e os nervos periféricos. O desenvolvimento dos sintomas se dá com o enfraquecimento do membro mordido, e consequentemente de todos os outros membros e da face. Em seguida, o indivíduo desenvolve hidrofobia. Em ambos os casos, os indivíduos, normalmente, vêm a óbito 14 dias após o início dos sintomas (JACKSON, 2016).

É relevante ressaltar que a raiva paralítica tem sintomas que induzem a um falso diagnóstico para a Síndrome de Guillain-Barré, devido ao sintoma clássico da perda de reflexos dos membros. Este fato traz um alerta acerca do cuidado ao se verificar os sintomas das doenças, visto que é possível aplicar PPE nos indivíduos contaminados com RABV, na tentativa de evitar o desenvolvimento dos sintomas e, portanto, o óbito (JACKSON, 2016).

A Organização Mundial da Saúde apresenta um plano de ação para quando se diagnostica um paciente com raiva. O tratamento, bem como a ação tomada pelo médico ou agente de saúde podem variar de acordo com condições do indivíduo, prévias ao contágio (doenças já estabelecidas, lactentes).

O tratamento pós-exposição é iniciado imediatamente após o acidente e consiste na aplicação de vacina no local do acidente (com ou sem a terapia conjunta de soro e/ou imunoglobulina). O acompanhamento do animal responsável pela mordedura ou arranhão, se possível, também deve ser feito. O tipo de medida profilática aplicada também irá depender da condição do animal agressor. É possível interromper o tratamento caso este não desenvolva sintomas após 10 dias de observação,ou seja diagnosticado como negativo para a doença.

A indicação para PPEs é diferenciada em três categorias, dependentes do tipo de contato que se tem com o animal transmissor do vírus:

- Categoria I: tocar ou alimentar os animais, lambidas na pele íntegra;
- Categoria II: pequenas mordidas, arranhões ou lambidas na pele não íntegra, sem a necessidade de sangramentos ocasionados nas regiões do tronco e dos membros;
- Categoria III: um (a) ou múltiplas mordidas ou arranhões profundos, exposição de mucosas à saliva de animais infectados, exposição a mordidas ou arranhões de morcegos. Quaisquer ferimentos na cabeça, face, pescoço, mãos, pés.

A partir desse panorama, tem-se que a Categoria I não exige a intervenção com nenhum tipo de medidas profiláticas pós-exposição, a não ser a assepsia local. Já a Categoria II e III exigem o início imediato dos processos de vacinação, entretanto, apenas a Categoria III necessita da aplicação imediata de imunoglobulinas (FOOKS *et al*., 2017, WHO, 2017). Fica evidente que o local da ferida também é determinante no tratamento, devido ao tropismo do vírus por células do sistema nervoso (SVS/MS, 2017).

As doses intramusculares vacinais devem ser administradas nos dias 0/3/7/14/28 contando com o dia em que o indivíduo foi mordido. A imunoglobulina, por sua vez, deve ser administrada na dose de 20 IU por kg de peso corporal do indivíduo (quando se tratar da imunoglobina humana) e 40 IU por kg de peso corporal para a imunoglobulina heteróloga (equina). Este biológico deve ser administrado ao mesmo tempo em pacientes da Categoria III, e podem causar choque anafilático (FOOKS *et al*., 2017).

2.2.1 Diagnósticos para a doença

Por se tratar de uma doença com graves consequências e com mortalidade próxima aos 100%, o diagnóstico torna-se outra ferramenta fundamental no combate aos casos de doença negligenciada (SOUZA; MADHUSUDANA, 2014). O maior percalço, no entanto, é a inexistência de uma metodologia que associe a rapidez de diagnóstico necessária para que o paciente não desenvolva os sintomas determinantes para o início da fase crítica da doença e o baixo custo da técnica, visto que se trata de uma enfermidade que atinge países cujas condições socioeconômicas demandam uma técnica acessível (FOOKS et al., 2017).
É possível observar na Tabela 1 os diagnósticos ante-mortem disponíveis para raiva.

Teste *Ante-mortem*	**RT-PCR convencional**	**Real time RT-PCR**	**Neutralização de Vírus por Anticorpos Fluorescentes (FAVN) ou Teste Rápido de Inibição de FocoFluorescente (RIFFT)**
Tempo Estimado	3/4 horas	2/3 horas	5/8 dias
Vantagens	• Rápido • Sensível • Específico • Baixo risco de contaminação • Amplicons podem ser utilizados para caracterização	• Rápido • Sensível • Específico • Baixo risco de contaminação	• Útil para avaliação da vacinação
Desvantagens	• Requer equipamento especializado • Passível de contaminação	• Requer equipamento especializado • Passível de contaminação • Amplicons não podem ser utilizados para caracterização	• Longo período de realização • Incompatível com a idéia de "*ante-mortem*" – detecção de Anticorpos após aparecimento dos sintomas • Contenção específica • Operador especializado

Tabela 1- Diagnósticos ante-mortem disponíveis para doença Raiva (Adaptado de FOOKS et al., 2017).

De maneira geral, é possível perceber que técnicas mais rápidas para diagnóstico da doença exigem equipamentos e mão-de-obra especializados, o que inviabiliza a utilização do método em alguns países em desenvolvimento (FOOKS *et al.*, 2017; KAW *et al.*, 2012). Além destas desvantagens, as técnicas FAVN e RIFFT ainda necessitam de um longo período de realização, e causam controvérsias no meio científico, visto que detectam anticorpos

produzidos após o aparecimento dos sintomas, indicando que a fase crítica da doença já teve seu início.

Assim como com os diagnósticos *ante-mortem*, na **Tabela 2** podem-se verificar os diagnósticos *post-mortem*.

Teste *Post -mortem*	**Teste por Anticorpos Fluorescentes (FAT)**	**Imunohistoquimica Direta (dRIT)**	**Dispositivo de Fluxo Lateral (LFDs)**	**Isolamento do vírus de Cultura de Tecidos (RTCIT)**	**Inóculo em Camundongo (MIT)**
Tempo Estimado	2/3 horas	2/3 horas	30/60 minutos	4/6 dias	> 28 dias
Vantagens	• Rápido • Sensível • Específico	• Rápido • Equipamento simples	• Preparo de amostra simples • Baixo risco • Teste tipo "point-of-care"	• Propagação do vírus para caracterização	• Propagação do vírus para caracterização
Desvantagens	• Anticorpo e equipamento caros • Resultado de difícil interpretação	• Resultado de difícil interpretação	• Necessário validar o resultado • Variação nos lotes	• Local específico para realização • Operador especializado • Longo tempo para realização	• Longo tempo para realização • Espaço específico para realização • Operador especializado • Questões éticas envolvendo ensaios in vivo

Tabela 2- Diagnósticos *post-mortem* disponíveis para doença Raiva (Adaptado de FOOKS *et al*., 2017).

2.3 Raiva: o vírus (RABV) e proteínas associadas.

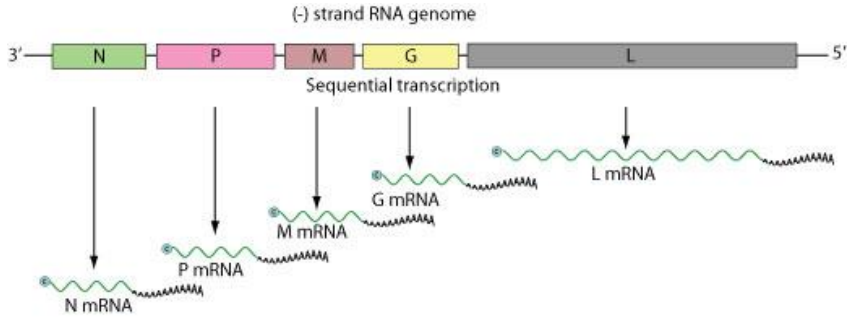
Os Rhabdovirus (Família *Rhabdoviridae*) representam um grupo diverso e amplo de vírus capazes de infectar vertebrados, invertebrados e até mesmo plantas (DIETZGEN *et al*., 2017). Esta diversidade é justificada não somente pela quantidade de patógenos associados à família, como também à forma de transmissão dos mesmos aos hospedeiros, podendo ocorrer por meio de artrópodes a vertebrados, entre vertebrados (intra-espécie ou inter-espécies), ou até mesmo de forma congênita (sigmavírus em *Drosophila melanogaster*), revelando a importância do grupo para a saúde pública (DIETZGEN *et al*., 2017). Entre outros, a família *Rhabdoviridae* abriga o gênero *Lyssavirus*, do qual o lissavírus da raiva (RABV) faz parte (DIETZGEN *et al*., 2017).

O RABV apresenta as características clássicas dos membros da família *Rhabdoviridae*, sendo um vírus envelopado com comprimento e diâmetro médios de

aproximadamente 180 nm e 75 nm, respectivamente, e morfologia em formato de bala de revólver (*bullet – shaped*) (DIETZGEN *et al*., 2017).

Seu genoma é composto por um filamento único de RNA negativo não segmentado de aproximadamente 12 kb, tendo a sequência 3'-N-P-M-G-L-5' como organização do genoma (**Figura 3**), na qual: (N) representa a nucleoproteína, (P) a fosfoproteína, (M) a proteína de matriz, (G) a glicoproteína (também conhecida como RVGP – *Rabies Virus Glycoprotein*) e (L) a polimerase-RNA dependente (ZHU *et al*., 2015; KING *et al*., 2012; ALBERTINI *et al*., 2011).

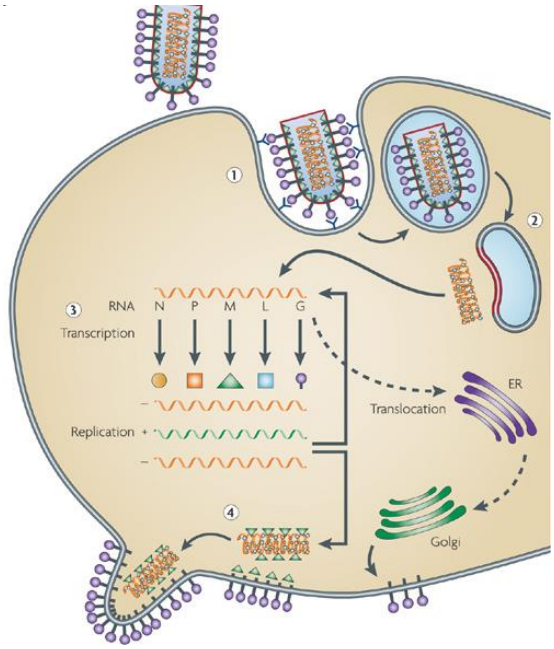
Figura 3 - Fita representativa do genoma do lissavírus da raiva.
Fonte: The UniProt Consotium, 2017.



O esquema mostra um genoma típico de vírus da família Rhabdoviridae. A fita negativa de RNA encapsidada serve como molde para a transcrição. Pequenas porções do RNA são desnudadas até região 3', possibilitando a transcrição sequencial de cada gene, a partir do reconhecimento dos iniciadores e paradas (Stop's). Ao final da transcrição, ocorre o capeamento da região 5' e a poliadenilação da região 3'do RNA mensageiro que codifica as proteínas virais.

Simplificadamente, o ciclo de replicação dos RABV (**Figura 4)** se divide em três fases: na primeira ocorre a ligação da RVGP do vírus aos mediadores das células hospedeiras. A segunda fase é definida pela produção dos componentes virais, e a fase final compreende a maturação de proteínas, a montagem dos vírus e brotamento.

Figura 4- Ciclo de replicação do lissavírus da raiva.
Fonte: Adaptado Schnell *et al.*, 2010.



O ciclo de replicação dos RABV, no geral, se dá em três fases: na primeira ocorre a ligação da glicoproteína G do vírus aos mediadores das células hospedeiras. A internalização dos vírus se dá através de endocitose mediada por clatrina(1). Em seguida, a membrana do vírus se fusiona a membrana do endossomo, permitindo a passagem do genoma viral ao citoplasma (2). A segunda fase é definida pela produção dos componentes virais, ou seja, têm-se a transcrição e a replicação do material genético, bem como a produção de proteínas estruturais(3). A fase final compreende a maturação de proteínas como a RVGP, a montagem dos vírus e o transporte até a membrana plasmática para que ocorra o brotamento (4).

No hospedeiro, o vírus infecta os nervos periféricos (e em alguns casos, as células musculares). A entrada na célula é mediada por três diferentes receptores: o receptor de neurotrofina (p75NTR), o receptor de acetilcolina nicotínico e a molécula de adesão celular neuronal. O vírus é então transportado por vesículas endossomais ao longo dos axônios (ASTRAY; JORGE; PEREIRA, 2017; FOOKS *et al*., 2017; JACKSON, 2016).

O complexo das ribonucleoproteínas (RNPs = RNA viral, nucleoproteínas e fosfoproteínas) é liberado no citoplasma dos neurônios através das vesículas, dando início a transcrição primária das proteínas estruturais. Com o acúmulo destas moléculas, formam-se corpos de inclusão citoplasmáticos, dentro dos quais ocorre a transcrição secundária, originando o RNA viral (FOOKS *et al*., 2017; JACKSON; A., 2016).

Depois de produzidos, os vírions são formados e enviados para o neurônio seguinte via glicoproteínas, iniciando um novo ciclo a partir do brotamento deste vírion por uma fissura da membrana e entrada em um novo neurônio, mediada pelos mesmos receptores. A região do cérebro atingida será determinada pelo neurônio motor atingido no momento do acidente. Em

seguida, o vírus espalha-se pelas glândulas salivares, o que possibilita a continuidade do ciclo de transmissão (FOOKS *et al*., 2017; JACKSON, 2016).

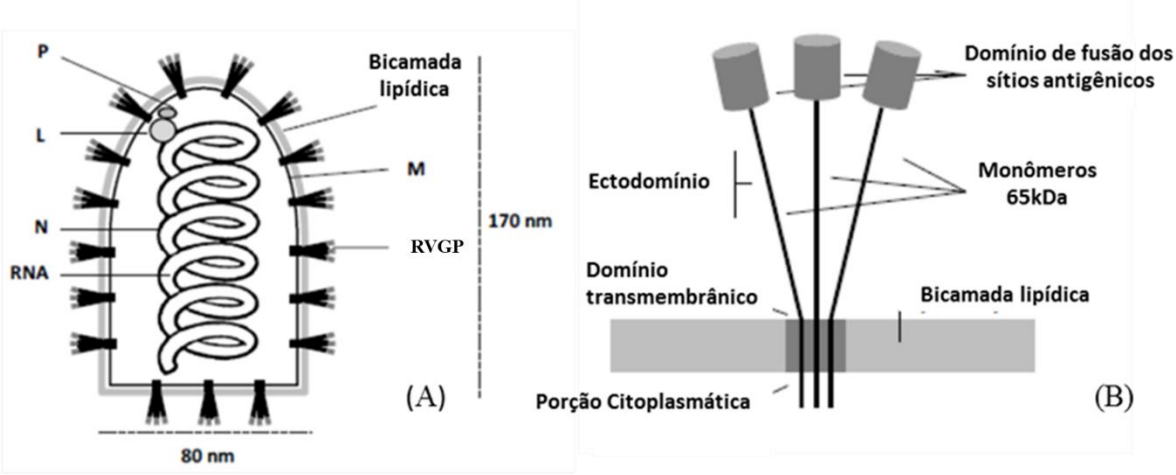
2.3.1 A glicoproteína do lissavírus da raiva (RVGP)

Considerando a organização do genoma do lissavírus da raiva, a proteína RVGP é o principal alvo de estudos, por ser a única capaz de induzir a resposta imunológica por anticorpos neutralizantes nos indivíduos expostos ao vírus (ZHU *et al*., 2015; KING *et al*., 2012; ALBERTINI *et al*., 2011; SCHNELL *et al*., 2010; OSINUBI *et al*., 2009 TORDO *et al*., 1988; TORDO *et al*., 1986).

A glicoproteína do lissavírus da raiva (**Figura 5B**) é uma molécula homotrimérica de membrana tipo I que apresenta padrão de N-glicosilação (WHITT *et al*., 1991). Naturalmente é uma molécula expressa em células de mamífero, e apresenta massa molecular de 65 kDa. Estes parâmetros podem variar para 58 kDa caso a proteína seja expressa em células de insetos devido a alterações nos padrões de glicosilação (WOJCZYK *et al*., 1998). A RVGP tem sua importância determinada pela localização da molécula, visto que se mantém ancorada na superfície da cápside viral e desempenha papel significativo na patogênese da raiva, sendo responsável por agir como ligante aos receptores da célula do hospedeiro.

Cada monômero da RVGP tem sua estrutura composta por três domínios distintos: ectodomínio, transmembrânico e citoplasmático (OSINUBI *et al*., 2009; YOKOMIZO *et al*., 2007; GUPTA *et al*., 2005; GAUDIN, 1999, GAUDIN *et al*., 1992). A trimerização da RVGP se dá pela atuação conjunta dos monômeros e sua estabilidade, segundo Sissoëff *et al*., (2005), é creditada à presença da porção transmembrânica e de sequências ricas em aminoácidos hidrofóbicos, entretanto, dentro de uma amostragem é possível encontrar também monômeros.

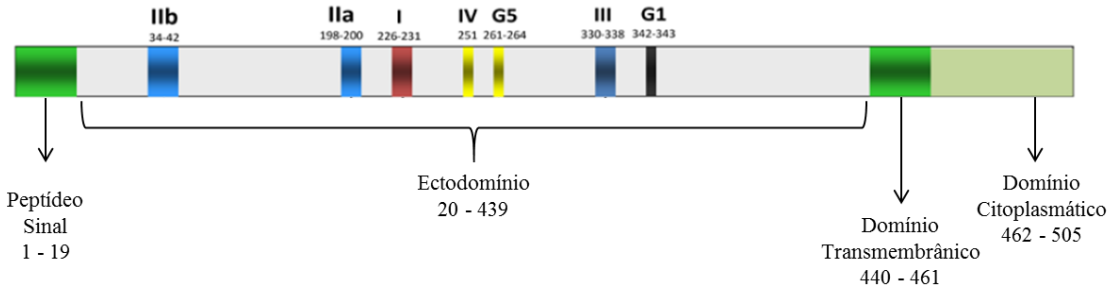
Figura 5- Esquema representativo do vírus e da glicoproteína (RVGP) da raiva.
Fonte: Adaptado de (Astray; Jorge; Pereira, 2017).



(A) São demonstradas no esquema as 5 proteínas que compõe o lissavírus da raiva: Glícoproteína (RVGP), Matriz (M), Fosfoproteína (P), Nucleoproteína (N) e a RNA- polimerase dependente (L). **(B)** A RVGP é uma glicoproteína trimérica, no qual cada um dos monômeros é dividido em 3 domínios: Ectodomínio, domínio transmembranário e domínio citoplasmático, cuja principal função é ligar-se aos receptores da célula hospedeira.

Dentre as porções da glicoproteína, o ectodomínio mais especificamente, é a parte que abriga os epítopos de reconhecimento por parte do organismo hospedeiro. Nele, é possível encontrar sete sítios antigênicos descritos (I/IIa/IIb/III/IV, G1 e G5) (**Figura 6)**. Dentre estes, os sítios II e III da RVGP demonstraram possuir a maior representação de epítopos para anticorpos neutralizantes (97%), sendo então, os de maior interesse para o estudo do desenvolvimento de resposta imune contra essa molécula (BENMANSOUR *et al*., 1991).

Figura 6 - Representação esquemática da localização dos sítios antigênicos na glicoproteína do lissavírus da raiva.
Fonte: Adaptado Kuzmina *et al*., 2013.



Os sítios antigênicos e sua localização na sequência gênicasão demonstrados acima da barra: (I) sítio conformacional e linear; (IIa) e (IIb), responsáveis por compor o sítio II, com caráter conformacional, porém descontínuo; (III) sítio conformacional e continuo; (IV) sítio composto por apenas 1 aminoácido (posição 251); (G1) sítio formado entre os aminoácidos 242 e 243, também denominado sítio *a*; (G5) sítio linear. Abaixo, são demonstrados os domínios que compõem cada monômero da RVGP: peptídeo sinal, ectodomínio, domínio transmembrânico e domínio citoplasmático, respectivamente.

2.4 Vacinas contra a Raiva

O investimento em torno do controle da raiva não tem sido o suficiente para conter sua distribuição (ERTL, 2009). Acredita-se que um controle efetivo frente às DTNs pode ser alcançado quando diversas abordagens em saúde pública são trabalhadas (*One health*), levando em consideração os levantamentos epidemiológicos, medidas de prevenção, detecção e controle da doença (GABREYES *et al*. 2014).

A intervenção mais óbvia da indústria é a busca por um método que previna o contágio do indivíduo. Com o passar do tempo, pôde-se perceber um avanço das técnicas utilizadas, bem como diferentes propostas de imunização. Neste sentido, encontram-se as vacinas como principal plataforma de estudo e de interesse do mercado, tanto para a raiva, quanto para outras doenças de caráter emergencial.

O desenvolvimento de uma abordagem vacinal para controlar a raiva vem sendo feito desde 1885, por Louis Pasteur. As vacinas produzidas foram caracterizadas em três diferentes gerações e categorizadas de acordo com seus protocolos de fabricação. Tradicionalmente, as vacinas humanas contra a raiva foram geradas por passagens em série do lissavírus da raiva em tecido cerebral de camundongos ou em cultura de células até atenuação do vírus (aplicação, portanto, de vírus vivos enfraquecidos) ou por inativação do mesmo (ERTL, 2009).

As vacinas contra a raiva são classificadas em três gerações. As de primeira geração são aquelas em que a obtenção do produto viral é feita a partir do substrato de tecido nervoso do animal adulto, ovos embrionados e até mesmo cérebro de camundongos, ratos ou coelhos. Estas podem ser do tipo atenuado ou inativado e seu apresenta risco elevado por conta de efeitos colaterais associados a anticorpos desenvolvidos em resposta à mielina e outras substâncias dos tecidos utilizados. Além deste fator, existe a possibilidade de reversão do patógeno para sua forma virulenta, provocando assim, o desenvolvimento da doença (PÉREZ; PAOLAZZI, 1997)**.**

As vacinas de segunda geração são produzidas em culturas celulares, (células VERO, células diploides e células de embrião de galinha) sendo inativadas em seguida. No Brasil, as vacinas contra a raiva de uso humano ou veterinário, se baseiam na cultura de células e posterior inativação do RABV (FEHLNER-GARDINER *et al*., 2012; MAINGUY *et al*., 2013).Tem-se como exemplo a vacina da raiva produzida pelo Instituto Butantan e distribuída para a rede pública no Brasil para uso humano, que é preparada a partir do lissavírus da raiva, cepa WISTAR PM/WI 38-1503-3M, cultivado em células VERO. Em seguida, o princípio

ativo é purificado por ultracentrifugação, e inativado pela substância β-propiolactona. A vacina é então estabilizada com albumina humana, maltose e liofilizada. Na campanha de vacinação para cães e gatos atualmente no Brasil utiliza-se uma formulação de vacina preparada em BHK-21, seguida de inativação do vírus. Uma das desvantagens das vacinas de primeira e segunda geração está atrelada a biossegurança, uma vez que existe a necessidade, inicialmente, de se manipular o vírus em sua forma ativa (FRAZATTI-GALLINA *et al*., 2004; COSTA *et al.*, 2000).

As vacinas de terceira geração são representadas pelas plataformas de vacinas recombinantes (DNA/RNA/Subunidades) e apresentam como vantagem principal a manipulação de proteínas e células recombinantes que expressem somente a molécula que confere a resposta imune ao indivíduo, não contendo interferência do material genético do patógeno. Essas vacinas são baseadas na expressão, principalmente, da RVGP (ERTL, 2009).

2.4.1 Novas plataformas vacinais para a raiva

Embora as vacinas clássicas contra a raiva sejam eficientes e tenham metodologia de produção bem estabelecida, ainda existe o interesse em desenvolver novas tecnologias para obtenção de vacinas mais imunogênicas, visando o desenvolvimento tecnológico com justificativa em fatores como biossegurança, eficiência vacinal e custo-benefício (ZHU *et al*., 2015; SAKAMOTO *et al*., 1999). Este processo não só aperfeiçoaria o processo de produção, como também se enquadraria nas medidas propostas pela WHO para dar continuidade no processo de eliminação da DTN nos países com economia mais prejudicada, com proposta para o ano 2030.

Neste contexto, é clara a necessidade de desenvolvimento de estruturas moleculares com potencial biotecnológico passíveis de serem produzidas em alta escala e baixo custo, mantendo o caráter antigênico da glicoproteína e suas propriedades imunogênicas, priorizando a segurança do manipulador e evitando o uso de partículas que contenham o material genético viral. Algumas estratégias têm sido desenvolvidas a fim de acompanhar o andamento destes novos estudos de propostas vacinais, como por exemplo, a utilização de vacinas de subunidades, as VLPs ou a produção de uma RVGP secretada (ZHU *et al*., 2015; ERTL, 2009; SAKAMOTO *et al.*, 1999).

2.4.2 Vacinas de subunidades e Partículas Semelhante à Vírus (Virus Like Particles-VLP)

A proposta das vacinas de subunidades já foi testada em diferentes plataformas: células de inseto infectadas com baculovírus (PREHAUD *et al*., 1989), culturas de leveduras expressando a RVGP (SAKAMOTO *et al.,* 1999), plantas transgênicas (McGARVEY *et al*., 1995).

Estas propostas obtiveram diferentes resultados, principalmente por conta da complexidade da RVGP. Deve-se destacar que, partindo de diferentes plataformas tem-se diferentes conformações e modificações pós traducionais obtidas da proteína de interesse, o que pode acarretar numa mudança na antigenicidade e imunogenicidade.

Quando expressa na membrana de *Saccharomyces cerevisiae*, a RVGP não foi capaz de proteger camundongos contra o desafio ao *Challenge Virus Stain* (CVS), apesar de proteger porquinhos-da-índia. A proposta de se utilizar a cultura de leveduras expressando a RVGP apresentou como resultado uma proteína com *conformação* diferente daquela apresentada pela glicoproteína nativa, gerando, portanto, uma molécula pobre em imunogenicidade. Além disso, um padrão de glicosilação rico em manoses desestabiliza e torna imprópria a glicoproteína do lissavírus da raiva produzida por meio deste sistema **(**ASTRAY; JORGE; PEREIRA, 2017; ERTL, 2009).

A glicoproteína do lissavírus da raiva também já foi expressa em células de inseto *Spodoptera frugiperda* (Sf9) infectadas por baculovírus. Nesta proposta, a proteína recombinante foi sintetizada de acordo com a molécula nativa, apresentando, no entanto, massa molecular um pouco mais baixa, evidenciando diferenças nas modificações pós traducionais. Apesar do fato, a molécula manteve-se como antigênica e imunogênica, induzindo a produção de anticorpos neutralizantes em camundongos nos ensaios *in vivo*. Outro teste utilizando a RVGP recombinante produzida a partir do sistema baculovírus-células Sf-9 comprovou imunogenicidade da molécula em testes *in vivo*, evidenciando altos títulos de anticorpos neutralizantes e 100% de proteção após o desafio intracerebral em camundongos (RAMYA *et al*., 2011). Uma das desvantagens desta plataforma seria a purificação das vacinas, método que aumenta o custo desta tecnologia e a inviabiliza, visto que a tornaria mais cara do que a vacina já utilizada (ERTL, 2009; PREHAUD *et al*., 1989).

Outra abordagem utilizada foi a expressão da RVGP em plantas, utilizando tomates (McGARVEY *et al*., 1995) e folhas de tabaco (ASHRAF *et al*., 2005). Essa RVGP expressa em plantas apresentou-se antigenicamente e imunogenicamente semelhante à molécula nativa. O resultado de Ashraf *et al*. (2005) indicou ainda que a molécula produzida apresentou altos

níveis de resposta imune (comparando-se com a vacina comercial) quando aplicadas via intraperitoneal em camundongos. Estes resultados são vantajosos visto que uma produção em larga escala em frutos e verduras é facilitada.

Outra proposta evidente vinda a partir dessa plataforma é a vacinação oral: a utilização desta metodologia já tem sido comprovada como vacina reforço, protegendo camundongos contra o vírus após o desafio. Acredita-se, no entanto, que a quantidade de RVGP contida em uma dose oral não seja suficiente para utilizá-la como preventiva ou como medida pós-exposição, por exigirem uma resposta mais rápida do organismo. Outra ressalva sobre o método é que se espera que a resposta ao vírus seja iniciada na mucosa oral, uma vez que se trata de um alimento. Entretanto, não se sabe quais são os efeitos caso parte da dose da vacina atinja o estômago e em seguida o intestino do indivíduo, e a distinção que o organismo e seu sistema imunológico farão entre uma imunização e um ataque efetivo do patógeno (ERTL, 2009).

As células de mamíferos (BHK-21, NA) foram também utilizadas para expressão de RVGP recombinante. Devido à natureza das linhagens, as células de mamíferos são, em sua maioria, utilizadas para o estudo dos diferentes padrões de glicosilação formados no vírus, comprovando a semelhança entre os selvagens e aqueles produzidos de forma recombinante nestas plataformas (ASTRAY; JORGE; PEREIRA, 2017; WOJCZYK *et al*., 2005; SHAKIN-ESHLEMAN *et al*., 1992). Além disso, outros ensaios como foram realizados comparando os níveis de expressão, de glicosilação e a citotoxicidade da rRVGP destacando as recombinantes produzidas em BHK-21 quando comparadas às produzidas em NA (MORIMOTO; KAWAI; MIFUNE, 1992).

Outra célula de inseto proposta como plataforma para o desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos é a linhagem de*Drosophila melanogaster* Schneider 2 (S2). As células S2 têm a versatilidade como principal atrativo para tornar-se uma plataforma de proteínas recombinantes. O produto da expressão neste sistema também é semelhante à RVGP nativa e é imunogenicamente ativa, protegendo camundongos contra infecção ao vírus utilizado no desafio de letalidade (ASTRAY; JORGE; PEREIRA, 2017; YOKOMIZO *et al*., 2007).O Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan também já propôs trabalhos em alternativa ao uso do lissavírus da raiva atenuado e inativado, produzindo a RVGP recombinante de membrana em células de inseto, mais especificamente células S2. Este modelo já foi cultivado de forma agitada em frascos do tipo Schott, e também escalonado em biorreator. A molécula produzida e utilizada para os ensaios foi reconhecida por anticorpos comerciais e soros, sendo, portanto, antigênica. Os autores concluem, no entanto, que não foi

possível fazer uma correlação entre a estabilidade de condições de cultivo e crescimento e a produção da RVGP, uma vez que a concentração total da proteína não atingiu melhores resultados quando produzida em biorreator (VENTINI *et al*., 2010; LEMOS *et al*., 2009). Dificuldades encontradas nos procedimentos de purificação da proteína recombinante também inviabilizam sua produção em nível comercial, uma vez que a proteína fica aderida a membrana celular. Assim, nossa proposta de se utilizar a plataforma S2 e uma recombinante da RVGP contendo apenas a porção do ectodomínio, constitui uma alternativa que ainda não havia sido testada em outros trabalhos e que poderá minimizar custos e etapas de purificação.

2.4.3 Vacinas de DNA

Vacinas de DNA apresentam inúmeras características que as tornam vantajosas para o desenvolvimento de uma proteína recombinante. Dentre elas estão à estabilidade, a indução de resposta imune apenas contra o antígeno de interesse, facilidade de escalonamento, o que acarreta em baixo custo de processo, além da segurança associada ao fato de não ser uma vacina viral atenuada ou inativada (ABDULHAQQ, WEINER, 2008).

Apesar dos benefícios, resultados utilizando os vetores plasmidiais para imunização indicaram uma resposta lenta por anticorpos neutralizantes, com níveis bem abaixo de uma dose tradicional da vacina de vírus inativada (DIETZSCHOLD *et al*., 1990). Estas vacinas foram testadas em diferentes espécies, conferindo proteção para cães e gatos (LIU *et al*., 2014).

2.4.4 Vetores virais

Vários vetores virais têm sido estudados como entrega do gene recombinante. O vírus vaccínia recombinante expressando a RVGP, por exemplo, é atualmente utilizado para imunização de animais silvestres. Neste sentido, temos as vacinas orais Raboral V-RG® e a Purevax (vacina oral recombinante de RVGP utilizando o vírus vaccínia e o vetor canarypox, respectivamente, produzidas pela empresa Merial, Maine, EUA) e a ONRAB® (vacina oral recombinante de RVGP utilizando o adenovírus produzido pela empresa Artemis Technologies, Guelph, Ontario, Canadá) ambas utilizando a RVGP da cepa ERA do lissavírus da raiva (FEHLNER-GARDINER *et al*., 2012).

Outra proposta de vetor viral para imunização contra a raiva é o uso do vírus da Floresta Semliki (*Semliki Forest Virus*-SFV), capaz de transportar mRNA de RVGP para dentro das células e, não só induzir altos níveis de expressão da proteína, como produzir

respostas humoral e celular em camundongos imunizados com esta formulação (BENMAAMAR *et al*., 2009).

2.4.5 Ectodomínio da RVGP secretada em variados sistemas de expressão

A produção de uma proteína secretada como imunológico também tem sido testada. Ensaios envolvendo a expressão da RVGP truncada, ou seja, contendo apenas a porção do ectodomínio desta proteína, demonstraram que a utilização da levedura *H. polymorpha* (QIAN *et al*., 2013) resultou na produção de monômeros e trímeros reconhecidos por soro de maneira similar ao vírus nativo, comprovando a antigenicidade da molécula recombinante. Além disso, a RVGP truncada foi testada em ensaios *in vivo* respondendo positivamente e induzindo a resposta por anticorpos neutralizantes.

A expressão do ectodomínio da RVGP em células de mamífero já foi testada nas linhagens CHO (WOJCZYK *et al*., 1995) e BSR, obtida a partir de células BHK-21 (GAUDIN *et al*., 1999). Estes resultados foram contraditórios, uma vez que a glicoproteína secretada mostrou-se antigenicamente semelhante à proteína nativa (WOJCZYK *et al*., 1995), apesar de Gaudin *et al*., (1999) sugerirem que a produção de rRVGP truncada gera apenas moléculas monoméricas, com pouco reconhecimento por anticorpos. Vale ressaltar que nenhuma destas moléculas foi testada *in vivo*, portanto não se sabe quais os aspectos imunogênicos da proteína e quais os níveis de resposta por anticorpos neutralizantes as mesmas induzem.

A proposta de desenvolver uma RVGP secretada também já foi testada em células de inseto do tipo *Spodoptera frugiperda* Sf-9. Além de outras construções, este estudo promoveu a produção de uma proteína recombinante partindo apenas do ectodomínio da RVGP, identificada por diversos anticorpos, o que evidenciou a presença de diferentes sítios na glicoproteína heteróloga. Outro importante experimento evidenciou que esta formulação não interagiu adequadamente ao ligante p75NTR, devido a conformação que esta adquiriu. Uma alternativa para este fato foi a utilização de uma sequência codificante para a fibritina, capaz de auxiliar na união dos monômeros, uma vez que o domínio transmembrânico está ausente. A utilização desta técnica manteve eficientemente a conformação nativa da molécula, crucial para o desempenho de seu papel biológico (SISSOËFF *et al*., 2005).

2.5 Sistema de expressão em células S2

A linhagem S2 foi obtida em 1972 por Schneider a partir de uma cultura primária de estágios tardios (20-24 horas) de embriões de *Drosophila melanogaster*. Após uma cultura de

três meses, essa população derivada foi imortalizada. As características das células sugerem que ela tenha sua origem derivada de células hematopoiéticas (ZITZMANN *et al*., 2017; KIRKPATRICK, SHATZMAN, 1999).

A utilização de sistemas de expressão de proteínas alternativos que possuem maquinaria e condições para reproduzir as modificações pós-traducionais têm sido estudados de modo a garantir a qualidade dos produtos originalmente sintetizados por mamíferos, assegurando a eficácia, antigenicidade e imunogenicidade da molécula recombinante (ALTMANN *et al*., 1999). Neste sentido, diferentes linhagens celulares vêm sendo utilizadas nas últimas décadas com intuito de produzir proteínas heterólogas. Dentre elas, as células de *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (S2) demonstram ser um importante sistema na expressão destes genes. Devido a sua origem eucariótica, as células de *Drosophila* possuem as condições necessárias para sinalizar, produzir e realizar as modificações pós-traducionais e secretar moléculas naturalmente sintetizados em outros sistemas, de modo a manter sua função (VENTINI *et al*., 2010; LEMOS *et al*., 2009; KIRKPATRICK; SHATZMAN, 1999).

Morfologicamente, as células S2 são pequenas, apresentando de 8 a 10 µm de diâmetro com formato bem arredondado (JONGH; SALGUEIRO; DYRING, 2013). Quanto ao cultivo, a linhagem S2 apresenta uma série de vantagens: manutenção da cultura a temperatura ambiente (28 ºC), sem a necessidade de atmosfera de CO_2; possibilidade de cultura em monocamada ou crescimento em suspensão; habilidade de crescer em meios livres de soro e de produtos de origem animal. Além disso, as células S2 são tolerantes a alterações no pH, oxigenação, alterações no meio de cultura e apresentam-se como uma interessante plataforma pelo baixo risco de contaminação com vírus humanos, uma vez que estes, em sua maioria, não replicam em células de inseto (MORAES *et al*., 2012; GALESI *et al*., 2008; SWIECH *et al*., 2008).

A incorporação de plasmídeos também é outra das versatilidades das células S2. A transfecção ou cotransfecção pode ocorrer por diferentes técnicas (eletroporação, co-preciptação do DNA por fosfato de Cálcio, utilização de lipídeos catiônicos) e os vetores podem ser associados de diversas formas, sendo a utilização de um plasmídeo de expressão adicionado a um plasmídeo de seleção a opção mais usual. Tem-se que a taxa de incorporação dos plasmídeos está diretamente ligada à proporção utilizada entre eles para realizar o processo de transfecção (ZITZMANN *et al*., 2017).

As culturas de S2 atingem densidades populacionais maiores que $7x10^7$ células/ml. Apesar disso, é necessária uma concentração mínima de $0,5x10^6$ células/ml de subcultura, devido ao fato destas células não crescerem em baixas densidades. Esse fato sugere a

necessidade que esta linhagem tem por fatores de crescimentos autócrinos, que se acumulam a níveis desejáveis apenas em densidades de células elevadas (VENTINI *et al*., 2010; LEMOS *et al*., 2009; GALESI *et al*., 2008). Essa característica da linhagem dificulta os processos de seleção clonal das recombinantes produzidas na plataforma S2, mantendo-a como uma população heterogênea. Apesar disto, acredita-se que a melhoria na expressão da recombinante pode ser alcançada a partir da pressão seletiva constante com antibiótico e enriquecimento da população por subculturas (ZITZMANN *et al*., 2017).

Uma das desvantagens do sistema S2 é o baixo número de produtos patenteados e regulamentados, quando comparados a produtos produzidos em outros sistemas. Apesar deste fato, já existem alguns biofármacos recombinantes em fase de testes clínicos:

- Vacina recombinante contra malária placentária – Fase I (JONGH; SALGUEIRO; DYRING, 2013; DYRING, 2012).
- Vacina contra West Nile Virus – Fase I (JONGH; SALGUEIRO; DYRING, 2013; LIEBERMAN *et al*., 2007).
- Proteína AutoVac^{TM} HER-2 (para combater o câncer de mama) – Fase II (JONGH; SALGUEIRO; DYRING, 2013).

Como já foi dito, assim como outras proteínas, acredita-se que a RVGP seja dependente de sua estrutura conformacional nativa para desempenhar sua atividade imunogênica em um sistema biológico, por conta disso, é necessário que a molécula secretada mantenha homologia quanto as suas características estruturais (GUPTA *et al*., 2005). Gaudin (1999), no entanto, afirma que os domínios que compõem a RVGP são independentes, permitindo a expressão bem-sucedida de proteínas quiméricas e, portanto, a secreção de porções na forma secretada. Foi observado ainda que formas triméricas, monoméricas, bem como somente a porção do ectodomínio são capazes de induzir as respostas antigênicas (SISSOEFF *et al*., 2005; GAUDIN *et al.*, 1999).

Comparando com as vacinas humanas atuais, a proposta de desenvolver uma proteína secretada de caráter imunogênico estabelece apoio para obtenção de um antígeno mais seguro, desprovido do material genético necessário para levar a uma infecção viral e uma resposta pós-imunização indesejada.

A ausência do domínio transmembrânico tornará possível a secreção da RVGP, ao passo que não existirá uma estrutura que impeça sua liberação para o sobrenadante. Associada as vantagens de produção de uma proteína recombinante secretada, a expressão em células de inseto permite a possibilidade de obter os níveis de glicosilação e *folding* da proteína desejada. Tais fatores, adicionados a não utilização de soro fetal bovino contribuem para o

downstream do processo, diminuindo o custo das etapas mais caras: a purificação. Espera-se, portanto, que a obtenção do ectodomínio da RVGP contribua para o desenvolvimento de kits diagnósticos e de uma vacina mais barata e segura, auxiliando na detecção e no controle dos casos e, consequentemente, contribuindo para a diminuição das taxas das populações atingidas pela doença.

3 OBJETIVOS

O projeto teve como principal objetivo expressar a porção do ectodomínio da glicoproteína do lissavírus da raiva em células de *Drosophila melanogaster* Schneider 2. Para tal, o trabalho envolveu algumas etapas:

- Construção de um plasmídeo contendo o ectodomínio da RVGP no vetor de expressão pMT/Bip/V5/His-C;

- Cotransfecção dos plasmídeos pMTBip_RVGP-ecto e pCoHygro em células S2, com posterior seleção das recombinantes utilizando o antibiótico higromicina;

-Obtenção de uma subpopulação a partir de S2MTBip_RVGP-ecto;

- Análise qualitativa da expressão de rRVGP-ecto por meio das técnicas de *Western Blotting* e *Dot Blotting*;

- Quantificação da expressão de rRVGP-ecto pelo imunoensaio de ELISA.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Construção do vetor pMTBip_RVGP-ecto

Para o desenvolvimento do projeto foi desenhada uma sequência gênica baseada na RVGP-AGN94258.1 da base de dados NCBI (BASTIDA – GONZÁLEZ *et al*., 2016).

A sequência utilizada para o desenvolvimento do projeto corresponde ao ectodomínio da glicoproteína do lissavírus da raiva, visto que é essa porção que contém os epítopos antigênicos e imunogênicos da molécula.

4.1.1 Síntese do plasmídeo contendo o gene do ectodomínio da RVGP.

Foram excluídos da construção proposta os domínios transmembrânico e citoplamático, presentes na forma nativa da molécula, na tentativa de compreender melhor o papel do próprio ectodomínio e sua atividade nos processos de resposta à doença quando estas outras porções estão ausentes. Além da sequência principal, foram adicionados sítios de reconhecimento para enzimas de restrição, no intuito de viabilizar as subclonagens em vetores de expressão, uma sequência codificante para cauda de Histidina (6xHis) na porção C-terminal, além de um *linker* de glicina e um *linker* de trombina. A sequência desenhada teve os códons otimizados para expressão em células de inseto (**Figura 7**).

Figura 7- Sequência sintetizada em plasmídeo comercial pela empresa GenScript®.

*GAATTC*AAGATCTATGAAATTCCCTATTTACACGATACCAGACAAGCTTGGTCCCTGGAGCCCGATTGACATACATCACCT
CAGCTGCCCAAACAATTTGGTAGTGGAGGACGAAGGATGCACCAACCTGTCAGGGTTCTCCTACATGGAACTTAAAGTTG
GATACATCTCAGCCATAAAAATGAACGGGTTCACTTGCACAGGCGTTGTGACGGAGGCTGAAACCTACACTAACTTCGTT
GGTTATGTCACAACCACGTTCAAAAGAAAGCATTTCCGCCCAACACCAGATGCATGTAGAGCCGCGTACAACTGGAAGAT
GGCCGGTGACCCCAGATATGAAGAGTCTCTACACAATCCGTACCCTGACTACCACTGGCTTCGAACTGTAAAAACCACCA
AGGAGTCTCTCGTTATCATATCTCCAAGTGTGGCAGATTTGGACCCATATGACAGATCCCTTCACTCGAGGGTCTTCCCTG
GCGGGAAGTGCTCAGGAGTAGCGGTGTCTTCTACCTACTGCTCCACTAACCACGATTACACCATTTGGATGCCCGAGAAT
CCGAGACTAGGGATGTCTTGTGACATTTTTACCAATAGTAGAGGGAAGAGAGCATCCAAAGGGAGTGAGACTTGCGGCTT
TGTAGATGAAAGAGGCCTATATAAGTCTTTAAAAGGAGCATGCAAACTCCAGTTATGTGGAGTTCTCGGACTTAGACTTAT
GGATGGAACATGGGTCTCGATGCAAACATCAAATGAAACCAAATGGTGCCCTCCCGGTCAGTTGATCAATTTGCACGACT
TTCGCTCAGACGAAATTGAGCACCTTGTTGTAGAGGAGTTGGTCAAGAAGAGAGAGGAGTGTCTGGATGCACTAGAGTCC
ATCATGACCACCAAGTCAGTGAGTTTCAGACGTCTCAGTCATTTAAGAAAACTTGTCCCTGGGTTTGGAAAAGCATATACC
ATATTCAACAAGACCTTGATGGAAGCCGATGCTCACTACAAGTCAGTCAGAACTTGGAATGAGATCATCCCTTCAAAAGG
GTGTTTAAGAGTTGGGGGGAGGTGTCATCCTCATGTAAACGGGGTATTTTTCAATGGTATAATATTAGGACCTGACGGCA
ATGTCTTAATCCCAGAGATGCAATCATCCCTCCTCCAGCAACATATGGAGTTGTTGGTATCCTCGGTTATCCCCCTTATGC
ACCCCCTGGCAGACCCGTCTACCGTTTTCAAGAACGGTGACGAGGCTGAGGATTTTGTTGAAGTTCACCTTCCCGATGTG
CACGAACGGATCTCAGGAGTTGACTTGGGTCTCCCGAACTGGGGGAAGGGCGGCGGCGCCCTGGTGCCGCGCGGCAGCA
GCAGCGGCCATCATCACCATCACCATTGAGGCGCCCATCATCACCATCACCATTGA*GCGGCCGC*

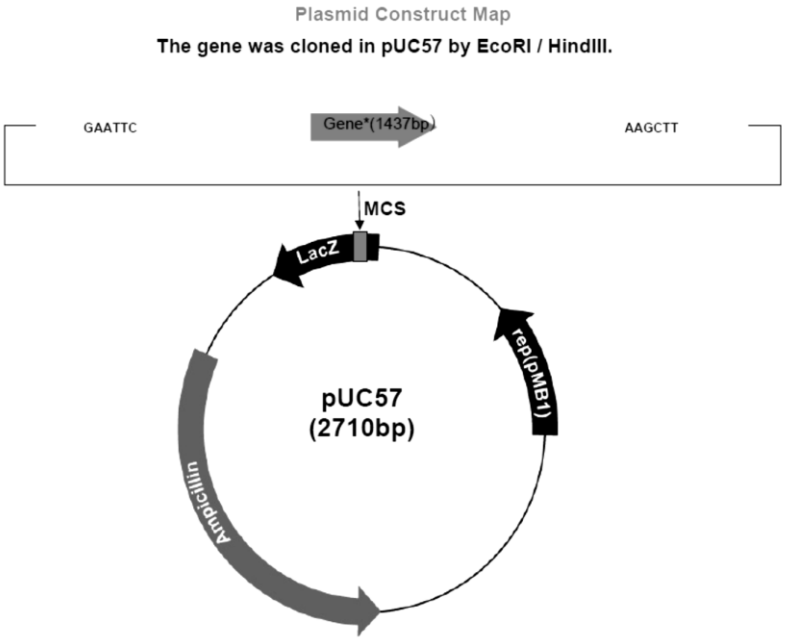
EcoRI/NotI – Ectodomínio-RVGP - Linker de glicina – Linker de trombina – 6xHis*tag* - SfoI/NarI

Sequência enviada para síntese do plasmídeo intermediário pUC57 pela empresa GenScript®. Além do inserto correspondente ao ectodomínio da RVGP, foram adicionadas sequências de reconhecimento para enzimas de restrição (E*co*RI/N*ot*I/S*fo*I/N*ar*I), *Linkers* de glicina e trombina e a cauda de polihistidina.

Este fragmento foi então sintetizado pela empresa GenScript® e inserido no plasmídeo comercial pUC57 (**Figura 8**) no sítio de múltiplas clonagens (MCS), utilizando as enzimas de

restrição *Eco*RI e *Hind*III. Desta forma, o vetor produzido serve apenas como vetor intermediário, sendo um vetor de replicação. Ao todo, o plasmídeo construído possui 4.147 bp, sendo 1.437 bp correspondentes ao inserto de interesse, denominado RVGP-ecto.

Figura 8 - Plasmídeo comercial pUC57 contendo o ectodomínio da RVGP (GenScript®).



O plasmídeo comercial produzido pela GenScript® apresenta o inserto clonado no centro múltiplo de clonagem (MCS) ou *polylinker* que contém os sítios de restrição enzimática e encontra-se fundido ao operador do gene *lac(LacZ)*, contém também o gene que confere resistência à ampicilina.

Após a aquisição, o plasmídeo liofilizado foi ressuspendido segundo protocolo sugerido pelo próprio fabricante e foi amplificado por maxi-preparação (Qiagen®). Parte do material foi utilizado para retirada do inserto a ser utilizado nos ensaios de subclonagem, transfecção e expressão, enquanto que o restante foi armazenado em freezer -20 ºC.

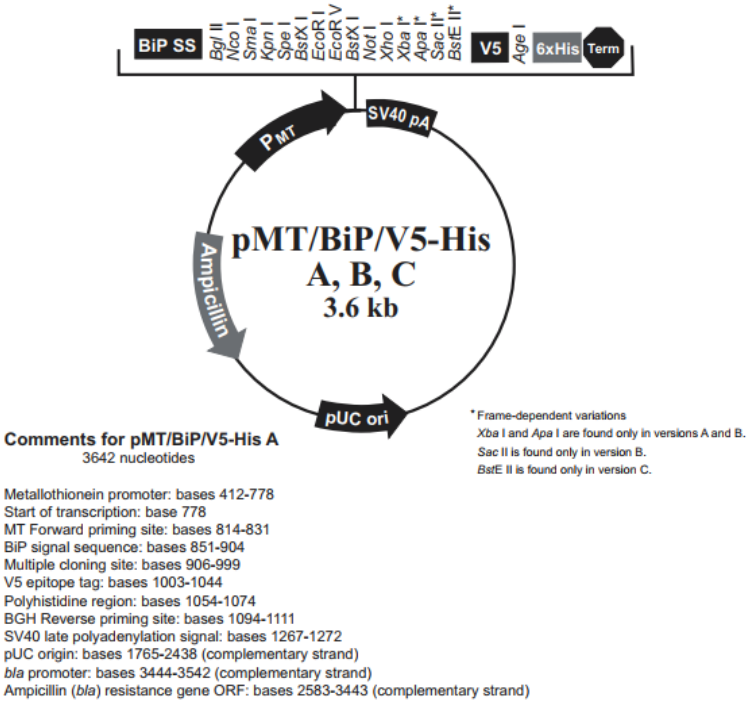
4.1.2 Subclonagem no vetor de expressão pMT/Bip/V5/His-C (Invitrogen®)

O insertocodificante para o ectodomínio da RVGP foi subclonado no vetor de expressão final pMTBipV5His-C (Invitrogen®), sistema específico para expressão em células de *Drosophila* (**Figura 9**).

O vetor escolhido permite: 1-) a expressão de proteínas heterólogas por meio da indução por metais, devido a presença do promotor da metalotioneína de drosófilas; 2-) a exportação das proteínas expressas para o meio de cultura, uma vez que apresenta o sinal BiP, capaz de direcionar o RNAm ao retículo endoplasmático e à via de secreção de proteínas (KIRKPATRICK *et al.*, 1995); 3-) detectar a proteína produzida por anticorpo Anti-V5, já

que apresenta este epítopo; 4-) o reconhecimento e a purificação por meio da cauda de histidina (6x-His) por meio de um anticorpo Anti-Histidina; 5-) transcrição e poliadenilação eficientes, garantidas pela presença de uma sequência codificante para o sinal SV40; 6-) construir um plasmídeo de ampla capacidade de replicação; 7-) selecionar colônias após a transformação em DH5α, devido a presença do gene *bla*, codificante à resistência a Ampicilina.

Figura 9 - Representação do vetor comercial pMT/Bip/V5/His-C (Invitrogen®).



O vetor comercial apresenta promotor indutível de metalotioneína (pMT) e o promotor de replicação bacteriana (pUC ori), região múltiplos sítios de clonagem (MCS) ou *polylinker* que além de abrigar os sítios de restrição enzimática, contém a sequência referente ao sinal de secreção (BipSS), os genes codificantes das *tags* V5 e de poli-histidina (6xHis) e o gene que confere resistência à ampicilina (Ampicilin).

Com a finalidade de utilizar apenas o fragmento correspondente ao ectodomínio, o plasmídeo sintético construído pela GenScript® (e também o vetor comercial de expressão pMTBipV5His-C) foram duplamente digeridos com as enzimas de restrição *Eco*RI (Fermentas) e *Not*I (Biolabs) a 37ºC por 18 horas, no intuito de gerar extremidades coesivas.

O material processado foi aplicado em gel de agarose 0,6% e a banda correspondente ao inserto foi extraída, purificada por meio de kit comercial (*Wizard – Gel and PCR Clean Up System* - Promega) e quantificada por Qubit® (Kit Invitrogen *Molecular Probs*). O mesmo processo foi feito para a banda do vetor digerido.

O processo de subclonagem foi realizado respeitando o tamanho dos plasmídeos (Biomath Promega Calculator), resultando em uma proporção de 2:1 (inserto:vetor) de razão

molar. Os fragmentos processados foram ligados utilizando a enzima T4 DNA ligase (Promega), incubados por 18 horas a 4 °C, e posteriormente inativados a 70 °C por 10 minutos.

4.1.3 Transformação em Escherichia coli DH5α competentes.

A transformação dos plasmídeos resultantes da subclonagem no vetor pMT/Bip/V5/His-C (Invitrogen®) foi feita em *Escherichia coli* DH5α quimicamente competentes do banco do Laboratório de Imunologia Viral, por meio da técnica de choque térmico (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

O processo se deu por meio da adição de 2 µl da ligação realizada a um volume 20 µl de bactéria competente (1:10 em proporção). Este preparo foi mantido por 30 minutos no gelo, e em seguida, foi submetido a um choque térmico em banho seco a 42 °C durante 1 minuto. Imediatamente após esse tempo, o material foi recolocado em gelo por mais 2 minutos.

Após esse processo, foram adicionados 9 volumes de meio LB líquido (Difco™ LB Broth, Miller, Luria-Bertani, BD Biosciences) livre de antibiótico ao material, sendo mantido sob agitação em Shaker (Incubadora Shaker Refrigerada SL-223 SOLAB, BR) a 230 rpm, 37 ºC durante 30 minutos. O material foi então centrifugado (Centrifuge 5804R, Eppendorf) a 2.655 g por 5 minutos e ressuspendido em 100 µl de LB.

Este volume foi estriado em placas de Petri contendo meio LB/ágar e o antibiótico ampicilina (100 µg/ml) viabilizando, portanto, a seleção das colônias transformadas pelo plasmídeo resultante da ligação. As placas foram incubadas por 18 horas a 37 ºC.

As colônias obtidas foram então selecionadas para a extração de DNA e posterior análise de padrão de restrição e sequenciamento.

4.1.4 Extração, confirmação e amplificação do DNA plasmidial.

As colônias obtidas da transformação bacteriana foram inoculadas em 3 ml de LB líquido contendo ampicilina (100 µg/ml) e incubadas por 18 horas a 37 °C para amplificação plasmidial e extração de DNA segundo o protocolo do kit PureYield Plasmid Miniprep System da Promega®, a fim de confirmar a presença do inserto.

Após a confirmação da clonagem, o DNA plasmidial da colônia selecionada como positiva foi escolhida para trabalho e novamente amplificada a partir do Kit Plasmid Maxi – Prep Qiagen®, de acordo com protocolo do fabricante.

4.1.5 Sequenciamento

O sequenciamento das colônias obtidas após a transformação em bactérias *E. coli* DH5α quimiocompetentes foi feito no Laboratório de Biotecnologia Molecular II do Instituto Butantan. Para este ensaio, foi utilizada a técnica de Sanger, utilizando os *primers* da **Tabela 3**.

Primer	Sequencia	pMoles necessários
MT forward	5'-CATCTCAGTGCAACTAAA-3'	368
BGH Reverse	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'	358

Tabela 3- *Primers forward* e *reverse* utilizados para confirmação da construção de pMTBip_RVGP-ecto por sequenciamento.

4.2 Linhagem celular *Drosophila melanogaster* Schneider 2.

As células utilizadas para o desenvolvimento do projeto foram obtidas originalmente da empresa Invitrogen™, e mantidas em nitrogênio líquido (N_2) no Laboratório de Imunologia Viral (LIV). Em seguida, foi produzido um banco de trabalho a partir desta ampola primária, e este foi então utilizado para a realização dos ensaios.

As células S2 se caracterizam por serem células do tipo semi-aderente, com capacidade de crescimento em suspensão, a 28 °C, sem necessidade de CO_2, tanto em culturas estáticas como em culturas agitadas. Para a manutenção das células foi utilizado o meio de cultura livre de soro SF-900™ III SFM (Invitrogen™). O repique foi realizado em frascos do tipo T25 (25cm^2) 2 vezes por semana, usando uma diluição de 1:10.

4.3 Cotransfecção em células de *Drosophila melanogaster* Schneider (S2)

Anteriormente a transfecção, células S2 selvagens foram inoculadas em placas de 6 poços na concentração final de 1x10^6 células totais (para volume final de 1 ml). O processo de transfecção foi iniciado após a adesão das células à placa, segundo protocolo estabelecido por LEMOS *et al*. (2009).

Foram utilizados diferentes lipídeos catiônicos capazes de transportar o plasmídeo para dentro da célula: O agente Lipofectamine® 2000 (Thermo Fisher Scientific) de alta eficiência e utilizado para diferentes linhagens celularese o agente Cellfectin® II (Thermo Fisher Scientific) específico para transfecção em células de inseto.

Para a transfecção foram utilizados 20µg do vetor de expressão pMTBip_RVGP-ecto e 1µg de vetor de seleção pCoHygro, que apresenta o gene que codifica para resistência ao antibiótico Higromicina B (Invitrogen™). Estes valores representam uma proporção de 20:1

(vetor expressão: vetor de seleção, expressos em concentração) em volume dos materiais genéticos. Anteriormente ao processo de transfeccção, ambos os plasmídeos foram esterilizados por clorofórmio.

O preparo das soluções de transfecção foi realizado segundo protocolo do fabricante (**Tabela 4**).

Transfecção em células S2 (Volume final total (A + B) = 1 ml)			
Solução Lípidica (A)		Solução de DNA (B)	
Lipofectamine® (µl)	CellFectin ® (µl)	DNA (µl)[1]	pCoHygro (µl)[2]
8	8	14,08	1,67
SF-900™III SFM adicionado (µl)			
492	492	484,25	
[1]Corresponde a 20 µg de DNA estéril			
[2] Corresponde a 1 µg de DNA estéril			

Tabela 4 - Condições de preparo das soluções para transfecção dos plasmídeos pMTBip_RVGP-ecto e pCoHygro em células S2.

As soluções lipídicas (A) e de DNA (B) preparadas foram misturadas e incubadas durante 20 minutos (sendo um preparo para Lipofectamine® e um para CellFectin ®). Após esse período, o meio de cultura da placa previamente inoculada foi retirado e a mistura composta de DNA + lípideo catiônico foi gotejada sob a monocamada de células. A placa foi mantida em agitação por 4 horas e em seguida, foi adicionado meio SF-900™III SFM (Gibco®) completando o volume de cada poço para 3 ml, permitindo incubação por 48 horas a 28 ºC.

Depois deste período, o meio condicionado foi retirado da cultura e 3 ml de SF-900™III SFM novo foram adicionados a cada poço. O antibiótico Higromicina B foi adicionado tanto nas culturas transfectadas quanto no controle negativo (população de S2 selvagem) na concentração de 300 µg/ml durante quatro semanas para a seleção das células resistentes, resultando, portanto, em populações recombinantes.

Após a morte das células selvagens, a pressão seletiva foi encerrada e a população de S2MTBip_RVGP-ecto foi considerada estabelecida.

4.3.1Congelamento da linhagem S2MTBip_RVGP-ecto

A linhagem, denominada S2MTBip_RVGP-ecto foi congelada em nitrogênio líquido para posterior utilização em experimentos de expressão e detecção da proteína. A composição do meio de congelamento deu-se nas seguintes proporções: 50% de Soro Fetal Bovino (SFB),

40% de meio SF-900™III SFM (Invitrogen™) e 10% de Dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich©). Essa solução foi passada em filtro 0,22 µm antes de ser utilizada para ressuspender o *pellet* celular. As alíquotas foram mantidas por 24 horas em freezer -80 ºC para congelamento gradual por isopropanol proporcionado pelo Mr. Frost (Nalgene™ Cryo 1 °C Freezing Conteiner, Thermo Scientific). Em seguida, os criotubos identificados foram enviados para o nitrogênio líquido (N_2), compondo o banco de células para trabalho do Laboratório de Imunologia Viral.

Após um período em N_2, foi testado o melhor protocolo para descongelamento do banco: 1-) Descongelamento seguido de centrifugação (1.057 g, 3 minutos), eliminando o meio condicionado com DMSO e adicionando 5 ml de SF-900™III SFM novo; 2-) Descongelamento direto em frasco T25, adicionando 4 ml de SF-900™III SFM novo. Após a aderência das células à parede do frasco T25, retirar completamente o meio de cultura e adicionar 5 ml de SF-900™III SFM novo.

4.4 Cinética de expressão darRVGP-ecto

O comportamento da linhagem recombinante S2MTBip_RVGP-ecto, bem como o desempenho da célula perante diferentes concentrações do indutor Sulfato de Cobre ($CuSO_4$) e tempos de coleta foram determinados por experimentos de cinética de crescimento celular. Frascos agitados do tipo Schott (100 ml) foram preparados com inóculos de $1{,}5x10^6$ células/ml e volume final de 20 ml de meio de cultura, mantidos sob agitação em Shaker (Refrigerated incubator Shaker – Innova 4230, Newbrunswick Scientific, Edison, NJ, USA) a 100 rpm, 28 ºC.

No dia seguinte, as células foram induzidas com diferentes concentrações de $CuSO_4$ (0,5mM, 0,7mM, 1mM, variando de acordo com o experimento), caso tivessem atingido faixa de concentração entre $2x10^6$ células/ml e $4x10^6$ células/ml.

As células foram contadas de 24 até 120 ou 216 horas pós indução, dependendo do objetivo do experimento. Essa contagem foi feita por coloração com azul de Trypan 0,04%, utilizando a câmara de Neubauer. Amostras de *pellet* e sobrenadante foram coletadas e armazenadas a uma temperatura de -20 ºC para posterior análise de detecção e quantificação da rRVGP-ecto.

4.5 Detecção de rRVGP-ecto

4.5.1 Anticorpos para detecção de rRVGP-ecto

Para os ensaios de detecção das amostras foram utilizados dois anticorpos monoclonais comerciais e um soro policlonal anti-camundongo.

4.5.1.1. Soro policlonal anti-RVGP

O soro policlonal foi produzido a partir de experimentos *in vivo* realizados pela aluna Mayra Pereira Rocca, doutoranda pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu (processo FAPESP #2013/07820-1, CEUA n° 0147/2017 - **Anexo I**).

Este ensaio consistiu da imunização de 10 camundongos fêmea da linhagem balb/c (20 g, 21 dias) com a vacina anti-raiva de uso comercial Defensor® (Zoetis, NJ, USA). O processo de imunização se deu a partir de doses (0,1 ml) ministradas nos dias 0/7/21, com coletas de sangue semanais para análise.

Uma semana após a última dose de imunização (dia 28) foi realizado o desafio nos animais utilizando a cepa *Challenge Virus Stain* (CVS) do lissavírus da raiva. O sangue dos animais foi coletado e a porção do soro foi separada por centrifugação a (1.057 g, 10 minutos, 4 °C) para análises. Foi realizado um *pool* destes soros coletados para ensaios de detecção de moléculas como, por exemplo, a rRVGP-ecto.

4.5.1.2 Anticorpo monoclonal C75

O monoclonal C75 é um anticorpo comercial não-conformacional de camundongo produzido pela empresa LSBio (*Anti-Rabies Virus Glycoprotein Antibody* (clone RV1C5) LS-C75309 Seattle, WA, USA), capaz de reagir a mais de 20 diferentes cepas de lissavírus da raiva. De acordo com a literatura, este anticorpo tem como epítopo o sítio II da glicoproteína do lissavírus da raiva.

4.5.1.3 Anticorpo monoclonal D1

O monoclonal D1 é um anticorpo comercial (Instituto Pasteur, Paris, França) utilizado principalmente para os testes de ELISA-RVGP. De acordo com Nagarajan *et al*.(2005), o epítopo de ligação deste anticorpo é o sítio III da RVGP do lissavírus da raiva, presente na porção do ectodomínio.

4.5.2 Dot Blotting

O preparo da amostra de precipitado celular se deu pela adição de 60 µl do tampão RIPA pH 8,0 (**Anexo II**) acrescido de 1µl de PMSF (1 mM) (*Phenylmethylsulfonyl fluoride*), um inibidor de proteases. As amostras foram armazenadas em geladeira por 30 minutos e centrifugadas a 20.817 g, 10 minutos, 4 °C. Já o preparo dos sobrenadantes se deu apenas por centrifugação (descrita anteriormente), garantindo a retirada dos *debris* celulares.

Após o preparo, as amostras foram aplicadas em membrana de nitrocelulose Amersham™Protran™ – Supported 0.45 µm (GE Healthcare). Como controle foram usados 20 µl do Vírus da Raiva (cepa Pasteur) inativado contido no Padrão de RVGP utilizado nos testes ELISA diluído 10x (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) e, portanto, correspondente a 25 ng de RVGP.

A membrana foi então lavada 3 vezes com 200 µl de PBS 1x e incubada sob agitação por 1 hora em solução de bloqueio (leitedesnatado 3% em PBS 1x). Após esse período de incubação foram feitas 4 lavagens de 5 minutos com PBS 1x + TWEEN 20 (0,05%) na membrana a fim de garantir a completa retirada da solução de bloqueio.

Em seguida foi adicionado o anticorpo primário monoclonal C75 (na proporção 1:4000 em 20 ml de BSA 1%/PBS 1x), o anticorpo monoclonal D1 (na proporção 1:2000 em 20 ml de BSA 1%/ PBS 1x) ou o policlonal de camungondo (1:2000 em 20 ml de BSA 1%/ PBS 1x). A membrana foi incubada por 1 hora e 30 minutos e mantida sob agitação em temperatura ambiente. Após esse período, a membrana foi lavada segundo o mesmo procedimento realizado após o bloqueio.

O anticorpo secundário utilizado foi um anti-IgG (HRP Goat Anti-MouseIgG, Invitrogen®, Carlsbad, CA, U.S.A), conjugado a uma peroxidase (na proporção 1:5000 em 20 ml de BSA 1%/ PBS 1x), mantido por 1 hora, seguido dos mesmos procedimentos de lavagem descritos anteriormente.

O processo de revelação foi feito por meio da distribuição do reagente Super Signal West Pico (ECL - 1:1) Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, U.S.A.) sobre a membrana. As imagens foram registradas e analisadas no fotodocumentador Alliance 2.7 (Uvitec, Cambridge, Reino Unido).

4.5.3 Western Blotting

Amostras de precipitado celular e sobrenadante, além dos controles negativo (S2 selvagem) e positivo (Vírus inativado contido no Padrão do ELISA RVGP, 25 ng) foram

preparadas segundo condições redutoras e não redutoras para realização dos ensaios de *Western blotting.*

As amostras preparadas foram carregadas em gel de poliacrilamida de 1 mm de espessura (PAGE), segundo protocolo do **Anexo II**. A corrida foi realizada a uma amperagem constante de 0,03A (por gel) durante 2 horas. Posteriormente o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (Amersham™Protran™ – Supported 0.45 μm, GE Healthcare) em sistema de transferência vertical e úmido (TE 22 Mini Tank Transfer Unit, GE Healthcare) sob voltagem constante de 30 V por 18 horas.

Após a retirada da cuba de transferência, a membrana foi incubada durante 1 hora em solução de bloqueio (leite desnatado 3% em PBS 1x) e após o período de incubação, foi lavada seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente para *Dot blotting*, no item 4.5.2.

Para este ensaio a membrana foi incubada no anticorpo primário monoclonal C75 (na proporção 1:4000 em 20 ml de BSA 1% + PBS 1x) e durante 1 hora e 30 minutos sob agitação. Novamente a membrana foi submetida à lavagem e em seguida adicionou-se o anticorpo secundário anti-IgG (HRP Goat Anti-MouseIgG - Invitrogen®, Carlsbad, CA, U.S.A), conjugado a peroxidase,(na concentração 1:5000 em 20 ml de BSA 1% + PBS 1x), sendo incubado por 1 hora sob agitação. Após a lavagem, a membrana foi revelada seguindo o mesmo protocolo descrito no item 4.5.2.

4.5.4 ELISA- RVGP

ELISA é uma técnica de ensaio com base em placa concebida para detecção e quantificação de uma molécula específica. Para a dosagem de RVGP trimérica em amostras de células S2, utilizamos o kit "*Rabies Glycoprotein Enzyme Immunoassay*", seguindo as orientações analíticas padronizadas em nosso laboratório (YOKOMIZO, 2007; ASTRAY, 2008).

No dia anterior ao experimento, as placas foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal mAB D1A (na proporção 1:2000 em PBS1x/BSA1X + Tween0,05%) e armazenadas a 4°C até o momento de uso, quando então foram bloqueadas com solução de bloqueio 0,3% (**Anexo II**) e incubadas por 30 minutos a 37°C. Em seguida, a placa foi lavada 5 vezes com tampão de lavagem (**Anexo II**).

O preparo da curva padrão do experimento se deu pela adição de 1 ml de H_2O MilliQ a uma ampola que contém 10 μg do antígeno referência liofilizado (RVGP). Uma diluição seriada foi preparada e as concentrações 7,8 ng/ ml, 14,6 ng/ ml, 31,2 ng/ ml, 62,5 ng/ ml, 125 ng/ ml, 250 ng/ ml e 500 ng/ ml foram obtidas.

Após descongelamento, amostras de sobrenadante da cultura (300 µl ou 150 µl) e do lisado (10^6 células totais) das células S2MTBip_RVGP-ecto foram preparadas. Foram adicionados 500 µl de tampão T4 pH 7,4 (**Anexo II**) às amostras. Após a centrifugação (10.621 g, 10 minutos, 4 °C), 100 µl de cada amostra e do padrão foram aplicados em duplicatas e incubados por 1 h a 37°C, para permitir a ligação da RVGP ao anticorpo aderido na placa.

Após esse período, as placas foram novamente lavadas 5 vezes e o anticorpo IgGD1B (na proporção 1:2000 em PBS1x/BSA1x + Tween0,05%) anti-camundongo conjugado com peroxidase foi adicionado, permitindo-se uma incubação por 1h a 37°C. As placas foram lavadas novamente (6 vezes) e a solução de cromógeno (**Anexo II**) foi adicionada. A reação foi incubada no escuro por 30 minutos a 22°C, recebendo após esse tempo a solução de parada (**Anexo II**).

A absorbância foi lida no comprimento de onda de 492 nm em leitor de microplacas (Original Multiskan EX -Thermo Scientific). A determinação da concentração de RVGP em cada amostra foi realizada com base na comparação das absorbâncias das amostras com a curva padrão.

Vale ressaltar que o mecanismo de ação deste anticorpo, primordialmente, propõe que o ensaio de ELISA detecta somente as moléculas triméricas de RVGP contidas em uma amostra. Isso se deve ao fato de que, tanto o monoclonal IgGD1A quanto o monoclonal IgGD1B possuem conformações idênticas e, portanto, ligam-se aos mesmos epítopos. Dessa forma, uma vez que o anticorpo de captura IgGD1A interagir com o epítopo presente em um monômero da RVGP, o mAb IgGD1B só se ligará na mesma molécula caso ela seja trimérica, possuindo mais de um do mesmo epítopo, fazendo com que essa amostra seja lida como positiva pelo ensaio ELISA-RVGP.

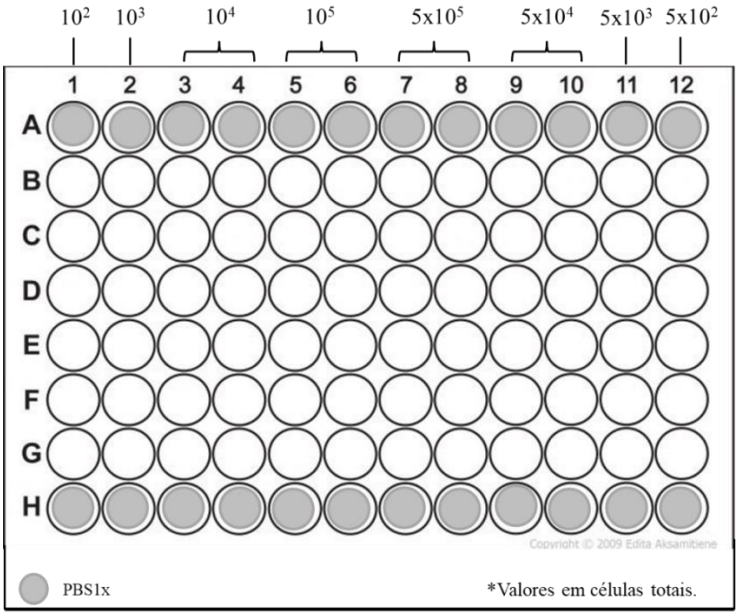
4.6 Seleção de subpopulações de S2MTBip_RVGP-ecto.

As populações de células de *Drosophila melanogaster* Schneider 2 tem como característica a dificuldade de crescimento quando inoculada a uma densidade populacional menor que $0{,}5x10^6$ células/ml que permite a sua multiplicação, este fato dificulta os processos de seleção de clones. Entretanto, autores defendem a idéia de que uma resseleção da população seja suficiente para selecionar aquela subpopulação que mais expressa a proteína de interesse (SANTOS *et al*., 2016).

O experimento teve como princípio a diluição limitante da linhagem S2MTBip_RVGP-ecto para obtenção de uma subpopulação com maior nível de expressão da rRVGP-ecto. Uma placa de 96 poços foi inoculada com diferentes concentrações celulares ($5x10^5$, $5x10^4$, $5x10^3$ e $5x10^2$; 10^5, 10^4, 10^3, e 10^2 células totais por poço) respeitando o volume final de 250 µl (**Figura 10**). As células foram mantidas em meio de cultura durante três semanas nestas condições, sendo observadas e sendo realizada a manutenção quando necessária.

Após o estabelecimento da cultura, com o preenchimento da linhagem S2MTBip_RVGP-ecto em alguns dos poços, iniciou-se o processo de resseleção, com adição de antibiótico (Higromicina 300 µg/ml) uma vez por semana. Ao final de cinco semanas, pode-se perceber que algumas subpopulações estavam estabelecidas e estas foram selecionadas para ensaios de detecção e expressão da rRVGP-ecto.

Figura 10– Esquema de diluição limitante em placa de 96 poços para obtenção de subpopulações de S2MTBip_RVGP-ecto.



Esquema de inóculo (em células totais) da linhagem S2MTBip_RVGP-ecto. Diferentes concentrações finais foram testadas ($5x10^5$, $5x10^4$, $5x10^3$, $5x10^2$; 10^5, 10^4, 10^3, 10^2) para o desenvolvimento da subpopulação. As fileiras A e H foram mantidas apenas com PBS 1x, evitando o ressecamento dos demais poços.

5 RESULTADOS

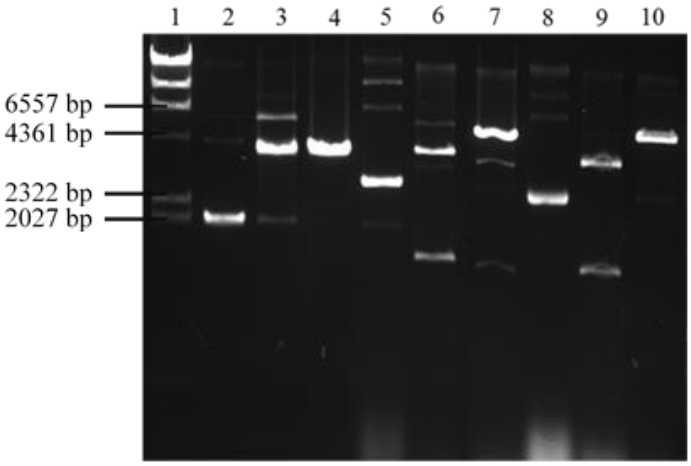
5.1 Obtenção do vetor de expressão pMTBip_RVGP-ecto

A sequência que codifica o ectodomínio da RVGP do lissavírus da raiva foi inserida de forma sintética no plasmídeo comercial pUC57 pela empresa GenScript®. Em seguida, esse inserto foi retirado do pUC57 através de dupla digestão (*Eco*RI + *Not*I), viabilizando o processo de subclonagem no vetor de expressão pMT/Bip/V5/His-C, também coesivamente digerido com o mesmo par de enzimas.

O material digerido foi então aplicado em gel de agarose 0,6% resultando em bandas correspondentes ao inserto extraído e ao vetor digerido. A banda correspondente ao inserto do ectodomínio foi retirada do gel, purificada e quantificada por Qubit®em 0,9 ng/µl de DNA com total de 40 µl de amostra. O mesmo processo foi feito para a banda do vetorpMT/Bip/V5/His-C também digerida (dados não mostrados).

A subclonagem do inserto no vetor de expressão pMT/Bip/V5/His-C ocorreu na proporção 2:1 (inserto: vetor, respectivamente). Ao final do processo, o material foi transformado em bactérias *E.coli* DH5α quimicamente competentes. Duas colônias cresceram sob pressão seletiva do antibiótico ampicilina no meio de cultivo. Ambas as colônias foram submetidas à extração do DNA por lise alcalina, confirmando a presença do inserto (**Figura 11**).

Figura 11 - Padrão de restrição de bandas obtidas após digestão do DNA das colônias obtidas após transformação da ligação de pMT/Bip/V5/His-C + ectodomínio em *E. coli* DH5α competente.

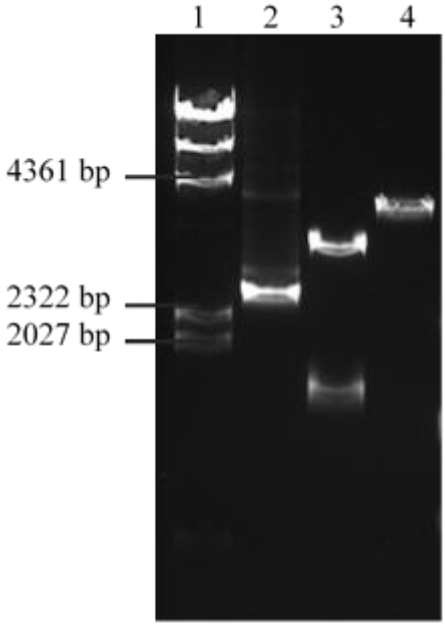


Gel de agarose 1%. 1: Marcador λ-HindIII (Invitrogen™); 2: pMTBipV5His-C não digerido (3638bp); 3: pMTBipV5His-C digerido *Eco*RI+*Not*I (3611bp +27bp); 4: pMTBipV5His-C digerido *Sca*I (3638bp); 5: Colônia 1 não digerida 5032bp; 6: Colônia 1 digerida *Eco*RI+*Not*I (3610bp + 1421bp); 7:Colônia 1 digerida *Sca*I (5031bp); 8: Colônia 2 não digerida (5032bp); 9: Colônia 2 digerida *Eco*RI+*Not*I (3610bp + 1421bp); 10: Colônia 2 digerida *Sca*I (5031bp).

Foi possível observar o mesmo padrão de bandas nas colônias obtidas após o processo de transformação. Os tamanhos gerados após a digestão das amostras estão de acordo com o esperado, sugerindo que o inserto foi subclonado no vetorpMT/Bip/V5/His-C.

Após esta confirmação, o DNA da colônia 1 foi novamente amplificado e purificado pela técnica de maxi-preparação (**Figura 12**), rendendo 1,4 µg/µl de DNA em um total de 500 µl de amostra.

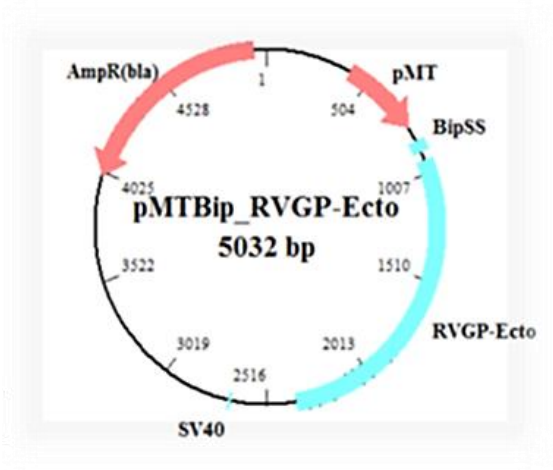
Figura 12 - Padrão de restrição de bandas obtidas após digestão do DNA de pMTBip_RVGP-ecto amplificado a partir da colônia 1 por maxi-preparação.



Gel de agarose 1%. 1: Marcador Marcador λ-HindIII (Invitrogen™); 2: pMTBip_RVGP-ecto não digerido (5032bp); 3: pMTBip_RVGP-ecto digerido *Eco*RI+*Not*I (3610bp + 1421bp); 4: pMTBip_RVGP-ecto digerido *Sca*I (5031bp).

As bandas obtidas a partir das digestões de pMTBip_RVGP-ecto (**Figura 12**) apresentam os mesmos padrões verificados nas mini-preparações, possibilitando novamente a confirmação da subclonagem e da amplificação do DNA. A clonagem também foi verificada por sequenciamento (dados não mostrados), validando a colônia escolhida para continuidade dos ensaios. A partir destes resultados, o vetor de expressão obtido (**Figura 13**) foi denominado pMTBip_RVGP-ecto.

Figura 13 - Vetor pMTBip_RVGP-ecto.



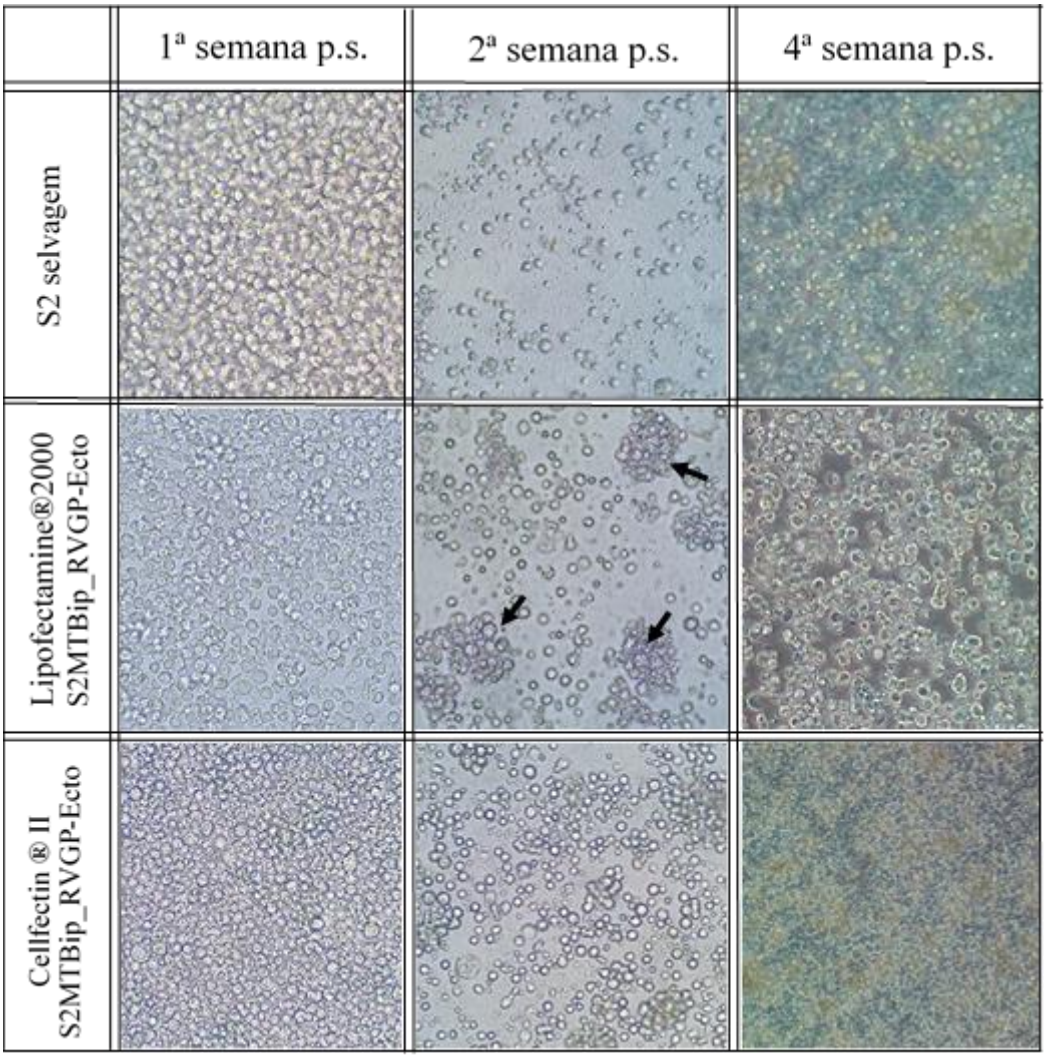
O vetor de expressão pMTBip_RVGP-ecto foi obtido a partir da clonagem do inserto do ectodomínio no vetor comercial pMT/Bip/V5/HisC (Invitrogen™). O plasmídeo apresenta o promotor da metalotioneína (pMT) de drosófila, o sinal de secreção Bip (BipSS), o gene que confere resistência à ampicilina (AmpR(bla)). Ao final do processo de subclonagem, o vetor apresentou tamanho de 5032bp.

5.2 Obtenção da linhagem S2MTBip_RVGP-ecto.

A linhagem S2MTBip_RVGP-ecto foi obtida pela cotransfecção do plasmídeo pMTBip_RVGP-ecto e pCo-Hygro em células de *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (S2) através da utilização de dois diferentes lipídeos catiônicos: Lipofectamine® 2000 e Cellfectin® II.

A seleção das linhagens portadoras dos vetores foi feita através da adição de higromicina B durante quatro semanas (**Figura 14**), até verificarmos a morte da população utilizada como controle negativo, composta somente por células S2 selvagens.

Figura 14 - Microscopia das células transfectadas com pMTBip_RVGP-ecto e pCoHygro durante o processo de seleção (p.s.) com o antibiótico Hygromicin® B (300 µg/ml).



Processo de seleção (p.s.) das células selvagens (S2 selvagem) e das células transfectadas (S2MTBip_RVGP-ecto) com diferentes lipídeos catiônicos durante quatro semanas. As imagens evidenciam a formação de ilhas (setas), indicando o início da população recombinante. Ao final da quarta semana, nota-se a mortalidade da população controle e a estabilidade das células transfectadas. Aumento: 240x.

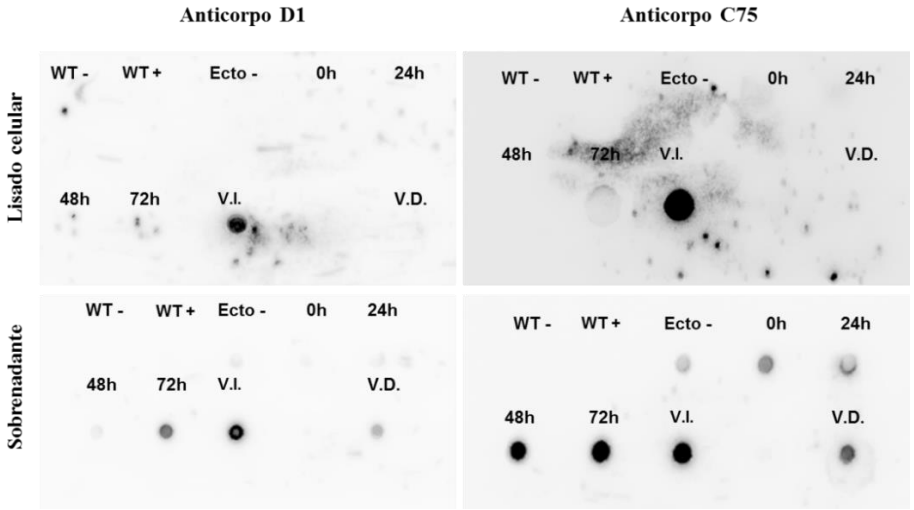
A microscopia mostra que o processo de seleção pôde ser finalizado em células transfectadas com o agente Lipofectamine® 2000 a partir da quarta semana, devido à morte das células S2 selvagem. Juntamente com o controle negativo, pode-se observar que a população de células transfectadas por meio do lípideo catiônico Cellfectin® II não resultou em uma população recombinante, apesar de ser um reagente indicado especificamente para células de inseto. Segundo o fabricante (Invitrogen™), este fato pode estar relacionado a diferentes fatores como baixa densidade celular, o surgimento de uma contaminação (mesmo indetectável) e até mesmo citotoxicidade. Assim, foi estabelecida a linhagem

S2MTBip_RVGP-ecto obtida através da cotransfecção com lipofectamina. Esta linhagem foi congelada e armazenada em um banco para realização dos ensaios descritos a seguir.

5.3 Expressão da rRVGP-ecto.

Um experimento preliminar pós-transfecção foi realizado para verificar se a linhagem obtida S2MTBip_RVGP-ecto era capaz de expressar a proteína de interesse. Para isso, as células recombinantes foram inoculadas e cultivadas em frascos agitados tipo Schott (volume de trabalho = 20 ml) e induzidas com 0,7mM de $CuSO_4$. Os tempos de cultivo foram escolhidos considerando estudos prévios realizados no laboratório (LEMOS *et al*., 2009; SANTOS *et al*., 2009) com a linhagem S2MtRVGP-Hy, que tem a expressão da glicoproteína completa em membrana. Dessa forma, optou-se por coletar os tempos 0h (instantes após a adição do indutor), 24h, 48h e 72h pós-indução como teste de expressão da proteína (**Figura 15**).

Figura 15 - Dot blotting de RVGP expressa por S2MTBip_RVGP-ecto.



Dot blotting de amostras de lisado e sobrenadante de S2MTBip_RVGP-ecto utilizando anticorpo primário monoclonal não-conformacional C75 ou anticorpo monoclonal D1 (mAB D1) e anticorpo secundário goat anti-mouse-HRP. WT-: S2 selvagem não induzida; WT+: S2 selvagem induzida; Ecto-: S2MTBip_RVGP-ecto não induzida; 0h/24h/48h/72h: S2MTBip_RVGP coletada em diferentes tempos após indução com 0,7mM de $CuSO_4$; V.I.: Vírus inativado utilizado como padrão para o ensaio ELISA-RVGP (25ng); V.D.: Vacina anti-raiva Defensor®, comercializada pela Zoetis.

Neste primeiro experimento, a escolha de dois diferentes anticorpos deu-se para: 1- definir um anticorpo monoclonal capaz de identificar a rRVGP-ecto no ensaio de detecção e 2- verificar se o anticorpo de captura (mAB D1) utilizado no ensaio de ELISA reconhece a proteína expressa por S2MTBip_RVGP-ecto e, portanto, viabilizar a técnica.

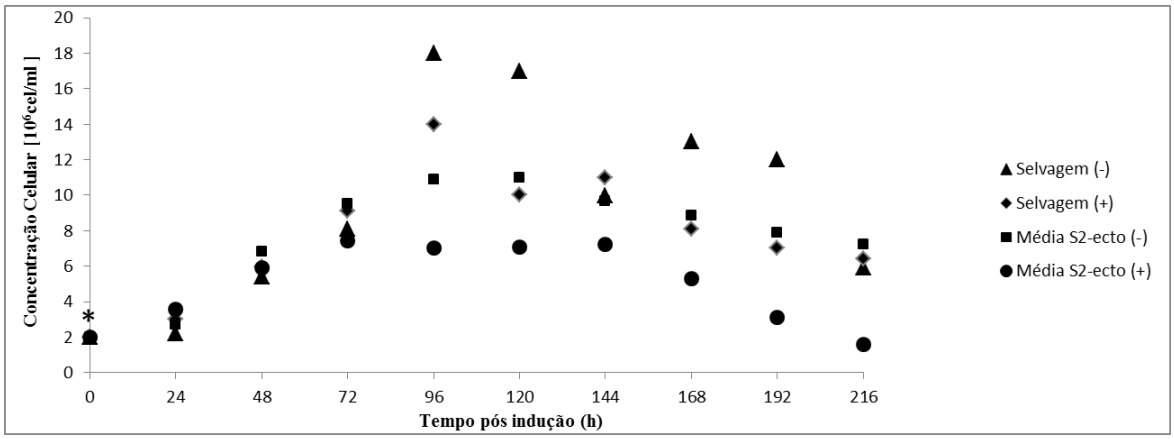
Foi possível notar que a expressão derRVGP-ecto é mais intensa em sobrenadante quando comparada ao lisado celular, confirmando a produção e secreção da proteína de interesse pela linhagem S2MTBip_RVGP-ecto. Além disso, é observada a expressão acentuada em 48 e 72 horas com detecção pelo anticorpo C75, bem como a expressão basal nas populações não induzidas. Com relação à imunodetecção pelo monoclonal D1, é possível notar uma expressão discreta somente na amostragem de 72 horas.

A partir destes resultados, pode-se inferir que o anticorpo monoclonal C75 e o monoclonal D1 são capazes de reconhecer epítopos correspondentes na porção da glicoproteína expressa, sendo neste caso os sítios II e III, respectivamente.

5.3.1 Cinética de crescimento da linhagem S2MTBip_RVGP-ecto.

A cinética de crescimento foi realizada a fim de analisar o comportamento das células recombinantes em comparação a S2 selvagem. (**Figura 16**).

Figura 16 - Cinética de crescimento populacional comparativo (S2MTBip_RVGP-ecto e S2 selvagem).



Cinética de crescimento comparativa entre populações selvagens e recombinantes, induzidas e não induzidas. A contagem de células foi realizada por meio de coloração por azul de Trypan 0,04% em câmara de Neubauer, no período de 24 a 216 horas pós-indução com $CuSO_4$ (*) Selvagem (-): célula selvagem não induzida; Selvagem (+): célula selvagem induzida com 0,7mM de $CuSO_4$; Média S2-ecto (-): resultado obtido da média do cultivo de dois Schotts da recombinante S2MTBip_RVGP-ecto não induzida; Média S2-ecto (+): resultado obtido da média do cultivo de dois Schotts da recombinante S2MTBip_RVGP-ecto induzida com 0,7mM de $CuSO_4$.

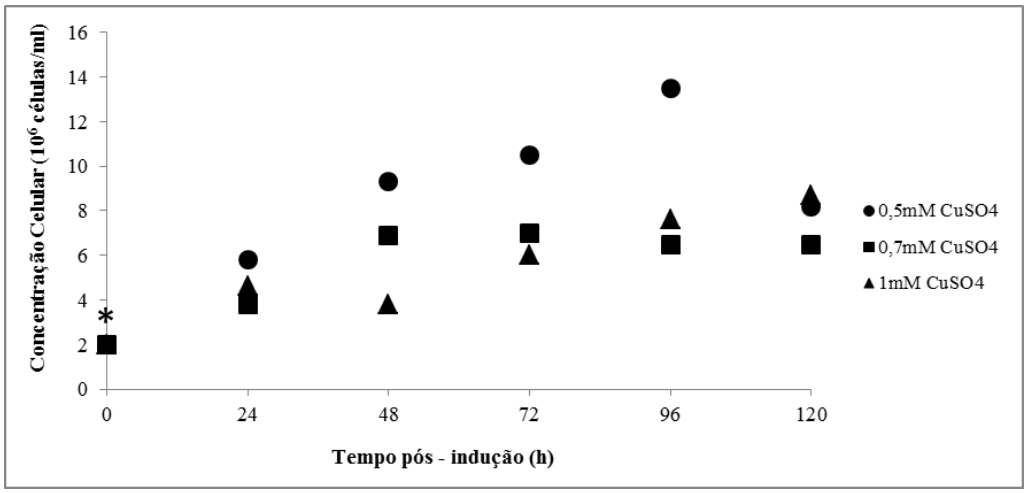
Os resultados mostram que a concentração celular (tanto em populações induzidas quanto não induzidas) é semelhante e crescente até às 72 horas. A partir de 96 horas a cultura de células selvagens induzidas (Selvagem (-)) começa a diminuir o crescimento. A cultura de S2MTBip_RVGP-ecto induzidas (Média S2RVGP-ecto (+)) atinge um platô que se mantém até aproximadamente 120 horas, iniciando a partir daí a diminuição do seu crescimento.

De maneira geral, as culturas contendo células S2 selvagem apresentaram concentração celular maior que as populações recombinantes. Este fato se repete quando analisamos comparativamente as populações não induzidas e induzidas, tendo a primeira cultura uma concentração celular maior do que a segunda, respectivamente.

A tendência do gráfico (**Figura 16**) revela que, no geral, as células selvagens exibem curva de crescimento maior quando comparadas a S2MTBip_RVGP-ecto. A indução das culturas com $CuSO_4$ também leva a uma redução no crescimento.

A modificação do comportamento de crescimento e expressão deS2MTBip_RVGP-ecto foi verificada a partir de ensaios utilizando diferentes concentrações do indutor (**Figura 17**), já que este é um fator de estresse que altera o comportamento e metabolismo da célula, influenciando desta forma, os níveis de expressão da proteína.

Figura 17 - Cinética de crescimento S2MTBip_RVGP-ecto sob influência de diferentes concentrações de indutor.



Cinética de crescimento comparativa entre culturas de S2MTBip_RVGP-ecto induzidas sob diferentes concentrações de indutor. A contagem de células foi realizada por meio de coloração por azul de Trypan 0,04% em câmara de Neubauer, no período de 24 a 120 horas pós-indução com $CuSO_4$ (*).0,5 mM $CuSO_4$: Cultura S2MTBip_RVGP-ecto induzida com 0,5 mM de $CuSO_4$; 0,7 mM $CuSO_4$: Cultura S2MTBip_RVGP-ecto induzida com 0,7 mM de $CuSO_4$; 1 mM $CuSO_4$: Cultura S2MTBip_RVGP-ecto induzida com 1 mM de $CuSO_4$.Os valores são resultantes das médias de duplicatas.

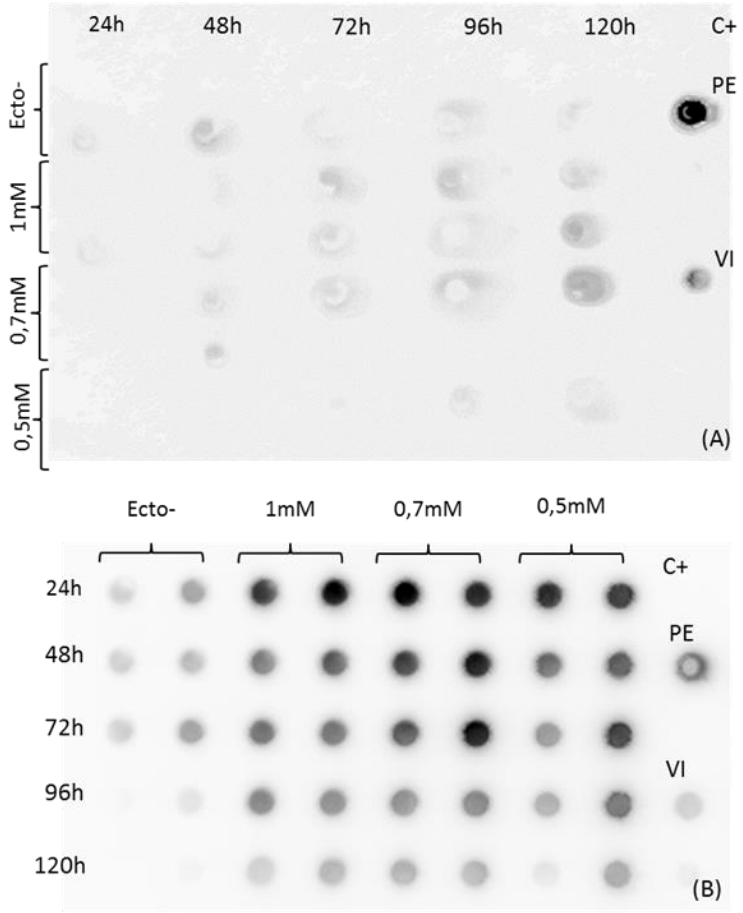
O resultado do ensaio revela que existe diferença quando a população S2MTBip_RVGP-ecto é submetida a diferentes concentrações de $CuSO_4$. A cultura induzida com 0,5 mM de $CuSO_4$ apresenta o maior crescimento dentre as culturas testadas, visto que foi aquela submetida a menor estresse, devido a baixa concentração do indutor. Em contrapartida, populações induzidas com 1 mM de $CuSO_4$ apresentaram um crescimento menor. Assim como no ensaio inicial, de cinética de comportamento por 216 horas **(Figura 16)**, as culturas induzidas com 0,7 mM cresceram até 72 horas, atingindo um platô e

mantendo-se assim até 120 horas. Da mesma forma que no ensaio anterior, as concentrações celulares mantiveram-se entre 6 e $8x10^6$ células/ml, indicando a estabilidade da população quanto ao crescimento.

5.3.2 Detecção da proteína rRVGP-ecto expressa por S2MTBip_RVGP-ecto.

Inicialmente, a detecção da rRVGP-ecto foi feita a partir de ensaios de *Dot* e *Western blotting*. Observamos pelos dados das cinéticas de crescimento que as células S2MTBip_RVGP-ecto induzidas têm sua máxima de crescimento atingida em 72 horas, estabilizando a partir de 96 horas. Partindo destes dados, optou-se por realizar amostragens até o 5° dia pós-indução (120 horas).

Figura 18 - Detecção da rRVGP-ecto em lisado e sobrenadante por *Dot blotting*.

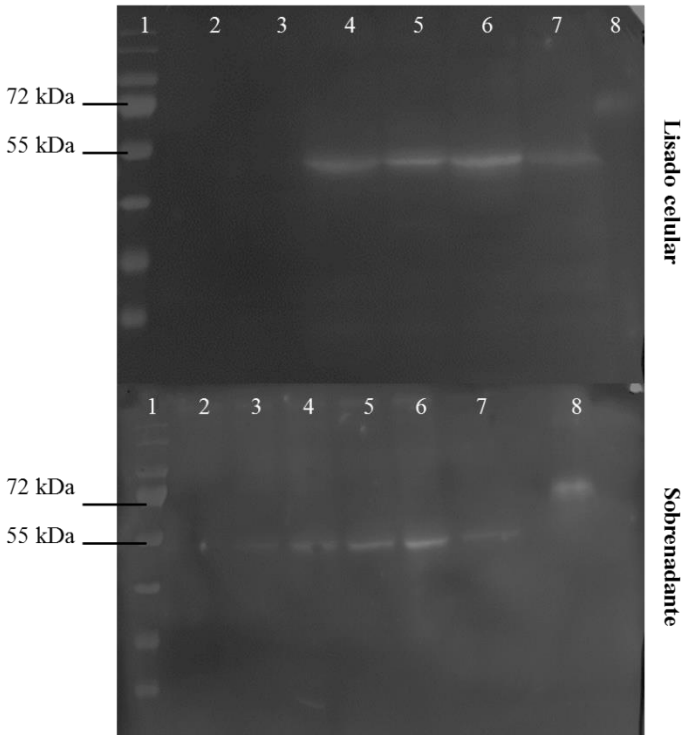


A linhagem celular S2MTBip_RVGP-ecto foi submetida a diferentes concentrações do indutor $CuSO_4$e detectada a partir do anticorpo primário monoclonal não-conformacional C75 e anticorpo secundário goat anti-mouse-HRP. Ecto-: S2MTBip_RVGP-ecto não induzida; C+: Padrão do ELISA (PE) - RVGP extraída de lissavírus da raiva inativado (25 ng) e Vírus Inativado (VI); A- Lisado celular; B- Sobrenadante das culturas celulares.

O resultado de *Dot blotting* revela que amostras de lisado celular (A) apresentam um tipo de marcação mais branda, confirmando a capacidade de secreção da proteína em meio de cultura. Com relação à detecção da rRVGP-ecto em sobrenadante (B), os tempos 24/48 e 72 horas são os melhores para a indução com 0,7mM, sendo aparentemente o tempo de 24 horas o melhor para as induções com 1mM e 0,5mM. Os tempos mais longos, de 96 e 120 horas demonstram uma possível degradação da proteína, com marcações singelas. Apesar disso, foram mantidas amostras oriundas de lise celular em ensaios de *Western blotting* e ELISA para controle da expressão da proteína de forma secretada.

Partindo destes resultados foram selecionadas as amostras 1mM/24horas, 0,7mM/48horas, 0,7mM/72horas e 0,5mM/24horas (além dos controles S2 selvagem e Vírus inativado utilizado como padrão do ELISA-RVGP) para análise do lisado celular e sobrenadante por *Western blotting*a fim de detectar e verificar a massa molecular da rRVGP-ecto em sua forma secretada (**Figura 19**).

Figura 19 - Detecção de rRVGP-ecto em lisado e sobrenadante por Western blotting.



Western blotting realizado com amostras de lisado celular e sobrenadante da cultura de S2MTBip_RVGP-ecto. As condições utilizadas para o ensaio foram escolhidas a partir do experimento demonstrado na Figura 18. 1- Marcador; 2- S2 selvagem; 3 – recombinante S2MTBip_RVGP-ecto não induzida; 4 - S2MTBip_RVGP-ecto induzida 1mM de $CuSO_4$e coletada após 24 horas; 5 - S2MTBip_RVGP-ecto induzida 0,7 mM de $CuSO_4$e coletada após 48 horas; 6- S2MTBip_RVGP-ecto induzida 0,7mM de $CuSO_4$e coletada após 72 horas; 7- S2MTBip_RVGP-ecto induzida 0,5 mM de $CuSO_4$e coletada após 24 horas; 8 – Controle positivo – Vírus inativado utilizado como padrão para o ensaio ELISA-RVGP (25 ng).

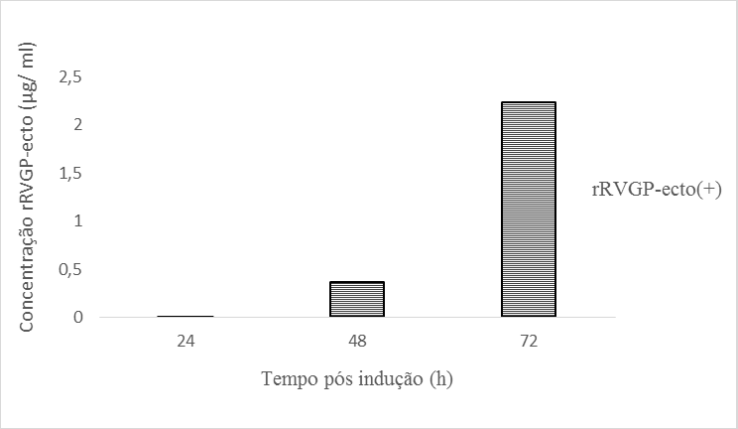
Os resultados revelaram a presença da proteína nas amostras do sobrenadante, mas também parte da rRVGP-ecto ainda retida dentro das células. A proteína apresentou uma banda com massa molecular correspondentes a aproximadamente 50 kDa. Esse é um resultado esperado, visto que a molécula não apresenta os domínios transmembrânico e citoplasmático.

5.3.3 Quantificação da rRVGP-ecto por imunoensaio de ELISA.

A quantificação da proteína recombinante foi realizada por ELISA direto, partindo da captura pelo anticorpo monoclonal IgGD1A e detecção pelo anticorpo monoclonal IgGD1B. Segundo Morgeaux *et al*., (2017), somente as moléculas na forma trimérica serão complexadas e detectadas pelo ensaio, uma vez que os anticorpos apresentam a mesma conformação e, portanto, se ligam a epítopos únicos e iguais presentes em cada monômero.

Amostras de sobrenadante da cultura de S2MTBip_RVGP-ecto foram coletadas com finalidade de quantificar a expressão de rRVGP-ecto. O ensaio abaixo (**Figura 20**) revela os resultados obtidos a partir das amostragens feitas no ensaio de expressão apresentado na **Figura 15**.

Figura 20 - Quantificação de rRVGP-ecto por ELISA.

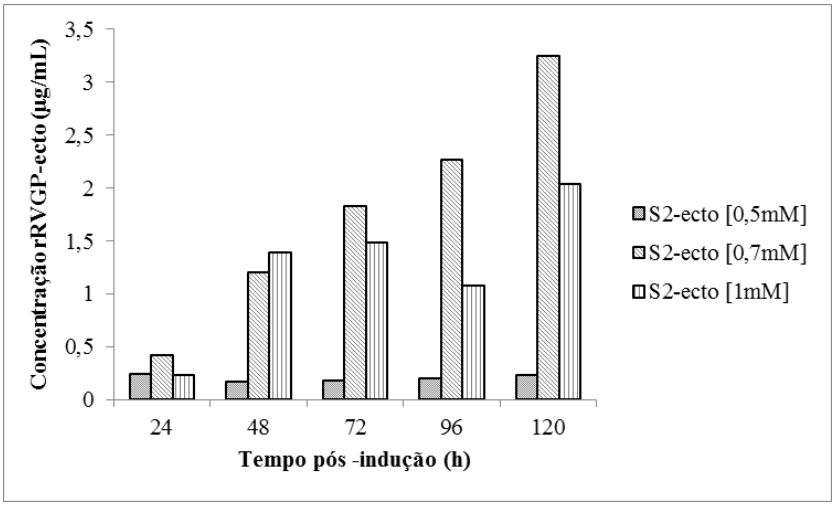


Quantificação da rRVGP-ecto presente no sobrenadante da cultura de células a partir de amostras coletadas do experimento representado na figura 15. A detecção da proteína se deu por associação dos anticorpos mAB IgGD1A e mAB IgGD1B. rRVGP-ecto (+): S2MTBip_RVGP-ecto induzida com 0,7mM $CuSO_4$e coletada 24/48 ou 72 horas pós-indução.

Os resultados revelaram a expressão da proteína recombinante em sobrenadante principalmente em 48 e 72 horas, corroborando com os ensaios anteriormente realizados de *Dot blotting* para as mesmas amostragens. Foi possível observar que a melhor quantificação foi obtida para a coleta em 72 horas pós-indução, com produção de 2,2 µg/ml da RVGP recombinante. Este dado corrobora ainda com o ensaio da **Figura 15**, utilizando o anticorpo D1, na qual a melhor detecção foi visualizada no tempo de 72 horas. Além disso, observou-se

a presença de expressão basal em S2MTBip_RVGP-ectonão induzida (rRVGP-ecto (-)), cujos valores de expressão atingiram 0,86 µg/ml (dados não mostrados).

Figura 21 - Quantificação por ELISA de rRVGP-ecto expressa em culturas induzidas com diferentes concentrações de CuSO4.



Quantificação por ensaio de ELISA da rRVGP-ectoa partir de culturas de S2MTBip_RVGP-ecto induzidas com diferentes concentrações de $CuSO_4$e amostradas no período de 24 a 120 horas pós - indução. A detecção da proteína se deu por associação dos anticorpos mAB IgGD1A e mAB IgGD1B. S2-ecto [0,5 mM]: Cultura S2MTBip_RVGP-ecto induzida com 0,5 mM de $CuSO_4$; S2-ecto [0,7 mM]: Cultura S2MTBip_RVGP-ecto induzida com 0,7 mM de $CuSO_4$; S2-ecto [1 mM]: Cultura S2MTBip_RVGP-ecto induzida com 1 mM de $CuSO_4$.

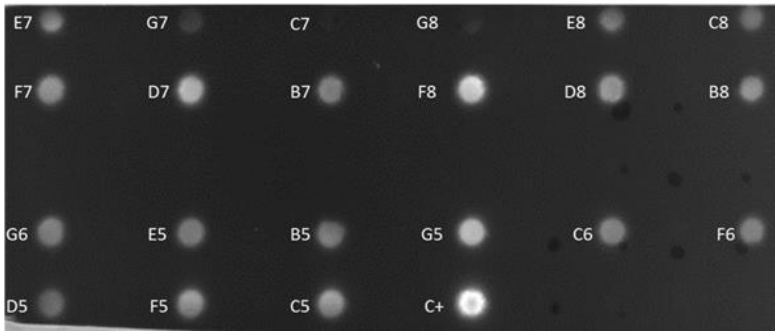
O ensaio correspondente à variação na concentração de indutor (**Figura 17**) indica que culturas submetidas à concentração de 0,7mM de $CuSO_4$ expressam mais rRVGP-ecto que as induzidas com 1mM ou 0,5mM. Quando comparadas as culturas induzidas com a menor e maior concentração de $CuSO_4$, nota-se que a concentração de 1 mM do metal é mais eficaz, resultando em uma melhor expressão da proteína recombinante do que 0,5 mM.

Quando se analisa a cultura induzida pela concentração 0,7 mM de $CuSO_4$, pode-se perceber que existe um aumento gradual de expressão da rRVGP-ecto, sendo que até 120 horas se observa um aumento na concentração da proteína em sobrenadante. Ao compararmos os níveis de expressão entre os dois experimentos, pode-se observar o tempo de 72 horas no ensaio da **Figura20**, na qual o valor de rRVGP-ecto expressa foi de 2,22 µg/ml, enquanto que neste ensaio, o mesmo tempo correspondeu a uma expressão próxima, de 1,85 µg/ml, revelando uma queda de 15,9%. A proteína produzida nos tempos de 96 e 120 horas, aparentemente sem detecção no teste de *Dot blotting* (possivelmente pela característica do anticorpo utilizado, não foi possível de se detectar no ensaio), apresentou boa quantificação (2,2 e 3,2 µg/ml, respectivamente).

5.4 Seleção de subpopulações da linhagem S2MTBip_RVGP-ecto.

Na tentativa de homogeneizar a população recombinante produzida foi feita uma diluição limitante da população de S2MTBip_RVGP-ecto a fim de produzir uma subpopulação com maior expressão de rRVGP-ecto.

Figura 22 - *Dot blotting* de expressão das subpopulações obtidas por diluição limitante de S2MTBip_RVGP-ecto.



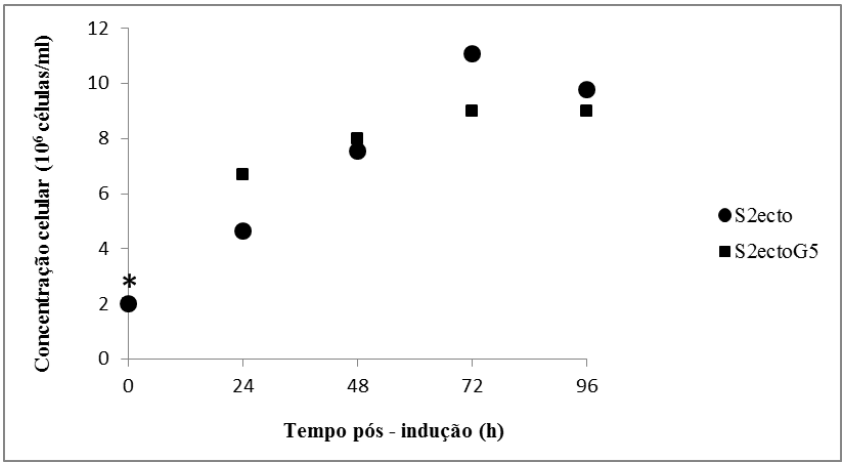
Dot blotting de sobrenadante (100µL) das subpopulações de S2MTBip_RVGP-ecto após a diluição limitante. B7/C7/D7/E7/F7/G7/B8/C8/D8/E8/F8/G8: subpopulações obtidas a partir de $5x10^5$ células totais de inóculo; B5/C5/D5/E5/F5/G5/C6/F6/G6: subpopulações obtidas a partir de 10^5 células totais de inóculo; C+: Vírus inativado (25 ng). Para detecção foi utilizado anticorpo policlonal anti-camundongo (Item 4.5.1.1) e anticorpo secundário goat anti-*mouse*-HRP.

O *dot blotting* acima representa as subpopulações selecionadas a partir da diluição limitante da população S2MTBip_RVGP-ecto. Foram obtidas mais subpopulações provenientes das diluições que partiram de $5x10^5$ células totais (12) do que as vindas de diluições que partiram de 10^5células totais (9). Usando o controle positivo (vírus inativado, 25 ng) como referência de expressão foram selecionadas as amostras D7, F8 e G5 para dar continuidade aos experimentos, devido a intensidade do sinal apresentada no ensaio realizado. As populações que representam estas amostras foram denominadas S2MTBip_RVGP-ectoD7, S2MTBip_RVGP-ectoF8 e S2MTBip_RVGP-ectoG5, respectivamente e congeladas segundo o protocolo descrito no item 4.3.1, seguido de teste dos bancos.

As diluições com $5x10^4$, 10^4, $5x10^3$, 10^3, $5x10^2$ e 10^2 células totais por poço não resultaram em subpopulações, evidenciando a dependência da linhagem S2 ao fator de crescimento propiciado por uma concentração mínima de células.

A linhagem escolhida para continuidade dos experimentos foi a S2MTBip_RVGP-ectoF8, no entanto, após teste do banco produzido e depois da tentativa de manutenção desta linhagem em cultura, notou-se que o banco havia contaminado e, portanto, está linhagem foi descontinuada. Desta forma, optou-se por realizar ensaios com a linhagem S2MTBip_RVGP-ectoG5, cujo banco foi testado e mantido em cultura.

Figura 23 - Cinética de crescimento da subpopulação S2MTBip_RVGP-ectoG5.

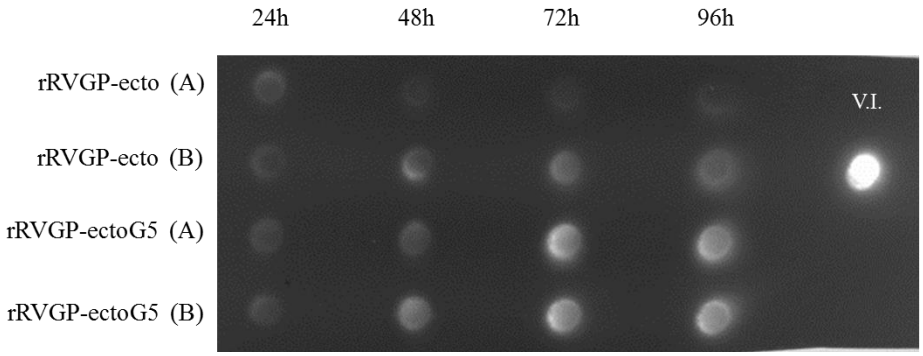


Cinética de crescimento comparativa entre culturas de S2MTBip_RVGP-ecto e a subpopulação S2MTBip_RVGP-ectoG5. As culturas foram induzidas com 0,7 mM de $CuSO_4$(*) e a contagem de células foi realizada por meio de coloração por azul de Trypan 0,04% em câmara de Neubauer entre o período de 24 a 96 horas pós-indução S2-ecto:S2MTBip_RVGP-ecto, provinda da cotransfecção com pMTBip_RVGP-ecto e pCoHygro, posteriormente selecionada por Higromicina; S2-ectoG5: cultura utilizando a subpopulação S2MTBip_RVGP-ectoG5.

A cinética comparativa entre a linhagem original e a subpopulação demonstram que o comportamento de ambas é similar, mantendo-se próximas aos valores máximos de concentração celular obtidas antes do processo de seleção por diluição limitante.

Amostras foram coletadas em diferentes tempos de indução para análise por ensaios qualitativos (*Dot blotting* e *Western blotting*) e quantitativos (ELISA), a fim de verificar se houve eficácia no processo de seleção.

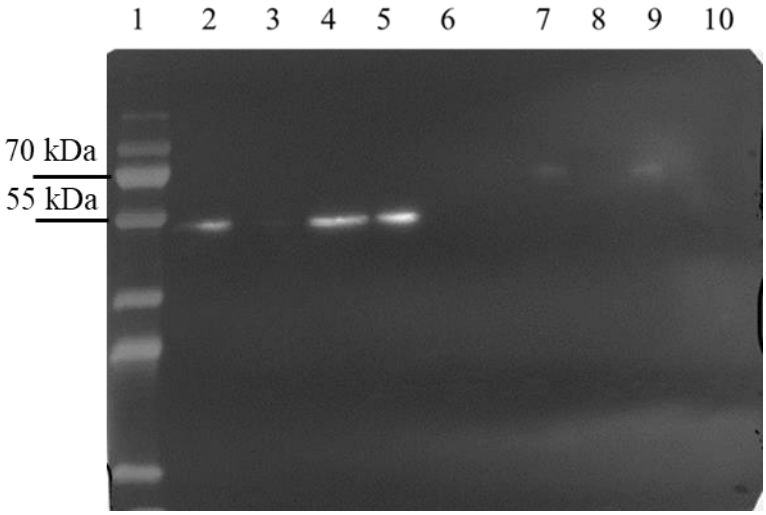
Figura 24 - *Dot blotting* comparativo da cinética de expressão da subpopulação S2MTBip_RVGP-ectoG5com a população de origem S2MTBip_RVGP-ecto.



As linhagens celularesS2MTBip_RVGP-ecto e S2MTBip_RVGP-ectoG5 foram submetidas à indução com 0,7 mM de$CuSO_4$, coletadas de 24 a 96 horas pós indução e detectadas a partir do anticorpo primário policlonal e anticorpo secundário goat anti-mouse-HRP. S2-ecto (A) e S2-ecto (B): S2MTBip_RVGP-ecto original (provinda da transfecção com pMTBip_RVGP-ecto e selecionada por higromicina); S2-ectoG5 (A) e S2-ectoG5 (B): Cultura utilizando a subpopulação S2MTBip_RVGP-ectoG5; C+: Vírus Inativado (25 ng).

O*Dot blotting* realizado revela que as amostras provenientes das culturas de S2MTBip_RVGP-ecto apresentam intensidade de sinal mais branda quando comparadas às amostras coletadas de culturas da subpopulação S2MTBip_RVGP-ectoG5. Outro fato é a expressão gradual apresentada da proteína rRVGP-ecto produzida pelas células resselecionadas após diluição limitante. Assim sendo, pode-se perceber uma diferença de detecção (mesmo que qualitativa) entre as culturas produzidas em duplicata.

Figura 25 - *Western blotting* da subpopulação S2MTBip_RVGP-ectoG5 em diferentes condições de preparo de amostra.

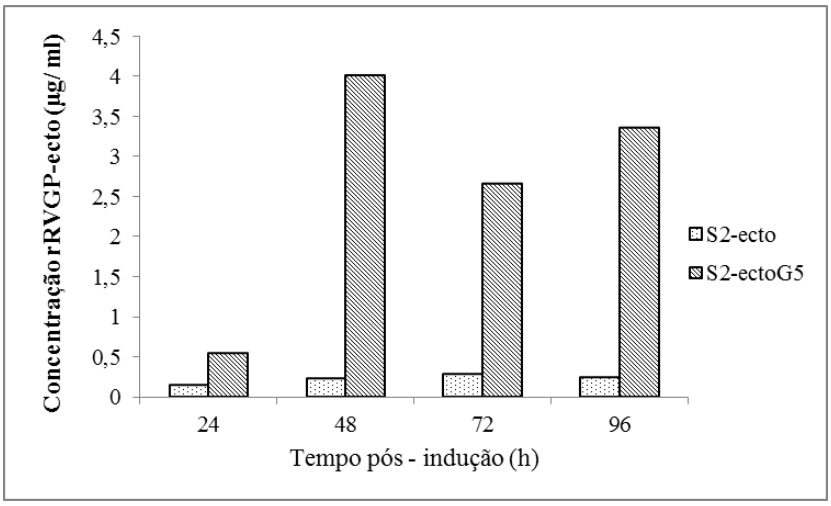


Western blotting realizado com amostras de sobrenadante da cultura de S2MTBip_RVGP-ectoG5 e detectadas a partir do anticorpo primário monoclonal não-conformacional C75 e anticorpo secundário goat anti-mouse-HRP.1 - Marcador; 2- Amostra de sobrenadante de S2MTBip_RVGP-ectoG5 sem SDS e não fervida; 3 – Amostra de sobrenadante de S2MTBip_RVGP-ectoG5 sem SDS e fervida a 100 °C; 4 - Amostra de sobrenadante de S2MTBip_RVGP-ectoG5 com SDS e não fervida;5 - Amostra de sobrenadante de S2MTBip_RVGP-ectoG5 com SDS e fervida a 100 °C; 6- Amostra de sobrenadante de S2MTBip_RVGP-ectoG5 reduzida sob ação de ß-mercaptoetanol e fervida a 100 °C; 7-Vírus inativado utilizado como padrão para o ensaio ELISA-RVGP (25 ng)sem SDS e não fervido; 8 Vírus inativado utilizado como padrão para o ensaio ELISA-RVGP (25 ng)sem SDS e fervido a 100 °C; 9 - Vírus inativado utilizado como padrão para o ensaio ELISA-RVGP (25 ng)com SDS e não fervido; 10 - Vírus inativado utilizado como padrão para o ensaio ELISA-RVGP (25 ng) reduzido sob ação de ß-mercaptoetanol e fervido a 100 °C.

Foi possível constatar a partir da imunodetecção por *Western blotting*, que as amostras provenientes da subpopulação S2MTBip_RVGP-ectoG5 apresentaram a mesma massa molecular que a população original S2MTBip_RVGP-ecto. Além disso, pode-se notar que algumas das condições utilizadas para o preparo das amostras alteraram a conformação do sítio II da RVGP, local ao qual ocorre a interação com o monoclonal utilizado, o comercial mAb C75. As condições correspondentes as linhas 3 e 6 da **figura 25** (preparo do sobrenadante sem SDS e fervida a 100 °C e preparo do sobrenandante reduzido sob ação de ß-mercaptoetanol e fervida a 100 °C, respectivamente) não foram detectadas.

Em contrapartida, amostras 2, 4 e 5 (sobrenadante sem SDS e não fervido, sobrenadante com SDS e não fervido e sobrenadante com SDS e fervida a 100 °C, respectivamente) foram detectadas, sendo um indicativo de que o SDS por si não representa um desnaturante tão potente, capaz de inviabilizar a ligação entre o epítopo e o anticorpo.

Figura 26 - Concentração de rRVGP-ecto expressa comparativamente por S2MTBip_RVGP-ectoG5 e S2MTBip_RVGP-ecto.



Quantificação de rRVGP-ecto realizada por ensaio de ELISA. As culturas foram realizadas a partir da população S2MTBip_RVGP-ecto e da subpopulação S2MTBip_RVGP-ectoG5, induzidas com 0,7 mM de $CuSO_4$, e as amostras foram coletadas no período de 24 a 96 horas. A detecção da proteína se deu por associação dos anticorpos mAB IgGD1A e mAB IgGD1B. S2-ecto: Média de duplicatas da população de S2MTBip_RVGP-ecto; S2-ectoG5: Média de duplicatas da subpopulação S2MTBip_RVGP-ectoG5.

Considerando os primeiros ensaios de quantificação realizados com rRVGP expressa por S2MTBip_RVGP-ecto, pode-se notar uma queda na expressão da recombinante de 86,3% - 2,2 µg/ml(**Figura 20**) para 0,3 µg/ml (**Figura 26**).

A quantificação da rRVGP-ecto produzida pelas duas linhagens recombinantes revela uma diferença significativa de concentração obtida após a seleção da subpopulação. É possível perceber que S2MTBip_RVGP-ectoG5 (2,66 µg/ml) expressa uma concentração de rRVGP-ecto 88,7% maior do que a população inicial da linhagem recombinante produzida (0,3 µg/ml), quando considerado o tempo de 72 horas, entretanto não apresentou uma constante de expressão ao longo do tempo de cultivo do ensaio realizado (sendo a rRVGP expressa por S2MTBip_RVGP-ectoG5 em 48 horas = 4,03 µg/ml e em 96 horas = 3,3 µg/ml).

6 DISCUSSÃO

Diferentes sistemas de expressão e modelos de produção já foram propostos a fim de se obter a glicoproteína do lissavírus da raiva de forma recombinante. De maneira geral, trabalhos que apresentam abordagem semelhante à de se produzir a rRVGP secretada (*H. polymorpha e Spodoptera frugiperda* Sf-9) resultaram na produção de moléculas reconhecidas por anticorpos e soro de maneira similar ao vírus nativo, revelando a presença de epítopos de importância que as caracterizam como recombinantes antigênicas (QIAN *et al*., 2013; SISSOËFF *et al*., 2005). A RVGP recombinante produzida em levedura (*H. polymorpha)* foi testada em coelhos respondendo positivamente e induzindo a produção de anticorpos neutralizantes (QIAN *et al*., 2013), enquanto que a rRVGP secretada de *Spodoptera frugiperda* Sf-9 foi testada quanto à capacidade de interagir com o ligante p75NTR, provando a inadequação na conformação da proteína. Outros autores utilizaram como plataforma as células de mamífero BHK-21 e CHO, respectivamente (GAUDIN *et al*., 1999; WOJCZYK *et al*., 1995). Estes dois sistemas apresentam como diferença a expressão apenas de moléculas monoméricas, com pouco reconhecimento por anticorpos na rRVGP produzida em BHK-21 e a produção de moléculas semelhantes à proteína nativa em CHO.

Neste trabalho, a rRVGP-ecto expressa em células S2 teve sítios antigênicos reconhecidos por anticorpos e soros, corroborando o encontrado por Qian *et al*. (2013), Sissoëff *et al*. (2005) e Wojczyk *et al*. (1995). A imunodetecção dos epítopos II e III da rRVGP-ecto deu-se por meio dos ensaios qualitativos de *Dot* e *Western blotting* (**Figuras 18 e 19**), e ELISA (**Figuras 20, 21 e 26**), respectivamente. É importante ressaltar ainda que as detecções de rRVGP-ecto realizadas com o anticorpo monoclonal C75 não garantem a existência da estrutura trimérica da glicoproteína devido ao caráter não conformacional do anticorpo, inviabilizando o reconhecimento total do sítio II descontínuo (constituído pelas porções IIa e IIb). Esta constatação foi feita a partir da submissão de S2MTBip_RVGP-ecto a diferentes condições de expressão, com variação dos tempos de amostragem e concentração de indutores utilizados. No nosso trabalho, verificou-se que populações induzidas com sulfato de cobre a 0,7mM e coletadas partindo de 72 horas da adição do metal apresentaram melhores resultados de detecção (**Figura 18**), confirmando estudos prévios do Laboratório de Imunologia Viral (LIV), que definiram 0,7mM como a concentração ideal de $CuSO_4$ para a indução de linhagens S2 recombinantes (no caso, a S2MtRVGP-Hy, onde a rRVGP é expressa integralmente, ou seja, é encontrada na membrana celular (LEMOS *et al*., 2009)). Apesar disso, foi possível verificar a presença da proteína também em outros tempos de

amostragem (48, 96 e 120 horas) e sob a utilização de outras concentrações de $CuSO_4$ (0,5 mM e 1 mM) (**Figura 18**).

Foram realizados ensaios de *Dot blotting* (**Figuras 15, 18, 22 e 24**) que revelaram outra característica importante da proteína expressa, determinante para os objetivos deste projeto: a capacidade de produzir rRVGP-ecto e exportá-la para o meio de cultura, certificando que o sinal de secreção Bip, presente no vetor escolhido (pMT/BiP/V5/His-C) apresenta-se funcional, direcionando, portanto, a proteína ao retículo endoplasmático (KIRKPATRICK *et al*., 1995). Deve-se destacar, no entanto, que parte da proteína ainda permanece no interior da célula, como é possível observar nos resultados de *Western blotting* das **Figuras 19 e 25.** Sugere-se que parte desta proteína se mantenha no Retículo Endoplasmático (RE) por um mecanismo próprio desta estrutura, na tentativa de evitar que moléculas imaturas sejam enviadas ao Complexo de Golgi, permitindo assim que estas proteínas tenham mais tempo para atingir uma estrutura capaz de desempenhar seu papel biológico (PAGNY *et al.*, 1999).

Nagarajan *et al*. (2006) afirma que o ELISA é um potente ensaio para estimar a presença do antígeno em preparados vacinais, além de amplamente utilizado na detecção de antígenos e anticorpos em amostras de pacientes, tornando a técnica uma excelente alternativa aos diagnósticos *ante mortem* e *post mortem* da doença (**Tabelas 1 e 2**), devido a desvantagens como o custo, a necessidade de mão de obra especializada, o tempo e também, as questões éticas quando há necessidade de realização de testes em animais (FOOLKS *et al*., 2017). Porém, a quantificação de proteínas em testes ELISA pode variar bastante. Em nossos ensaios utilizando a técnica de ELISA em um primeiro momento, pudemos observar que a concentração de proteína produzida atingiu aproximadamente 2,5 µg/ml no sobrenadante (**Figura 20**). Outros ensaios utilizando a rRVGP de membrana chegaram a quantificar 1,5-2 µg/ 10^7 células quando produzidas em condições controladas em biorreator (VENTINI *et al*., 2010) ou até mesmo 5,5 µg/ 10^7 células em cultivo agitado em frascos tipo Schott (LEMOS *et al*., 2009).

Para os ensaios de ELISA utilizamos o anticorpo o mAb D1, que diferentemente do mAb C75, tem caráter linear. A escolha deste anticorpo deu-se a partir de uma detecção prévia da rRVGP-ecto por *Dot blotting* (**Figura 15**), comprovando a capacidade do mesmo de ligar-se a molécula. Uma vez que os anticorpos de captura e detecção utilizados no ELISA possuem mesma conformação e, portanto, ligam-se a um mesmo epítopo presente nos três monômeros da RVGP (o sítio III), desta forma, tem-se como princípio a detecção apenas das moléculas triméricas, uma vez que os agregados de RVGP são desfeitos após a adição de

detergente (MORGEAUX *et al*., 2017; KUZMINA *et al*., 2013; BENMANSOUR *et al*., 1991).

Uma das desvantagens ao se trabalhar com a linhagem S2 é a dificuldade de obtenção de um clone. Uma vez que a origem das células S2 é embrionária e apresenta como característica marcante a dependência do fator de crescimento autócrino, faz-se difícil o isolamento de uma única célula (VENTINI *et al*., 2010; LEMOS *et al*., 2009; GALESI *et al*., 2008). Uma das abordagens utilizadas na tentativa de se otimizar a produção de qualquer proteína produzida por meio deste sistema é a adição do antibiótico de escolha (no caso, higromicina) antes do início dos ensaios, buscando tornar a população de S2MTBip_RVGP-ecto mais homogênea, com uma produção mais constante da proteína recombinante (SANTOS *et al*., 2016).

A subclonagem e seleção de uma subpopulação mais homogênea buscando níveis de expressão maiores surtiram em um aumento de 88,7% na expressão da rRVGP-ecto quando comparadas com a produção inicial (**Figura 20 e 21**). Esses dados sugerem a importância em se manter a seleção e subclonar populações celulares com expressões de proteínas recombinantes mais eficientes.

Análises da recombinante foram realizadas em programas de bioinformática (ProtParam) a fim de inferir a massa molecular da rRVGP-ecto expressa em nossa linhagem S2, obtendo como resultado aproximadamente 51 kDa. Esse dado é compatível com outros já encontrados em literatura, no qual a proteína apresentou massa molecular de ~50-50,7 kDa (RATH *et al.*, 2005; SISSOËFF *et al*., 2005), a partir de construção semelhante à realizada neste trabalho. A variação existente entre as construções de ectodomínio, no entanto, podem ser associadas ao fato da adição de porções tais como *Histag*, *linkers* de glicina e de trombina na sequência sintetizada pela GenScript®. A diferença entre outras rRVGP produzidas em células de inseto (aproximadamente 58 kDa) deve-se justamente à ausência dos domínios transmembrânicos e citoplasmáticos nas construções propostas pelos autores (LEMOS *et al.* 2009).

A RVGP secretada permanece como controvérsia no meio científico. Os autores divergem quanto a sua capacidade de ser antigênica e imunogênica, ainda mais quando se associa o papel do domínio transmembrânico a discussão: esta porção auxilia na oligomerização da molécula, restringindo os movimentos entre os monômeros, mantendo, portanto, a associação entre as unidades, o que permite a conformação correta da proteína bem como sua interação com os receptores da célula hospedeira (GAUDIN *et al*., 1999).

Testes adicionais realizados por Rath *et al.* (2005) e Sissoëff *et al*. (2005) vêm de encontro à necessidade de se mapear a molécula recombinante, localizando outros sítios além dos principais II e III. Tentativas com o mesmo objetivo também foram abordadas neste projeto (dados não mostrados) por meio da utilização de outros anticorpos (30AA5, 41BC2, 9B4, 17D2), entretanto, foi detectada na rRVGP-ecto somente a porção correspondente ao ectodomínio (anticorpo 17D2). Estes resultados são preliminares, uma vez que a detecção por meio destes anticorpos se faz através de ensaios de imunoprecipitação (GAUDIN *et al*., 1999).

Dessa forma, os dados de caracterização da proteína ainda são preliminares e exigem mais estudos, visto que não se sabe ao certo qual a conformação da rRVGP produzida, se o padrão de glicosilação apresentado é o esperado, qual o comportamento dessa molécula em sistemas de produção controlados e, se é capaz de desempenhar papel biológico. Apesar do ensaio de ELISA identificar as moléculas como triméricas, é necessário iniciar o processo de purificação da rRVGP-ecto (em andamento no laboratório) para então dar continuidade aos estudos de caracterização e análises antigênicas e imunogênicas da molécula, certificando o papel que o ectodomínio da RVGP é capaz de desempenhar quando atua só, sem auxílio dos domínios transmembrânico e citoplasmático. Sendo assim, pode-se sugerir novas idéias na tentativa de se utilizar a proteína como plataforma para diagnóstico, como por exemplo um novo antígeno de captura para ELISA ou até mesmo como *booster* vacinal para utilização via oral. Além disso, produção com maior concentração da rRVGP-ecto viabiliza outros estudos, visto que se pode investir na purificação da mesma. É possível utilizá-la na produção em biorreator, aumentando a escala e, a partir do purificado, estudar a qualidade da proteína em termos de glicosilação e verificar sua reatividade e a resposta que a recombinante causa em testes *in vivo*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso trabalho permitiu expressar a glicoproteína do lissavírus da raiva de maneira recombinante e secretada para o meio de cultura a partir de clonagens envolvendo o gene correspondente ao ectodomínio da RVGP e um vetor passível de transfecção em células de *Drosophila melanogaster* Schneider 2 - pMT/Bip/V5His-C (Invitrogen™), cujo sinal de secreção viabiliza o envio de rRVGP-ecto para o meio de cultura. A proteína produzida apresenta aproximadamente 51 kDa, e a indução de sua produção pode ser realizada com diferentes concentrações de $CuSO_4$ com coletas viáveis a partir de 48 horas p.i., gerando de 2,5 a 4 µg/ml de proteína por cultivo em pequena escala. A caracterização desta molécula quanto à glicosilação, aspectos antigênicos e imunogênicos, e o processo de purificação ainda precisam ser estudados.

REFERÊNCIAS

AAGAARD-HANSEN, J.; CHAIGNAT, C.L. Neglected tropical diseases: equity and social determinants. Equity, social determinants and public health programmes (World Health Organization), cap. 8, p.135-157, 2010.

ABDULHAQQ, S. A.; WEINER, D. B. DNA vaccines: developing new strategies to enhance immune responses. **Immunol Res**, V: 42, p.219–232, 2008.

ALBERTINI, A.A.; RUIGROK R.W.; BLONDEL, W. Rabies virus transcription and replication. **Adv virus Res**, v. 79, p. 1-22, 2011.

ALTMANN, F. Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. **Glycoconjugates Journal**, V.16, p. 109-123, 1999.

AMANN *et al.* A new rabies vaccine based on a recombinant ORF virus (parapoxvirus) expressing the rabies virus glycoprotein **Journal of Virolology**, Feb; V 87(3):1618-30, 2013

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 for the extraction os recombinant membrane viral glycoprotein for stably transfected Drosophila melanogaster cells. **Biotechnology Journal**, v. 3, p. 98-103, 2008.

ASTRAY, R. M., JORGE, S. A. C., PEREIRA, C.A. Rabies vaccine development by expression of recombinant viral glycoprotein **Arch Virol** 162:323–332, 2017.

BABBONI, S. D.; MODOLO, J. R. Raiva: origem, importância e aspectos históricos. UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde, v. 13, n. ESP, 2011.

BASTIDA-GONZÁLE, F. *et al*., Predicted 3D Model of the Rabies Virus Glycoprotein Trimer, **BioMed Research International,** 2016.

BATISTA, H. B. C. R.; FRANCO A. C.; ROEHE, P. M. Raiva: uma breve revisão. **Acta Scientiae Veterinariae**, V. 35, n. 2, p. 125 – 144, 2007.

BENMAAMAR, R. *et al.* High-level expression of rabies virus glycoprotein with the RNA-based Semliki Forest Virus expression vector, **Journal of Biotechnology**, V. 139, n.4, P. 283-290, 2009.

BENMANSOUR A. *et al*. Antigenicity of rabies virus glycoprotein. **Journal of Virology**, Aug;V. 65(8):p.4198-203, 1991.

CHEN *et al*., A Novel Rabies Vaccine Based on a Recombinant Parainfluenza Virus 5 Expressing Rabies Virus Glycoprotein **Journal of Virology**. 2013 Mar;87(6):2986-93 2013.

COSTA, W.A., *et al*. **Manual Técnico do Instituto Pasteur: Profilaxia da Raiva Humana**. 2 Ed., São Paulo, Instituto Pasteur, 2000.

DIETZGEN, R. G. The family Rhabdoviridae: mono- and bipartite negative-sense RNA viruses with diverse genome organization and common evolutionary origins. **Virus Reaserch: Review**, V. 227, p. 158–170, 2017.

DIETZSCHOLD, B. Structural and Immunological Characterization of a Linear Virus-Neutralizing Epitope of the Rabies Virus Glycoprotein and Its Possible Use in a Synthetic Vaccine. **Journal of Virology**, p. 3804-3809, Aug 1990.

DIETZSCHOLD, B.; SCHNELL, M. J. New approaches to the development of live attenuated rabies vaccines, **Hybrid Hybridomics.**, Apr;21(2):129-34, 2002.

ERTL, H. C. J. Novel Vaccines to Human Rabies. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 3, n. 9, p. e515, 2009.

FEHLNER-GARDINER, C *et al*., Comparing ONRAB® and RABORAL V-RG® oral rabies vaccines 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.

FONTANA, D. *et. al*. Rabies virus-like particles expressed in HEK293 cells. **Vaccine**, Mai, 19;32(24):2799-804, 2014.

FOOD AND ORGANIZATION OF UNITED NATIONS (FAO) - A neglected zoonotic disease: dog-mediated rabies eliminating human deaths by 2030 (março, 2018).

FOOKS, A. R. *et al.* Rabies. ***Nat. Rev. Dis. Primers* 3**, 17091 (2017).

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

GAUDIN, Y. *et al*. Rabies Virus Glycoprotein Is a Trimer. **Virology**, v. 187, 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.

GEBREYES W. A. *et al.* The Global One Health Paradigm: Challenges and Opportunities for Tackling Infectious Diseases at the Human, Animal, and Environment Interface in Low-Resource Settings. **PLoS Negl Trop Dis** V.8, Artigo. 11, e3257, 2014.

GENZ, B. *et al*. Chimeric rabies viruses for trans-species comparison of lyssavirus glycoprotein ectodomain functions in virus replication and pathogenesis. **Berliner und Münchener Tierärztliche** Wochenschrift, v. 125, Issue 06/05, p. 211-227, 2012.

GUPTA, P. K. *et al*. Immunogenic and antigenic properties of recombinant soluble glycoprotein of rabies virus. **Veterinary Microbiology**, v. 108, n. 3-4, p. 207–14, 2005.

HAMPSON K. *et al*. Estimating the Global Burden of Endemic Canine Rabies. **PLoS Negl Trop Dis**, V.9, N. 4, Abr, 2015.

JACKSON, A. C. Human Rabies: a 2016 Update. **Curr Infect Dis Rep**, p.18- 38, 2016.

JONGH,W. A., SALGUEIRO, S., DYRING, C. The use of *Drosophila* S2 cells in R&D and bioprocessing. **Pharm. Bioprocess**, V. 1, N. 2, p. 197-213, 2013.

KAW *et al.* Itravitam diagnosis of rabies from saliva by nested RT-PCR and Real Time PCR. Bras. **J. Vet. Pathol,** V.5, n.2, p.70-73, 2012

KESSELS, J.A. *et al*. Pre-exposure rabies prophylaxis: a systematic review. **Bull World Health Organ**, V. 95, p.210–219C, 2017.

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, p.1326, 2012.

KIRKPATRICK, R. B. *et al.* Heavy Chain Dimers as Well as Complete Antibodies Are Efficiently Formed and Secreted from *Drosophila* via a BiP-mediated Pathway, **J. Biol. Chem.** V. 270, n.34, p.19800-19805, 1995.

KIRKPATRICK, R. B., SHATZMAN, A. **Drosophila S2 system for heterologous gene expression**. In Fernandez, J. M., Hoffler, J. P. Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression. 1 ed. California: Invitrogen Corporation, p.289-330, 1999.

KORAKA, P. *et. al*. A recombinant rabies vaccine expressing the trimeric form of the glycoprotein confers enhanced immunogenicity and protection in outbred mice, **Vaccine,** Aug 6;32(36):4644-50, 2014.

KUZMINA NA, KUZMIN IV, ELLISON JA, RUPPRECHT CE Conservation of Binding Epitopes for Monoclonal Antibodies on the Rabies Virus Glycoprotein. Journal Antivirals and Antiretrovirals, 5: 037-043, 2013.

LEMOS *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 Biotchnology**, V. 143, p. 103–110, 2009.

LI, Z. *et al*., 2015 A recombinant canine distemper virus expressing a modified rabies virus glycoprotein induces immune responses in mice. **Virus Genes** V. 50 (3), p. 434-441. 2015.

LIU, X., *et al.* Study rabies virus-like particles comprised of G and M proteins induced protective immune responses in BALB/c mice. **Journal of Applied Virology**, V.14, n.2, 2015.

MAINGUY, J. *et al.* Oral rabies vaccination in raccoons: comparison of ONRAB® an 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.

MCGARVEY P. B. *et al*. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. **Biotechnology**, V.13, n.13, p.1484–1487, 1995.

MORAES A. M. *et al*. Drosophila melanogaster S2 cells for expression of heterologous genes: From gene cloning to bioprocess development. **Biotechnol Adv V**.30, n.3, p.613–628, 2012.

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.

MORGEAUX, S. *et al*. Replacement of *in vivo* human rabies vaccine potency testing by *in vitro* glycoprotein quantification using ELISA – Results of na international collaborative study, **Vaccine**, Feb 7;35(6):966-971, 2017.

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. **Journal of general virology**, v. 73, p. 335-345, 1992.

NAGARAJAN, T. *et al.*, A simple immuno-capture ELISA to estimate rabies viral glycoprotein antigen in vaccine manufacture. **Biologicals**, V. 34, p. 21-27, 2006.

NETO, A. M. S.; RODRIGUES, A. R.; CARVALHO, K. C. N. DE. Caracterização da raiva humana no Brasil no período de 2001 - 2011. **Revista Educação em Saúde**, v. 1, n. 1, 24 2014.

NORRIS, J. *et al*. Social and Economic Impact Review on Neglected Tropical Diseases. **Global Network Neglected Tropical Diseases**, November 2012.

OSINUBI, M. O. V., *et al*. Enhancing comparative rabies DNA vaccine effectiveness through glycoprotein gene modifications. **Vaccine**, V.27, p. 7214-7218, 2009.

PAGNY, S. Signals and mechanisms for protein retention in the endoplasmic reticulum. **J. Exp. Bot**. V. 50**,** p. 157–164, 1999.

PÉREZ, O., PAOLAZZI, C. C. Production methods for rabies vaccine. **Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology**, V. 18, p. 340-347, 1997.

PREHAUD C. *et al*. Immunogenic and protective properties of rabies virus glycoprotein expressed by baculovirus vectors. **Virology**, V. 173, n. 2, p. 390–399, 1989.

QIAN, W. *et al*. Secretion of Truncated Recombinant Rabies Virus Glycoprotein with Preserved Antigenic Properties Using a Co-Expression System in Hansenula polymorpha, **Journal of Microbiology** Vol. 51, No. 2, pp. 234–240, 2013.

RAMYA, R., *et al.* Expression and solubilization of insect cell based rabies virus glycoprotein and assessment of its immunogenicity and protective and efficacy in mice. **Clin Vaccine Immunol.** Aug, 3, 2011.

RATH, A. *et al.* DNA vaccine for rabies: Relevance of the trans-membrane of the glycoprotein in generating an antibody response, **Virus Research**, V. 113, p. 143–152, 2005.

RUPPRECHT C, KUZMIN I, MESLIN F. Lyssaviruses and rabies: current conundrums, concerns, contradictions and controversies [version 1; referees: 2 approved] F1000Research, 6**(F1000 Faculty Rev**):184, 2017

SAKAMOTO, S., *et al.* Studies on the structures and antigenic proprieties of rabies virus glycoprotein analogue produced in yeast cells. **Vaccine**, V. 17, p. 205-218, 1999.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Labortory Press, 2001.

SANTOS N. G. *et al.* Impact of recombinant Drosophila S2 cell population enrichment on expression of rabies virus glycoprotein, **Cytotechnology**, V.68, n.6, p. 2605-2611, 2016.

SANTOS, A. S. *et al.* Rabies virus glycoprotein expression in Drosophila S2 cells: Influence of re-selection on protein expression **Biotechnology. Journal**. V.4, p. 1578–1581, 2009.

SCHNELL, M. J., *et al.* The cell biology of virus: Using stealth to reach the brain. **Nature Review Microbiology**, V.8, n.1, p.51-61, 2010.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO (SVS/MS). Casos de Raiva Animal por Região Administrativa e Unidades Federadas no ano de 2017. Brasil, 2018 (Atualizado em 04.04.2018). Disponível em < http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/abril/30/Tabela-6.pdf>. Acesso em 27.07.2018.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO (SVS/MS) – Análise da situação epidemiólogica da Raiva no Brasil, no período de 2011 a 2016* Disponível em <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/maio/27/Informe-epidemiol--gico-raiva.pdf> Acesso em : 21 jun 2017.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO (SVS/MS) – Mapa da Raiva no Brasil. Disponível em <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/15/MAPAS%20ATUALIZADOS%20RAIVA%202017%20Atualizado%20-%2015-05-17.pdf> Acesso em 21 jun 2017.

SHAKIN-ESHLEMAN, S.H. *et al.* N-Linked Glycosylation of Rabies Virus Glycoprotein. **The journal of biological chemistry**, Vol. 267, N. 15, pp. 10690 - 10698, 1992

SINGH, R. *et al.* Rabies – epidemiology, pathogenesis, public health concerns and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**, V. 37, n.1, p. 212-251, 2017.

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

SOUZA, A; MADHUSUDAN, S. N. Survival from rabies encephalitis – Review Article. **Journal of the Neurological Sciences**, V. 339, p. 8-14, 2014.

SRINIVASAN, A.Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients**. N Engl J Med**. V. 352, N. 11, p. 1103–11, mar. 2005.

STONER-DUNCAN, B.; STREICKER, D. G.; TEDESCHI, C. M. Vampire Bats and Rabies: Toward an Ecological Solution to a Public Health Problem. **PLOS Negl. Trop Dis**, V. 8, n. 6, e2867, 2014.

SWIECH K. *et al.* Bioreactor culture of recombinant *Drosophila melanogaster* S2 cells: characterization of metabolic features related to cell growth and production of the rabies virus glycoprotein. **Cytotechnology**, V.57, n.1 p.61–66, 2008.

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

TORDO, N., *et al*. Walking along the rabies genome: Is the large G-L intergenic region a remnant gene? **Proc Natl Acad Sci USA**, v.83, p. 3914-3918, 1986.

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. 169-72, 2010.

WALLACE, R. M. *et al*. Elimination of Dog-Mediated Human Rabies Deaths by 2030: Needs Assessment and Alternatives for Progress Based on Dog Vaccination. Front Vet Sci. V. 4, Artigo 9, 2017.

WHITT, M.A *et al.* Membrane fusion activity, oligomerization, and assembly of the rabies virus glycoprotein. **Virology**, 185, 681–688, 1991.

WOJCZYK, B. Stable secretion of a soluble, oligomeric form of rabies virus glycoprotein: influence of N-glycan processing on secretion. **Biochemistry**, V.34, p. 2599–2609, 1995.

WOJCZYK, B.S. *et al.* N-glycosylation at one rabies virus glycoprotein sequon influences N-glycan processing at a distant sequon on the same molecule. Glycobiology, V. 15, n. 6, p. 655-666, jun., 2005.

WOJCZYK, B.S. *et al*. The role of site-specific N-glycosylation in secretion of soluble forms of rabies virus glycoprotein. **Glycobiology** vol. 8 no. 2 pp. 121–130, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Expert consultation on rabies. Second Edition, (2013) Disponível em <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85346/1/9789240690943_eng.pdf?ua=1>Acesso em: 06 de jan. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases (2015). Disponível em:<https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=mV00DgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR9&dq=World+Health+Organization+(WHO).+Neglected+Tropical+Diseases&ots=dirvW-T-mX&sig=DpJV6JxuHHfA2QOTUHOScPcAPZ0#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 12 de abr. 2017.

World Health Organization (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: 04 de jan. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Zero by 30: The global strategic plan to end human deaths from dog-mediated rabies by 2030. Disponível em http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272756/9789241513838-eng.pdf?ua=1. Acesso em: 27.07.2018

WUNNER, W. H. *et al*. Rabies Subunit Vaccines **J Gen Virol**. Aug;64 (Pt 8):1649-56, 1983.

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

ZHU, S. *et al*. Reverse genetics of rabies virus: new strategies to attenuate virus virulence for vaccine development. **Journal of Neurovirology,** v. 21, p. 335–345, 2015.

ZITZMANN, J. *et al*. **Process Optimization for Recombinant Protein Expression in Insect Cells.** New Insights into Cell Culture Technology, INTEC**,** p. 43-97, 2017.

ANEXO I

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

fmvz - unesp
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

ATESTADO

Atesto que o Projeto "DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA VACINA VETERINÁRIA DE SUBUNIDADE CONTRA RAIVA " **Protocolo CEUA 0147/2017** , a ser conduzido por Mayra Pereira Rocca, responsável/orientador Helio Langoni, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	01/09/2017 a 31/05/2019
Nome Comum / Espécie / Linhagem	CAMUNDONGO / MUS MUSCULUS / balb/c
Raça	
Nº de animais machos	0
Nº de animais fêmeas	150
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	0
Peso médio de animais fêmeas	20g
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	0 ano(s) e 0 mes(es) e 21 dia(s).
Procedência	Biotério Central UNESP Botucatu

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 13/07/2017

PROFª. ASS. DRª. IBIARA CORREIA DE LIMA ALMEIDA PAZ
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Mauricio Corrêa, s/n
UNESP - Campus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
(14) 3880-2176 - patrizia@fmvz.unesp.br - www.fmvz.unesp.br

ANEXO II

RIPA pH 8,0

150mM NaCl + 50mM Tris + 1% NP40 + 0,5% Deoxycholate (q.s.p. 50 mL de H_2O milliQ).

Gel SDS 12% espessura 0,75 mm – 1 mm

Gel: Tris 1,5 M pH 8,8 (1,54 mL) + Acrilamida 40% (1,65 mL) + SDS 20% (27,5 µL) + APS 10% (49,5 µL) + Temed (5 µL) + H2O milliQ (2,3 mL).Stacking: Tris 0,5 M pH 6,8 (490 µL) + Acrilamida 40% (436 µL) + SDS 20% (17,5 µL) + APS 10% (17,5 µL) + Temed (4,5 µL) + H2O milliQ (2,6 mL).

Tampão Carbonato

Solução A: 2,12 g de Carbonato de Sódio Anidro (Na_2CO_3) 0,05 M em 400 mL de H_2O milliQ.

Solução B: 1,68 g de Bicarbonato de Sódio ($NaCO_3$)0,05 Mem 400 mL de H_2O milliQ.

Adicionar a solução A na solução B aos poucos, até que esta atinja o pH 9,6.

Solução de bloqueio 0,3% (ELISA-RVGP)

17,5 g Sacarose+ 10,5 g BSA diluído em 350 ml de Tampão Carbonato

Solução de lavagem (ELISA-RVGP)

PBS 1x + Tween20 a 0,05%

Tampão T4 pH 7,4 sem detergente

1,514 g de Tris 25mM + 0,508 g de $MgCl_2$ 5mM + 0,730 g de NaCl 25mM, q.s.p 500 mL H_2O milliQ. Acertar o para pH 7,4.

Quando necessário, adiciona-se o detergente CHAPS: 5 mL de Tampão T4 + 100 mg de CHAPS.

Tampão citrato pH 5,6

4,668 g de Citrato de Sódio ($Na_3C_6H_5O_7$) + 0,868 g Ácido Cítrico Anidro ($C_6H_8O_7$),q.s.p 400 mL H_2O milliQ.

Solução de cromógeno (ELISA-RVGP)

30 mL de Tampão Citrato pH 5,6 + 60 mg de OPD () + 30 µL de H_2O_2 (Peróxido de Hidrogênio 80%).

Solução Stop (ELISA-RVGP)

Ácido sulfúrico 10% em 100 mL H_2O milliQ.

PBS 1x

8 g NaCl + 1,133 g de Fosfato de Sódio Dibásico dodecaidratado (31,6mM) + 0,2 g de KCl (26,8 mM) + 0,2 g KH_2PO_4 (14,7 mM), q.s.p. 1000 ml.