MARCOS ALEXANDRE NOBRE LEMOS

**CONSTRUÇÃO E TRANSFECCÃO DE VETORES
PLASMIDIAIS CONTENDO O GENE DA GLICOPROTEÍNA DO
VÍRUS DA RAIVA (GPV) EM CÉLULAS DE *DROSOPHILA*
*MELANOGASTER***

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

São Paulo
2009

MARCOS ALEXANDRE NOBRE LEMOS

**CONSTRUÇÃO E TRANSFECCÃO DE VETORES
PLASMIDIAIS CONTENDO O GENE DA GLICOPROTEÍNA DO
VÍRUS DA RAIVA (GPV) EM CÉLULAS DE *DROSOPHILA*
*MELANOGASTER***

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador:

Dr. Carlos Augusto Pereira

Co-orientadora:

Dra. Soraia Attie Calil Jorge

São Paulo
2009

À minha mãe, aos meus irmãos, familiares e amigos
que sempre estiveram me apoiando nos momentos de
conquistas e embates que fizeram parte desse meu
processo de formação.

Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Imunologia Viral e ao Instituto Butantan pela infraestrutura, inestimável auxílio e convivência.

Ao Carlos Augusto Pereira por todo apoio, confiança em meu trabalho e pelas oportunidades que me proporcionou.

À Soraia Attie Calil Jorge pela paciência, suporte, apoio, ensinamentos e transmissão de conhecimento que foram fundamentais para a realização do meu trabalho.

À Carmen Ligia Cuce Nobre, Carmem Lia Nobre Lemos e ao Fabio Luis Nobre Lemos pelo apoio, suporte, paciência e conselhos em todos os momentos vividos durante esse processo de formação.

À minha tia Rita Helena Nobre Gabriades que me deu uma oportunidade que foi de fundamental importância para poder concluir essa dissertação.

À Mariza Gerdulo dos Santos e Alexandra Souza Santos por todos os ensinamentos e convivência no dia-a-dia do laboratório.

Aos colegas do LIV que sempre foram ajudaram para a realização desse trabalho.

Aos demais colegas participantes das discussões durante os workshops sobre Biologia Molecular e Engenharia de Bioprocessos para a Produção de Proteínas Recombinantes com Células de Inseto: Vacinas Virais para Uso Humano e Veterinário.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro do projeto temático (02/09482-3) e bolsa de mestrado (05/51746-6).

Ao programa de pós-graduação Interunidades em Biotecnologia.

Muito obrigado!

“A gente não pode ser aquele garoto tímido toda a vida. Tem que se dar um pouco mais, chegar perto do público sem aquela armadura toda.”

Antônio Carlos Brasileiro de Almeida Jobim (Tom Jobim)

“Tem sido uma amarga penitência para mim digerir a conclusão de que 'essa corrida é para os fortes' e que eu provavelmente farei pouco mais do que me contentar em admirar os avanços que outros obtiveram na ciência.”

Charles Darwin

RESUMO

Lemos MAN. Construção e transfecção de vetores plasmidiais contendo o gene da glicoproteína do vírus da raiva (GPV) em células de *Drosophila melanogaster* [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

O cDNA da glicoproteína do vírus da raiva (GPV) foi clonado em vetores plasmidiais sobre o controle de promotor indutível da metalotioneína (MT). Vetores com ou sem o cDNA do sinal de secreção da proteína BiP (i) e o cDNA que confere resistência ao antibiótico higromicina B (H) foram construídos (pMTGPV, pMTiGPV, pMTGPV-Hygro e pMTiGPV-Hygro). Esses vetores foram transfectados em células S2, e populações celulares foram selecionadas (S2MTGPV, S2MTiGPV, S2MTGPV-H, S2MTiGPV-H). Subpopulações foram obtidas por re-seleção com higromicina B (S2MTGPV*, S2MTiGPV*, S2MTGPV*-H, S2MTiGPV*-H). Em culturas celulares foram examinadas a cinética de crescimento celular, a detecção do RNAm da GPV e a expressão da GPV por citometria de fluxo, microscopia confocal e ELISA. Todas as populações celulares apresentaram cinéticas de crescimento celular similares. Em contraste, as subpopulações apresentaram uma redução relativa no crescimento entre as diferentes populações. Todas as populações celulares apresentaram síntese de RNAm da GPV após indução. A população S2MTGPV-H apresentou níveis 5 vezes maiores na expressão da GPV em análise por citometria de fluxo (~ 50% das células) e por ELISA (~ 0,65 $\mu\text{g}/10^7$ células após 4 dias da indução). A seleção de subpopulações permitiu um aumento de aproximadamente 10 vezes na expressão da GPV, especialmente na população S2MTGPV*-H (~ 5,4 $\mu\text{g}/10^7$ células após 4 dias da indução). O tratamento com butirato de sódio resultou em uma redução de aproximadamente 20% no crescimento celular e um aumento de 50% na GPV expressa pela população S2MTGPV*-H (~ 8,3 $\mu\text{g}/10^7$ células após 4 dias da indução). O meio de cultura SF900 II permitiu um maior crescimento das células S2MTGPV*-H e uma maior síntese de GPV comparado com outros meios de cultura. Nossos dados mostram que a expressão da GPV pôde ser otimizada através da construção de vetores de expressão/seleção, obtenção de subpopulações celulares, da exposição da cromatina e do meio de cultura utilizado.

PALAVRAS-CHAVE: Células S2 de *Drosophila melanogaster*. Expressão de proteína. Sinal de secreção BiP. Glicoproteína do vírus da raiva. “GPV”.

ABSTRACT

Lemos MAN. Constuction and transfection of plasmid vectors with rabies vírus glycoprotein (RVGP) gene in *Drosophila melanogaster* cells [Master thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

The cDNA encoding the entire rabies virus glycoprotein (*RVGP*) gene was cloned in expression plasmids under the control of the inductive metallothionein promoter (MT). They were designed in order to bear or not a cDNA coding for the secretion signal of the molecular chaperone of the endoplasmic reticulum called the BiP immunoglobulin heavy-chain binding protein (i) and a cDNA coding for the selection hygromycin (H) antibiotic (pMTRVGP, pMTiRVGP, pMTRVGP-Hygro, pMTiRVGP-Hygro). These vectors were transfected into S2 cells, cell populations selected (S2MTRVGP, S2MTiRVGP, S2MTRVGP-H, S2MTiRVGP-H) and sub-populations were then obtained by reselection with hygromycin (S2MTRVGP*, S2MTiRVGP*, S2MTRVGP*-H, S2MTiRVGP*-H). Cell cultures were examined for kinetics of cell growth, detection of *RVGP* RNAm and expression of RVGP by flow cytometry, confocal analyses and ELISA. All cell populations showed similar magnitude and kinetic of cell growth. In contrast, sub-populations showed a relative decreased ability to grow and higher kinetic differences among them. All cell populations were shown to express the *RVGP* RNAm upon induction. S2MTRVGP-H cell population were shown to express 5 times higher of RVGP as evaluated by flow cytometry analysis (~ 50 %) and ELISA (~ 0.65 µg/10⁷ cells at day 4 after induction). Sub-population selection allowed a higher RVGP expression, especially for the S2MTRVGP*-H (~ 5.4 µg/10⁷ cells at day 4 after induction). NaBu treatment leading to lower cell growth and higher RVGP expression allowed an even higher RVGP synthesis by S2MTRVGP*-H (~ 8.3 µg/10⁷ cells at day 4 after induction). SF900II medium leading to a higher S2MTRVGP*-H cell growth allowed a higher final RVGP synthesis in this cell culture. The data show that RVGP synthesis may be optimized by the expression/selection vectors design, cell sub-populations selection, chromatine exposure and culture medium employed.

KEYWORDS: *Drosophila melanogaster* S2 cell. Protein expression. Secretion signal BiP. Rabies viral glycoprotein. “RVGP”.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Expressão de genes heterólogos em culturas celulares	12
1.1.1 <i>Expressão em células de Drosophila melanogaster</i>	13
1.2 A raiva e o vírus rábico	16
1.3 Expressão da GPV	18
1.4 Sinal de secreção celular	20
1.4.1 <i>O Chaperone BiP</i>	20
2 OBJETIVO	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Cultura de Bactérias.....	23
3.2 Introdução do DNA Plasmidial em Bactérias	24
3.2.1 <i>Obtenção de bactérias competentes</i>	24
3.2.2 <i>Transformação de bactérias competentes</i>	25
3.3 Preparo de DNA de Plasmídeo	25
3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	26
3.4.1 <i>Seqüenciamento</i>	27
3.4.2 <i>Validação e alinhamento das seqüências</i>	27
3.5 Vetores genéticos.....	27
3.5.1 <i>Vetor pMTiGPV</i>	28
3.5.2 <i>Vetor pMTiGPV-Hygro (ah)</i>	28
3.5.3 <i>Vetor pMTGPV</i>	30
3.5.4 <i>Vetor pMTGPV-Hygro</i>	33
3.6 Cultura de células Schneider 2 (S2)	35
3.6.1 <i>Meios de cultura utilizados</i>	36
3.6.2 <i>Manutenção das células S2</i>	36
3.6.3 <i>Preparo das células para cinética em frascos agitados</i>	36
3.6.4 <i>Congelamento das células S2</i>	36
3.6.5 <i>Descongelamento</i>	37
3.7 Transfecção	37
3.8 Reação PCR após síntese do DNA complementar (RT-PCR)	38
3.8.1 <i>Extração de RNA</i>	39
3.8.2 <i>Tratamento com DNase</i>	39
3.8.3 <i>Síntese do DNA complementar (cDNA)</i>	39
3.9 Análise da expressão de GPV	40
3.9.1 <i>Microscopia de fluorescência</i>	40
3.9.2 <i>Citometria de fluxo</i>	41

3.9.3 ELISA.....	41
3.9.4 “Western Blotting”	43
3.10 Análise estatística.....	45
3.11 Resumo dos ensaios	45
4 RESULTADOS.....	46
4.1 Obtenção de populações celulares portadoras dos vetores genéticos	46
4.1.1 <i>Transcrição do RNAm-GPV em células transfectadas</i>	48
4.2 Análise da GPV por “Western blotting”	48
4.3 Ensaio do efeito da indução no crescimento celular e expressão da GPV	49
4.3.1 <i>Análise da GPV por Microscopia de Fluorescência.....</i>	50
4.4 Comparação da expressão da GPV nas quatro diferentes populações celulares	51
4.4.1 <i>Ensaio I.....</i>	52
4.4.1.1 <i>Análise da produção de GPV por ELISA.....</i>	53
4.4.1.2 <i>Análise por Citometria de Fluxo (FACS).....</i>	54
4.4.2 <i>Ensaio II – Após tratamento com higromicina B.....</i>	56
4.4.2.1 <i>Análise da produção de GPV por ELISA.....</i>	57
4.4.3 <i>Ensaio III – Adição de butirato de sódio.....</i>	60
4.4.3.1 <i>Análise da produção de GPV por ELISA.....</i>	61
4.5 Análise da expressão da GPV da população S2MTGPV-H (Mc 7)	63
4.5.1 <i>Análise em microscopia confocal.....</i>	63
4.5.2 <i>Comparação da expressão da GPV em diferentes meios de cultura</i>	64
4.5.2.1 <i>Análise da produção de GPV por ELISA.....</i>	66
5 DISCUSSÃO.....	68
6 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS.....	74
ANEXOS	80

1 INTRODUÇÃO

Culturas de células animais em grande escala têm sido usadas largamente por laboratórios de investigação básica e por indústrias, para a obtenção de uma grande variedade de produtos destinados à investigação, diagnóstico, uso terapêutico e também controle biológico na agricultura. Um considerável esforço tem sido despendido no sentido de se desenvolver metodologias que permitam o cultivo de linhagens celulares em alta densidade, capazes de levar à produção de grandes quantidades de um determinado produto. Assim, tecnologias para preparação de produtos virais, como antígenos e vacinas em culturas celulares, vêm sendo desenvolvidas há alguns anos com bastante sucesso. São tecnologias que permitem uma produção em larga escala e com alto grau de controle e reprodutibilidade (Ivey-Hoyle, 1991).

Para a preparação de produtos virais, diferentes sistemas de cultura em suspensão têm-se mostrado de grande eficiência. Estes sistemas se baseiam em multiplicação livre das células em suspensão mantida por sistemas adequados de agitação e em ambiente favorável. As células assim cultivadas, após atingirem alta densidade, podem ser infectadas pelo vírus, seguindo-se um processo de multiplicação viral intracelular quando então os produtos virais são coletados e processados. Estes sistemas, devidamente ajustados (padronização e otimização), podem permitir a produção de proteínas de síntese viral. Alternativamente, células de animais podem ser transfectadas com genes heterólogos e durante a cultura expressar estes genes de forma indutível ou constitutiva e, portanto, produzir as proteínas de interesse. Estas etapas são conhecidas como fase de síntese ou “upstream” (Schatzmayr, 2001).

Para preparação do produto viral, a massa celular, o sobrenadante das culturas infectadas, ou de células transfectadas deve passar por processos de concentração e purificação, ou “downstream”. Esses processos constituem etapas importantes nas quais ocorre inevitavelmente uma perda da produtividade obtida. É de todo interesse, portanto, um exaustivo trabalho de otimização da multiplicação celular e, se for o caso, da infecção viral para a obtenção de grandes concentrações de produto durante a fase de síntese, que deverão ser submetidas aos processos de concentração e purificação e deverão guardar propriedades de alta infectividade e ou imunogenicidade (Schatzmayr, 2001).

1.1 Expressão de genes heterólogos em culturas celulares

A tecnologia de DNA recombinante, surgida no início dos anos 70, permitiu a adição de fragmento de ácido nucléico em um hospedeiro e a expressão posterior pelo hospedeiro das proteínas codificadas pelo fragmento introduzido. Dentre suas múltiplas aplicações, a produção de vacinas atraiu o interesse de pesquisadores e, em relativamente pouco tempo, obteve-se diferentes sistemas de expressão de vários genes heterólogos. Em geral, o gene de interesse é inserido em um plasmídeo e este é introduzido nas células, a qual se torna então, capaz de transcrever, traduzir e assim, sintetizar as proteínas de interesse (Schatzmayr, 2001).

Visando altos níveis de produção (McCarroll e King, 1997), diferentes sistemas de expressão gênica foram desenvolvidos, uma vez que há a necessidade de se inserir o gene heterólogo de interesse para a produção da proteína nas culturas celulares. Células eucarióticas, por exemplo, são capazes não só de traduzir uma determinada proteína heteróloga através da adição do seu respectivo gene, como também processá-la realizando as alterações pós-traducionais necessárias para sua manutenção, localização e função. Entre as células animais que têm sido usadas para este fim, encontramos as células de mamíferos, que embora tenham capacidade de incorporar, manter, expressar constitutivamente e processar convenientemente genes heterólogos, exigem condições de cultura delicadas e dispendiosas (Tartaglia e Paoletti, 1990; Jorge *et al.*, 1995; Jorge *et al.*, 1996; Kazanji *et al.*, 1997). Células de insetos, como as células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) têm sido, pelas suas condições facilitadas de cultura, largamente usadas para expressão de genes transportados por vírus (baculovírus). Este sistema mostra, no entanto, o inconveniente de se constituir num sistema de expressão gênica transiente e não permanente, além de exigir especificamente o sistema derivado de baculovírus (Summers e Smith, 1987; Pfeifer *et al.*, 1997).

Alternativamente, têm-se desenvolvido sistemas de expressão em células de drosófila. Estes sistemas mostram ótimos resultados em relação aos demais, produzindo um elevado nível de expressão das proteínas heterólogas (Brighty *et al.*, 1991; Buckingham *et al.*, 1996). Isto se deve, provavelmente, ao uso de eficientes promotores gênicos e ao elevado número de cópias de plasmídeos encontrados por célula transfectada (McCarroll e King, 1997). Porém, dificuldades em crescer culturas em baixa densidade foram observadas (Jorge *et al.*, 2008), podendo limitar os processos iniciais de obtenção de linhagens recombinantes. Ainda assim, estratégias de produção de proteínas têm sido desenvolvidas em células de drosófila, visando

um elevado nível de expressão de genes heterólogos (Culp *et al.*, 1991; Buckingham *et al.*, 1996; Shotkoski *et al.*, 1996; Deml *et al.*, 1999; Benting *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Mendonca *et al.*, 2008; Swiech *et al.*, 2008b; Swiech *et al.*, 2008c).

1.1.1 Expressão em células de *Drosophila melanogaster*

Cerca de 94 linhagens de células de drosófila são independentemente cultivadas, das quais 12, aproximadamente, têm sido mais facilmente manipuladas. Para a expressão de genes heterólogos, duas linhagens de células Schneider têm sido bastante utilizadas, as linhagens S2 e S3 (Cherbas *et al.*, 1994). Ambas constituem células semi-aderentes derivadas de uma cultura primária de embriões em estágios tardios de desenvolvimento.

Dentre as vantagens do sistema de expressão gênica em células de drosófila observa-se a alta taxa de crescimento celular, a simplicidade de manipulação, além das condições de manutenção não requererem atmosfera de gás carbônico (CO₂) e serem capazes de cultivo em temperatura ambiente. Estas características tornam a cultura de células de inseto vantajosa economicamente, pois requer baixo custo para sua manutenção e manipulação (Bovo *et al.*, 2008; Swiech *et al.*, 2008a).

Diversas proteínas já foram expressas em células de drosófila S2. Li *et al.* (1996) expressaram a dopamina β hidroxilase humana em células S2. A proteína produzida apresentou peso molecular abaixo do esperado, porém manteve sua atividade enzimática, sendo expressa e secretada numa taxa superior a 16 mg/L de cultura celular. Posteriormente, Nilsen e Castellino (1999) produziram o plasminogênio humano nesta mesma linhagem celular (S2), obtendo de 10-15 mg/L de cultura celular de proteína secretada. O plasminogênio humano produzido em S2 não foi analisado quanto à estrutura, mas manteve as mesmas propriedades encontradas na proteína do plasma humano.

O antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), também já foi expresso em células S2, através da co-transfecção de um vetor sob controle de um promotor da metalotioneína (pMT) juntamente com um vetor de seleção, este constitutivo contendo o gene da dihydrofolato redutase sob o comando do promotor da actina 5C de drosófilas. O HBsAg também já foi expresso pela transfecção de um único vetor, este contendo o gene de seleção no próprio vetor. Observou-se com estas abordagens que os clones de células selecionadas expressaram o antígeno viral, sendo que os melhores resultados são provenientes das co-

transfecções e alcançaram concentrações superiores a 4,75 µg/mL, em detrimento aos resultados obtidos nas transfecções de um único vetor com o qual a expressão do antígeno chegou a apenas 2,95 µg/mL (Deml *et al.*, 1999).

Células S2 foram recentemente co-transfectadas com o plasmídeo contendo o gene da EGFP (proteína verde fluorescente) sob o controle de um promotor da metalotioneína e com um outro vetor contendo o gene de seleção (higromicina). Após a seleção com higromicina aproximadamente 90% de células recombinantes estavam fluorescentes após o quinto dia de indução (Santos *et al.*, 2007).

A glicoproteína G do vírus rábico (rRVGP) também foi expressa em células S2 (Yokomizo *et al.*, 2007; Astray *et al.*, 2008) alcançando concentrações de 0,3 a 1,0 mg/L de proteína. Da mesma forma, a proteína E do vírus de encefalite japonesa (JEV) foi expressa nessas células. A expressão da proteína E (JEV) foi analisada por imunofluorescência, microscopia confocal e “*Western Blotting*”. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que a proteína produzida apresentava o mesmo peso molecular esperado, além de manterem antigenicidade contra três diferentes anticorpos monoclonais (Zhang *et al.*, 2007).

Outras proteínas de interesse biotecnológico foram expressas em células de drosófila como a “menin” humana. Esta proteína caracteriza-se principalmente por atuar como potencial supressor de tumor em neoplasia endócrina do tipo 1, uma síndrome familiar autossômica dominante. Neste estudo, Valle *et al.* (2001) caracterizaram o processo de produção da proteína expressa a partir de células co-transfectadas com um vetor indutível por sulfato de cobre portador do gene que codifica para “menin” sob controle de um promotor indutível por metais e um vetor portador do gene de resistência a higromicina. Após a otimização da expressão da proteína através de cinéticas de indução com diferentes concentrações de sulfato de cobre, bem como estudos de crescimento celular em frascos agitados os autores conduziram um ensaio em larga escala em um fermentador de 10 litros recuperando 1 a 2 mg da proteína expressa por cada litro de meio de cultura.

Em um trabalho recente, o sistema de expressão em células S2 destacou-se por sua utilização na intervenção terapêutica para doença de Alzheimer. Chang *et al.* (2005) publicaram seu trabalho onde expressaram em células de drosófila a β -secretase humana. Esta enzima é responsável pela formação de um amilopectídeo $\alpha\beta$ presente nas placas cerebrais que se formam no desenvolvimento da doença de Alzheimer. O foco desse estudo foi utilizar um sistema de expressão para produção de β -secretase ativa, uma vez que a glicosilação desta proteína é essencial para sua atividade e a produção da enzima é de crucial importância para o

desenvolvimento de um inibidor da β -secretase para futuros estudos de controle da doença. Para isso, os autores optaram por co-transfectar um vetor de expressão onde a β -secretase se encontra sob comando de um promotor indutível (pMT) e um outro vetor contendo os cDNAs da β 1, 4 galactosiltransferase e da α 2,6 siaciltransferase (enzimas responsáveis por algumas modificações pós-traducionais) e ainda o vetor de seleção pCoHygro. Foi constatado que o peso molecular da proteína expressa aumentou de 56 kDa para 61 kDa e que a β -secretase recombinante possuía resíduos de galactose e ácido siálico ligados em sua estrutura. A atividade da enzima expressa pelas células S2 co-transfectadas mostrou-se 260% maior quando comparada com células S2 transfectadas somente com o vetor de expressão da β -secretase, demonstrando a possibilidade de introduzir o cDNA de glicosiltransferases humano em células S2 para aumentar a capacidade de glicosilação das células S2 e com isso aumentar a atividade das proteínas recombinantes produzidas neste sistema.

Assim, a expressão das proteínas heterólogas em células S2 pode variar de acordo com as propriedades estruturais e funcionais da proteína, tornando-se maioria das vezes, um sistema alternativo e eficiente, capaz de permitir o estudo da expressão de genes heterólogos para a produção de imunobiológicos em larga escala, com possível redução de custo e risco.

Desta forma, neste trabalho optamos em estudar o sistema de expressão em células de drosófilas, através da análise da expressão do antígeno do vírus rábico (GPV). Para isso, comparamos a expressão de GPV em células S2 transfectadas com um único vetor contendo os genes de seleção e expressão e células co-transfectadas com dois vetores um contendo o gene de seleção e outro de expressão. Em ambas as estratégias há vantagens e desvantagens teóricas, que se encontram sumarizadas na tabela 1, que foram estudadas neste trabalho.

Tabela 1. Vantagens e desvantagens do sistema de transfecção e co-transfecção.

Sistema	Vantagens	Desvantagens
Transfecção (vetor único)	<ul style="list-style-type: none">• Seleção de células com os genes de expressão e de seleção	<ul style="list-style-type: none">• Vetores maiores• Menor eficiência de integração
Co-transfecção (vetor de interesse e vetor de seleção)	<ul style="list-style-type: none">• Vetores menores• Maior eficiência de integração	<ul style="list-style-type: none">• Possível seleção de células com apenas o vetor de seleção

1.2 A raiva e o vírus rábico

O agente causador da raiva é um vírus da família Lyssavirus, capaz de infectar várias espécies de mamíferos. A transmissão viral ocorre por mordedura de animais contaminados, uma vez que o vírus rábico é encontrado na saliva e a enfermidade é fatal (Bahloul *et al.*, 1998).

Os sinais da raiva humana são inicialmente muito discretos, como febre, cefaléia, respostas emocionais exageradas (ansiedade e agressividade), desânimo, insônia e uma sensação profunda de mal - estar. Em animais, a raiva pode ficar incubada por um período de 20 a 50 dias. Os sintomas são os mesmos que aparecem nos homens, paralisia ocular também é freqüente, assim como a agressividade e a ansiedade (Bahloul *et al.*, 1998).

A raiva, também conhecida como um tipo de encefalomielite é responsável por cerca de 60 mil mortes humanas em todo o mundo. Dez milhões de tratamentos pós-exposição contra o vírus rábico são calculados por ano, tanto em países desenvolvidos como não (Bahloul *et al.*, 1998). Os principais agentes transmissores da raiva são os mamíferos silvestres, devido à dificuldade de vaciná-los em massa. Atualmente, no Brasil, os morcegos são as principais fontes de estoque do vírus rábico, transmitindo a raiva não só para os animais domésticos, mas principalmente para herbívoros, como bovinos e eqüinos.

O vírus se propaga unicamente pelo caminho dos nervos, uma vez atingido o centro nervoso vai se multiplicar e criar lesões, as quais irão resultar na raiva encefálica. As durações destes processos combinadas, ou seja, migração e multiplicação representam a duração do período de incubação (Debré e Cellers, 1970).

A velocidade de invasão não parece estar relacionada com a distância percorrida pelo vírus, desde a mordida até o cérebro, mas a quantidade de inervações da região justifica a possibilidade de "fixação" imediata e da multiplicação do vírus. Isto explica o fato de que feridas na face tenham menor período de incubação do vírus (Debré e Cellers, 1970).

A vacina contra a raiva foi inicialmente produzida através da purificação e inativação do vírus rábico de cérebro de camundongos infectados. Esta vacina ainda tem sido utilizada em muitos países tanto para uso humano quanto veterinário. Atualmente, o vírus rábico purificado e inativado de culturas celulares têm sido comercialmente disponíveis para a vacinação contra a raiva e novas tecnologias têm sido estudadas para eliminar-se a utilização do cultivo do vírus rábico vivo na produção da vacina. Além da vacina, a produção de soro

anti-rábico também é importante no controle da doença, uma vez que o tratamento pós-exposição através de soro e vacina mostra-se bastante protetor (Bahloul *et al.*, 1998).

Como mostra a figura 1 o vírus rábico é um vírus em forma de projétil, que possui uma fita simples de RNA negativo como material genético, com diâmetro de 75 nm e comprimento de 100-300 nm. É um vírus não-lítico que não produz efeitos citopáticos, tendo grande afinidade por neurônios (Debré e Cellers, 1970). Produz cinco proteínas: a nucleoproteína N, a fosfoproteína P, uma RNA polimerase L, a proteína de matriz M e a glicoproteína de superfície G, ou GPV. As proteínas N, P e L se unem formando um complexo ribonucleoprotéico conhecido como RNP, a glicoproteína G (GPV) é uma proteína transmembrana que forma o envelope viral (Delagneau *et al.*, 1981) e induz a produção de anticorpos neutralizantes (VNAb) que protegem contra o ataque viral (Perrin *et al.*, 1985). Alguns estudos demonstraram também a indução de resposta imune através dos complexos RNP em camundongos e macacos.

Figura 1. Esquema do vírus rábico e suas proteínas.

Atualmente a raiva tem sido praticamente erradicada no Brasil. Porém o número de morcegos infectados pelo vírus rábico tem crescido significativamente no estado de São Paulo e em consequência vários eqüinos e bovinos têm sido infectadas, vítimas da mordedura dos morcegos. Portanto, torna-se preocupante o monitoramento e estudo de vacinas mais baratas e eficazes contra a raiva.

1.3 Expressão da GPV

A glicoproteína do vírus rábico é a única proteína exposta na superfície da partícula viral e é mediadora na adesão aos receptores celulares e também na entrada na célula hospedeira. A estrutura da glicoproteína, uma proteína transmembrana do tipo 1, consiste em um domínio citoplasmático, um domínio transmembrânico e um ectodomínio exposto como trímeros na superfície do vírus (Gupta *et al.*, 2005). O peso molecular da glicoproteína na forma monomérica é de 65 kDa e na forma trimérica é de 195 kDa.

A GPV tem sido reconhecida como um antígeno capaz de induzir anticorpos neutralizantes do vírus, conferindo imunidade protetora contra raiva, resultando no interesse de produzi-la nos mais diversos sistemas de expressão conhecidos. Por esta razão a expressão do gene da GPV tem sido estudada tanto em células eucarióticas (Lathe *et al.*, 1984; Lecocq *et al.*, 1985) quanto em procarióticas (Kieny *et al.*, 1984; Prehaud *et al.*, 1989). A proteína expressa em bactérias falhou na proteção de camundongos após desafio, provavelmente porque procariotos não são capazes de realizar adequadamente a glicosilação de proteínas (modificações pós-traducionais) que seriam fundamentais para a atividade da GPV. Neste sentido, sistemas de expressão em células de mamíferos também foram testados. Morimoto *et al.* (1992), construíram um vetor derivado de retrovírus contendo o gene da GPV. Esse vetor permitiu a expressão de GPV em células de neuroblastoma (NA) e células de rim de hamster (BHK-21). A proteína produzida foi corretamente glicosilada apenas em células BHK-21, sugerindo que as alterações pós-traducionais dependem também das condições celulares sob as quais a proteína é metabolizada. Mochizuki *et al.* (1998), utilizaram HIV-1 defeutivo e também observaram produção de GPV em células humanas HEK293-T.

Em leveduras *Saccharomices cerevisiae*, Klepfer *et al.* (1993), expressaram a proteína G do vírus rábico utilizando um vetor de expressão sob controle de um promotor indutível (metalotioneína) e um promotor constitutivo (triose desidrogenase). A glicoproteína foi glicosilada e encontrou-se associada à membrana das leveduras, porém extratos de levedura contendo a proteína G protegeram animais em desafio intramuscular, mas não no desafio intracerebral com camundongos.

Estudos da expressão da GPV em células de inseto *Spodoptera frugiperda* (Sf9) utilizando um baculovírus recombinante foram realizados. Prehaud *et al.* (1989), demonstraram através da construção de um baculovírus recombinante com o gene da GPV sob

comando do promotor da poliedrina que a GPV expressa manteve as características estruturais e imunogênicas nessas culturas. Tuchiya *et al.* (1992), verificaram que a GPV produzida por baculovírus recombinante é capaz de se fundir formando complexos em condições de baixo pH. Assim, os diferentes sistemas de expressão gênica podem ser mais uma alternativa barata e efetiva para produção de imunobiológicos para diagnósticos e ou vacinas.

Além disso, a GPV solúvel (sem a região transmembrânica) produzida em células de mamíferos apresentou estrutura monomérica e antigênicamente diferente da forma ancorada na membrana, que apresenta estrutura trimérica (Maillard e Gaudin, 2002; Gupta *et al.*, 2005). A glicoproteína trimérica na sua forma ativa, como a encontrada nos vírus, apresenta uma estrutura diferenciada com sítios distintos em relação às outras formas inativas da proteína (Gaudin *et al.*, 1993). A figura 2 mostra um esquema da GPV trimérica e monomérica com seus sítios de reconhecimento.

Figura 2. Esquema da GPV sintetizada como trímero e monômero em vista lateral e superior com sítios reconhecidos pelos anticorpos. Esquema modificado de Sissoeff *et al.* (2005).

Assim, optamos em utilizar a expressão da GPV a fim de monitorar o sistema de expressão em células de drosófilas, como um sistema alternativo aos de células de mamífero, uma vez que a GPV, por se encontrar na superfície do vírus e ser responsável pela indução de resposta imunológica protetora, sendo um constituinte fundamental da vacina anti-rábica.

1.4 Sinal de secreção celular

Células eucariontes possuem um sistema de secreção celular mediante ação do retículo endoplasmático e complexo de Golgi, nesse processo o RNA mensageiro possui um sinal que promove a associação do ribossomo ao retículo endoplasmático (Alberts *et al.*, 1989).

No sistema de expressão em células de *Drosophila melanogaster* diversas proteínas foram expressas com a utilização do sinal de secreção da proteína BiP de drosófila (Kirkpatrick *et al.*, 1995; Schamel *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2007). Segundo as informações apresentadas pela Invitrogen™ o sinal de secreção BiP atua como um sinal para a via de secreção celular.

1.4.1 O Chaperone BiP

O sinal de secreção da proteína BiP tem a função de direcionar o RNA mensageiro para a via de secreção celular, entretanto, o chaperone BiP tem a função de prevenir a liberação de proteínas incompletas do retículo endoplasmático (Haas e Wabl, 1983; Ellis, 1987; Kirkpatrick *et al.*, 1995).

Como foi sugerido por Haas e Wabl (1983), Kirkpatrick *et al.* (1995) e Schamel *et al.* (2003), esse chaperone também atua na correta formação do dímero da cadeia leve com a cadeia pesada no processo de síntese de anticorpos em células de drosófila S2. Na produção da glicoproteína da raiva em células BSR a função do chaperone também foi estudada e, verificou-se que as proteínas que não foram corretamente glicosiladas permaneciam associadas a essa proteína (Gaudin, 1997). Estes estudos sugerem que essa proteína se comporta de maneira semelhante em célula de mamífero e em célula de inseto.

Uma vez que a GPV é reconhecida como uma proteína imunogênica capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes em animais e é facilmente detectada por imunoensaídeos específicos, decidimos utilizar essa proteína para o estudo de expressão heteróloga em células de *Drosophila melanogaster* S2.

Assim, estudamos a expressão da proteína GPV em células de S2 utilizando vetores contendo ou não o sinal de secreção BiP e ainda com um único vetor com gene de resistência a higromicina B ou com dois vetores diferentes (um vetor de expressão e um de seleção). Para

a análise da expressão da GPV, utilizamos imunoensaios por ELISA, ensaios de imunofluorescência, FACS e “*Western blotting*” com a finalidade de comparar os diferentes sistemas de expressão utilizados.

2 OBJETIVO

Este trabalho teve como principal objetivo estudar o sistema de expressão de GPV em células de drosófilas, para isso, também visamos:

- Construir diferentes vetores plasmidiais utilizando o gene da glicoproteína do vírus da raiva (GPV) e de resistência a higromicina B.
- Transfectar estes vetores em células S2 de *Drosophila melanogaster*.
- Comparar:
 - sistemas de transfecção e co-transfecção.
 - expressão da GPV em vetores contendo ou não o sinal de secreção da proteína BiP.
- Analisar a expressão da GPV por ELISA, imunofluorescência, FACS.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de Bactérias

Nos experimentos de transformação bacteriana utilizou-se a cepa de *Escherichia coli* DH5 α e TOP10, cujos genótipos são:

DH5 α : (supE44 Δ lacU 169(ϕ 80 lacZ Δ M15) hasd R17 rec A1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1)

TOP10: mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80 lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

Os meios de cultura de bactéria foram preparados com água MilliQ e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Para culturas sólidas, o meio LB foi acrescido de 16 g de ágar por litro e distribuídos em volumes de 12 a 25 mL em placas de Petri de 10 ou 15 cm de diâmetro. Quando adequado após esterilização e resfriamento foi adicionado 50 mg/L de ampicilina (filtrada em filtro 0,22 μ m) isoladamente ou em conjunto com 20 mg/L de higromicina B (filtrada em filtro 0,22 μ m)

➤ LB:

- 2% Lennox L Broth Base[®] (Invitrogen[™])

➤ SOB:

- 2% bactotripton
- 0,5% extrato de levedura
- 10 mM NaCl
- 2,5 mM KCl
- 10 mM MgCl₂
- 10 mM MgSO₄
- pH 6,8 -7,0

➤ SOC:

- Meio SOB
- 20 mM de glicose

3.2 Introdução do DNA Plasmidial em Bactérias

O protocolo utilizado para transformação de bactéria foi baseado na técnica descrita por Hanahan (1983).

3.2.1 Obtenção de bactérias competentes

Soluções:

➤ RF I:

- 100 mM KCl
- 50 mM MnCl_2
- 30 mM acetato de potássio
- 10 mM CaCl_2
- 15% glicerol

➤ RF II:

- 10 mM NaMOPS
- 10 mM KCl
- 75 mM CaCl_2
- 15% glicerol

As bactérias competentes para transformação por choque térmico foram obtidas da seguinte maneira: Após a bactéria ter sido estriada por esgotamento em placa LB ágar e incubada a 37 °C por 20 horas, uma colônia foi inoculada em 3 mL de meio SOB e mantida a 37 °C por 16 horas sob agitação de aproximadamente 250 rpm. Quando o meio de cultura já estava com DO entorno de 0,8 a 600 nm, foram adicionados 100 mL de meio SOB e as bactérias foram novamente incubadas a 37 °C com agitação, por aproximadamente 2 horas, até a cultura atingir uma DO entre 0,3 e 0,5 a 600 nm.

A essa suspensão foi adicionado 1 mL de solução de MgCl_2 (1 M), mantida no gelo por 15 minutos e precipitada por centrifugação a 1.000 g por 12 minutos a 4 °C (centrífuga Eppendorf). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 20 mL de solução RF I, mantendo os tubos no gelo por 15 minutos.

Passado esse tempo, a suspensão foi novamente centrifugada a 1.000 g por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 4 mL de solução RF II. Alíquotas de 400 µL em microtubos foram congeladas em nitrogênio.

3.2.2 Transformação de bactérias competentes

As bactérias competentes, preparadas como anteriormente descrito, foram descongeladas em gelo e aliquoteadas em 30, 50 ou 100 µL em microtubos. Adicionou-se a cada alíquota 10% v/v de solução contendo DNA do plasmídeo (ou da ligação). Após 30 minutos no gelo, as bactérias foram submetidas a um choque térmico a 42 °C por 45 segundos e imediatamente resfriadas e mantidas em gelo por 2 minutos. Um volume de LB, 9 vezes o volume da suspensão de bactérias, foi adicionado e essa suspensão foi incubada a 37 °C por 1 hora e meia. Passado esse tempo as bactérias foram espalhadas em placas de meio LB sólido com antibióticos adequado a seleção dos plasmídeos e incubadas a 37 °C por 12 a 18 horas.

3.3 Preparo de DNA de Plasmídeo

A extração de DNA foi feita por lise alcalina, adaptada da técnica elaborada por Birnboim e Doly (1979).

Extração de DNA em pequena escala: “miniprep”

Soluções:

- GTE:
 - 50 mM glicose
 - 25 mM Tris-base (pH 8,0)
 - 10 mM EDTA (pH 8,0)
- NaOH/SDS
 - 0,2 N NaOH
 - 1% SDS

Uma colônia bacteriana contendo o plasmídeo foi inoculada em 1,5 mL de meio LB contendo antibiótico e incubada a 37 °C com agitação por 16 horas.

Passada a incubação, as bactérias foram centrifugadas a 10.000 g por 2 minutos (microcentrífuga Eppendorf) e o sobrenadante descartado. O precipitado das células foi ressuspensão em 50 µL de GTE e em seguida adicionou-se 100 µL de NaOH/SDS homogeneizado por eversão. Após 5 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 100 µL de Acetato de amônio 8 M e o tubo colocado em gelo por 10 minutos.

O material foi centrifugado a 20.000 g por 15 minutos após a incubação em gelo. O sobrenadante, então, foi transferido para um novo tubo.

O DNA foi precipitado com adição de 0,6 volumes de isopropanol e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA lavado com etanol 70 %, seco e ressuspensão em 50 µL de tampão TE.

3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O gene da GPV foi amplificado pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se a enzima *Platinum Taq* DNA polimerase (InvitrogenTM Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Foram utilizados iniciadores (“*primers*”) específicos para a amplificação (Tabela 2).

As reações foram realizadas com volume final de 50 µL nas seguintes condições: 20 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP (10 mM), 0,4 pmol/µL de cada iniciador, 2,5 unidades da enzima *Platinum Taq* DNA polimerase e 5 µL de DNA. Os reagentes utilizados foram da marca InvitrogenTM.

Os ciclos de variação de temperatura utilizados na PCR foram: 94 °C por 30 segundos, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 50 °C por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos com uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

Tabela 2. Sequência dos iniciadores utilizados nas reações de amplificação.

Iniciadores	Sequência (5' → 3')
MT F	CATCTCAGTGCAACTAAA
BGH R	TAGAAGGCACAGTCGAGG

3.4.1 Seqüenciamento

Para as reações de seqüenciamento o produto da amplificação foi identificado e quantificado em gel de agarose 1% com brometo de etídeo (0,5 µg/mL). A quantificação foi realizada por comparação de bandas com padrão de massa, High DNA Mass Ladder (InvitrogenTM Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), conforme orientação do fabricante.

A concentração de DNA utilizado nas reações de seqüenciamento foi determinada de acordo com o tamanho do produto de PCR e seguindo as orientações do kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, USA). Para o tamanho do fragmento seqüenciado (~550 pb) foram utilizados 15 ng de DNA por reação.

Foi utilizada a técnica de seqüenciamento por PCR modificada da metodologia de Sanger *et al.* (1977), com dideoxynucleotídeos (ddNTPs) marcados com fluorescência. Para o seqüenciamento foram utilizados os iniciadores da tabela 2.

3.4.2 Validação e alinhamento das seqüências

As seqüências de nucleotídeos obtidas do gene GPV foram analisadas e validadas utilizando os programas *Pher-Pharp-Consed* (Ewing e Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998; Gordon *et al.*, 1998). Em seguida as seqüências foram alinhadas no programa *Clustal X* (Thompson *et al.*, 1997) juntamente com a seqüência da GPV referência M13215 obtida do *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) inserida no vetor pMT/V5-HisA (InvitrogenTM).

3.5 Vetores genéticos

Quatro diferentes vetores foram obtidos para as análises de expressão da GPV em células S2. Basicamente esses vetores diferem em: possuir ou não o sinal de secreção BiP e possuir ou não o gene de resistência à higromicina. Além disso, todos os vetores possuem o promotor indutível da metalotioneína (pMT), seqüência de poli-adenilação do vírus SV40, resistência a ampicilina, origem de replicação em bactérias e epítipo de detecção V5.

3.5.1 Vetor pMTiGPV

No vetor pMTiGPV (Figura 3) o cDNA da GPV está sob controle do promotor indutível da metalotioneína de drosófilas com o sinal de secreção BiP. Esse vetor foi construído anteriormente no laboratório e cedido para utilização nesse trabalho (Yokomizo, 2006; Yokomizo *et al.*, 2007).

Figura 3. Mapa do vetor pMTiGPV. pMt corresponde ao promotor do gene da metalotioneína de drosófila, BiP ao sinal de secreção, GPV ao cDNA da glicoproteína do vírus da raiva, SV40 à sequência de poli-adenilação do vírus SV40 e V5 ao epítipo da proteína V5. O gene que confere resistência a ampicilina (ampicillin) e a origem de replicação em bactérias (pUC ori) também estão presentes nesse vetor.

3.5.2 Vetor pMTiGPV-Hygro (ah)

Para a construção do vetor pMTiGPV-Hygro (contendo o gene da GPV, o sinal de secreção BiP e com o gene de resistência à higromicina no mesmo vetor) foi inserido o fragmento contendo o gene de resistência a higromicina B sob controle do promotor pCopia (gene de seleção) retirado do vetor pCoHygro (InvitrogenTM) no vetor pMTiGPV (Figura 4).

Primeiramente, os vetores pMTiGPV e pCoHygro (InvitrogenTM) foram digeridos com as enzimas *Hpa I* e *Pvu II*, respectivamente, por 16 horas a 37 °C. Após a digestão as amostras foram aplicadas em gel de agarose 0,8% e submetidas à eletroforese. Como observamos na figura 4, a partir da digestão, foram obtidos os vetores pMTiGPV linearizado com 5227 pb e o vetor pCoHygro (InvitrogenTM) com dois fragmentos um de 2364 pb

contendo o pUC ori e o gene para resistência à ampicilina e outro de 2162 pb contendo o gene de seleção.

Para a ligação do vetor pMTiGPV linearizado ao fragmento contendo o gene de seleção, ambos foram purificados do gel de agarose com o kit “*Wizard® SV gel and PCR Clean-Up System*” (Promega, Madison, WI, USA) e ligados na proporção de 1:3 com o kit *LigaFast™ Rapid DNA Ligation System* (Promega, Madison, WI, USA) por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a ligação os vetores obtidos foram amplificados em bactérias para análise da construção.

Para a amplificação das ligações, bactérias *Escherichia coli* cepa DH5α foram transformadas e cultivadas em meio LB sólido contendo os antibióticos ampicilina (50 µg/mL) e higromicina B (20 µg/mL).

Das colônias de bactérias que cresceram, foram extraídos os plasmídeos por “miniprep” e a confirmação da construção do vetor pMTiGPV-Hygro e a orientação do fragmento foi verificada através da análise do padrão de restrição das digestões com as enzimas de restrição *Eco RI*, *Xba I* e *Pst I* (dado não mostrado). O padrão de restrição mostrou que o fragmento se ligou no sentido anti-horário.

Uma vez obtido o vetor pMTiGPV-Hygro (ah) este foi utilizado para transfectar células S2, como será descrito a seguir.

Figura 4. Construção do vetor pMTiGPV-Hygro (ah). Mapa do vetor pMTiGPV (a esquerda) e padrão de restrição em gel de agarose 0,8% desse vetor (1), o mesmo linearizado com Hpa I (2) e o padrão de peso molecular (M); mapa do vetor pCoHygro (Invitrogen™) (a direita) e padrão de restrição em gel de agarose 0,8% desse vetor (3), o mesmo digerido com Pvu II (4) e o padrão de peso molecular (M); mapa do vetor pMTiGPV-Hygro (ah) (embaixo). pMT corresponde ao promotor do gene da metalotioneína de drosófila, BiP ao sinal de secreção, GPV ao cDNA da glicoproteína do vírus da raiva, SV40 à sequência de poli-adenilação do vírus SV40 e V5 ao epítipo da proteína V5. pCopia corresponde ao promotor do gene que confere resistência a higromicina B (Hygromycin). O gene que confere resistência a ampicilina (ampicillin) e a origem de replicação em bactérias (pUC ori) também estão presentes nesses vetores.

3.5.3 Vetor pMTGPV

Analizando os resultados preliminares da expressão da GPV pelas células modificadas com os vetores pMTiGPV e pMTiGPV-Hygro (ah) que apresentam o sinal de secreção BiP

decidimos construir vetores sem o sinal de secreção BiP. Primeiramente construímos o vetor pMTGPV, contendo o gene da GPV sob controle do promotor indutível da metalotioneína de *drosófilas*.

Para essa construção, os vetores pMT/V5-HisA (InvitrogenTM) e pGPV/PV (cedido gentilmente por Yves Jacob, Instituto Pasteur, Paris–França) foram digeridos com as enzimas *Eco RI* e *Not I* por 16 horas a 37 °C. Após a digestão as amostras foram aplicadas em gel de agarose 0,8% e submetidas à eletroforese. Como observamos na figura 5, a partir da digestão, foram obtidos os vetores pMT/V5-HisA (InvitrogenTM) linearizado com 5227 pb e o vetor pGPV/PV com dois fragmentos um de 5475 pb e outro de 1627 pb contendo o gene da GPV.

Para a ligação do vetor pMT/V5-HisA (InvitrogenTM) linearizado ao fragmento contendo o gene da GPV, ambos foram purificados do gel de agarose com o kit “*Wizard[®] SV gel and PCR Clean-Up System*” (Promega, Madison, WI, USA) e ligados na proporção de 1:3 com o kit *LigaFastTM Rapid DNA Ligation System* (Promega, Madison, WI, USA) por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a ligação os vetores obtidos foram amplificados em bactérias para análise da construção.

Para a amplificação das ligações, bactérias *Escherichia coli* cepa DH5α foram transformadas e cultivadas em meio LB sólido contendo ampicilina (50 µg/mL). Das colônias de bactérias que cresceram, foram extraídos os plasmídeos por “miniprep” e a confirmação da construção do vetor pMTGPV foi verificada pela PCR (Figura 6) com os iniciadores MT F e BGH R (Tabela 2) e a orientação do fragmento foi confirmada através da análise do padrão de restrição das digestões com as enzimas de restrição *Apa I* e *Hind III* (dado não mostrado) e também pelo sequenciamento das regiões terminais (ANEXO A).

Uma vez obtido o vetor pMTGPV, este foi utilizado para construção do vetor pMTGPV-Hygro (ah) e para transfectar células S2, como descrito a seguir.

Figura 5. Construção do vetor pMTGPV. Mapa do vetor pMT/V5-His A (Invitrogen™) (a esquerda) e padrão de restrição em gel de agarose 0,8% desse vetor (1), o mesmo linearizado com Eco RI e Not I (2) e o padrão de peso molecular (M); mapa do vetor pG PV/PV (a direita) e padrão de restrição em gel de agarose 0,8% desse vetor (3), o mesmo digerido com Eco RI e Not I (4) e o padrão de peso molecular (M); mapa do vetor pMTGPV (embaixo). pMT corresponde ao promotor do gene da metalotioneína de drosófila, GPV ao cDNA da glicoproteína do vírus da raiva, SV40 à sequência de poli-adenilação do vírus SV40 e V5 ao epítipo da proteína V5. pCopia corresponde ao promotor do gene que confere resistência a higromicina B (Higromycin). O gene que confere resistência a ampicilina (ampicillin) e a origem de replicação em bactérias (pUC ori) também estão presentes nesses vetores.

Figura 6. Padrão de restrição dos fragmentos gerados em PCR do vetor pMTGPV em gel de agarose 2%. Marcador de peso molecular (M); pMTGPV (1); fragmento amplificado da região de inserção do gene da GPV (2).

3.5.4 Vetor pMTGPV-Hygro

Para a construção do vetor pMTGPV-Hygro, contendo o gene da GPV e com o gene de resistência à higromicina no mesmo vetor, foi usado o vetor pMTGPV para a inserção do fragmento contendo o gene de resistência a higromicina B sob controle do promotor pCopia (gene de seleção) retirado do vetor pCoHygro (InvitrogenTM) (Figura 7).

Primeiramente, o vetor pMTGPV foi digerido com a enzima *Hpa I* e o vetor pCoHygro (InvitrogenTM) foi digerido com as enzimas *Pvu II* e *Ahd I*, por 16 horas a 37 °C. Após a digestão as amostras foram aplicadas em gel de agarose 0,8% e submetidas à eletroforese. Como observamos na figura 7, a partir da digestão, foram obtidos os vetores pMTGPV linearizado com 5119 pb e o vetor pCoHygro (InvitrogenTM) com três fragmentos um de 2162 pb contendo o gene de seleção, outros dois de 1069 pb e 1295 pb.

Para a ligação do vetor pMTGPV linearizado ao fragmento contendo o gene de seleção, ambos foram purificados do gel de agarose com o kit “Wizard[®] SV gel and PCR Clean-Up System” (Promega, Madison, WI, USA) e ligados na proporção de 1:3 com o kit *LigaFastTM Rapid DNA Ligation System* (Promega, Madison, WI, USA) por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a ligação os vetores obtidos foram amplificados em bactérias para análise da construção.

Para a amplificação das ligações, bactérias *Escherichia coli* cepa DH5α foram transformadas e cultivadas em meio LB sólido contendo os antibióticos ampicilina (50 µg/mL) e higromicina B (20 µg/mL).

Das colônias de bactérias que cresceram, foram extraídos os plasmídeos por “miniprep” e a confirmação da construção do vetor pMTGPV-Hygro e a orientação do fragmento foi verificada através da análise do padrão de restrição das digestões com as enzimas de restrição *Eco RI*, *Sca I* e *Pst I* (dados não mostrados). O padrão de restrição observado sugere a obtenção de vetores nos quais o fragmento se ligou tanto no sentido horário (h) quanto anti-horário (ah).

O vetor pMTGPV-Hygro (h) que foi construído não será utilizado nesse trabalho e foi estocado a – 20 °C. E o vetor pMTGPV-Hygro (ah) foi utilizado para transfectar células S2, como descrito a seguir.

Figura 7. Construção do vetor pMTGPV-Hygro (ah). Mapa do vetor pMTGPV (a esquerda) e padrão de restrição em gel de agarose 0,8% desse vetor (1), o mesmo linearizado com Hpa I (2) e o padrão de peso molecular (M); mapa do vetor pCoHygro (Invitrogen™) (a direita) e padrão de restrição em gel de agarose 0,8% desse vetor (3), o mesmo digerido com Pvu II e Ahd I (4) e o padrão de peso molecular (M); mapa do vetor pMTGPV-Hygro (ah) (embaixo). pMT corresponde ao promotor do gene da metalotioneína de drosófila, GPV ao cDNA da glicoproteína do vírus da raiva, SV40 à sequência de poli-adenilação do vírus SV40 e V5 ao epítipo da proteína V5. O gene que confere resistência a ampicilina (ampicillin) e a origem de replicação em bactérias (pUC ori) também estão presentes nesses vetores.

3.6 Cultura de células Schneider 2 (S2)

As culturas utilizadas são de células de *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (S2) (Schneider, 1972), as quais são facilmente cultivadas, pois crescem em suspensão ou semi-

aderência, em temperatura ambiente (entre 22 °C e 28 °C) e sem a necessidade de atmosfera controlada com CO₂. Entretanto, essas células apresentam dificuldades de crescimento em densidades menores que 5x10⁴ células/mL.

3.6.1 Meios de cultura utilizados

Foram utilizados quatro meios de cultura de células de insetos neste trabalho, SF-900 II SFM (GIBCO™) e Insect-Xpress™ (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) que são livres de soro fetal bovino, Schneider (GIBCO™) e TNM-FH com adição de 10% soro fetal bovino (SFB). Sendo que o meio na maioria dos ensaios foi SF-900 II SFM (GIBCO™).

3.6.2 Manutenção das células S2

O repique das culturas celulares foi realizado, a cada sete dias, com 500 µL de uma cultura de células e adicionando 4,5 mL de meio SF-900 II SFM (GIBCO™) em frascos T-25. Esse repique é muito eficiente, gerando uma grande quantidade de células tanto para iniciar nova cultura quanto para armazenamento.

3.6.3 Preparo das células para cinética em frascos agitados

Antes do início de cada cinética em frascos agitados as células foram adaptadas sendo cultivadas por uma ou duas semanas em frasco agitado de 100 mL com 20 mL de volume de trabalho e sob agitação orbital de 100 rpm a 28 °C. Quando necessário, as células foram adaptadas em diferentes meios de cultura da mesma maneira.

3.6.4 Congelamento das células S2

As células na fase exponencial foram centrifugadas a 100 g por 5 minutos a 28 °C e ressuspensas em meio de congelamento contendo 50% de Soro Fetal Bovino, 40% de SF-900

II SFM e 10% de DMSO em concentração de 10^7 células/mL. Essa suspensão foi aliquotada em criotubos com volume de 1 mL a 1,6 mL, após aproximadamente 15 minutos em contato com o DMSO os tubos foram congelados baixando a temperatura a 1 °C por minuto em congelador a – 80 °C. Depois de 16 horas no congelador os tubos foram transferidos e mantidos em nitrogênio líquido.

3.6.5 Descongelamento

Para o descongelamento das células um tubo criogênico foi retirado do nitrogênio líquido, descongelado parcialmente a 37 °C e transferido para um tubo de 15 mL contendo 9 mL de meio de cultura SF-900 II SFM. O tubo, então foi centrifugado a 100 g por 5 minutos a 28 °C e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em meio de cultura e mantidas em frascos T-25 por quatro dias e repicadas normalmente após esse período.

3.7 Transfecção

As transfecções foram realizadas utilizando o lipossoma “Cellfectin® Reagent” seguindo o protocolo da Life Technologies com algumas modificações. Utilizamos esse lipossoma devido as suas características de utilização em células de inseto de acordo com a Invitrogen™.

As células selvagens foram repicadas na concentração de 5×10^6 células por garrafas T-25 em meio SF-900 II SFM (GIBCO™) 24 horas antes da transfecção. A solução de transfecção foi preparada em duas etapas, primeiramente foram diluídos 20 µg do vetor de expressão em 500 µL de meio SF-900 II SFM (GIBCO™), quando se tratava de co-transfecção a proporção de vetor de seleção pCoHygro (Invitrogen™) (Figura 8) para vetor de expressão foi de 1:20. Em seguida essa solução foi misturada gentilmente com a solução, previamente preparada, com 20 µL de Cellfectin® e 480 µL de SF-900 II SFM (GIBCO™).

Figura 8. Mapa do vetor pCoHygro (Invitrogen™). pCopia corresponde ao promotor do gene que confere resistência a higromicina B (Higromycin). SV40 à seqüência de poliadenilação do vírus SV40 e o gene que confere resistência a ampicilina (ampicillin) e a origem de replicação em bactérias (pUC ori) também estão presentes nesse vetor.

Após 20 minutos de incubação a temperatura ambiente, o meio de cultura da garrafa foi substituído por 1 mL da solução de transfecção e a cultura foi incubada a 28 °C por 5 horas sob agitação lenta. O volume da cultura celular foi, então, completado para 5 mL com meio SF-900 II SFM (GIBCO™) e essa cultura incubada por 2 dias a 28 °C. A seleção das células se deu pela adição de 600 µg/mL de higromicina B no meio da cultura celular.

Como controle da transfecção, também foi adicionado higromicina B (na mesma concentração utilizada nas células modificadas) em uma cultura de células selvagens. Consideramos que o processo de seleção terminou quando todas as células da cultura selvagem estavam mortas e nesse momento retiramos a pressão seletiva de nossa cultura modificada.

3.8 Reação PCR após síntese do DNA complementar (RT-PCR)

O RNA mensageiro extraído das populações celulares foi amplificado pela técnica de PCR após a síntese do DNA complementar (RT-PCR).

3.8.1 Extração de RNA

O RNA das populações celulares foi extraído das células utilizando-se o método de isotiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio, conforme descrito por Chomczynski e Sacchi (1987).

Para a extração, 300µL de uma solução de isotiocianato de guanidina (GT) e 50 µL de clorofórmio PA (Merck, Sharp & Dohme, Campinas-SP) gelado foram acrescentados a 100 µL com 1×10^6 células. Após homogeneização, incubação e centrifugação o sobrenadante foi transferido para outro tubo e o RNA foi precipitado com 300 µL de etanol PA (Merck, Sharp & Dohme, Campinas-SP) gelado por duas vezes. Depois de descartado o sobrenadante, foi realizado o tratamento com DNase.

3.8.2 Tratamento com DNase

O tratamento com DNase foi realizado com o kit RQ1 RNase-free DNase (Promega, Madison, WI, USA) da seguinte maneira: ao RNA extraído, foi adicionado 10 µL de água RNase-free. Após homogeneização foram adicionados 1,5 µL de tampão 10x (400mM Tris-HCl [pH 8,0 a 25 °C], 100 mM MgSO₄, 10 mM CaCl₂), 6 µL de DNase e incubado por 30 minutos a 37 °C. A reação foi bloqueada com 1,5 µL de solução bloqueadora (20 mM EGTA [pH 8,0 a 25 °C]) e a enzima inativada por 10 minutos a 65 °C. A essa suspensão foi adicionada a mistura para síntese do cDNA.

3.8.3 Síntese do DNA complementar (cDNA)

A síntese do cDNA foi realizada com utilização da enzima transcriptase reversa do vírus da leucemia murina de Moloney (MMLV-RT) (InvitrogenTM Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e o *iniciador* reverso específico GPV R3 (5' AGCCGCAAGTCTCACTCCC 3'). À suspensão de RNA foi adicionado 2 pmol do *iniciador* GPV R3, 1 µL de dNTP Mix a 10 mM e incubada 5 minutos a 65 °C. Essa suspensão foi resfriada rapidamente em gelo e centrifugada. Após centrifugação foram adicionados 4 µL de tampão 5x (250 mM de Tris-HCl

[pH 8,0 a 25 °C], 375 mM de KCl e 15 mM de MgCl₂), 1 µL de DTT a 0,1 M e incubado por dois minutos a 37 °C. Foi adicionada a essa solução 1 µL de M-MLV (200 u) e incubada por 50 minutos a 37 °C. A inativação da enzima foi realizada por 15 minutos a 70 °C.

Esse cDNA foi então amplificado por PCR com os iniciadores MT F (Tabela 2) e GPV R1 (5' TGTAATCGTGGTTAGTGGAGC 3') seguindo protocolo 3.4.

3.9 Análise da expressão de GPV

3.9.1 Microscopia de fluorescência

A análise em microscopia de fluorescência foi realizadas em microscópio de fluorescência “Olympus System Microscopes” modelo BX51 ou em microscópio confocal “Carl Zeiss” modelo LSM 510 meta com o auxílio da Dra. Toshie Kawano e do Sr. Alexsander de Souza Seixas no laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan.

Para essa análise uma amostra de 40 µL da suspensão celular foi colocada em lâmina de vidro e deixada sedimentar por 30 minutos a 28 °C, após o sobrenadante ser retirado, algumas gotas de acetona 80% gelada foram usadas durante 20 minutos a 4 °C para fixar as células.

O anticorpo IgG monoclonal anti glicoproteína do vírus rábico (D1-25N°I-1805 Instituto Pasteur Paris, conjugado com FITC), que reconhece o sítio III da glicoproteína da cepa PV (Figura 2), foi diluído na razão de 1:400 em azul de Evans e 40 µL dessa suspensão foi adicionada as células, as quais foram incubadas por 1 hora a 37 °C. A lâmina foi, então, lavada com PBS e seca com gaze. Para não ressecar as células, foi colocada uma gota de glicerol 50% em PBS e uma lamínula sobre as células.

A visualização da marcação destas células foi realizada nos microscópios citados acima utilizando uma luz ultravioleta e no microscópio de fluorescência foi utilizado um filtro WBS do próprio microscópio. As fotos foram capturadas por um sistema automático (“Automatic Photomicrographic System” modelo PM-30) acoplado ao microscópio de fluorescência ou pelo programa do microscópio confocal.

3.9.2 Citometria de fluxo

Na análise em citometria de fluxo foram adquiridos 10.000 eventos para cada amostra analisada, sendo que os eventos considerados foram aqueles que compõem a população homogênea da amostra (R1). As análises de citometria de fluxo (FACS) foram realizadas no setor de citometria de fluxo do Instituto Butantan supervisionado pelo Dr. Jorge Mário da C. F. Junior do laboratório de Imunoquímica em um aparelho FACSCALIBUR da Becton Dickinson (FACS).

Amostra de 2×10^6 células foi centrifugada a 100 g por 5 minutos e as células foram ressuspensas em 50 μ L de PBS. O anticorpo (D1-25N°I-1805 Instituto Pasteur Paris, conjugado com FITC) foi diluído na razão de 1:400 em PBS e 50 μ L dessa suspensão foi adicionada as células, as quais foram incubadas por 30 minutos a 4 °C. Após a incubação, a suspensão celular foi novamente centrifugada, ressuspensa em 1 mL de PBS e analisada no FACS.

O anticorpo quando excitado pelo raio laser do FACS emite luz que é detectada pelo filtro de 530 nm (FL1), capaz de detectar, portanto a fluorescência verde. O FACS foi configurado, a cada análise, com base em uma suspensão de células não transfectadas que foram tratadas igualmente às células transfectadas, sendo esta a fluorescência controle negativo, somente valores diferentes desses puderam ser considerados como resultados positivos para células transfectadas expressando a GPV que foi ligada ao anticorpo.

3.9.3 ELISA

Na análise por ELISA foi utilizado o kit “*Rabies Glycoprotein Enzyme Immunoassay*” (Instituto Pasteur, Paris) segundo Astray *et al.* (2008). Nesse imunoensaio foi utilizado o anticorpo IgG monoclonal anti glicoproteína do vírus rábico (D1-25N°I-1805).

Soluções:

- Tampão Carbonato:
 - 0,05 M Carbonato
 - pH 9,6
- Solução de Bloqueio

- 0,3% BSA
- 5% Sacarose
- Tampão Carbonato
- Solução de Lavagem
 - PBS (pH 7,0)
 - 0,005% Tween 20
- Solução de Diluição
 - PBS (pH 7,0)
 - 0,05% Tween 20
 - 0,5 % BSA
- Solução Substrato-cromógeno
 - 40 mM Citrato tri-sódio diidratado
 - 10 mM Ácido cítrico monoidratado
 - 30% H₂O₂
 - 2 mg/mL OPD
- Solução de Parada
 - 4 N Ácido sulfúrico

O anticorpo primário, de sensibilização da placa, foi diluído na proporção de 1:200 em tampão carbonato e distribuído 200 µL por poço da placa de 96 poços. Em seguida a placa foi incubada selada a 37 °C por 3 horas e a 4 °C durante a noite. Após o descarte do anticorpo de sensibilização, a placa foi bloqueada com 300 µL por poço de solução de bloqueio a 37 °C por 30 minutos.

Para a obtenção de amostras, as células foram cultivadas em meio SF-900 II SFM (GIBCO™), centrifugadas a 100 g por 5 minutos e lavadas em PBS. Para as primeiras análises, as células foram lisadas com tampão de lise (50 mM Tris, 150 mM NaCl e 1% Nonidet P-40) por 10 minutos ou por sonicação. Quando a análise não ocorreu no mesmo dia da coleta, a amostra de células (precipitadas por centrifugação) foi congelada a -80 °C. Nas demais análises, 10⁶ células foram precipitadas por centrifugação, lavadas com PBS e congeladas secas a -20 °C. No momento da análise, as amostras foram descongeladas e ressuspensas no tampão de lise descrito acima. Para as amostras de sobrenadante do cultivo, 300 µL de meio foram armazenados a -20 °C. No momento da análise, estas amostras foram descongeladas e lisadas com 1 mL do tampão de lise. Como as amostras de sobrenadante

foram diluídas 4,334 vezes, os valores de GPV em ng/mL obtidos nas análises por ELISA dessas amostras foram corrigidos multiplicando por 4,334.

Com a vacina referência ressuspensa em solução de diluição foi feita uma curva padrão. E após aplicação 200 µL por poço das amostras e da curva de referência, sempre em duplicata, a placa foi incubada a 37 °C por 1 hora. Essa placa foi então lavada novamente e incubada a temperatura ambiente por 30 minutos com 200 µL por poço de solução substrato-cromógeno. Após essa incubação a reação foi parada com 50 µL de solução de parada e analisada a 492 nm.

Para a obtenção dos valores de GPV em ng/mL, foi obtida uma curva padrão. Para isso, a vacina anti-rábica referência foi ressuspensa em diferentes diluições e 200 µL das amostras experimentais e das diluições vacinais foram colocadas por poço em placa de ELISA, sempre em duplicatas. A placa foi então incubada a 37 °C por 1 hora. Após a incubação, a placa foi lavada novamente e incubada a temperatura ambiente por 30 minutos com 200 µL por poço de solução substrato-cromógeno. Após essa incubação a reação foi parada com 50 µL de solução de parada e analisada em leitora de ELISA (Multiskan EX, MJ-Labsystems) a 492 nm.

3.9.4 “Western Blotting”

Para a análise por “western blotting” as amostras de lisado celular e vírus foram submetidos à eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% conforme procedimento abaixo.

Soluções:

- Solução de acrilamida 30%:
 - 30% Acrilamida (Riedel-deHaën 62021)
 - 0,8% N,N' -methylene-bis-acrylamida 9 Sigma M 7256)
- Tampão de amostra
 - 50 mM de Tris (pH 6.8)
 - 2% SDS
 - 0,1% azul de bromofenol
 - 10% glicerol
- Tampão de corrida (pH 8,8)
 - 0,3% Tris-HCl

- 1,44% Glicina
- 0,1% SDS

Géis:

- Gel de separação 12,5%
 - 3,44 mL H₂O MilliQ
 - 4,2 mL solução de acrilamida 30%
 - 2,6 mL solução Tris-HCl 1,5 M (pH 8.8)
 - 104 µL solução SDS 10%
 - 104 µL solução Persulfato de amônio 10%
 - 4,2 µL TEMED (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- Gel de empilhamento
 - 4,1 mL H₂O MilliQ
 - 1,0 mL solução de acrilamida 30%
 - 750 µL solução Tris-HCl 1,5 M (pH 6.8)
 - 60 µL solução SDS 1 %
 - 60 µL solução Persulfato de amônio 10%
 - 6 µL TEMED

Após a contagem da concentração celular, 10⁶ células foram centrifugadas a 100 g por 5 minutos, lavadas em PBS, lisadas e concentradas com 100 µL de tampão de lise (mesmo do item anterior) por 10 minutos. Esse lisado foi fervido por 10 minutos, aplicado em um gel SDS-PAGE 12,5% e submetido à eletroforese a 150 volts por 3 horas. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por 30 minutos. Essa membrana foi bloqueada com solução de bloqueio (5 % de leite desnatado) por 30 minutos sob agitação e marcada com anticorpo policlonal de coelho anti-GPV (diluído 1:200 em solução de bloqueio). Após a lavagem da membrana com solução de lavagem (150 mM NaCl e 10 mM Tris-HCl) foi colocado o segundo anticorpo, marcado com peroxidase, anti-anticorpo de coelho e revelado com solução de substrato cromógeno (30 mg de 4-chloro-1-naphthol, 10 mL de metanol e 0,3% de peróxido de hidrogênio em 17 mL solução de lavagem). Com o aparecimento das bandas a reação foi parada com solução de parada (5% de leite desnatado e 0,2% de Tween 20 em PBS).

3.10 Análise estatística

As análises estatísticas dos resultados desse trabalho para as diferentes linhagens celulares no crescimento ou na expressão de GPV foram feitas através de análise de variância das médias. E para completar essa análise foi aplicado o teste de Tukey com nível de significância de 5%, somente quando a análise anterior mostrava diferença entre as médias de cada linhagem e tratamento. A média foi considerada estatisticamente diferente quando $p < 0,05$.

3.11 Resumo dos ensaios

Neste trabalho foram realizados diversos ensaios com diferentes populações celulares, diferentes meios de cultura, diferentes metodologias de análise da glicoproteína do vírus rábico e sob diversas condições. Um resumo desses ensaios está na tabela 3.

Tabela 3. Resumo dos ensaios realizados neste trabalho.

Populações Celulares	Meio de Cultura	Análise da GPV	Observação
S2MTiGPV-H (Mc 1)	SF-900 II SFM	“Western Blotting”	Indução com 700 μ M de CuSO_4 no 3º dia de cultivo
S2MTiGPV (Mc 3)	SF-900 II SFM	Microscopia de fluorescência	Indução ou não com 700 μ M de CuSO_4 no 3º dia de cultivo
S2MTiGPV (Mc 4)	SF-900 II SFM	ELISA FACS	Indução com 700 μ M de CuSO_4 no 3º dia de cultivo
S2MTiGPV-H (Mc 5)			Antes e após re-seleção com 600 μ g/mL de higromicina B
S2MTGPV (Mc 6)			Com ou sem adição de 5mM de butirato de sódio
S2MTGPV-H (Mc 7)			
S2MTGPV-H (Mc 7)	SF-900 II SFM	ELISA Microscopia Confocal	Indução com 700 μ M de CuSO_4 no 3º dia de cultivo
	Insect-Xpress™		
	Schneider + 10% SFB TNM-FH + 10% SFB		

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção de populações celulares portadoras dos vetores genéticos

Foram realizadas diversas transfecções para a obtenção das populações celulares portadoras dos vetores genéticos apresentados no item 3.5. Dessas transfecções obtivemos sete populações celulares modificadas (Tabela 4). As populações S2MTiGPV-H (Mc 1), S2MTiGPV-H (Mc 2) e S2MTiGPV (Mc 3) foram utilizadas em ensaios preliminares deste trabalho.

Tabela 4. Populações celulares obtidas neste trabalho em relação aos vetores transfectados.

Populações celulares	Vetores transfectados
S2MTiGPV-H (Mc 1) S2MTiGPV-H (Mc 2)	pMTiGPV-Hygro (ah)
S2MTiGPV (Mc 3) S2MTiGPV (Mc 4)	pMTiGPV + pCoHygro (Invitrogen™)
S2MTiGPV-H (Mc 5)	pMTiGPV-Hygro (ah)
S2MTGPV (Mc 6)	pMTGPV + pCoHygro (Invitrogen™)
S2MTGPV-H (Mc 7)	pMTGPV-Hygro (ah)

As populações mais utilizadas neste trabalho foram obtidas de células S2 selvagens na passagem entre 4 e 7, co-transfectadas na razão de 20:1 (vetor de expressão: vetor de seleção) utilizando cellfectina (Invitrogen™) com os vetores pMTiGPV ou pMTGPV (linearizados com a enzima *Hpa I*) juntamente com o vetor pCoHygro (Invitrogen™) ou transfectadas com os vetores pMTiGPV-Hygro (ah) ou pMTGPV-Hygro (ah) (linearizados com a enzima *Ahd I*).

Dois dias após a transfecção foi adicionado ao meio de cultura 600 µg/mL de higromicina B para selecionar as células que expressavam o gene de resistência a higromicina. A fim de estimar quando não haviam mais células selvagens nas culturas transfectadas, a mesma concentração de antibiótico foi adicionada a uma cultura de células S2 selvagens.

Como se observa na figura 9, a porcentagem de células selvagens viáveis no 18º dia que estavam submetidas à pressão seletiva com 600 µg/mL de higromicina B estava menor que 1%, sendo assim consideramos a seleção concluída e a população celular modificada estabelecida.

Figura 9. Porcentagem de células viáveis de culturas de células selvagens ou transfectadas sob seleção com 600 µg/mL de higromicina B. S2 representa o controle com cultura de células selvagens; S2MTiGPV (Mc 4) a cultura de células co-transfectadas com os vetores pMTiGPV + pCoHygro (Invitrogen™); S2MTiGPV-H (Mc 5) a cultura de células transfectadas com o vetor pMTiGPV-Hygro (ah); S2MTGPV (Mc 6) a cultura de células co-transfectadas com os vetores pMTGPV + pCoHygro (Invitrogen™); e S2MTGPV-H (Mc 7) a cultura de células transfectadas com o vetor pMTGPV-Hygro (ah).

Nesse momento, nomeamos as culturas celulares de S2MTiGPV (Mc 4) para a cultura das células que foram co-transfectadas com os vetores pMTiGPV e pCoHygro (Invitrogen™), S2MTiGPV-H (Mc 5) para a cultura das células que foram transfectadas com o vetor pMTiGPV-Hygro (ah), S2MTGPV (Mc 6) para a cultura das células que foram co-transfectadas com os vetores pMTGPV e pCoHygro (Invitrogen™), S2MTGPV-H (Mc 7) para a cultura das células que foram transfectadas com o vetor pMTGPV-Hygro (ah) (Tabela 4).

4.1.1 Transcrição do RNAm-GPV em células transfectadas

Para confirmar a transcrição do gene da GPV nas células modificadas as populações S2MTiGPV (Mc 4), S2MTiGPV-H (Mc 5), S2MTGPV (Mc 6) e S2MTGPV-H (Mc 7) foram cultivadas em frascos T e induzidas no 3º dia de cultivo com 700 μM de CuSO_4 .

Após dois dias da indução por sulfato de cobre, 1×10^6 células de cada população foram centrifugadas a 100 g por 5 minutos a 28 °C e somente as células foram congeladas a – 80 °C. Posteriormente, o RNA mensageiro foi extraído, transcrito reversamente para cDNA com o iniciador GPV R3 e amplificado por 2 PCRs com os iniciadores MT F e GPV R1. O resultado dessa amplificação foi visualizado em gel de agarose 1% (Figura 10), indicando que as populações S2MTiGPV (Mc 4), S2MTiGPV-H (Mc 5), S2MTGPV (Mc 6) e S2MTGPV-H (Mc 7) foram modificadas e que todas transcrevem o gene da GPV.

Figura 10. Gel de agarose das amostras amplificadas por PCR. O cDNA obtido por transcrição reversa do RNA extraído das populações de células em gel de agarose 1%. Marcador de peso molecular (M); amostras de células selvagens S2 (1); células S2MTiGPV (Mc 4) (2); S2MTiGPV-H (Mc 5) (3); S2MTGPV (Mc 6) (4); e S2MTGPV-H (Mc 7) (5).

4.2 Análise da GPV por “Western blotting”

As proteínas produzidas nas células S2 selvagens e S2MTiGPV-H (Mc 1) induzidas com 700 μM de CuSO_4 (na passagem 66) no oitavo dia de cultura foram extraídas e separadas em gel de SDS/PAGE 12,5%. O padrão de proteínas obtido no gel foi transferido para uma

membrana de nitrocelulose. A membrana foi submetida ao contato com anticorpo policlonal de coelho anti-GPV e revelada com anticorpo anti-anticorpo de coelho marcado com peroxidase (Figura 11).

Neste procedimento pudemos observar que a proteína GPV, de aproximadamente 65 kDa, foi reconhecida no lisado das células S2MTiGPV-H (Mc 1) com mesmo tamanho encontrado no vírus vacinal utilizado como referência. Isso confirma que as células modificadas expressam a GPV.

Figura 11. “*Western blotting*”. Marcador de peso molecular (M); célula S2 selvagem (1); vírus da raiva (2); e lisado de células S2MTiGPV-H (Mc 1).

4.3 Ensaio do efeito da indução no crescimento celular e expressão da GPV

A fim de saber se a indução por sulfato de cobre poderia influenciar no crescimento das células modificadas, células S2 e S2MTiGPV (Mc 3) na passagem 73 foram cultivadas em frasco agitados e induzidas ou não com 700 μ M de sulfato de cobre no terceiro dia do cultivo. O inóculo inicial para realização desse ensaio teve origem em culturas em frascos T. Para essa análise foram feitas cinéticas de crescimento celular (Figura 12).

Podemos notar que o crescimento das células S2MTiGPV (Mc 3) que foram induzidas com sulfato de cobre, apresentou-se 20% maior do que as outras culturas no sexto dia de cultivo. Entretanto, o mesmo não foi observado nos demais dias do cultivo, nos quais o crescimento das células modificadas induzidas ou não é semelhante ao crescimento das células selvagens.

Figura 12. Cinética de crescimento de células induzidas ou não. Células S2 e S2MTiGPV (Mc 3) foram inoculadas na concentração de 5×10^5 células/mL em frascos agitados de 100 mL com volume de trabalho de 20 mL e mantidas sob agitação de 100 rpm a 28 °C. As culturas de células modificadas foram induzidas ou não com 700 μ M de CuSO_4 no terceiro dia de cultivo (indicado pela seta).

4.3.1 Análise da GPV por Microscopia de Fluorescência

As análises por microscopia de fluorescência foram realizadas com uma amostra das células selvagens e modificadas no oitavo dia de cultivo fixadas em uma lâmina de vidro e marcada com anticorpo anti-GPV com FITC juntamente com azul de Evans para criar contraste.

A figura 13 apresenta as células S2 (Figura 13A), S2MTiGPV (Mc 3) não induzidas ou induzidas no terceiro dia do cultivo com 700 μ M de CuSO_4 (Figura 13B e C, respectivamente). Observamos que as células modificadas, diferentemente das células selvagens, apresentaram uma marcação com o anticorpo anti-GPV, mostrando que as células modificadas estão expressando a proteína heteróloga. Além desse fato, observamos nas células que foram induzidas (Figura 13C) uma marcação com o anticorpo anti-GPV mais intensa do que as células que não foram induzidas (Figura 13B).

Figura 13. Fotografia de microscopia de fluorescência das células marcadas com anticorpo anti-GPV com FITC e azul de Evans. Células S2 selvagens (A); S2MTiGPV (Mc 3) não induzidas (B); e induzidas com 700 μ M de CuSO_4 (C).

4.4 Comparação da expressão da GPV nas quatro diferentes populações celulares

Considerando que a indução por sulfato de cobre não influencia no crescimento das células realizamos uma nova cinética para analisar a produção da proteína heteróloga, assim que obtivemos as populações transfectadas com os quatro vetores (S2MTiGPV (Mc 4), S2MTiGPV-H (Mc 5), S2MTGPV (Mc 6) e S2MTGPV-H (Mc 7)).

Para isso, foram realizados alguns ensaios com as populações celulares S2MTiGPV (Mc 4), S2MTiGPV-H (Mc 5), S2MTGPV (Mc 6) e S2MTGPV-H (Mc 7). Para melhor compreensão os ensaios serão divididos em I, II e III.

4.4.1 Ensaio I

Esse primeiro ensaio realizado com as quatro populações celulares diferentes teve a finalidade de comparar as diferentes construções genéticas e as diferentes populações obtidas da transfecção desses vetores. Para isso as células S2, S2MTiGPV (Mc 4), S2MTiGPV-H (Mc 5), S2MTGPV (Mc 6) e S2MTGPV-H (Mc 7) foram cultivadas, entre as passagens 10 e 27, em triplicatas em frascos agitados e induzidas com 700 μ M de sulfato de cobre no terceiro dia de cultivo.

Podemos notar na cinética de crescimento celular (Figura 14) que há diferença de crescimento entre algumas linhagens celulares modificadas em relação ao controle ($p < 0,05$). Porém, as médias entre apenas as células modificadas não se demonstraram diferentes ao longo do cultivo, sugerindo que essas populações não apresentam um perfil de crescimento diferente.

Figura 14. Cinética de crescimento de células modificadas ou não. Células S2, S2MTiGPV (Mc 4), S2MTiGPV-H (Mc 5), S2MTGPV (Mc 6) e S2MTGPV-H (Mc 7) foram inoculadas na concentração de 5×10^5 células/mL em frascos agitados de 100 mL com volume de trabalho de 20 mL e mantidas sob agitação de 100 rpm a 28 °C. As culturas modificadas foram induzidas com 700 μ M de CuSO_4 no terceiro dia de cultivo (indicado pela seta). Os dados representam a média entre as triplicatas com o erro padrão. ★ indica diferença entre o crescimento das populações celulares S2MTGPV (Mc 6) com as populações S2MTiGPV-H (Mc 5) e S2MTGPV-H (Mc 7) ($p > 0,05$); + indica diferença entre o crescimento das populações celulares S2MTiGPV (Mc 4) e S2MTGPV-H (Mc 7) ($p < 0,05$). Os círculos indicam quais populações apresentam diferenças entre a população selvagem e as modificadas ($p < 0,05$).

Desse ensaio foram coletadas 10^6 células de cada uma das triplicatas de cada população celular modificada no terceiro, quinto, sétimo e décimo dia de cultivo para análise da GPV por ELISA.

4.4.1.1 Análise da produção de GPV por ELISA

A GPV das amostras celulares obtidas durante a cinética celular no terceiro, quinto, sétimo e décimo dia de cultivo foram quantificadas por ELISA com o kit “*Rabies Glycoprotein Enzyme Immunoassay*” (Instituto Pasteur, Paris). A figura 15A mostra a quantificação da glicoproteína no vírus da raiva em μg por 10^7 células e a figura 15B mostra a quantificação dessa proteína por mililitro de cultivo.

Os resultados de GPV por célula sugerem que essa produção é três vezes maior na população de células S2MTGPV-H (Mc 7) do que na população S2MTGPV (Mc 6) (sem o gene de resistência associado ao vetor com o gene de interesse), isso também ocorre nos resultados de produção de proteína por volume de cultivo. Na dosagem de GPV por volume de cultivo a produção diminui até cinco vezes ao longo do tempo, indicando uma possível degradação ou secreção da proteína após o sétimo dia de cultivo. Como nesses ensaios temos apenas o valor de GPV no sobrenadante sétimo dia de cultivo, não podemos ainda descartar nenhuma das possibilidades, que deverão ser analisadas posteriormente.

Além disso, foi realizada uma análise em citometria de fluxo dessas populações para verificar a quantidade de células que expressa a GPV nessas populações celulares.

Figura 15. Dosagem de GPV por ELISA de células modificadas. Células S2MTiGPV (Mc 4), S2MTiGPV-H (Mc 5), S2MTGPV (Mc 6) e S2MTGPV-H (Mc 7) foram inoculadas na concentração de 5×10^5 células/mL em frascos agitados de 100 mL com volume de trabalho de 20 mL e mantidas sob agitação de 100 rpm a 28 °C. Dosagem em $\mu\text{g}/10^7$ células (A) e em $\mu\text{g}/\text{mL}$ (B). Os dados representam a média entre as triplicatas com o erro padrão. ★ indica diferença na dosagem da GPV da população S2MTGPV-H (Mc 7) em relação às outras populações celulares ($p < 0,05$).

4.4.1.2 Análise por Citometria de Fluxo (FACS)

Com a finalidade de melhor comparar as diferentes populações celulares em relação à porcentagem de células que expressam a GPV, as células S2, S2MTiGPV (Mc 4), S2MTiGPV-H (Mc 5), S2MTGPV (Mc 6) e S2MTGPV-H (Mc 7), entre as passagens 16 e 29,

foram cultivadas em frascos agitados e induzidas no 3º dia de cultivo com 700 μM de CuSO_4 . Após 48 horas de indução, 2×10^6 células foram marcadas com anticorpo anti-GPV conjugado com FITC (D1-25N^oI-1805 Instituto Pasteur Paris) e a fluorescência de 10.000 células foram analisadas por FACS (Figura 16).

Figura 16. Citometria de fluxo de células selvagens ou modificadas. As células foram marcadas com anticorpo anti-GPV marcado com FITC e as células que possuíam fluorescência formaram a população M1. Células selvagens S2 (A); S2MTiGPV (Mc 4) (B); S2MTiGPV-H (Mc 5) (C); S2MTGPV (Mc 6) (D); e S2MTGPV-H (Mc 7) (E) induzidas no 3º dia de cultivo com 700 μM de CuSO_4 e analisadas 48 horas após a indução.

Essa análise de citometria de fluxo sugere que as populações celulares S2MTiGPV (Mc 4), S2MTGPV (Mc 6) e S2MTGPV-H (Mc 7) apresentam a proteína GPV na superfície das células, pois no processo de marcação com anticorpo não houve permeabilidade da membrana celular ao anticorpo. Porém, a população S2MTiGPV-H (Mc 5) não expressa a proteína de interesse na superfície celular, uma vez que a porcentagem de células fluorescentes é semelhante que a encontrada nas células selvagens. Observa-se também fluorescência induzida pela marcação com anticorpo anti-GPV em aproximadamente 10% das células S2MTiGPV (Mc 4) e S2MTGPV (Mc 6) e em 50% das células S2MTGPV-H (Mc 7).

Tentando melhorar a expressão da proteína heteróloga pelas células modificadas, estas foram submetidas a duas semanas de indução com 700 μ M de sulfato de cobre e mais duas semanas sob nova pressão seletiva com 600 μ g/mL de higromicina B. Após esse tratamento as células modificadas foram novamente cultivadas para análise da expressão da GPV no ensaio II.

4.4.2 Ensaio II – Após tratamento com higromicina B

A fim de verificar se a presença da pressão seletiva causa diferença na expressão da GPV, as quatro diferentes populações celulares modificadas foram submetidas a tratamento com 600 μ g/mL de higromicina B por duas semanas.

Após esse tratamento, as populações celulares S2MTiGPV* (Mc 4), S2MTiGPV-H* (Mc 5), S2MTGPV* (Mc 6) e S2MTGPV-H* (Mc 7), entre as passagens 20 e 33, foram cultivadas em duplicatas em frasco agitado e as culturas foram induzidas com 700 μ M de sulfato de cobre no terceiro dia de cultivo.

Como observamos na figura 17 a cinética de crescimento celular das populações modificadas não apresentaram diferenças significativas entre elas. Somente foi observada diferença ($p < 0,05$) no terceiro dia de cultivo entre as populações S2MTiGPV* (Mc 4) e S2MTGPV* (Mc 6).

Figura 17. Cinética de crescimento de células modificadas após tratamento com 600 µg/mL de higromicina B durante duas semanas. Células S2MTiGPV* (Mc 4), S2MTiGPV-H* (Mc 5), S2MTGPV* (Mc 6) e S2MTGPV-H* (Mc 7) foram inoculadas na concentração de 5×10^5 células/mL em frascos agitados de 100 mL com volume de trabalho de 20 mL e mantidas sob agitação de 100 rpm a 28 °C. As culturas foram induzidas com 700 µM de CuSO_4 no terceiro dia de cultivo (indicado pela seta). Os dados representam a média entre as duplicatas com o erro padrão. ★ indica diferença entre o crescimento das populações celulares S2MTiGPV* (Mc 4) e S2MTGPV* (Mc 6) ($p < 0,05$).

Desse ensaio foram coletadas 10^6 células de cada uma das duplicatas de cada população celular modificada no terceiro, quinto, sétimo e décimo primeiro dia de cultivo para análise da GPV por ELISA.

4.4.2.1 Análise da produção de GPV por ELISA

A GPV das amostras celulares obtidas durante a cinética celular no terceiro, quinto, sétimo e décimo primeiro dia de cultivo foram quantificadas por ELISA com o kit “*Rabies Glycoprotein Enzyme Immunoassay*” (Instituto Pasteur, Paris). A figura 18 mostra a quantificação da glicoproteína no vírus da raiva em µg por 10^7 células.

Figura 18. Dosagem de GPV por ELISA de células modificadas após tratamento com 600 µg/mL de higromicina B durante duas semanas. Células S2MTiGPV* (Mc 4), S2MTiGPV-H* (Mc 5), S2MTGPV* (Mc 6) e S2MTGPV-H* (Mc 7) foram inoculadas na concentração de 5×10^5 células/mL em frascos agitados de 100 mL com volume de trabalho de 20 mL, mantidas sob agitação de 100 rpm a 28 °C e induzidas no 3º dia de cultivo com 700 µM de CuSO₄. Os dados representam a média entre as duplicatas com o erro padrão. ★ indica diferença na dosagem da GPV da população S2MTiGPV* (Mc 4) em relação às outras populações celulares ($p < 0,05$). ✦ indica diferença na dosagem da GPV da população S2MTGPV-H* (Mc 7) em relação às outras populações celulares ($p < 0,05$).

Esses dados mostram que após a nova pressão seletiva com higromicina B as células S2MTiGPV* (Mc 4), S2MTGPV* (Mc 6) e S2MTGPV-H* (Mc 7) apresentaram quantidade de GPV por célula cerca de 10 vezes maior do que antes dessa pressão como observado na figura 15A. Assim como no ensaio I, na população celular modificada S2MTiGPV-H* (Mc 5) não foi detectada a presença da proteína mesmo após a essa nova pressão seletiva. Esses resultados também mostraram que a quantidade de GPV produzida pelas células modificadas aumenta ao longo do cultivo, ao contrário do observado com as populações celulares não tratadas novamente com higromicina B.

Neste ensaio, a GPV encontrada no sobrenadante foi dosada. Os resultados da dosagem desta glicoproteína no meio de cultivo (que foi lisado) estão apresentados na tabela 5 e sugerem que as populações celulares S2MTiGPV* (Mc 4), S2MTGPV* (Mc 6) e S2MTGPV-H* (Mc 7) secretam a GPV associada à membrana celular, uma vez que essa só foi detectada após lise do sobrenadante (dados não mostrados). Pode-se notar que após a indução, a quantidade de proteína no meio do cultivo aumenta aproximadamente 20 vezes, sugerindo que a indução do promotor da metalotioneína está associada à secreção da proteína de interesse.

Tabela 5. Dosagem de GPV por ELISA do sobrenadante lisado de células modificadas após tratamento com 600 µg/mL de higromicina B durante duas semanas (re-seleção).

População celular	GPV (µg/mL de meio de cultivo)			
	3º dia	5º dia	7º dia	10º dia
S2MTiGPV* (Mc 4)	-	0,192 ± 0,041	0,419 ± 0,015	0,692 ± 0,064
S2MTiGPV-H* (Mc 5)	-	-	-	-
S2MTGPV* (Mc 6)	-	-	0,194 ± 0,153	0,173 ± 0,073
S2MTGPV-H* (Mc 7)	0,068 ± 0,018	1,146 ± 0,278	0,983 ± 0,150	1,165 ± 0,184

Observação: Células S2MTiGPV* (Mc 4), S2MTiGPV-H* (Mc 5), S2MTGPV* (Mc 6) e S2MTGPV-H* (Mc 7) foram inoculadas na concentração de 5×10^5 células/mL em frascos agitados de 100 mL com volume de trabalho de 20 mL, mantidas sob agitação de 100 rpm a 28 °C e induzidas no 3º dia de cultivo com 700 µM de CuSO₄. Os dados representam a média entre as duplicatas da dosagem de GPV do sobrenadante lisado com o respectivo erro padrão.

Como os valores apresentados na tabela 5 são referentes somente à quantificação da GPV nos sobrenadantes lisado dos cultivos, esses valores foram somados a dosagem de GPV por células (referente à quantidade de células no cultivo) para a análise da produção total de GPV por volume de cultivo (Figura 19). Os resultados sugerem que durante o cultivo a expressão da proteína aumenta, atingindo valores de aproximadamente 5 µg de GPV por mililitro de cultura no décimo primeiro dia de cultivo da população de células S2MTGPV-H* (Mc 7).

Figura 19. Dosagem de GPV por ELISA de células modificadas após tratamento com 600 µg/mL de higromicina B durante duas semanas. Células S2MTiGPV* (Mc 4), S2MTiGPV-H* (Mc 5), S2MTGPV* (Mc 6) e S2MTGPV-H* (Mc 7) foram inoculadas na concentração de 5×10^5 células/mL em frascos agitados de 100 mL com volume de trabalho de 20 mL, mantidas sob agitação de 100 rpm a 28 °C e induzidas no 3º dia de cultivo com 700 µM de CuSO₄. Os dados representam a média entre as duplicatas da dosagem de GPV das células referente à quantidade de células no cultivo somada à dosagem do sobrenadante lisado com o erro padrão. ★ indica diferença na dosagem da GPV da população S2MTGPV-H* (Mc 7) em relação às outras populações celulares ($p < 0,05$).

Como a integração dos vetores pode ter ocorrido em regiões inativas do genoma das células S2 e que a adição de butirato de sódio (NaBu) à cultura tem a função de expor a cromatina favorecendo um aumento na expressão gênica de modo geral. Decidimos testar o butirato de sódio como uma alternativa de aumento da síntese de proteínas heterólogas nas populações celulares modificadas no ensaio III.

4.4.3 Ensaio III – Adição de butirato de sódio

A fim de verificarmos a possível integração do vetor de expressão em regiões inativas do genoma, realizamos ensaio adicionando butirato de sódio (NaBu) à cultura. O butirato de sódio é conhecido por ser um inibidor de desacetilação da histona afetando a estrutura da cromatina e levando a uma desestruturação do núcleo celular (Dorner *et al.*, 1989; Baumert *et al.*, 1998; Condreay *et al.*, 1999; Sambrook e Russel, 2001; Chen *et al.*, 2002; Li e Li, 2006; Ping *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2007). Sendo assim, o butirato de sódio pode ser uma poderosa ferramenta quando se trata de expressão gênica em diferentes sistemas.

Neste ensaio as populações celulares S2MTiGPV* (Mc 4), S2MTiGPV-H* (Mc 5), S2MTGPV* (Mc 6) e S2MTGPV-H* (Mc 7), entre as passagens 20 e 33, foram cultivadas em duplicatas em frasco agitado e as culturas foram induzidas com 700 μ M de sulfato de cobre juntamente ao tratamento com 5 mM de butirato de sódio no terceiro dia de cultivo.

Na cinética de crescimento celular das populações modificadas observamos que as células S2MTGPV* (Mc 6) tiveram um crescimento diferente ($p < 0,05$) de outras células modificadas em alguns dias, mas não durante todo o cultivo e nem com todas as populações celulares (Figura 20). Entretanto, essa população celular apresentou contaminação durante o ensaio. Nessa figura, podemos notar que as populações celulares tratadas com NaBu obtiveram um crescimento 40% inferior quando comparamos as células que não foram (apresentadas na figura 17).

Figura 20. Cinética de crescimento de células modificadas tratadas com 5 mM de butirato de sódio. Células S2MTiGPV* (Mc 4), S2MTiGPV-H* (Mc 5), S2MTGPV* (Mc 6) e S2MTGPV-H* (Mc 7) foram inoculadas na concentração de 5×10^5 células/mL em frascos agitados de 100 mL com volume de trabalho de 20 mL e mantidas sob agitação de 100 rpm a 28 °C. As culturas foram induzidas com 700 μ M de CuSO_4 e tratadas com 5 mM de butirato de sódio no 3º dia de cultivo (indicado pela seta). Os dados representam a média entre as triplicatas com o erro padrão. ★ indica diferença entre o crescimento das populações celulares S2MTiGPV* (Mc 4) e S2MTGPV* (Mc 6) ($p < 0,05$); ✦ indica diferença entre o crescimento das populações celulares S2MTiGPV-H* (Mc 5) e S2MTGPV* (Mc 6) ($p < 0,05$).

Desse ensaio foram coletadas 10^6 células de cada uma das duplicatas de cada população celular modificada no terceiro, quinto, sétimo (exceto da população S2MTGPV* (Mc 6)) e décimo primeiro dia de cultivo para análise da GPV por ELISA.

4.4.3.1 Análise da produção de GPV por ELISA

A GPV das amostras celulares obtidas durante a cinética celular no terceiro, quinto, sétimo e décimo primeiro dia de cultivo foram quantificadas por ELISA com o kit “*Rabies Glycoprotein Enzyme Immunoassay*” (Instituto Pasteur, Paris). A figura 21A mostra a quantificação da glicoproteína no vírus da raiva em μ g por 10^7 células e a figura 21C mostra a quantificação dessa proteína por mililitro de cultivo. Para facilitar a visualização dos ensaios com e sem butirato de sódio a figura 18 está reproduzida na figura 21B e a figura 19 como 21D representando o ensaio sem butirato de sódio.

Figura 21. Dosagem de GPV por ELISA de células modificadas tratadas ou não com 5 mM de butirato de sódio. Células S2MTiGPV* (Mc 4), S2MTiGPV-H* (Mc 5), S2MTGPV* (Mc 6) e S2MTGPV-H* (Mc 7) foram inoculadas na concentração de 5×10^5 células/mL em frascos agitados de 100 mL com volume de trabalho de 20 mL, mantidas sob agitação de 100 rpm a 28 °C, induzidas com 700 μM de CuSO_4 e tratadas ou não com 5 mM de butirato de sódio no 3º dia de cultivo. Dosagem em $\mu\text{g}/10^7$ células tratadas com NaBu (A) e não tratadas (B) e em $\mu\text{g/mL}$ em populações tratadas com NaBu (C) e não tratadas (D). Os dados representam a média entre as duplicatas com o erro padrão. ★ indica diferença na dosagem da GPV das populações S2MTiGPV* (Mc 4) e S2MTGPV-H* (Mc 7) ($p < 0,05$). ✦ indica diferença na dosagem da GPV das populações S2MTGPV* (Mc 6) e S2MTGPV-H* (Mc 7) ($p < 0,05$).

Apesar do crescimento celular inferior nas populações modificadas tratadas com butirato de sódio em relação às não tratadas, a quantificação de GPV de cada uma dessas populações celulares foi semelhante ($p > 0,05$) entre si. Esse resultado sugere que os vetores não foram inseridos em regiões inativas do DNA. Além disso, novamente somente na população celular S2MTiGPV-H* (Mc 5) não foi detectável a proteína heteróloga, sugerindo que essa proteína não está sendo expressa de modo adequado para hibridação com o anticorpo utilizado.

Como em todos os ensaios descritos a população S2MTGPV-H* (Mc 7) apresentou melhores resultados de expressão da GPV, resolvemos analisar melhor a expressão da proteína nessa população.

4.5 Análise da expressão da GPV da população S2MTGPV-H (Mc 7)

Com a população celular S2MTGPV-H* (Mc 7) expressando quantidades de proteínas aproximadamente 5 vezes maiores do que as outras populações, decidimos avaliar melhor essa população. Para isso analisamos por microscopia confocal e quantificamos a proteína heteróloga quando as células foram cultivadas em diferentes meios de cultura.

4.5.1 Análise em microscopia confocal

As células S2 e S2MTGPV-H* (Mc 7) foram cultivadas em frascos T e induzidas no 3º dia de cultivo com 700 µM de CuSO₄. Após dois dias da indução por sulfato de cobre, uma amostra das células selvagens e modificadas foram fixadas em uma lâmina de vidro e marcadas com anticorpo anti-GPV com FITC juntamente com azul de Evans para criar contraste.

Podemos observar nas fotografias tiradas no microscópio confocal que as células S2 não apresentaram marcação com anticorpo e que as células S2MTGPV-H* (Mc 7) apresentam marcação principalmente na superfície celular (Figura 22A e B). Utilizando outras funções do equipamento podemos ampliar uma região da figura 22B apresentada em detalhe na figura 22C, além disso, realizamos uma imagem em três dimensões dessas células modificadas que mostra a superfície celular totalmente marcada com anticorpo anti-GPV (dado não mostrado).

Figura 22. Fotografia de microscopia confocal. Das células marcadas com anticorpo anti-GPV com FITC e azul de Evans. Células S2 selvagens (A), S2MTGPV-H* (Mc 7) após dois dias de indução com 700 μM de CuSO_4 (B) e detalhe das células S2MTGPV-H* (Mc 7) (C).

4.5.2 Comparação da expressão da GPV em diferentes meios de cultura

Para a comparação da expressão da GPV em diferentes meios de cultura a população celular S2MTGPV-H* (Mc 7) foi descongelada e cultivada por duas semanas com 600 $\mu\text{g/mL}$ de higromicina B. Em seguida, as células foram adaptadas por duas semanas em frasco agitado com os meios: SF-900 II SFM, Insect-Xpress™, Schneider (+ 10% SFB) e TNM-FH (+ 10% SFB).

Após esses tratamentos, as células S2MTGPV-H* (Mc 7), na passagem 34, foram cultivadas em duplicatas em frasco agitado em cada um dos meios e as culturas foram induzidas com 700 μ M de sulfato de cobre no terceiro dia de cultivo.

Como observamos na figura 23 a cinética de crescimento celular das populações modificadas apresenta o crescimento das células S2MTGPV-H* (Mc 7) em meio SF-900 II SFM até cinco vezes maior do que nos outros meios de cultura, nos quais as células apresentaram grandes dificuldades de crescimento.

Figura 23. Cinética de crescimento de células S2MTGPV-H* (Mc 7) em diferentes meios de cultivo. Células S2MTGPV-H* (Mc 7) foram inoculadas nos meios de cultura SF-900 II SFM, Insect-Xpress™, Schneider + 10% SFB e TNM-FH + 10% de SFB na concentração de 5×10^5 células/mL em frascos agitados de 100 mL com volume de trabalho de 20 mL e mantidas sob agitação de 100 rpm a 28 °C. As culturas foram induzidas com 700 μ M de CuSO_4 (indicado pela seta). Os dados representam a média entre as duplicatas com o erro padrão. ★ indica diferença entre o crescimento da população celular cultivada em meio SF-900 II SFM com as demais culturas ($p < 0,05$); ✦ indica diferença entre o crescimento da população celular cultivada em meio Schneider + 10% de SFB com as demais culturas ($p < 0,05$).

Apesar da diferença no crescimento celular foram coletadas 10^6 células de cada uma das duplicatas dos cultivos nos meios SF-900 II SFM, Insect-Xpress™ e Schneider + 10% de SFB no terceiro, quinto, oitavo e décimo dia de cultivo para análise da GPV por ELISA. Das células cultivadas no meio TNM-FH somente foram coletadas células no décimo dia de cultivo.

4.5.2.1 Análise da produção de GPV por ELISA

A GPV das amostras celulares obtidas durante a cinética celular no terceiro, quinto, sétimo e décimo primeiro dia de cultivo foram quantificadas por ELISA com o kit “*Rabies Glycoprotein Enzyme Immunoassay*” (Instituto Pasteur, Paris). A figura 24A mostra a quantificação da glicoproteína no vírus da raiva em μg por 10^7 células e a figura 24B mostra a quantificação dessa proteína por mililitro de cultivo.

Podemos observar que as células que foram cultivadas em meio Insect-Xpress™, apesar do menor crescimento celular apresentam cerca de duas vezes mais GPV por célula do que as células cultivadas em meio SF-900 II SFM. Entretanto, quando calculado a quantidade de proteína por mililitro de cultivo a relação se inverte, sugerindo que a quantidade de células produzidas tem grande importância na quantidade proteína obtida no cultivo.

Figura 24. Dosagem de GPV por ELISA de células S2MTGPV-H* (Mc 7) em diferentes meios de cultivo. Células S2MTGPV-H* (Mc 7) foram inoculadas nos meios de cultura SF-900 II SFM, Insect-Xpress™, Schneider + 10% SFB e TNM-FH + 10% de SFB na concentração de 5×10^5 células/mL em frascos agitados de 100 mL com volume de trabalho de 20 mL e mantidas sob agitação de 100 rpm a 28 °C. As culturas foram induzidas com 700 μM de CuSO_4 no 3º dia de cultivo. Dosagem em $\mu\text{g}/10^7$ células (A) e em $\mu\text{g}/\text{mL}$ (B). Os dados representam a média entre as duplicatas com o erro padrão. ★ indica diferença na dosagem da GPV da cultura com meio SF-900 II SFM e Insect-Xpress™ ($p < 0,05$). + indica diferença na dosagem da GPV da cultura com meio SF-900 II SFM com as culturas com meio Schneider + 10% SFB e TNM-FH + 10% de SFB ($p < 0,05$). ● indica diferença na dosagem da GPV da cultura com meio Insect-Xpress com as culturas com meio Schneider + 10% SFB e TNM-FH + 10% de SFB ($p < 0,05$).

A seguir discutiremos os dados apresentados nesse trabalho.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram construídos os vetores genéticos pMTiGPV, pMTiGPV-H (ah), pMTGPV e pMTGPV-H (ah) (Figuras 3, 4, 5 e 7). Esses vetores possuem o gene da GPV sob comando do promotor indutível da metalotioneína com ou sem o sinal de secreção BiP e com ou sem o gene de resistência a higromicina B (para seleção das células). Após a obtenção das populações de células de *Drosophila melanogaster* contendo os vetores, pudemos comparar dois diferentes sistemas de expressão gênica: a expressão da glicoproteína do vírus rábico em células com ou sem sinal de secreção BiP e também em células transfectadas com um único vetor ou co-transfectadas com dois vetores (um de expressão e outro de seleção).

Para o estudo da interferência do sinal de secreção BiP, a expressão de GPV nas populações de células S2MTiGPV e S2MTGPV podem ser comparadas, assim como a expressão nas populações celulares S2MTiGPV-H e S2MTGPV-H. O sinal de secreção BiP utilizado tem a função de direcionar o RNAm para o retículo endoplasmático e para a via de secreção de proteínas (Doms *et al.*, 1993; Kirkpatrick *et al.*, 1995; Gaudin, 1997), entretanto, o cDNA da GPV/PV, conforme foi utilizado nesse trabalho, já possui uma sequência própria de sinalização para secreção (*GeneBank* E07580).

Com relação a ação do sinal de secreção BiP, utilizado nas populações celulares S2MTiGPV e S2MTiGPV-H, nossos dados sugerem que esse sinal não influencia na expressão de GPV quando comparamos as populações S2MTiGPV e S2MTGPV. Entretanto, quando comparamos a expressão de GPV das populações S2MTiGPV-H e S2MTGPV-H, encontramos diferenças, uma vez que não foi possível detectar a GPV produzida pelas células S2MTiGPV-H através de nossas análises de ELISA ou imunofluorescência (Figuras 15, 16, 18, 19, 21).

Gaudin (1997), Kirkpatrick *et al.* (1995) e Doms *et al.* (1993) observaram que o chaperone BiP celular age impedindo que proteínas não totalmente glicosiladas e associadas sejam liberadas do retículo. Esses autores também mostraram que esse chaperone foi associado à correta síntese de proteínas heterólogas como anticorpos e algumas proteínas virais de membrana incluindo a glicoproteína do vírus rábico. Quando não há a desassociação da proteína com o chaperone essa não é liberada do retículo endoplasmático e será degradada. Como não tínhamos por objetivo verificar essa associação, nossos resultados não nos permitem afirmar que a expressão de GPV associada ao sinal de secreção BiP pelas

células S2MTiGPV-H esteja associada ao chaperone BiP celular e possivelmente por isso não detectamos a GPV. Entretanto, nessas células detectamos a síntese de RNAm específico da GPV (Figura 10), a proteína na forma monomérica por “*western blotting*” (Figura 11) e não detectamos a glicoproteína do vírus rábico através de imunoenaios específicos para a forma trimérica da proteína sugerindo que essas populações celulares não apresentam a correta síntese da proteína heteróloga.

Para verificar a eficiência de expressão de GPV em células transfectadas ou co-transfectadas, foram obtidas por transfecção do vetor pMTiGPV-H (ah) as populações celulares S2MTiGPV-H (Mc 1) e S2MTiGPV-H (Mc 2) e por co-transfecção a população S2MTiGPV (Mc 3), todas contendo o sinal de secreção BiP. A partir destas populações, por “*Western Blotting*”, verificamos que a proteína expressa (pela população S2MTiGPV-H (Mc 1)) apresenta tamanho semelhante à GPV monomérica (Figura 11), entretanto, não foi possível a observação da GPV trimérica nessa análise pela utilização de amostras fervidas, removendo as ligações entre os monômeros como também observado na proteína GPV do vírus.

Observamos também que a indução por sulfato de cobre não influencia no crescimento celular (nas células S2MTiGPV (Mc 3)) e que essa indução promove a expressão da GPV detectado por imunofluorescência (Figuras 12 e 13). O mesmo foi observado por Santos *et al.* (2007) em células de drosófila modificadas com a proteína verde fluorescente (EGFP) que, após indução com CuSO₄, apresentaram aumento de intensidade de fluorescência sem influência no crescimento celular. A ligeira diferença de crescimento entre as populações como observada na figura 12, foi possivelmente causada pelo fato de que o inóculo foi originado em culturas estáticas diferentemente das demais, o que pode ter gerado uma fase de adaptação de 3 a 4 dias, sendo responsável pelas diferenças no crescimento das células modificadas e selvagem.

Dessas populações celulares não foi possível a detecção da GPV por ELISA em quantidades acima de 0,05 µg por 10⁷ células (dados não mostrados) e, em nosso laboratório, transfecções das células S2 realizadas em passagens baixas geraram populações celulares com melhor produção da proteína heteróloga (Yokomizo, 2006; Santos *et al.*, 2007; Yokomizo *et al.*, 2007). Decidimos realizar outras transfecções com os quatro vetores, sendo dois com o sinal de secreção BiP e dois com o gene de seleção integrado ao vetor de interesse. Nestas novas transfecções, realizadas simultaneamente em passagens mais baixas, observamos que as populações celulares que foram transfectadas com vetores contendo os genes de interesse e

seleção (S2MTiGPV-H (Mc 5) e S2MTGPV-H (Mc 7)) apresentaram menor sensibilidade a higromicina B do que as populações celulares co-transfectadas (S2MTiGPV (Mc 4) e S2MTGPV (Mc 6)). Isso se deve possivelmente à maior quantidade de genes de seleção, uma vez que, nas transfecções a quantidade de gene de seleção é igual a dos genes de interesse e nas co-transfecções a relação gene de seleção para gene de interesse é de 1:20.

Utilizando estas novas populações celulares para análise por ELISA e FACS, pudemos notar que apenas três das quatro populações celulares produzidas expressam a GPV de modo detectável por estes testes. Somente a população S2MTiGPV-H (Mc 5), não produz a proteína de interesse (Figuras 15 e 16), apesar de transcrever o DNA para RNA mensageiro como observado por PCR da transcrição reversa (Figura 10).

Com a finalidade de aumentar a expressão da proteína heteróloga por essas populações celulares decidimos adicionar novamente a pressão seletiva com 600 µg/mL de higromicina B durante duas semanas. Após esse tratamento, observamos um aumento de aproximadamente 10 vezes na expressão de todas as populações celulares (Figuras 18 e 19), com exceção da população S2MTiGPV-H* (Mc 5). Nesse ensaio nós analisamos também a GPV no sobrenadante lisado (Tabela 5), isso indica que a proteína heteróloga produzida pelas células está sendo liberada no meio de cultura, provavelmente em fragmentos membranares. Novamente, somente a população S2MTiGPV-H* (Mc 5) não apresentou a proteína nessa análise por ELISA.

Outra estratégia para aumentar a expressão de proteínas em culturas celulares, que tem sido muito utilizada, é a adição de butirato de sódio no cultivo. Esse tratamento promove uma descondensação do DNA e consequente aumento da síntese protéica (Dorner *et al.*, 1989; Baumert *et al.*, 1998; Sambrook e Russel, 2001; Chen *et al.*, 2002; Li e Li, 2006; Ping *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2007). Assim, realizamos análise da GPV pelas populações celulares S2MTiGPV (Mc 4), S2MTiGPV-H (Mc 5), S2MTGPV (Mc 6) e S2MTGPV-H (Mc 7) com a adição de 5 mM de NaBu juntamente com a indução por 700 µM de CuSO₄.

O resultado desse tratamento foi observado com o aumento de aproximadamente 50% na quantificação de GPV produzida pelas células S2MTGPV-H (Mc 7) tratadas com butirato de sódio em relação as não tratadas (Figuras 18, 19 e 21). Embora essa diferença não tenha sido significativa ($p < 0,05$), provavelmente devido às amostras estarem em duplicatas e não em maior número, esses dados podem indicar uma possível inserção dos vetores em regiões

não ativas do genoma celular. Novamente, na população S2MTiGPV-H (Mc 5) não foi detectada a GPV por análise em ELISA mesmo quando tratadas com NaBu.

As células S2MTGPV-H* (Mc 7) expressaram a glicoproteína da raiva em torno de 3 vezes mais do que as demais populações. Essas células foram analisadas em microscopia confocal após dois dias da indução por sulfato de cobre. Essa análise mostra que a GPV se localiza principalmente na membrana celular (Figura 22), sendo pouco encontrada em regiões internas das células.

Análises com a finalidade de verificar o melhor sistema para expressão dessa proteína foram realizadas. Para isso, a população celular S2MTGPV-H* (Mc 7) foi submetida a diferentes meios de cultivo e analisada por ELISA. O cultivo das células S2MTGPV-H* (Mc 7) em diferentes meios mostra que a expressão da proteína heteróloga pode ser maior quando utilizado o meio Insect-Xpress™ em relação ao meio SF-900 II SFM, entretanto, em nossos resultados o crescimento celular inferior no meio Insect-Xpress™ não favorece a utilização desse meio para produção maior de GPV (Figuras 23 e 24) diferentemente do observado por Galesi *et al.* (2008) e Batista *et al.* (2008; 2009) que em meios sem livre de soro fetal bovino o crescimento das células S2 recombinantes foi similar ao crescimento no meio SF-900 II SFM.

A partir desses nossos resultados podemos apresentar algumas conclusões que estão apresentadas a seguir.

6 CONCLUSÕES

Nesse trabalho obtivemos as construções plasmidiais contendo o gene da glicoproteína do vírus da raiva associado ou não ao sinal de secreção BiP, em vetores com ou sem o gene de resistência a higromicina B, utilizada para seleção das células de *Drosophila melanogaster* recombinantes. Para isto, realizamos as transfecções dos vetores pMTiGPV-Hygro e pMTGPV-Hygro e as co-transfecções dos vetores pMTiGPV e pMTGPV com o vetor pCoHygro em células S2, obtendo populações celulares S2MTiGPV-H, S2MTGPV-H, S2MTiGPV e S2MTGPV, respectivamente.

Nossos dados da análise da GPV expressa pelas células S2MTiGPV-H por “*western blotting*” sugerem que esta proteína encontra-se no tamanho esperado de ~65 kDa. A comparação da expressão da GPV das células transfectadas e co-transfectadas por ELISA sugere que o sistema de transfecção é mais eficiente, uma vez que encontramos três vezes mais GPV que no sistema de co-transfecção. Quando comparamos a expressão da GPV pelas células com ou sem o sinal de secreção BiP, nossos dados não nos permitiram afirmar que há influência na expressão da proteína pela presença da sequência sinal BiP. A GPV também foi analisada por imunofluorescência, sendo detectada na superfície celular em até 52% das células S2MTGPV-H.

Após um novo tratamento com higromicina B nas populações celulares nós obtivemos as populações celulares S2MTiGPV* (Mc 4), S2MTiGPV-H* (Mc 5), S2MTGPV* (Mc 6) e S2MTGPV-H* (Mc 7). Estas diferentes populações apresentaram um aumento de aproximadamente dez vezes na expressão da GPV em relação às não re-selecionadas. Após a adição de butirato de sódio ao meio de cultura não encontramos diferenças na expressão da GPV, sugerindo que o gene desta proteína não se encontra integrado em regiões inativas do genoma celular.

A expressão de GPV em células cultivadas em outros meios de cultivo indica que a produção da GPV pode ser melhorada, entretanto o crescimento das células S2MTGPV-H* (Mc 7) foi afetado, sugerindo a necessidade de se estabelecer padrões de otimização, como crescimento e expressão gênica. Nas condições que utilizamos o meio mais eficiente para a expressão da proteína heteróloga foi o SF900 II SFM.

A partir dos dados deste trabalho foi publicado um artigo no “*Journal of Biotechnology*” com o título: “*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” (ANEXO B)

REFERÊNCIAS*

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular biology of the cell. 2nd. ed. New York: Garland; 1989. 1218 p.

Astray RM, Augusto E, Yokomizo AY, Pereira CA. Analytical approach for the extraction of recombinant membrane viral glycoprotein from stably transfected drosophila melanogaster cells. *Biotechnol J*. 2008;3(1):98-103.

Bahloul C, Jacob Y, Tordo N, Perrin P. DNA-based immunization for exploring the enlargement of immunological cross-reactivity against the lyssaviruses. *Vaccine*. 1998;16(4):417-25.

Batista FR, Moraes AM, Buntmeyer H, Noll T. Influence of culture conditions on recombinant drosophila melanogaster s2 cells producing rabies virus glycoprotein cultivated in serum-free medium. *Biologicals*. 2009;37(2):108-18.

Batista FR, Pereira CA, Mendonca RZ, Moraes AM. Formulation of a protein-free medium based on ipl-41 for the sustained growth of drosophila melanogaster s2 cells. *Cytotechnology*. 2008;57(1):11-22.

Baumert TF, Ito S, Wong DT, Liang TJ. Hepatitis c virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J Virol*. 1998;72(5):3827-36.

Benting J, Lecat S, Zacchetti D, Simons K. Protein expression in drosophila schneider cells. *Anal Biochem*. 2000;278(1):59-68.

Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 1979;7(6):1513-23.

Bovo R, Galesi AL, Jorge SAC, Piccoli RA, Moraes AM, Pereira CA, Augusto EF. Kinetic response of a drosophila melanogaster cell line to different medium formulations and culture conditions. *Cytotechnology*. 2008;57(1):23-35.

Brighty DW, Rosenberg M, Chen IS, Ivey-Hoyle M. Envelope proteins from clinical isolates of human immunodeficiency virus type 1 that are refractory to neutralization by soluble cd4 possess high affinity for the cd4 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(17):7802-5.

Buckingham SD, Matsuda K, Hosie AM, Baylis HA, Squire MD, Lansdell SJ, Millar NS, Sattelle B. Wild-type and insecticide-resistant homo-oligomeric gaba receptors of drosophila melanogaster stably expressed in a drosophila cell line. *Neuropharmacology*. 1996;35(9-10):1393-401.

* **De acordo com:**

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

- Chang KH, Yang JM, Chun HO, Chung IS. Enhanced activity of recombinant beta-secretase from drosophila melanogaster s2 cells transformed with cdnas encoding human beta1,4-galactosyltransferase and galbeta1,4-glcna2,6-sialyltransferase. *J Biotechnol.* 2005;116(4):359-67.
- Chen T, Sun H, Lu J, Zhao Y, Tao D, Li X, Huang B. Histone acetylation is involved in hsp70 gene transcription regulation in drosophila melanogaster. *Arch Biochem Biophys.* 2002;408(2):171-6.
- Cherbas L, Moss R, Cherbas P. Transformation techniques for drosophila cell lines. *Methods Cell Biol.* 1994;44:161-79.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of rna isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.
- Condreay JP, Witherspoon SM, Clay WC, Kost TA. Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(1):127-32.
- Culp JS, Johansen H, Hellmig B, Beck J, Matthews TJ, Delers A, Rosenberg M. Regulated expression allows high level production and secretion of hiv-1 gp120 envelope glycoprotein in drosophila schneider cells. *Biotechnology (N Y).* 1991;9(2):173-7.
- Debré R, Cellers J. Clinical virology: The evaluation and management of human viral infections. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1970. 138-54 p.
- Delagneau J-F, Perrina P, Atanasiu P. Structure of the rabies virus: Spatial relationships of the proteins g, m1, m2 and n *Annales de l'Institut Pasteur. Virologie.* 1981;132(4):473-93.
- Deml L, Wolf H, Wagner R. High level expression of hepatitis b virus surface antigen in stably transfected drosophila schneider-2 cells. *J Virol Methods.* 1999;79(2):191-203.
- Doms RW, Lamb RA, Rose JK, Helenius A. Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology.* 1993;193(2):545-62.
- Dorner AJ, Wasley LC, Kaufman RJ. Increased synthesis of secreted proteins induces expression of glucose-regulated proteins in butyrate-treated chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1989;264(34):20602-7.
- Ellis J. Proteins as molecular chaperones. *Nature.* 1987;328(6129):378-9.
- Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. Ii. Error probabilities. *Genome Res.* 1998;8(3):186-94.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 1998;8(3):175-85.
- Galesi AL, Aguiar MA, Astray RM, Augusto EF, Moraes AM. Growth of recombinant drosophila melanogaster schneider 2 cells producing rabies virus glycoprotein in bioreactor employing serum-free medium. *Cytotechnology.* 2008;57(1):73-81.

- Gaudin Y. Folding of rabies virus glycoprotein: Epitope acquisition and interaction with endoplasmic reticulum chaperones. *J Virol*. 1997;71(5):3742-50.
- Gaudin Y, Ruigrok RW, Knossow M, Flamand A. Low-ph conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion. *J Virol*. 1993;67(3):1365-72.
- Gordon D, Abajian C, Green P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. *Genome Res*. 1998;8(3):195-202.
- Gupta PK, Sharma S, Walunj SS, Chaturvedi VK, Raut AA, Patial S, Rai A, Pandey KD, Saini M. Immunogenic and antigenic properties of recombinant soluble glycoprotein of rabies virus. *Vet Microbiol*. 2005;108(3-4):207-14.
- Haas IG, Wabl M. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature*. 1983;306(5941):387-9.
- Hanahan D. Studies on transformation of escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*. 1983;166(4):557-80.
- Ivey-Hoyle M. Recombinant gene expression in cultured drosophila melanogaster cells. *Curr Opin Biotechnol*. 1991;2(5):704-7.
- Jorge SAC, Hera C, Spina AM, Moreira RC, Pinho JR, Menck CF. Expression of the hepatitis b virus surface antigen in mammalian cells using an epstein-barr-virus-derived vector. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1996;46(5-6):533-7.
- Jorge SAC, Hera C, Spina AM, Pinho JR, Menck CF. Transient expression of hepatitis b virus surface antigen (hbsag) gene in monkey cells by a sv40-based virus vector. *Biotechnol Lett*. 1995;17(12):1285-90.
- Jorge SAC, Santos AS, Spina A, Pereira CA. Expression of the hepatitis b virus surface antigen in drosophila s2 cells. *Cytotechnology*. 2008;57(1):51-9.
- Kazanji M, Bomford R, Bessereau JL, Schulz T, de The G. Expression and immunogenicity in rats of recombinant adenovirus 5 DNA plasmids and vaccinia virus containing the htlv-i env gene. *Int J Cancer*. 1997;71(2):300-7.
- Kieny MP, Lathe R, Drillien R, Spehner D, Skory S, Schmitt D, Wiktor T, Koprowski H, Lecocq JP. Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature*. 1984;312(5990):163-6.
- Kirkpatrick RB, Ganguly S, Angelichio M, Griego S, Shatzman A, Silverman C, Rosenberg M. Heavy chain dimers as well as complete antibodies are efficiently formed and secreted from drosophila via a bip-mediated pathway. *J Biol Chem*. 1995;270(34):19800-5.
- Klepfer SR, Debouck C, Uffelman J, Jacobs P, Bollen A, Jones EV. Characterization of rabies glycoprotein expressed in yeast. *Arch Virol*. 1993;128(3-4):269-86.
- Lathe RF, Kieny MP, Schmitt D, Curtis P, Lecocq JP. M13 bacteriophage vectors for the expression of foreign proteins in escherichia coli: The rabies glycoprotein. *J Mol Appl Genet*. 1984;2(4):331-42.

- Lecocq JP, Kieny MP, Lemoine Y, R. Drillien, Wiktoi T, Koprowski H, Lathe R. New rabies vaccines: Recombinant DNA approaches. In: Koprowski, Plotkin, editor. World's debt to pasteur New York: Alan R. Liss; 1985, p.259-71.
- Lee JM, Park JH, Park JO, Chang KH, Chung IS. Expression of recombinant erythropoietin in stably transformed drosophila melanogaster s2 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2000;36(6):348-50.
- Li B, Tsing S, Kosaka AH, Nguyen B, Osen EG, Bach C, Chan H, Barnett J. Expression of human dopamine beta-hydroxylase in drosophila schneider 2 cells. *Biochem J.* 1996;313 (Pt 1):57-64.
- Li RW, Li C. Butyrate induces profound changes in gene expression related to multiple signal pathways in bovine kidney epithelial cells. *BMC Genomics.* 2006;7::234.
- Maillard AP, Gaudin Y. Rabies virus glycoprotein can fold in two alternative, antigenically distinct conformations depending on membrane-anchor type. *J Gen Virol.* 2002;83(Pt 6):1465-76.
- McCarroll L, King LA. Stable insect cell cultures for recombinant protein production. *Curr Opin Biotechnol.* 1997;8(5):590-4.
- Mendonca RZ, Greco KN, Sousa AP, Moraes RH, Astray RM, Pereira CA. Enhancing effect of a protein from *Ionomia obliqua* hemolymph on recombinant protein production. *Cytotechnology.* 2008;57(1):83-91.
- Mochizuki H, Schwartz JP, Tanaka K, Brady RO, Reiser J. High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells. *J Virol.* 1998;72(11):8873-83.
- 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. *J Gen Virol.* 1992;73 (Pt 2):335-45.
- Nilsen SL, Castellino FJ. Expression of human plasminogen in drosophila schneider s2 cells. *Protein Expr Purif.* 1999;16(1):136-43.
- Perrin P, Thibodeau L, Sureau P. Rabies immunosome (subunit vaccine) structure and immunogenicity. Pre- and post-exposure protection studies. *Vaccine.* 1985;3(3):325-32.
- Pfeifer TA, Hegedus DD, Grigliatti TA, Theilmann DA. Baculovirus immediate-early promoter-mediated expression of the zeocin resistance gene for use as a dominant selectable marker in dipteran and lepidopteran insect cell lines. *Gene.* 1997;188(2):183-90.
- Ping W, Ge J, Li S, Zhou H, Wang K, Feng Y, Lou Z. Baculovirus-mediated gene expression in chicken primary cells. *Avian Dis.* 2006;50(1):59-63.
- Prehaud C, Coulon P, Diallo A, Martinet-Edelist C, Flamand A. Characterization of a new temperature-sensitive and avirulent mutant of the rabies virus. *J Gen Virol.* 1989;70(Pt 1):133-43.

Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463-7.

Santos MG, Jorge SA, Brillet K, Pereira CA. Improving heterologous protein expression in transfected drosophila s2 cells as assessed by egfp expression. *Cytotechnology*. 2007;54(1):15-24.

Schamel WW, Kuppig S, Becker B, Gimborn K, Hauri HP, Reth M. A high-molecular-weight complex of membrane proteins bap29/bap31 is involved in the retention of membrane-bound igd in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(17):9861-6.

Schatzmayer HG. Emerging and reemerging viral diseases. *Cad Saude Publica*. 2001;17 Suppl:209-13.

Schneider I. Cell lines derived from late embryonic stages of drosophila melanogaster. *J Embryol Exp Morphol*. 1972;27(2):353-65.

Shotkoski F, Zhang HG, Jackson MB, ffrench-Constant RH. Stable expression of insect gaba receptors in insect cell lines. Promoters for efficient expression of drosophila and mosquito rdl gaba receptors in stably transformed mosquito cell lines. *FEBS Lett*. 1996;380(3):257-62.

Sissoeff L, Mousli M, England P, Tuffereau C. Stable trimerization of recombinant rabies virus glycoprotein ectodomain is required for interaction with the p75^{ntr} receptor. *J Gen Virol*. 2005;86(Pt 9):2543-52.

Song J, Liang C, Chen X. Transduction of avian cells with recombinant baculovirus. *J Virol Methods*. 2006;135(2):157-62.

Summers MD, Smith GE. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedure. Texas: Department of Entomology Texas Agricultural Experiment Station; 1987. 1-56 p.

Swiech K, da Silva CS, Arantes MK, dos Santos AS, Astray RM, Pereira CA, Suazo CA. Characterization of growth and metabolism of drosophila melanogaster cells transfected with the rabies-virus glycoprotein gene. *Biotechnol Appl Biochem*. 2008a;49(Pt 1):41-9.

Swiech K, Rossi N, Astray RM, Suazo CA. Enhanced production of recombinant rabies virus glycoprotein (rrvgp) by drosophila melanogaster s2 cells through control of culture conditions. *Cytotechnology*. 2008b;57(1):67-72.

Swiech K, Rossi N, Silva BG, Jorge SA, Astray RM, Suazo CA. Bioreactor culture of recombinant drosophila melanogaster s2 cells: Characterization of metabolic features related to cell growth and production of the rabies virus glycoprotein. *Cytotechnology*. 2008c;57(1):61-6.

Tartaglia J, Paoletti E. Live recombinant viral vaccines. In: Van Regenmortel MHV, Neurath AR, editor. *Immunochemistry of viruses ii. The basis for serodiagnosis and vaccines* Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1990. p.125-51.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The clustal_x windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(24):4876-82.

Tuchiya K, Matsuura Y, Kawai A, Ishihama A, Ueda S. Characterization of rabies virus glycoprotein expressed by recombinant baculovirus. *Virus Res.* 1992;25(1-2):1-13.

Valle MA, Kester MB, Burns AL, Marx SJ, Spiegel AM, Shiloach J. Production and purification of human menin from drosophila melanogaster s2 cells using stirred tank reactor. *Cytotechnology.* 2001;35(2):127-35.

Yokomizo AY. Expressão do gene da glicoproteína do vírus da raiva (gvp/pv) em células de drosophila melanogaster (s2) [Tese]. São Paulo: Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo; 2006.

Yokomizo AY, Jorge SA, Astray RM, Fernandes I, Ribeiro OG, Horton DS, Tonso A, Tordo N, Pereira CA. Rabies virus glycoprotein expression in drosophila s2 cells. I. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line. *Biotechnol J.* 2007;2(1):102-9.

Zhang F, Ma W, Zhang L, Aasa-Chapman M, Zhang H. Expression of particulate-form of japanese encephalitis virus envelope protein in a stably transfected drosophila cell line. *Virol J.* 2007;4:17.

Zhao YM, Chen X, Sun H, Yuan ZG, Ren GL, Li XX, Lu J, Huang BQ. Effects of histone deacetylase inhibitors on transcriptional regulation of the hsp70 gene in drosophila. *Cell Res.* 2006;16(6):566-76.

ANEXOS

ANEXO A – Alinhamento da sequência da GPV (M13215 obtida do *GeneBank*) e parte do vetor pMT/V5-HisA (Invitrogen[™]) com a sequência obtida com os primers BGHR e MTF

```

GPV      cat ctc agt gca act aaa ggg ggg atc tag atc ggg gta cct act agt cca gtg tgg tgg aat tgg agc tgg gta ccc
pMTGPVBGHRc  --- --- --- --- --- --- --- --- ---g att cga --t ggg cta cct act aat cca gtg tgg tgg aat tcc agc tgg gta ccc
pMTGPVMTF    --- --- --- --- --- --- --- --- ---

GPV      ttc tag agc cac cat ggt tcc tca ggc tct cct gtt tgt tgt acc cct tct ggt ttt tcc att gtg ttt tgg gaa att ccc
pMTGPVBGHRc  --- --- --- --- --- --- --- --- ---
pMTGPVMTF    ttc tag agc cac cat ggt tcc tca ggc tct cct gtt tgt tgt acc cct tct ggt ttt tcc att gtg ttt tgg gaa att ccc

GPV      tat tta cac gat acc aga caa gct tgg tcc ctg gag ccc gat tga cat aca tca cct cag ctg ccc aaa caa ttt ggt
pMTGPVBGHRc  --- --- --- --- --- --- --- --- ---
pMTGPVMTF    tat tta cac gat acc aga caa gct tgg tcc ctg gag ccc gat tga cat aca tca cct cag ctg ccc aaa caa ttt ggt

GPV      agt gga gga cga agg atg cac caa cct gtc agg gtt ctc cta cat gga act taa agt tgg ata cat ctc agc cat aaa
pMTGPVBGHRc  --- --- --- --- --- --- --- --- ---
pMTGPVMTF    agt gga gga cga agg atg cac caa cct gtc agg gtt ctc cta cat gga act taa agt tgg ata cat ctc agc cat aaa

GPV      aat gaa cgg gtt cac ttg cac agg cgt tgt gac gga ggc tga aac cta cac taa ctt cgt tgg tta tgt cac aac cac
pMTGPVBGHRc  --- --- --- --- --- --- --- --- ---
pMTGPVMTF    aat gaa cgg gtt cac ttg cac agg cgt tgt gac gga tgc tga aac cta cac taa ctt cgt tgg tta tgt cac aac cac

GPV      gtt caa aag aaa gca ttg ccg ccc aac acc aga tgc atg tag agc cgc gta caa ctg gaa gat ggc cgg tga ccc cag
pMTGPVBGHRc  --- --- --- --- --- --- --- --- ---
pMTGPVMTF    gtt caa aag aaa gca ttg ccg ccc aac acc aga tgc atg tag agc cgc gta caa ctg gaa gat ggc cgg tga ccc cag

GPV      ata tga aga gtc tct aca caa tcc tga ccc tga cta cca ctg gct tgg aac tgt aaa aac cac caa gga gtc tct cgt
pMTGPVBGHRc  --- --- --- --- --- --- --- --- ---
pMTGPVMTF    ata tga aga gtc tct acg caa tcc tga ccc tga cta cca ctg gct tgg aac tgt taa aac cac caa gga gga gtc tct cgt

GPV      tat cat atc tcc aag tgt ggc aga ttt gga ccc ata tga cag atc cct tca ctc gag ggt ctt ccc tgg cgg gaa gtg
pMTGPVBGHRc  --- --- --- --- --- --- --- --- ---
pMTGPVMTF    gat cat atc tcc gag tgt ggc aga ttt t--- --- --- --- --- --- --- --- ---

```



```

GPV      ctc agg agt agc ggt gtc ttc tac cta ctg ctc cac taa cca cga tta cac cat ttg gat gcc cga gaa tcc gag act
pMTGPVBGHRrc  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
pMTGPVMTF      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

GPV      agg gat gtc ttg tga cat ttt tac caa tag tag agg gaa gag agc atc caa agg gag tga gac ttg cgg ctt tgt aga
pMTGPVBGHRrc  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
pMTGPVMTF      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

GPV      tga aag agg cct ata taa gtc ttt aaa agg agc atg caa act cca gtt atg tgg agt tct cgg act tag act tat gga
pMTGPVBGHRrc  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
pMTGPVMTF      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

GPV      tgg aac atg ggt ctc gat gca aac atc aaa tga aac caa atg gtg ccc tcc cgg tca gtt gat caa ttt gca cga ctt
pMTGPVBGHRrc  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
pMTGPVMTF      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

GPV      tcg ctc aga cga aat tga gca cct tgt tgt aga gga gtt ggt caa gaa gag aga gga gtg tct gga tgc act aga gtc
pMTGPVBGHRrc  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
pMTGPVMTF      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

GPV      cat cat gac cac caa gtc agt gag ttt cag acg tct cag tca ttt aag aaa act tgt ccc tgg gtt tgg aaa agc ata
pMTGPVBGHRrc  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
pMTGPVMTF      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

GPV      tac cat att caa caa gac ctt gat gga agc cga tgc tca cta caa gtc agt cag aac ttg gaa tga gat cat ccc ttc
pMTGPVBGHRrc  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
pMTGPVMTF      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

GPV      aaa agg gtg ttt aag agt tgg ggg gag gtg tca tcc tca tgt aaa cgg ggt att ttt caa tgg tat aat att agg acc
pMTGPVBGHRrc  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
pMTGPVMTF      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

GPV      tga cgg caa tgt ctt aat ccc aga gat gca atc atc cct cct cca gca aca tat gga gtt gtt ggt atc ctc ggt tat
pMTGPVBGHRrc  --- --- --- -tt ctt aat ccc aga gat gca atc atc cct cct cca gca aca tat gga gtt gtt ggt atc ctc ggt tat
pMTGPVMTF      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

GPV      ccc cct tat gca ccc cct ggc aga ccc gtc tac cgt ttt caa gaa cgg tga cga ggc tga gga ttt tgt tga agt tca
pMTGPVBGHRrc  --- --- --- ccc cct tat gca ccc cct ggc aga ccc gtc tac cgt ttt caa gaa cgg tga cga ggc tga gga ttt tgt tga agt tca
pMTGPVMTF      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

```



```

GPV
PMTGPVBGHRrc cct tcc cga tgt gca cga acg gat ctc agg agt tga ctt ggg tct ccc gaa ctg ggg gaa gta tgt att act gag tgc
PMTGPVMTF pct tcc cga tgt gca cga acg gat ctc agg agt tga ctt ggg tct ccc gaa ctg ggg gaa gta tgt att act gag tgc
PMTGPVMTF --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

GPV
PMTGPVBGHRrc agg ggc cct gac tgc ctt gat gtt gat aat ttg cct gat gac atg ctg gag aag agt caa tgg atc gga acc tac aca
PMTGPVMTF agg ggc cct gac tgc ctt gat gtt gat aat ttg cct gat gac atg ctg gag aag agt caa tgg atc gga acc tac aca
PMTGPVMTF --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

GPV
PMTGPVBGHRrc aca caa tct cag agg gac agg gag gga ggt gtc agt cac tcc cca aag cgg gaa gat cat atc ttc atg gga atc ata
PMTGPVMTF aca caa tct cag agg gac agg gag gga ggt gtc agt cac tcc cca aag cgg gaa gat cat atc ttc atg gga atc ata
PMTGPVMTF --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

GPV
PMTGPVBGHRrc caa gag cgg ggg tga gac cgg act gtg atc tag aat ggg tac cga ggg gcg gcc gct cga gtc tag agg gcc ctt cga
PMTGPVMTF caa gag cgg ggg tga gac cgg act gtg atc tag aat ggg tac cga ggg gcg gcc gct cga gtc tag agg gcc ctt cga
PMTGPVMTF --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

GPV
PMTGPVBGHRrc agg taa gcc tat ccc taa ccc tct cct cgg tct cga ttc tac gcg tac cgg tca tca tca cca tca cca tlg agt taa
PMTGPVMTF agg taa gcc tat ccc taa ccc tct cct cgg tct cga ttc tac gcg tac cgg tca tca tca cca tca cca tlg agt taa
PMTGPVMTF --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

GPV
PMTGPVBGHRrc acc cgc tga tca gcc tgg act gtg cct tct a
PMTGPVMTF acc gat --g tca g
PMTGPVMTF --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

```

ANEXO B – Trabalhos publicados

- I. Lemos MAN, Santos AS, Astray RM, Pereira CA, Jorge SAC. Rabies virus glycoprotein expression in drosophila s2 cells. I. Design of expression/selection vectors, subpopulations selection and influence of sodium butyrate and culture medium on protein expression. *Journal of Biotechnology*. 2009;143:103-10.
- II. Santos AS, Lemos MAN, Pereira CA, Jorge SAC. Rabies virus glycoprotein expression in drosophila s2 cells: Influence of re-selection on protein expression. *Biotechnol J*. In press 2009.