

**THAISSA CONSONI BERNARDINO**

**EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA G (RVGP) E  
DA PROTEÍNA DE MATRIZ (M) DO VÍRUS DA RAIVA  
UTILIZANDO BACULOVÍRUS RECOMBINANTE**

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

SÃO PAULO  
2019

**THAISSA CONSONI BERNARDINO**

**EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA G (RVGP) E DA PROTEÍNA  
DE MATRIZ (M) DO VÍRUS DA RAIVA UTILIZANDO  
BACULOVÍRUS RECOMBINANTE**

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Soraia Attie Calil Jorge

Versão corrigida. A versão corrigida eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo  
2019

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Bernardino, Thaissa Consoni  
EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA G (RVGP) E DA  
PROTEÍNA DE MATRIZ (M) DO VÍRUS DA RAIVA UTILIZANDO  
BACULOVÍRUS RECOMBINANTE / Thaissa Consoni  
Bernardino; orientador Soraia Attie Calil Jorge. --  
São Paulo, 2019.  
111 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,  
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Virus-Like Particles. 2. Glicoproteína do  
Lyssavirus da raiva. 3. Proteína de Matriz do  
Lyssavirus da raiva. 4. Baculovirus. I. Jorge, Soraia  
Attie Calil, orientador. II. Título.

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

Candidato (a): Thaissa Consoni Bernardino

Título da Tese: Expressão da glicoproteína G (RVGP) e proteína de matriz (M) do vírus da raiva utilizando baculovírus recombinante

Orientador: Soraia Attie Calil Jorge

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o (a) candidato (a):

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

Examinador (a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador (a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador (a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador (a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador (a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....


Presidente:                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

São Paulo, 09 de setembro de 2015

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Expressão da glicoproteína G (RVGP) e proteína de matriz (M) do vírus da raiva utilizando baculovírus recombinante", protocolado nº 5581190815, sob a responsabilidade de Soraia Attie Calil Jorge; Thaissa Consoni Bernardino, foi revisado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN em 20/08/2015, e não envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica.

This is to certify that the proposal "", protocol number 5581190815, under the responsibility Soraia Attie Calil Jorge; Thaissa Consoni Bernardino, has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee in 08/20/2015, and that it does not involve breeding and/or use of animais belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata, in scientific research.



Prof. Dr. José Ricardo Jensen  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan

Aos meus pais, Paulo David Bernardino e Maria Antônia Consoni Bernardino, que muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Vocês são meu exemplo de força e dedicação, sem seus ensinamentos e cuidados eu nada teria conseguido. Sim, nós conseguimos! Agradeço pela paciência e compreensão com minha ausência durante essa longa jornada. Obrigada!

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

À minha cachorra, Vida por tornar meus dias mais leves e alegres. Sem dúvida anjo da guarda tem quatro patas.

Ao meu marido, Odirlei Araújo de Aguiar, pelo companheirismo, respeito, incentivo, suporte e paciência.

À minha, não somente Orientadora, mas muito mais do que isso, uma grande amiga Dra. Soraia Attie Calil Jorge. Tive a sorte e o privilégio de ser sua aluna no Mestrado e no Doutorado, poucos tiveram essa oportunidade e serei sempre grata. Obrigada por todos os ensinamentos na pesquisa científica, por sempre auxiliar e me conduzir nessa difícil, porém encantadora área. “A escolha de um jovem depende da sua inclinação, mas também da chance de conhecer um grande mestre” - Rita Levi Montalcini.

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

Ao Dr. Carlos Augusto Pereira (*in memoriam*) pela oportunidade de poder desenvolver esse projeto. Infelizmente o senhor partiu antes de eu concluir, mas tenho certeza que onde o senhor estiver, estará muito orgulhoso de nós! Obrigada pela oportunidade.

À minha grande amiga Sandra Fernanda Suárez Patiño, eu não tenho palavras para te agradecer, mesmo distante sempre esteve presente! Agradeço por todos os ensinamentos, carinho e por não me deixar desanimar e desacreditar. “Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós” - Antoine de Saint-Exupery.

Agradeço a todos, sem exceções, do laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan. Todos esses anos, quase 12 anos, foram fundamentais para o meu crescimento emocional, profissional e pessoal. Muito obrigada pelo carinho, risadas e conselhos.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, em especial à Simone Gonçalves Silva Jared, agradeço a ajuda, carinho e torcida.

Ao Professor Bergmann Ribeiro, pela oportunidade de realizar um pequeno estágio em seu laboratório na Universidade de Brasília. Esse estágio me proporcionou um grande aprendizado para o desenvolvimento do meu projeto.

À Lorena Chaves por me ensinar pacientemente, pela ajuda sempre que necessária, pelo carinho, atenção e pelo incentivo sempre.

Ao Instituto Butantan e ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo.

À FAPESP e CNPq pelos auxílios de projetos de pesquisas.

À CAPES pela bolsa concedida. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

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

Sim eu consegui! A todos vocês meu sincero MUITO OBRIGADA!



“Acima de tudo, não temas os momentos difíceis. O melhor vem deles”. Rita Levi Montalcini

“As mulheres que mudaram o mundo não precisaram mostrar nada além de sua inteligência”.  
Rita Levi Montalcini

## RESUMO

**BERNARDINO, T.C.** Expressão da glicoproteína g (RVGP) e da proteína de matriz (M) do vírus da raiva utilizando baculovírus recombinante. 2019. 111 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A raiva é uma doença zoonótica antiga e ainda hoje causa a morte de mais de 60.000 pessoas em todo o mundo a cada ano. O vírus da raiva codifica 5 proteínas, entre elas a glicoproteína (RVGP) e a proteína de matriz (RVM). A RVGP é a única proteína exposta na superfície da partícula viral e é mediadora da adesão e entrada do vírus na célula hospedeira, e tem a capacidade de induzir resposta imune com formação de anticorpos neutralizantes. Já a proteína de matriz tem sido descrita com inúmeras funções, entre elas, está a sua capacidade de auxiliar no processo de produção de partículas semelhantes a vírus (VLPs). As VLPs têm sido produzidas em diferentes sistemas de expressão, como o sistema de baculovírus recombinantes. Esse sistema tem se destacado para a produção e expressão de proteínas heterólogas. Para este trabalho, nós construímos dois bacmídeos recombinantes portadores dos genes da RVGP e RVM. Esses bacmídeos foram utilizados para transfectar células Sf9, para a produção dos lotes virais. Os lotes virais foram titulados utilizando células SF9 *Easy Titer*. A partir dos ensaios de infecção e coinfeção nós padronizamos o melhor MOI e o tempo de coleta das VLPs. O sobrenadante celular foi coletado, concentrado e purificado por gradiente de sacarose. Cada etapa foi utilizada para detecção das proteínas por imunoenaios, como *dot blot*, *western blot* e ELISA (para a RVGP). Utilizando o gradiente de sacarose com frações de 10, 30 e 50% foi possível verificar a separação das VLPs dos BVs recombinantes. Através da técnica de contrastação negativa visualizamos estruturas que se assemelham a VLPs de raiva, produzidas em células de inseto, assim como também observávamos os BVs recombinantes. Vale ressaltar que as VLPs e os BVs foram detectados em diferentes frações do gradiente de sacarose. Com a utilização do ELISA para dosar a RVGP total conseguimos verificar a eficiência de recuperação das VLPs em cada etapa do processo de purificação. Esses dados nos permitiram concluir que obtivemos uma boa produção de lotes com altos títulos virais; através das técnicas de imunodeteção observamos as proteínas no tamanho esperado, tanto na infecção quanto na coinfeção; os métodos para purificação das VLPs necessitam ser otimizados, porém o gradiente de sacarose nos mostrou ser eficiente para a separação das VLPs dos BVs recombinantes.

**Palavras-Chave:** *Virus-Like Particles*. Glicoproteína do vírus da raiva. Proteína de Matriz do vírus da raiva. Baculovírus recombinante.

**ABSTRACT**

**BERNARDINO, T.C.** Expression of glycoprotein G (RVGP) and matrix protein (M) of rabies virus using recombinant baculovirus. 2019. 111 f. Ph. D. These (Biothecnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Rabies is an ancient zoonotic disease and still causes the deaths of over 60,000 people worldwide each year. The rabies lyssavirus encodes 5 proteins, including glycoprotein (RVGP) and matrix protein (RVM). RVGP is the only protein exposed on the surface of the viral particle and mediates virus adhesion and entry into the host cell, and is capable of inducing immune response with neutralizing antibody formation. Already the matrix protein has been described with numerous functions, among them is its ability to assist in the process of production of virus-like particles (VLPs). VLPs have been produced in different expression systems, such as the recombinant baculovirus system. This system has been outstanding for the production and expression of heterologous proteins. For this work, we built two recombinant bacmids carrying the RVGP and RVM genes. These bacmids were used to transfect Sf9 cells for the production of viral lots. Viral lots were titrated using SF9 Easy Titer cells. From the infection and coinfection assays we standardized the best MOI and the collection time of the VLPs. Cell supernatant was collected, concentrated and purified by sucrose gradient. Each step was used for protein detection by immunoassays such as dot blot, western blot and ELISA (for RVGP). Using the sucrose gradient with fractions of 10, 30 and 50% it was possible to verify the separation of VLPs from recombinant BVs. Through the negative contrast technique we visualized structures resembling rabies VLPs produced in insect cells, as we also observed recombinant BVs. It is worth mentioning, that VLPs and BVs were detected in different fractions of the sucrose gradient. Using ELISA to measure total RVGP we were able to verify the recovery efficiency of VLPs at each stage of the purification process. These data allowed us to conclude that we obtained a good production of lots with high viral titers; Through immunodetection techniques we observed proteins of the expected size, both in infection and in co-infection; The methods for purification of the VLPs need to be optimized, but the sucrose gradient showed us to be efficient for the separation of VLPs from recombinant BVs.

**Key-words:** *Virus-Like Particles*. Rabies envelope glycoprotein. Rabies matrix protein. Recombinant Baculovirus.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Esquema representativo do vírus da raiva.....	23
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida do RABV .....	25
<b>Figura 3.</b> Esquema representativo da glicoproteína de membrana (RVGP) do vírus da raiva	28
<b>Figura 4.</b> Ciclo de vida do baculovírus selvagem.....	30
<b>Figura 5.</b> Ciclo de vida dos vírus brotados (BVs) .....	33
<b>Figura 6.</b> Geração de baculovírus recombinante e expressão do gene de interesse usando o sistema de expressão de baculovírus Bac-to-Bac® .....	36
<b>Figura 7.</b> Mapa dos elementos que compõem o vetor doador pFastBac™1 .....	42
<b>Figura 8.</b> Geração de baculovírus recombinante e a expressão do gene de interesse usando o Sistema de Expressão Baculovírus Bac-to-Bac®.....	43
<b>Figura 9.</b> Representação do fragmento sintetizado por <i>gBlocks Gene Fragments</i> para expressão da proteína RVM .....	45
<b>Figura 10.</b> Representação do fragmento de DNA da glicoproteína do vírus da raiva utilizado para a clonagem no pFastBac™1 .....	47
<b>Figura 11.</b> Titulação dos lotes de baculovírus recombinantes (BVM ou BVG) utilizando células Sf9 ET.....	51
<b>Figura 12.</b> Amplificação do gene da proteína de matriz do vírus da raiva por PCR.....	58
<b>Figura 13.</b> Representação da construção do plasmídeo pFastBac-RVM .....	59
<b>Figura 14.</b> Confirmação da clonagem do plasmídeo pFastBac-RVM por digestão com as enzimas de restrição <i>Bam</i> HI e <i>Eco</i> RI e <i>Bgl</i> I .....	60
<b>Figura 15.</b> Confirmação da transposição do gene RVM para o bacmídeo por PCR .....	60
<b>Figura 16.</b> Amplificação do gene da glicoproteína de membrana RVGP do vírus da raiva por PCR.....	61
<b>Figura 17.</b> Representação da construção do plasmídeo pFastBac-RVGP .....	62
<b>Figura 18.</b> Confirmação da clonagem do plasmídeo pFastBac-RVGP por digestão com enzimas de restrição e por amplificação da RVGP .....	63
<b>Figura 19.</b> Confirmação da transposição do gene RVGP para o bacmídeo por PCR .....	64
<b>Figura 20.</b> Efeito citopático da infecção por diferentes BV recombinantes em células Sf9 - 120 h.p.i. ....	65
<b>Figura 21.</b> Análise por <i>Dot Blot</i> da produção de VLPs do vírus da raiva produzidas em células de inseto.....	67
<b>Figura 22.</b> Análise por <i>Western Blot</i> da expressão das proteínas das VLPs de raiva produzidas em células de inseto .....	68

<b>Figura 23.</b> Foto do gradiente de sacarose utilizado para purificar BVs recombinantes e VLPs do vírus da raiva .....	69
<b>Figura 24.</b> Análise das etapas de purificação das VLPs a partir de sobrenadante de células Sf9 não infectadas e coinfectedas .....	71
<b>Figura 25.</b> Análise das 4 últimas frações do gradiente de sacarose a partir de sobrenadante de células Sf9 coinfectedas utilizando a técnica de <i>Western Blot</i> .....	72
<b>Figura 26.</b> Dosagem da proteína RVGP nas diferentes etapas de purificação .....	74
<b>Figura 27.</b> Contrastação negativa das partículas purificadas por gradiente de sacarose .....	75
<b>Figura 28.</b> Análise do brotamento dos BVs e das VLPs por contrastação negativa .....	76

---

---

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Número de casos da raiva animal no Brasil.....	20
<b>Tabela 2.</b> Número de casos da raiva humana no Brasil.....	21
<b>Tabela 3.</b> Geração de VLPs utilizando sistema de baculovírus recombinante.....	34
<b>Tabela 4.</b> VLPs que estão atualmente disponíveis no mercado ou em fase de desenvolvimento clínico.....	38
<b>Tabela 5.</b> Descrição dos vetores utilizados no projeto.....	44
<b>Tabela 6.</b> Pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação da proteína de matriz do vírus da raiva.....	44
<b>Tabela 7.</b> Pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação da glicoproteína do vírus da raiva.....	46
<b>Tabela 8.</b> Anticorpos utilizados para os ensaios de imunodeteção.....	53
<b>Tabela 9.</b> Padrões de restrição esperados para o vetor pFastBac-RVGP.....	63
<b>Tabela 10.</b> Valores das frações do gradiente do gradiente.....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcMNPV	<i>Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus</i>
B.O.D	Câmara de demanda bioquímica de oxigênio
Bac-G	Bacmídeo recombinante que contém o gene que codifica a glicoproteína RVGP
Bac-M	Bacmídeo recombinante que contém o gene que codifica a proteína RVM
BV	Vírus brotados
BVG	Baculovírus que carregam o gene para codificar a glicoproteína do vírus da raiva
BVM	Baculovírus que carregam o gene para codificar a proteína de matriz do vírus da raiva
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eGFP	Proteína Fluorescente Verde
h.p.i	Horas pós-infecção
IPTG	Isopropil Beta D tiogalactopiranosídeo (do inglês <i>Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside</i> )
L	RNA polimerase RNA-dependente
MOI	Multiplicidade de Infecção ou <i>Multiplicity Of Infection</i>
N	Nucleoproteína do vírus da raiva
P	Fosfoproteína do vírus da raiva
pPH	Promotor da poliedrina
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês <i>phosphate buffered saline</i> )
pFastBac-RVGP	Plasmídeo intermediário que carrega o gene da proteína de matriz do vírus da raiva
pFastBac-RVM	Plasmídeo intermediário que carrega o gene da glicoproteína do vírus da raiva
pfu	Unidade formadora de placa
pUC e F1	Região de replicação bacteriana utilizada no sistema Bac-to-Bac
RABV	Vírus da raiva
RNP	Ribonucleoproteína do vírus da raiva
RNA <sub>v</sub>	RNA negativo não segmentado
RVGP	Glicoproteína do vírus da raiva
RVM	Proteína de matriz do vírus da raiva
Sf9	Células de <i>Spodoptera frugiperda</i> clone 9
Sf9 ET	Células Sf9 <i>Easy Titer</i>
SV-40 pA	É uma região do genoma do SV40 (vírus do símio 40) que funciona como um terminador de transcrição e um sinal poli A.
TCID 50	Doses infectantes para 50% da cultura de tecido
Tn7	Regiões de transposição utilizadas no sistema Bac-to-Bac
TOH	Tempo de coleta
TOI	Tempo de infecção
VLPs	Partículas semelhantes a vírus ou <i>virus-like particles</i>

---



---

**SUMÁRIO**

<b>1 Introdução</b> .....	17
<b>2 Revisão Bibliográfica</b> .....	19
2.1 <i>Doença Raiva</i> .....	19
2.2 <i>Vírus da raiva</i> .....	22
2.2.1 <i>Proteína de Matriz do vírus da raiva (RVM)</i> .....	25
2.2.2 <i>Glicoproteína do vírus da raiva (RVGP)</i> .....	27
2.3 <i>Baculovírus selvagem</i> .....	29
2.4 <i>Baculovírus recombinante como sistema de expressão</i> .....	30
2.4.1 <i>Produção de baculovírus in vitro</i> .....	32
2.4.2 <i>Sistema de produção de baculovírus recombinante Bac-to-bac</i> .....	35
2.5 <i>Partículas semelhantes à vírus - Virus-like particles (VLP)</i> .....	36
2.6 <i>Purificação das VLPs</i> .....	39
<b>3 Objetivos</b> .....	41
3.1 <i>Objetivo Geral</i> .....	41
3.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	41
<b>4 Material e Método</b> .....	42
4.1 <i>Sistema de expressão Bac-to-Bac e esquema de desenvolvimento do projeto</i> .....	42
4.1.1 <i>Construção do vetor pFastBac-RVM e do bacmídeo recombinante Bac-M</i> .....	44
4.1.2 <i>Construção do vetor pFastBac-RVGP e Bac-G</i> .....	46
4.2 <i>Células</i> .....	48



## SUMÁRIO

---

4.3 Transfecção dos bacmídeos recombinantes ( <i>Bac-M</i> e <i>Bac-G</i> ) para a produção dos lotes virais de baculovírus recombinante e análise do efeito citopático na cultura celular .....	49
4.4 Titulação Viral dos lotes virais de <i>BVM</i> e <i>BVG</i> .....	50
4.5 Cinética da expressão de VLP da raiva .....	51
4.6 Purificação e concentração das VLPs utilizando gradiente de sacarose .....	52
4.7 Análise da expressão das proteínas recombinantes .....	53
<b>4.7.1 Análise da expressão das proteínas recombinantes por Dot Blot</b> .....	53
<b>4.7.2 Análise da expressão das proteínas recombinantes por Western Blot</b> .....	54
<b>4.7.3 Análise da expressão da glicoproteína recombinantes RVGP por ELISA</b> .....	55
4.8 Análise por contrastação negativa das VLPs da raiva e dos BVs recombinantes por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....	56
4.9 Análise do perfil de brotamento das VLPs da raiva e dos BVs recombinantes por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....	57
<b>5 Resultados</b> .....	58
5.1 Confirmação da obtenção do plasmídeo <i>pFastBac-M</i> e bacmídeo recombinante <i>Bac-M</i> . .....	58
5.2 Confirmação da obtenção do plasmídeo <i>pFastBac-RVGP</i> e bacmídeo recombinante <i>Bac-G</i> .....	61
5.3 Efeito citopático da cultura celular e titulação dos lotes dos baculovírus recombinantes .....	64
5.4 Cinética da expressão de VLP da raiva .....	65
5.5 Detecção das proteínas recombinantes por Western Blot.....	67
5.6 Análise da produção de VLPs do vírus da raiva após as etapas de purificação .....	69
<b>5.6.1 Análise da produção de VLPs por Dot Blot</b> .....	70

---

---

<b>5.6.2 Análise da produção de VLPs por Western Blot</b> .....	71
<b>5.6.3 Análise da RVGP por ELISA</b> .....	72
<b>5.6.4 Análise das partículas virais por contrastação negativa</b> .....	74
<b>5.6.5 Análise do brotamento das partículas virais</b> .....	75
<b>6 Discussão</b> .....	77
<b>7 Conclusão</b> .....	86
<b>Apêndice A – Sequenciamento do gene da proteína RVM no vetor pFastBac</b> .....	102
<b>Apêndice B – Sequenciamento do gene da proteína RVGP no vetor pFastBac</b> .....	104
<b>Apêndice C – Artigo Publicado</b> .....	107
<b>Apêndice D – Artigo Publicado</b> .....	108
<b>Apêndice E – Artigo Publicado</b> .....	109
<b>Apêndice F – Artigo Submetido</b> .....	110

## 1 Introdução

O Vírus da raiva (RABV) é um membro do gênero *Lyssavirus* que pertence à família Rhabdoviridae. Este é o agente causador da doença raiva e representa uma grave ameaça à saúde humana e animal (FOOKS et al., 2014). Com uma taxa de mortalidade de 100% e uma alta contagem global de mortes por ano, a raiva é considerada uma das mais importantes doenças zoonóticas. A maioria dos casos de raiva humana ocorre em países em desenvolvimento devido aos limitados recursos médicos e ao tratamento inadequado (WHO, 2014; GUO et al., 2019). Esses números refletem desvantagens graves em relação à implementação da profilaxia pré e pós-exposição em ambientes endêmicos, como falta de vontade política e baixa prioridade dada à raiva. Como esses fatores contextuais têm se mostrado persistentes, há uma urgência em melhorar as estratégias atuais ou desenvolver novas abordagens para controlar a doença da raiva no futuro (NEEVEL et al., 2018).

O vírus da raiva codifica 5 proteínas, as de maiores interesses para o desenvolvimento do nosso projeto foram a glicoproteína de membrana (RVGP) e a proteína de matriz (RVM). A RVGP é o principal antígeno capaz de conferir resposta imunológica neutralizante contra uma infecção pelo vírus da raiva. Esta é uma glicoproteína transmembrânica, trimérica, que depende de modificações pós-traducionais para preservação de sua imunogenicidade (PERRIN; THIBODEAU; SUREAU, 1985; GAUDIN et al., 1992; JACKSON, 2013). Enquanto a proteína de matriz (RVM), além de inúmeras funções, a de principal interesse é a sua capacidade de realizar o brotamento de partículas semelhantes a vírus (VLPs) (MEBATSION; KONIG; CONZELMANN, 1996; MEBATSION; WEILAND; CONZELMANN, 1999).

Ao longo das últimas três décadas, partículas semelhantes a vírus se tornou uma tecnologia amplamente aceita, especialmente no campo da vacinologia. Como o significado das VLPs foi apreciado para o desenvolvimento de vacinas de última geração, várias plataformas de expressão para a produção de VLPs foram desenvolvidas, incluindo bactérias (*Escherichia coli*), levedura, células de inseto, células de mamíferos e plantas (JEONG; SEONG, 2017).

Há no mercado algumas vacinas baseadas em VLPs já disponíveis e outras que estão em diferentes estágios de estudo clínicos (ZELTINS, 2013; MERCK & CO., INC., 2017a; PROTEIN SCIENCES CORPORATION, 2018). Algumas dessas plataformas se baseiam na utilização de baculovírus recombinantes.

Por serem capazes de infectar células de insetos, os baculovírus são utilizados de forma segura em diversos processos biotecnológicos, em particular e de maior interesse para a produção de VLPs (PALOMARES et al., 2018). Esse sistema tem a vantagem de induzir uma

modificação pós-traducional mais completa, incluindo glicosilação e expressão de VLPs de múltiplos componentes (O'REILLY; MILLER; LUCKOW, 1994; RODRÍGUEZ-LIMAS et al., 2011). As vacinas baseadas em VLPs produzidas usando esses sistemas incluem a vacina contra o HPV Cervarix® (GlaxoSmithKline) e contra a influenza NanoFlu™ (Novavax) e FluBlock (Protein Science Corporation) (JEONG; SEONG, 2017).

Nesse contexto, nós utilizamos o sistema de baculovírus para a coexpressão das proteínas RVM e RVGP do vírus da raiva a fim de obter VLPs da raiva que carreguem a RVGP adequadamente dobrada e glicosilada contendo epítomos para respostas imunes humorais e celulares. Como já foi dito, a proteína RVGP, quando ancorada na membrana celular, é de difícil purificação, a grande vantagem desse sistema é permitir que a RVGP se apresente de forma solúvel nas VLPs o que pode facilitar o processo de purificação.

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 Doença Raiva

A raiva é uma doença antropozoonótica viral causada pelo vírus da raiva, esta é uma das infecções virais mais temida na história da humanidade. Isso se deve ao fato de que os pacientes que apresentam síndrome da raiva morrem invariavelmente da doença (YAMADA et al., 2018). A doença é transmitida pela saliva de animais infectados que entra no corpo por meio de uma mordida ou pele lesionada. É uma enfermidade infectocontagiosa e apresenta como principal característica o comprometimento do sistema nervoso central, causando encefalite, com sinais nervosos representados por agressividade, parestesia e paralisia. O vírus da raiva infecta todos os mamíferos, sendo os cães, morcegos e bovinos os mais infectados atualmente. O vírus viaja da ferida até o cérebro, onde causa inchaço e inflamação do tecido, o que causa os sintomas da doença (SEIF et al., 1985; BAHLOUL et al., 1998; LACKAY; KUANG; FU, 2008; MORATO; IKUTA; ITO, 2011).

A raiva por séculos têm representado um sério problema de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento (WHO, 2010), causando sérios danos socioeconômicos (BANYARD et al., 2011).

Apesar da disponibilidade de uma vacina segura e eficaz, a raiva causa a morte de cerca 60.000 pessoas por ano em todo o mundo, exceto Austrália e Antártica onde não há relatos de incidência da doença (SINGH et al., 2018). Mesmo com uma taxa de 100% de mortalidade, recentemente foram descritos 14 casos de sobrevivência humana da raiva em diferentes países, sendo 5 casos associados a contatos com morcegos e 6 casos associados a contatos com cães (WEYER et al., 2016).

Dentre os possíveis animais transmissores, o cão é o principal responsável por essas mortes e a maioria das vítimas dessa doença estão localizadas na África e na Ásia. Globalmente, as mortes por raiva raramente são relatadas e as crianças com idades entre 5 e 14 anos são as principais vítimas dessa doença (WHO, 2014).

Tratar uma exposição à raiva, onde o custo médio da profilaxia pós-exposição à doença é de 40 dólares na África e 49 dólares na Ásia, pode ser um fardo financeiro catastrófico para as famílias afetadas cuja renda média diária é de 1 a 2 dólares por pessoa (WHO, 2018a), e esta pode ser a causa do elevado número de mortes nesses continentes.

Os custos econômicos globais do combate à raiva canina foram estimados em 124,2 bilhões de dólares por ano. Esses custos são atribuídos ao risco de mortalidade humana

prematuras, gastos diretos com profilaxia pós-exposição, perda de renda devido as medidas pós-exposição, custos de vacinação do cão, custos de viagem para profilaxia pós-exposição, controle de cães, mortalidade de gado e testes de diagnóstico de raiva (ANDERSON; SHWIFF, 2015). Só no Brasil estima-se que os custos econômico com a raiva seja de  $\approx$  80 milhões de reais por ano, destes  $\approx$  36 milhões de reais são gastos com ações de vigilância epidemiológica para a raiva canina,  $\approx$  42 milhões de reais foram destinados à aquisição de imunobiológicos para profilaxia pós-exposição em humanos e  $\approx$  200 mil reais foram utilizados para o tratamento da doença em humanos (BRASIL, 2015).

No Brasil o número de casos de raiva transmitido por cães diminuiu, uma vez que houve sucesso nas campanhas de vacinação em massa (WADA; ROCHA; MAIA-ELKHOURY, 2011). Nos últimos anos tem se observado um aumento no número de casos da doença em animais silvestres, como morcegos, cachorros do mato, raposas e primatas não humanos (Tabela 1), o que nos mostra uma alteração no perfil epidemiológico da doença no Brasil (WADA; ROCHA; MAIA-ELKHOURY, 2011).

**Tabela 1.** Número de casos da raiva animal no Brasil

<b>Animal \ Ano</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>	<b>2019</b>
<b>Canina</b>	32	15	83	11	14	83	0
<b>Felina</b>	4	5	8	8	4	8	0
<b>Bovina</b>	778	730	207	250	555	318	1 <sup>1</sup>
<b>Equina</b>	105	111	30	50	84	48	0
<b>Outros herbívoros*</b>	19	25	4	10	12	6	0
<b>Quirópteros não hematofágos</b>	139	136	41	85	265	71	11 <sup>1</sup>
<b>Quirópteros hematofágos</b>	18	11	2	19	23	6	0
<b>Primata não humanos</b>	7	nd	3	1	7	4	0
<b>Canídeo Silvestre</b>	18	6	5	25	38	19	0

\* Outros herbívoros – compreende suínos, caprinos, ovinos, entre outros. nd - informação não definida. <sup>1</sup> informações dadas por órgãos não regulatórios. Tabela resumida das informações encontradas nos documentos do BRASIL (2019a).

As espécies de morcegos hematofagas ou não hematofagas são consideradas importantes, já que muitas delas são adaptadas à vida em áreas urbanas e podem transmitir o vírus para gatos e cães (PACHECO et al., 2010; SODRÉ; GAMA; ALMEIDA, 2010). O morcego hematofago *Desmodus rotundus* é o principal mantenedor da raiva em bovinos e, mais recentemente, responsável por surtos da doença em humanos (Tabela 2) (RUPPRECHT;

HANLON; HEMACHUDHA, 2002; KOTAIT; CARRIERI; TAKAOKA, 2009; SCHNEIDER et al., 2009; FAVORETTO et al., 2013). Deste modo, a reintrodução da raiva urbana a partir de animais silvestres é de grande preocupação para a saúde pública do país (KOTAIT; CARRIERI; TAKAOKA, 2009; FAVORETTO et al., 2013).

**Tabela 2.** Número de casos da raiva humana no Brasil

Ano	Número de Casos de Raiva Humana	Região com maior número de casos	Principal Animal Transmissor
<b>1990 - 2003</b>	485	Nordeste	Cães
<b>2004</b>	30	Norte	Morcego
<b>2005</b>	44	Nordeste	Morcego
<b>2006 - 2016</b>	39 – 1º caso de cura em 2008	Nordeste	Cães
<b>2017</b>	6 casos - 2º caso de cura	Norte	Morcego
<b>2018</b>	12	Norte	Morcego
<b>2019</b>	1*	Sul	Gato

Tabela resumida das informações encontradas nos documentos do BRASIL, 2019. \*Caso relatado pelo GOVERNO DO ESTADO DE SANTA CATARINA (2019).

Os casos de raiva no Brasil se concentram nas regiões do nordeste e norte, esse perfil epidemiológico pode ocorrer pelas dificuldades encontradas para realizar as atividades estabelecidas pelo Programa Nacional de Profilaxia da Raiva, o que se reflete em coberturas vacinais muito baixas e manutenção de grande contingente de pessoas suscetíveis. Além disso, a ocorrência de surtos na região da bacia Amazônica em 2004 e 2005, ocasionados por morcegos hematófagos, aumentou a ocorrência da doença acima dos níveis habituais naquela região (WADA; ROCHA; MAIA-ELKHOURY, 2011). Ainda assim, há a subnotificação de casos da doença em algumas regiões, estima-se que, para cada caso notificado existam 10 outros que não o foram (KOTAIT; CARRIERI; TAKAOKA, 2009).

O tratamento contra a doença é baseado em medidas pré e pós-exposição ao vírus. A OMS recomenda o uso de vacinas de cultivo celular, por esta apresentar imunogenicidade comprovada, maior segurança e menores riscos de reações adversas (GOMES et al., 2012).

A profilaxia pré-exposição é recomendada para médicos veterinários, professores, alunos e profissionais que trabalham com animais potencialmente infectados com o vírus da raiva e profissionais de laboratórios (BRASIL, 2014, 2016). O tratamento consta de três doses de vacina, ministradas nos dias 0, 7 e 28. Os anticorpos circulantes devem ser testados a partir do 14º dia após a última dose do esquema vacinal. Uma dose de reforço é preconizada quando a titulação estiver em níveis inferiores a 0,5 UI/mL.

No caso da profilaxia pós-exposição, deve-se iniciar o tratamento o mais precocemente possível com uma dose de vacina nos dias 0 e 3. Se o animal (“agressor”) estiver sadio no

décimo dia da exposição, encerrar o caso. Se o animal adoecer, morrer ou desaparecer durante o período de observação, aplicar o soro (imunoglobulinas heterólogas, específicas e purificadas, para neutralização do vírus rábico) e completar a vacinação até 5 doses. Aplicar uma dose entre o 7º e o 10º dia e uma dose nos dias 14 e 28 (BRASIL, 2014, 2016)

A vacina produzida em cultivo celular, utilizada no Brasil desde 2003, é gratuita e encontra-se disponível em toda rede do Sistema Único de Saúde (SUS) (GOMES et al., 2012).

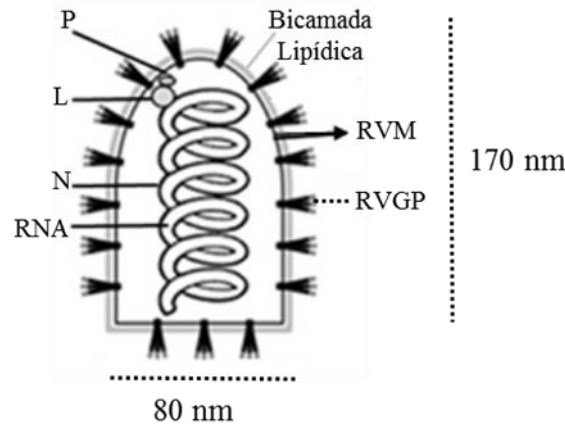
Apesar desse panorama favorável, ainda se utiliza o vírus inativado como vacina. O advento de novas tecnologias torna necessária a busca de alternativas de produção mais eficientes, seguras e de baixo custo para a vacina antirábica.

## 2.2 Vírus da raiva

O vírus da raiva (RABV) pertence ao gênero *Lyssavirus* da família Rhabdoviridae. O RABV é o membro mais proeminente deste gênero, com uma distribuição global e uma longa história de estudo (DAVIS; RALL; SCHNELL, 2015).

O RABV tem comprimento médio de 170 nm e diâmetro médio é de 80 nm, sua morfologia é baciliforme, semelhante à “bala de revólver” com uma extremidade plana e outra arredondada (KAPLAN, 1986; KING et al., 2012; ASTRAY; JORGE; PEREIRA, 2017). Seu genoma é um filamento único de RNA negativo não segmentado (RNA<sub>v</sub>) de aproximadamente 12 kb e codifica 5 proteínas: a nucleoproteína (N), a fosfoproteína (P), a RNA polimerase RNA-dependente (L), a proteína de matriz (RVM) e a glicoproteína (RVGP) (JACKSON, 2013) (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema representativo do vírus da raiva

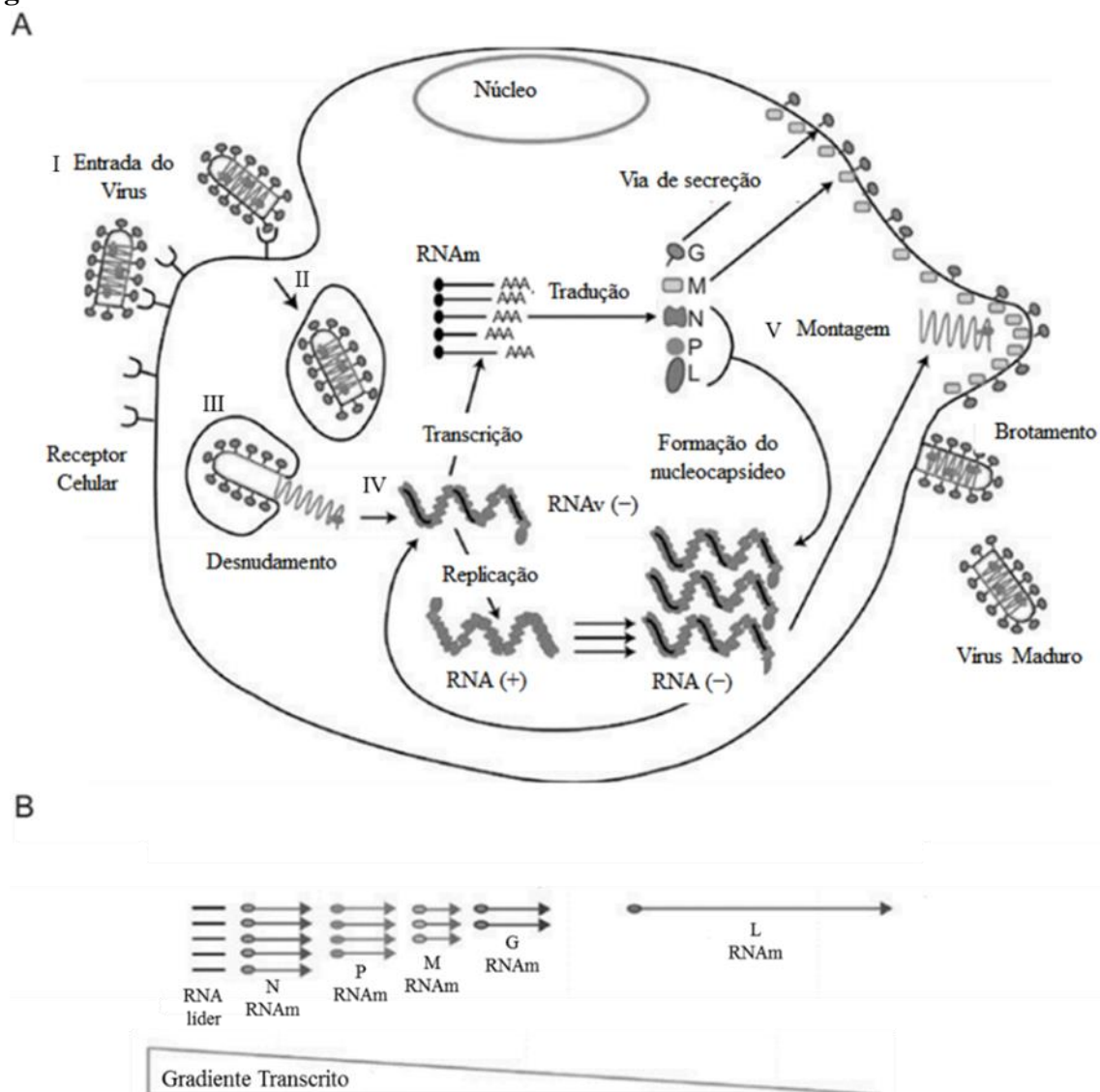
Na figura estão demonstradas as 5 proteínas que compõe o vírus da raiva: Glicoproteína (RVGP), Matriz (RVM), Fosfoproteína (P), Nucleoproteína (N) e a RNA- polimerase dependente (L). Fonte: Adaptado de ASTRAY; JORGE; PEREIRA (2017).

O RNA viral mais as proteínas N, P e L formam a ribonucleoproteína (RNP), que é responsável pela ativação da transcrição e replicação do vírus na célula hospedeira (ALBERTINI; RUIGROK; BLONDEL, 2011). O processo de replicação e transcrição viral ocorrem no citoplasma da célula hospedeira (MURPHY et al., 1999). A infecção viral pelo vírus da raiva induz a formação de corpos de inclusão citoplasmáticos, chamados de corpos de Negri. Nos corpos de Negri pode ocorrer também os processos de transcrição e replicação do vírus da raiva (MATSUMOTO et al., 1974; MANGHANI et al., 1986; LAHAYE et al., 2009, 2012).

Após a ligação da RVGP do vírus ao receptor acetilcolina nicotínico da célula hospedeira, o vírus entra na célula através da via endocítica. O ambiente ácido do endossoma induz uma alteração na conformação da RVGP que medeia a fusão do envelope viral com a membrana celular (ALBERTINI; RUIGROK; BLONDEL, 2011). Após a liberação do RNP no citoplasma da célula hospedeira, inicia-se a replicação viral.

Para a replicação, o complexo da polimerase produz uma cadeia de RNA positiva complementar ao genoma do RNAv (ALBERTINI; RUIGROK; BLONDEL, 2011). Estes RNAs de cadeia positiva ligam-se ao complexo da polimerase e são utilizados como modelo para amplificar os genomas de cadeia negativa para novas progênes virais. A proteína N recém-sintetizada liga-se ao RNA líder nascente. Essa associação da proteína N ao genoma viral é regulada pela proteína P, que desempenha o papel de chaperona na forma de um complexo N-P, impedindo que a proteína N se ligue ao RNA celular ou que a mesma se agregue (PELUSO; MOYER, 1988; DAVIS; RALL; SCHNELL, 2015) (Figura 2A).

Durante o processo de transcrição, o complexo da polimerase obtém acesso ao RNA<sub>v</sub> de maneira ainda pouco entendida. Acredita-se que ele reconheça um promotor específico na extremidade 3' do genoma e progrida em direção ao 5' terminal por um mecanismo *stop-start*, produzindo seis transcritos consecutivos: primeiro, o RNA líder e então os cinco RNAm que codificam para as proteínas N, P, RVM, RVGP e L (MURPHY et al., 1999; ALBERTINI; RUIGROK; BLONDEL, 2011). Os níveis de expressão dos RNAm do vírus da raiva e, portanto, das proteínas que eles codificam, são máximos na extremidade 3' do genoma e se tornam sequencialmente menos abundantes em direção à extremidade 5' do genoma. Assim, o N é mais abundante, seguido pelo P, RVM, RVGP e L. Este decréscimo é devido à desassociação da polimerase do RNP durante a transcrição quando um sinal de terminação é atingido, requerendo que a polimerase se reconecte para iniciar a transcrição do gene a *downstream* (DAVIS; RALL; SCHNELL, 2015), essa desassociação leva a atenuação da expressão das proteínas em cerca de 20 a 30% (WAGNER; ROSE, 1996; ROSE; WHITT, 2001) (Figura 2B). Tal condição nos levam a refletir que possa ser necessário uma concentração maior da proteína RVM do que da RVGP.

**Figura 2.** Ciclo de vida do RABV

(A) O vírus da raiva se replica no citoplasma da célula hospedeira. Podemos observar as fases de: I - ligação ao receptor; II - endocitose seguida por fusão de membrana; III - liberação de nucleocapsídeo; IV - processos de transcrição, seguida de tradução, e replicação do RNA viral; V - montagem do vírus e brotamento da progênie viral. (B) Organização do genoma do vírus da raiva. Durante a transcrição, os 5 RNAm com um CAP na extremidade 5' e com uma cauda poli-A na extremidade 3' codificam as proteínas virais. O complexo de polimerase se desassocia do molde em cada sinal de terminação (*STOP*). A polimerase nem sempre se liga com sucesso ao RNA líder, levando a um gradiente de transcrição negativo de 3' a 5'. Fonte: Adaptado de ALBERTINI; RUIGROK; BLONDEL (2011).

### 2.2.1 Proteína de Matriz do vírus da raiva (RVM)

Entre as cinco proteínas estruturais do RABV, a proteína RVM é uma pequena proteína ( $\approx 20 - 25$  kDa) que forma oligômeros que se ligam a região externa do nucleocapsídeo (M-RNP), dando a rigidez e o formato da estrutura do vírus (TORDO et al., 1986; AMEYAMA et al., 2003; GE et al., 2010; KHALIFA et al., 2016).

No vírus, a RVM (Figura 1 - RVM indicada pela seta) está localizada abaixo do envelope lipídico e ela tem contato com a região citoplasmática da glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) e também com o complexo RNP (ZAN et al., 2016). Após a transcrição, o complexo M-RNP migra para uma área da membrana plasmática que possui altas concentrações de glicoproteína (RVGP). O complexo então se liga à glicoproteína e o vírus completo brota da membrana plasmática da célula hospedeira (CDC, 2011).

Além de seu papel estrutural no vírus, a proteína RVM é considerada uma proteína multifuncional que participa em diferentes processos do vírus e da célula hospedeira. A RVM atua na condensação do nucleocapsídeo durante a montagem do vírus, na união do envelope celular ao nucleocapsídeo, na degradação do citoesqueleto celular e na inibição de funções na célula hospedeira (FINKE; CONZELMANN, 2003). Além de ser um potente modulador da apoptose após a infecção viral, uma vez que induz a disfunção mitocondrial e atua como um dos principais indutores de apoptose em células neuronais (LEE et al., 2012; KHALIFA et al., 2016).

Apesar do papel proeminente da RVM na montagem, no brotamento do RABV e manipulação da célula hospedeira, o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos sobre cada função desta proteína ainda é pouco conhecido. Trabalhos de pesquisas têm sido realizados com expressão transiente de RVM, na ausência de outras proteínas virais (POLLIN et al., 2013). KASSIS et al. (2004) mostraram as vias de apoptose usadas pelo RABV. Os autores transfectaram células HeLa (células de adenocarcinoma humano) com um plasmídeo contendo o gene da proteína de matriz. A proteína expressa foi capaz de induzir apoptose celular, ativando vias similares àquelas descritas no contexto da infecção viral.

Já o grupo de KOMAROVA et al. (2007) foram os primeiros a demonstrar que a RVM pode inibir a tradução eucariótica por meio de uma interação proteína-proteína com o Fator de iniciação eucariótica 3 e também forneceram uma nova visão sobre o entendimento da patogênese da infecção pelo vírus da raiva.

LARROUS et al. (2010) compararam a proteína RVM do vírus Mokola (genótipo 3 de baixa patogenicidade) com a proteína RVM de um vírus da raiva isolado de um cão da Tailândia (genótipo 1). O grupo demonstrou que um pequeno fragmento de 20 aminoácidos localizado entre os resíduos 67 e 86 da proteína RVM do vírus Mokola foi capaz de induzir a morte celular mediada por TRAIL (Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF), bem como inibiu a atividade de citocromo C oxidase.

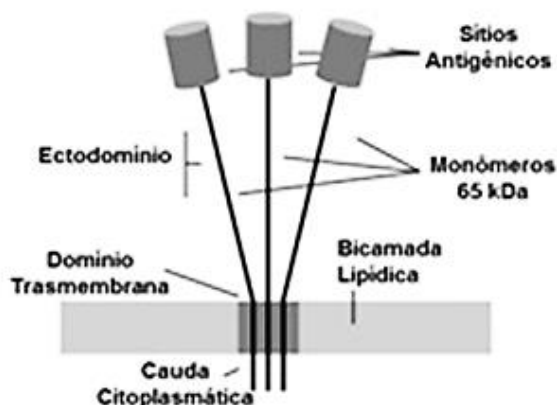
Embora a proteína RVM seja uma das principais constituintes do envelope viral, ela não foi tão estudada quanto a glicoproteína RVGP. Conseqüentemente, a natureza e as funções da proteína RVM têm sido mal compreendidas (NAKAHARA et al., 2003).

A proteína RVM expressa em células é capaz de causar brotamento de vesículas, (MEBATION; WEILAND; CONZELMANN, 1999) o que permite supor que esta proteína seja importante no processo de brotamento viral (ROSE; WHITT, 2001) e na formação de partículas semelhantes a vírus (*virus-like particles* – VLP). MEBATION; KONIG; CONZELMANN (1996) e MEBATION; WEILAND; CONZELMANN (1999) mostraram que o domínio citoplasmático da proteína RVGP interage especificamente com a proteína RVM, e que a deleção deste domínio reduz a taxa de brotamento em torno de 6x (FINKE; CONZELMANN, 2003; FINKE; MUELLER-WALDECK; CONZELMANN, 2003), esses dados nos mostram a importância da interação dessas duas proteínas para a produção dos vírus da raiva e para produção de VLPs da raiva.

### **2.2.2 Glicoproteína do vírus da raiva (RVGP)**

A RVGP é uma glicoproteína de membrana do tipo 1 com 505 aminoácidos dentre algumas de suas funções, ela tem um papel importante na patogênese da raiva por ser mediadora na adesão aos receptores celulares e também na entrada do vírus na célula hospedeira (ETESSAMI et al., 2000).

Esta é a única proteína do envelope viral que se projeta para o exterior com espículas glicosiladas triméricas (WUNNER et al., 1985; GAUDIN et al., 1992). A estrutura da glicoproteína é composta por quatro domínios distintos, o domínio peptídeo sinal, o ectodomínio, o domínio transmembrana e o domínio citoplasmático (GUPTA et al., 2005). A RVGP madura, sem o peptídeo sinal, tem massa molecular de aproximadamente 65 kDa (quando produzida em células de mamíferos), na forma trimérica tem 195 kDa (YOKOMIZO et al., 2007a; ASTRAY; JORGE; PEREIRA, 2017) (Figura 3).

**Figura 3.** Esquema representativo da glicoproteína de membrana (RVGP) do vírus da raiva

A proteína RVGP é uma glicoproteína trimérica dividida em 3 domínios: ectodomínio, domínio transmembrana e domínio citoplasmático, cuja principal função é ligar-se aos receptores da célula hospedeira. Fonte: Adaptado de ASTRAY; JORGE; PEREIRA (2017).

Além de a RVGP ter um papel importante na adesão às células hospedeiras, ela também é altamente imunogênica, sendo fundamental para a resposta imune contra o vírus da raiva, induzindo a produção de anticorpos neutralizantes, ativação de linfócitos T auxiliares e citotóxicos e atuando na patogênese da doença (PERRIN; THIBODEAU; SUREAU, 1985; GAUDIN et al., 1992; JACKSON, 2013).

Por causa da sua atividade imunogênica, a RVGP tem sido estudada em diferentes sistemas de expressão como bactérias, leveduras, células de inseto, plantas e células de mamíferos. A proteína expressa em bactérias não foi capaz de proteger camundongos após desafio, provavelmente porque procariotos não são capazes de realizar a glicosilação de proteínas, modificações pós-traducionais que seriam fundamentais para a antigenicidade da RVGP (YELVERTON et al., 1983). MORIMOTO; KAWAI; MIFUNE (1992) construíram um vetor derivado de retrovírus contendo o gene da RVGP. Esse vetor permitiu a expressão de RVGP em células de neuroblastoma e células de rim de hamster. 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. Em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, KLEPFER et al. (1993), expressaram a RVGP do vírus da raiva utilizando um vetor de expressão sob controle de um promotor indutível (metalotioneína) e um promotor constitutivo (triose desidrogenase). A glicoproteína foi glicosilada e encontrou-se associada à membrana das leveduras, os extratos de levedura contendo a RVGP na membrana protegeram animais em desafio intramuscular, mas não no desafio intracerebral em camundongos.

Estudos da expressão da RVGP em células de inseto *Spodoptera frugiperda* (Sf9) utilizando um baculovírus recombinante foram realizados por diferentes grupos de pesquisa. PREHAUD et al. (1989), demonstraram através da construção de um baculovírus recombinante com o gene da RVGP sob comando do promotor da poliedrina que a RVGP expressa manteve as características estruturais e imunogênicas nessas culturas. TUCHIYA et al. (1992) verificaram que a RVGP produzida por baculovírus recombinante é capaz de se fundir formando complexos em condições de pH abaixo de 6. Estes experimentos conseguiram resultados variáveis, o que não é surpreendente considerando a complexidade estrutural da glicoproteína do vírus da raiva (ERTL, 2009).

### 2.3 *Baculovirus selvagem*

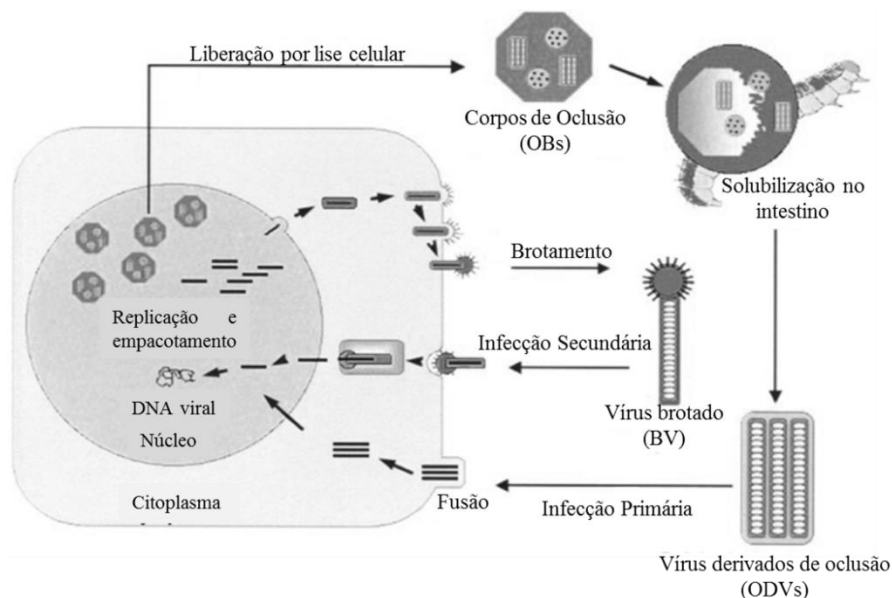
Os baculovírus são vírus patogênicos que infectam invertebrados das ordens Lepidoptera, Hymenoptera e Diptera de forma espécie-específica (JEHLE et al., 2006; KATAOKA et al., 2012; BLISSARD; THEILMANN, 2018). Eles são vírus de DNA circular dupla fita, envelopados e com tamanho variado entre 80 kbp a 180 kbp e capsídeo viral de tamanho entre 40-60 nm de diâmetro e 250-385 nm de comprimento (HERNIOU et al., 2003; JEHL et al., 2006; OKANO et al., 2006).

O ciclo de infecção dos baculovirus pode ser dividido em três fases: inicial (*early*), tardia (*late*) e muito tardia (*very late*) (O'REILLY; MILLER; LUCKOW, 1994). Durante o ciclo, ocorre a produção de dois tipos de vírions, os ODVs (vírus derivados de oclusão - "*Occlusion-derived virus*") e os BVs (vírus brotados - "*Budded virus*"). Ambos possuem o mesmo genoma, mas diferem na morfogênese, composição dos envelopes e função dentro do ciclo de infecção viral (ROHRMANN, 2013b; BLISSARD; THEILMANN, 2018).

O ciclo de infecção de baculovírus na natureza é iniciado pelos ODVs, que são encontrados imersos em uma matriz proteica, constituída basicamente de uma proteína chamada poliedrina, formando uma estrutura cristalina chamada corpo de oclusão (OB, do inglês: "*Occlusion Body*"). Os OBs são ingeridos por larvas de insetos e seguem pelo sistema digestivo (ROHRMANN, 2013b). Pela ação do pH, a matriz proteica é dissolvida liberando os ODVs (HORTON; BURAND, 1993). Após essa infecção primária, os BVs são formados e saem das células dando início à infecção sistêmica. Em períodos tardios da infecção viral, vírions são inseridos nos corpos de oclusão dentro do núcleo das células infectadas e são

liberados no ambiente após a morte e desintegração do inseto (ROHRMANN, 2013b) (Figura 4).

**Figura 4.** Ciclo de vida do baculovírus selvagem



Os corpos de oclusão presentes no meio ambiente são ingeridos pelo inseto e dissolvem-se no intestino liberando os ODVs, que, em seguida, infectam as células epiteliais do intestino médio (infecção primária). Os ODVs migram para o núcleo celular iniciando o processo de replicação e transcrição viral, dando origem ao BVs que, por sua vez, causam infecção secundária. Além disso, os vírus da progênie são incorporados em OBs que são liberados após a morte do hospedeiro. Adaptado de GHOSH et al. (2002).

#### 2.4 *Baculovírus recombinante como sistema de expressão*

O sistema baculovírus tem muitos recursos atrativos, tais como: potencial vetor para terapia gênica e de expressão de proteínas heterólogas, incluindo fácil manipulação, habilidade em carregar grandes e múltiplos insertos de DNA, altos títulos de produção de vírus e purificação (CHESHENKO et al., 2001), baixa toxicidade e baixo custo. E as suas capacidades intrínsecas para translocação dentro do citoplasma e passagem através do envelope nuclear, podem potencialmente aumentar a eficiência dos vetores de entrega de genes (AIRENNE et al., 2013). O sistema de expressão de proteínas heterólogas utilizando baculovírus vem sendo amplamente utilizado na pesquisa e na indústria (SARI et al., 2016).

O sistema inclui a presença de promotores altamente ativos, como o promotor da poliedrina (pPH) e o promotor p10, e a substituição de genes não essenciais à replicação do vírus pelo gene heterólogo de interesse (POSSEE, 1997). Deste modo, o baculovírus tornou-se uma ferramenta essencial para a produção e caracterização de uma ampla variedade de proteínas



recombinantes, *virus-like particles* e como *display* de proteínas heterólogas nas superfícies dos *Budded Virus* (O'REILLY; MILLER; LUCKOW, 1994; JARVIS, 1997; MÄKELÄ; OKER-BLOM, 2006; GRABHERR; ERNST, 2010; YAMAJI, 2014).

A família *Baculoviridae* é subdividida em quatro gêneros: *Alphabaculovirus*, *Betabaculovirus*, *Deltabaculovirus* e *Gammabaculovirus*. Entre os baculovírus, vários vírus do gênero *Alphabaculovirus* foram estudados de forma mais intensa, incluindo o vírus de *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) (BLISSARD; THEILMANN, 2018).

Baculovírus do gênero AcMNPV tornaram-se um dos mais úteis como vetores de expressão de genes heterólogos, uma vez que é possível produzir títulos de expressão de proteínas mais altos que em outros sistemas eucarióticos de expressão (MAEDA, 1989; BROWN et al., 1991).

Os baculovírus recombinantes apresentam a vantagem de serem capazes de infectar células de insetos, o que torna sua produção relativamente simples, uma vez que a manutenção celular é de baixo custo, pelo fato de o meio de cultivo não conter soro fetal bovino e não haver a necessidade de ambiente com CO<sub>2</sub>. Além disso, a célula de inseto é capaz de realizar modificações pós-traducionais importantes para manter a função de algumas glicoproteínas (VAN OERS, 2011).

Estudos utilizando baculovírus como vetores de expressão estão sendo realizados com sucesso e com resultados promissores (MADHAN; PRABAKARAN; KWANG, 2010; WANG; BALASUNDARAM, 2010), haja vista, a produção da vacina Cervarix<sup>®</sup> (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Bélgica) que foi obtida por recombinação genética a partir de baculovírus, esta vacina tem aprovação para comercialização pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pela Agência Europeia de Medicamento (ALVES, 2011).

Em 2014 o FDA (ESTADOS UNIDOS DA AMERICA, 2018) aprovou o uso de uma nova vacina para a prevenção da gripe sazonal para pessoas de 18 a 49 anos de idade. A nova vacina chamada Flublok<sup>®</sup> (*Protein Science Corporation*, New York, EUA) é uma vacina quadrivalente de influenza recombinante constituída por antígenos de hemaglutinina recombinantes purificados produzidos pelo sistema de baculovírus recombinantes. A Flublok é adaptada anualmente, de acordo com os requisitos do Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos, para fornecer proteção contra as mais recentes cepas de influenza (PROTEIN SCIENCES CORPORATION, 2018).

Com seu potencial de superexpressão e rápida velocidade de desenvolvimento, os BVs têm sido uma das escolhas mais atraentes para a produção de proteínas recombinantes para

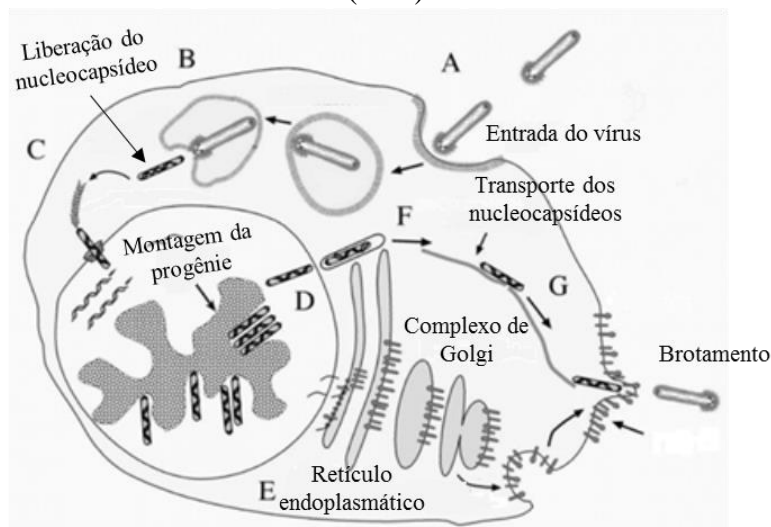
qualquer finalidade. Desde que os BVs foram desenvolvidos nos anos 80, centenas de proteínas recombinantes, desde enzimas citosólicas até proteínas ligadas a membranas, foram produzidas com sucesso em células de inseto infectadas por baculovírus recombinantes (SEBASTIAN; VIDAL; ESCRIBANO, 2018).

#### ***2.4.1 Produção de baculovírus in vitro***

Em células de inseto a infecção é iniciada pelos BVs (Figura 5). A ligação dos BV às células hospedeiras é mediada pela principal glicoproteína de envelope, a GP64. Após a ligação à superfície celular, os BVs penetram nas células por endocitose mediada via clatrina (BLISSARD; THEILMANN, 2018). Após a internalização do BV, os endossomas são acidificados, e esse processo de acidificação do endossoma desencadeia a fusão da membrana endossomal com o envelope viral, liberando os nucleocapsídeos no citoplasma da célula hospedeira (ROHRMANN, 2013a; CHAVES, 2016; BLISSARD; THEILMANN, 2018). Os nucleocapsídeos entram no núcleo celular através de um complexo de poros nucleares, dando início à transcrição dos genes, replicação do DNA e reunião dos nucleocapsídeos no estroma virogênico (ROHRMANN, 2013a; BLISSARD; THEILMANN, 2018).

A partir de estudos baseados na análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET), acredita-se que a saída do nucleocapsídeo do núcleo celular ocorre através de um processo de brotamento a partir da membrana nuclear. Esse nucleocapsídeo que brota do núcleo parece produzir uma vesícula de transporte no citoplasma. O tráfico de nucleocapsídeos envelopados (centro das vesículas de transporte) pode ocorrer via microtúbulos (DANQUAH et al., 2012).

A modificação da membrana da célula hospedeira pela GP64 é necessária para a formação de vírus e, conseqüentemente, para infecções secundárias (VAN OERS et al., 2008; BIERNAT et al., 2012). Ao atingir a membrana citoplasmática modificada, os BVs brotam e obtêm envelopes virais (ROHRMANN, 2013a). Esses BVs serão responsáveis pela infecção sistêmica na cultura celular (O'REILLY; MILLER; LUCKOW, 1994; BLISSARD; THEILMANN, 2018).

**Figura 5.** Ciclo de vida dos vírus brotados (BVs)

(A) BV se liga e entra na célula hospedeira por endocitose mediada via clatrina. (B e C) Após a internalização do BV, os endossomos são acidificados o que leva a fusão da membrana endossomal com o envelope viral, liberando os nucleocapsídeos no citoplasma da célula hospedeira. Os nucleocapsídeos entram no núcleo celular através de um complexo de poros nucleares. (D) Nucleocapsídeo presente no núcleo celular, inicia os processos de replicação, transcrição e montagem da progênie de nucleocapsídeos no estroma virogênico. (E) A GP64 é traduzida em associação com o retículo endoplasmático, glicosilada, transportada e incorporada na membrana citoplasmática através do aparelho de Golgi. (F) Os nucleocapsídeos que saem do núcleo são observados em vesículas citoplasmáticas (vesículas de transporte), posteriormente eles são liberados no citoplasma. (G) O transporte de nucleocapsídeos para a membrana plasmática envolve microtúbulos. Ao atingir a membrana citoplasmática modificada os BVs brotam e obtêm envelopes virais. Adaptado de ROHRMANN (2013a).

Os primeiros sinais de efeito citopático da infecção na cultura celular, visíveis em microscópio ótico, aparecem na fase tardia da infecção. Esses efeitos são identificados pelo aumento do volume nuclear, cessar do crescimento celular e a diminuição da viabilidade celular (ÜSTÜN-AYTEKIN et al., 2014).

Assim, a produção de baculovírus *in vitro* é relativamente fácil e apresenta algumas vantagens, algumas já mencionadas, mas que valem a pena serem ressaltadas. A expressão em células eucarióticas permite que as proteínas de interesse sofram as modificações pós-traducionais que são importantes para a obtenção da proteína na conformação nativa; rapidez e alto nível de expressão, uma vez que o baculovírus possui promotores fortes; produção de mais de uma proteína simultaneamente; baixo custo, quando comparado com animais transgênicos ou células transformadas, e linhagens celulares de fácil manutenção (CHESHENKO et al., 2001; KOST; CONDREAY; JARVIS, 2005; VAN OERS, 2011).

Entretanto, existem algumas limitações no sistema que podem afetar a produção e expressão da proteína. O caráter transiente de expressão do sistema devido à natureza lítica da infecção pode levar a degradação e ao processamento ineficiente da proteína recombinante em estágios avançados da infecção (HITCHMAN; POSSEE; KING, 2009). Outra limitação descrita é a diminuição da eficiência da infecção (virulência) do vírus por conta de mutações e

a formação de partículas interferentes defectivas resultantes de passagens sucessivas do vírus em cultura de células (ALMEIDA, 2010; MOSCARDI et al., 2011).

Diante das vantagens do sistema e de desvantagens contornáveis, o sistema de baculovírus *in vitro* vem sendo amplamente estudado em diferentes áreas da pesquisa científica, com grande relevância para a produção de *virus-like particles* (Tabela 3).

**Tabela 3.** Geração de VLPs utilizando sistema de baculovírus recombinante

Vírus	Classificação da VLP	Linhagem Celular	Proteína Recombinante	Estratégia de expressão	Referência
Vírus da leucemia Felina	Envelopada	Sf9	Gp85 e Gag	Coinfecção	THOMSEN; MEYER; POST (1992)
Poliovírus	Não envelopada	Sf21	VP0, VP3 E VP1	Coinfecção	BRÄUTIGAM; SNEZHKOV; BISHOP (1993)
Papilomavírus Humano	Não envelopada	Sf21	L1 e L2	Coexpressão	KIRNBAUER et al. (1993)
Rotavírus	Não envelopada	Sf9	VP2, VP6, VP7 e VP4	Coinfecção	CRAWFORD et al. (1994)
Vírus da imunodeficiência humana	Envelopada	Sf9	Gag e gp120	Coexpressão	BUONAGURO et al. (2001)
Calicivírus Felino	Não envelopada	Sf9	Capsídeo	Infecção	DI MARTINO; MARSILIO; ROY (2007)
Vírus da Influenza Aviária (H5N1)	Envelopada	Sf9	HA, NA e M1	Coexpressão	TAO et al. (2009)
Vírus Ebola	Envelopada	Sf9	VP40 e GP	Coinfecção	SUN et al. (2009)
Norovírus	Envelopada	Sf9	VP1	Infecção	HUHTI et al. (2010)
Vírus Chikungunya	Envelopada	Sf21	Poliproteína estrutural	Infecção	METZ et al. (2013)
Vírus da encefalite Japonesa	Envelopada	Sf9	prM e gE	Coinfecção	YAMAJI et al. (2013)
Vírus da Hepatite E	Não envelopada	Sf9	Cápside	Infecção	PONTERIO et al. (2014)
Vírus da raiva	Envelopada	Sf9	Proteína de Matriz e glicoproteína de membrana	Coinfecção e Infecção	KANG et al. (2015) e LIU; HUANG; YANG (2015)
Vírus da Influenza Aviária	Envelopada	Sf9	HA - H5N1	Infecção	KAPCZYNSKI et al. (2016)
Vírus da Influenza Aviária (H7N9)	Envelopada	Sf9	HA, NA e M1	Coinfecção	HU et al. (2017)
Vírus da imunodeficiência humana	Envelopada	Sf9	Gag	Infecção	CHAVES; RIBEIRO; BLISSARD (2018)
Vírus da Influenza	Envelopada	High Five*	HA e M1	Coinfecção	SEQUEIRA et al. (2018)

Fonte: Adaptado de LIU et al. (2013). \* Linhagem celular *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4)

#### 2.4.2 Sistema de produção de baculovírus recombinante *Bac-to-bac*

Há diversos métodos para a construção de um baculovírus recombinante e há uma ampla variedade de vetores comerciais para a produção dos mesmos (KOST; CONDREAY; JARVIS, 2005). Um dos sistemas comerciais disponíveis para a expressão de baculovírus recombinantes é o *Kit Bac-to-Bac™ Baculovirus Expression System* da Invitrogen – Life Technologies (Califórnia, EUA).

Este sistema se baseia nos estudos de LUCKOW et al. (1993) que descreveram uma nova estratégia para gerar baculovírus recombinantes baseada na capacidade de gerar rapidamente o vírus recombinante por meio de transposição de sítios específicos em *Escherichia coli* (*E. coli*). O vetor de transporte do baculovírus recombinante (bacmídeo) se replica em *E. coli* como um grande plasmídeo e permanece infeccioso quando introduzido em células de inseto.

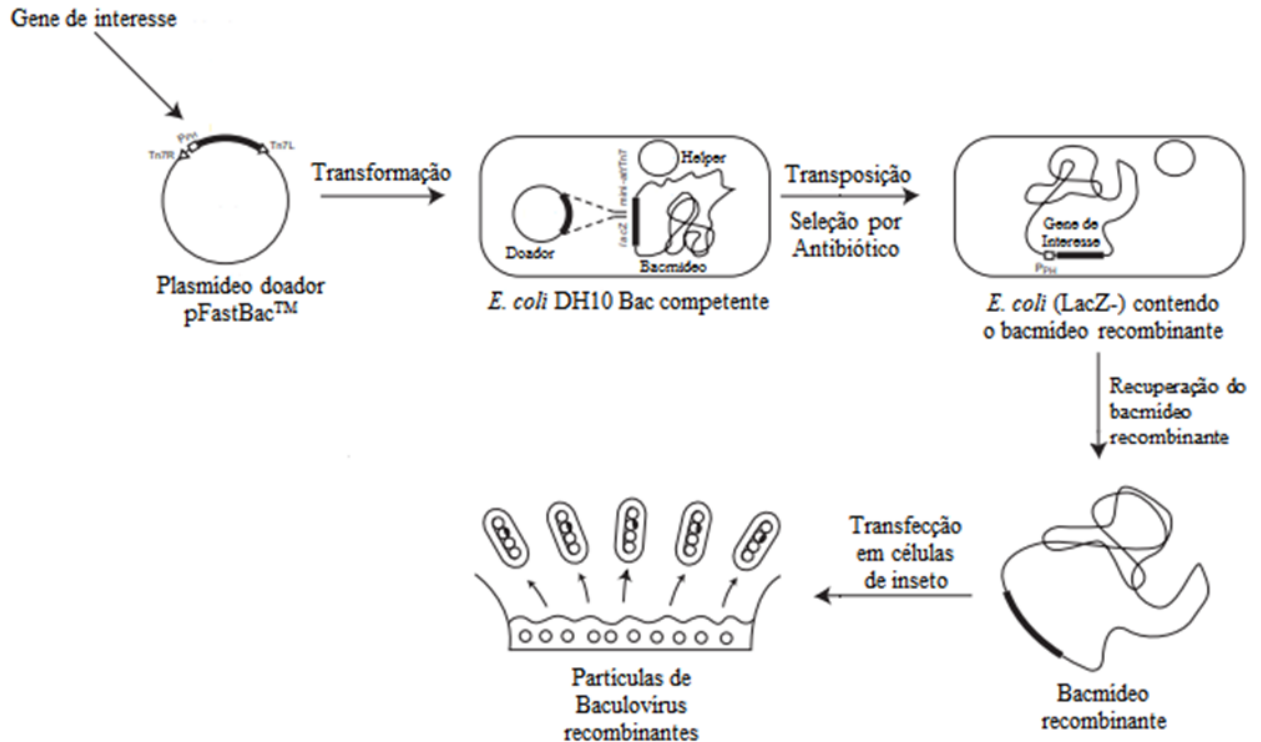
Um dos principais componentes do sistema é o vetor doador, pFastBac™, no qual o gene de interesse é clonado. Dependendo do vetor doador selecionado, a expressão do gene de interesse é controlada pelo promotor da poliedrina (pPH) ou pelo promotor p10, ambos são promotores tardios que permitem a expressão eficiente e de alto nível da sua proteína recombinante em células de inseto. Além disso, o cassete de expressão está flanqueado a duas regiões de transposição (Tn7 direita e esquerda), além de conter genes de resistência à antibióticos, uma região de replicação mini-F (fragmento do plasmídeo F de *E. coli* que transporta todos os genes e sítios requeridos para manutenção e controle do replicon) e um sinal de poliadenilação de SV40 (LIFE TECHNOLOGIES, 2015).

Outro componente importante é a cepa bacteriana *E. coli* DH10Bac™, essa cepa contém o bacmídeo (DNA do baculovírus). O bacmídeo contém um sítio alvo min-*att* Tn7, gene de resistência a canamicina e um segmento de DNA que codifica o gene do LacZα para formar colônias que são azuis (Lac +) na presença de um substrato cromogênico como o Bluo-gal ou X-gal e o indutor IPTG (LIFE TECHNOLOGIES, 2015).

Além do bacmídeo, a bactéria *E. coli* DH10Bac™ contém também um plasmídeo *Helper* que codifica uma transposase, que irá auxiliar no processo de transposição e confere resistência a tetraciclina. Após a transformação da cepa bacteriana DH10Bac™ com o vetor doador pFastBac™ contendo o gene de interesse, a transposição ocorre entre os sítios Tn7 do vetor e mini-*att* Tn7 do bacmídeo, essa transposição rompe o gene do LacZα (Lac -). Os clones são selecionados em placa com ágar contendo os antibióticos apropriados e pela coloração branca das colônias, formadas pelo rompimento do gene LacZα. O clone é amplificado e o

bacmídeo recombinante é utilizado para transfecção em células de inseto para a produção dos lotes de baculovírus recombinantes (LIFE TECHNOLOGIES, 2015). O sistema Bac-to-Bac está ilustrado na figura 6.

**Figura 6.** Geração de baculovírus recombinante e expressão do gene de interesse usando o sistema de expressão de baculovírus Bac-to-Bac®



O gene de interesse é inserido em um vetor doador que é usado para transformação em *E. coli* DH10Bac. Durante esse processo ocorre a transposição do gene de interesse para o bacmídeo, por meio das regiões Tn7. É feita a seleção do clone por meio de antibióticos e rompimento do gene LacZa. O bacmídeo recombinante é recuperado e utilizado para transfectar células de inseto para a produção dos lotes de baculovírus recombinantes. Fonte: Adaptado de LIFE TECHNOLOGIES (2015).

### 2.5 Partículas semelhantes à vírus - Virus-like particles (VLP)

Há um crescente interesse no uso de métodos moleculares para obter novas vacinas seguras e eficientes. Tradicionalmente, vacinas contra doenças virais foram preparadas a partir de cepas virais infecciosas atenuadas ou inativadas (LEE et al., 2012; CHROBOCZEK; SZURGOT; SZOLAJSKA, 2014).

Para a raiva a vacinação ainda é a maneira mais eficaz de prevenir e controlar a doença em animais e humanos. Assim, o desenvolvimento de uma vacina contra a raiva mais acessível, barata, segura e potente é necessário (KANG et al., 2015).

Durante a replicação, o vírus tem uma característica única de auto-montagem, esta característica torna possível gerar VLP no sistema de cultura de células (LEE et al., 2012). As vacinas baseadas em partículas semelhantes à vírus exibem parâmetros tradicionais iguais aos das vacinas inativadas ou atenuadas (MOHSEN et al., 2017). Por apresentar essas características, as vacinas de VLP têm sido reconhecidas como um conceito relativamente novo e promissor no desenvolvimento de vacinas (YOUNG et al., 2006; CRISCI; BÁRCENA; MONTOYA, 2012).

*Virus-Like Particles* (VLPs) ou partículas semelhantes à vírus são formadas por uma ou mais proteínas virais estruturais que possuem uma característica inerente para auto-montagem e imitam a morfologia do patógeno. Diferentemente do vírus nativo, as VLPs são estáveis, não são infecciosas e nem replicantes (KARACOSTAS et al., 1989; KIRNBAUER et al., 1992; NOAD; ROY, 2003; GRGACIC; ANDERSON, 2006; CHACKERIAN, 2007; ROLDÃO et al., 2010; ZELTINS, 2013; LUA et al., 2014; KANG et al., 2015).

As VLPs são comumente mais imunogênicas do que subunidades ou imunógenos de proteínas recombinantes e são capazes de estimular ambas as respostas, humoral e celular do sistema imunológico (GRGACIC; ANDERSON, 2006; CHACKERIAN, 2007; ROLDÃO et al., 2010; ZELTINS, 2013; KANG et al., 2015). Estas já demonstraram ser altamente imunogênicas e recentemente têm sido utilizadas para diversas aplicações em vacinação, entrega de medicamentos direcionada, terapia genética e terapia imune (CHACKERIAN, 2007; KUSHNIR; STREATFIELD; YUSIBOV, 2012; ZELTINS, 2013; LUA et al., 2014).

As *virus-like particles* podem ser classificadas em envelopadas ou não envelopadas. As não envelopadas são estruturalmente simples e são compostas de uma única proteína de cápside. Por serem mais simples, podem ser produzidas em sistemas de expressão de eucariotos ou procariotos. Já as envelopadas consistem em proteínas de matriz envolvidas por uma membrana lipídica derivada da célula hospedeira com glicoproteínas incorporadas na membrana lipídica (LUA et al., 2014).

As VLPs, envelopadas ou não, podem ser produzidas por uma série de alvos usando células de mamíferos (SOULIÉ et al., 1991), plantas (LANDRY et al., 2010), insetos (LÓPEZ-MACÍAS et al., 2011), leveduras (AGNANDJI et al., 2011) ou bactérias (NARDIN et al., 2004) e, ainda, em plataformas sem células (BOVIER, 2008; HERZOG et al., 2009).

Dentre as VLPs envelopadas, as VLPs da influenza são possivelmente as mais estudadas (KANG; KIM; COMPANS, 2012), consistindo de proteínas da matriz M1 e hemaglutinina glicoproteica (HA) e/ou neuraminidase (NA) incorporadas na bicamada lipídica. As VLPs do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (BUONAGURO et al., 2013) e VLPs do vírus Ebola

(WARFIELD; AMAN, 2011) foram bem relatadas, com atenção recente às VLPs do vírus Chikungunya (VELEZ et al., 2012; METZ et al., 2013).

Algumas vacinas baseadas em VLP projetadas para prevenir várias doenças infecciosas, já estão aprovadas e no mercado, com muitas outras em fase clínica ou de pesquisa (FUENMAYOR; GÒDIA; CERVERA, 2017). Na tabela 4 pode ser encontrado o resumo de algumas vacinas recombinantes baseadas em VLPs altamente purificadas.

**Tabela 4.** VLPs que estão atualmente disponíveis no mercado ou em fase de desenvolvimento clínico

<b>Nome da Vacina de VLP</b>	<b>Empresa</b>	<b>Indicação</b>	<b>Sistema de Produção</b>	<b>Ano de Aprovação</b>	<b>Referência</b>
<b>Engerix® B</b>	GlaxoSmith Kline (GSK)	Vírus da hepatite B – HBV	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1998	(GSK, 2016)
<b>Cervarix®</b>	GlaxoSmith Kline (GSK)	Papilomavírus humano - HPV	Baculovírus recombinante	2007	(ALVES, 2011)
<b>Mosquirix™</b>	GlaxoSmith Kline (GSK)	Malária	Vírus da hepatite B – HBV	Fase III	(WHO, 2017)
<b>Recombivax HB®</b>	Merck e Co.	Vírus da hepatite B – HBV	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1983	(MERCK & CO., INC., 1983)
<b>Gardasil®</b>	Merck e Co.	Papilomavírus humano - HPV	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2006	(MERCK & CO., INC., 2006)
<b>Gardasil®9</b>	Merck e Co.	Papilomavírus humano - HPV	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2014	(MERCK & CO., INC., 2017b)
<b>Medicago's QIV</b>	Medicago	Influenza	Planta	Fase III	(MEDICAGO, 2017)
<b>TAK 214</b>	Takeda	Norovirus	Células de Inseto	Fase II	(TAKEDA, 2018)
<b>NanoFlu™</b>	Novavax	Influenza	Baculovírus recombinante	Fase II	(NOVAVAX, 2018)
<b>FluBlock</b>	Protein Science Corporation	Influenza	Baculovírus recombinante	2014	(PROTEIN SCIENCES CORPORATION, 2018)
<b>Hecolin</b>	Xiamen Innovax Biotech	Hepatite E	<i>Escherichia coli</i>	2012	(PROFFITT, 2012)

Fonte: Elaborada pela autora.

As VLPs são sistemas robustos de auto-montagem para a formação espontânea de complexos moleculares. Elas são caracterizadas pela simplicidade, estabilidade, uniformidade, estruturas únicas e modelos seguros. Essas características oferecem uma abordagem promissora para a produção de vacinas contra diversas doenças (GRGAGIC; ANDERSON, 2006).



## 2.6 Purificação das VLPs

Para assegurar que as VLPs construídas e sintetizadas permaneçam intactas para as aplicações pretendidas, a seleção de um processo de purificação correto é de grande importância (VICENTE et al., 2011a, 2011b).

A primeira etapa de processamento *downstream* depende se as VLPs são liberadas para o meio extracelular. Se a VLP não for secretada eficientemente, uma lise celular ou outra etapa de extração pode ser necessária antes da etapa de clarificação. No entanto, a tendência atual é projetar um clone compatível com uma eficiente via secretória facilitando ou encurtando o processamento *downstream* (VICENTE et al., 2011a).

Uma das desvantagens críticas do BVs é a coprodução de baculovírus recombinantes durante o processo de infecção. Como os baculovírus mostraram atividade adjuvante, se não forem removidos ou inativados, podem induzir alguns efeitos sinérgicos negativos na resposta imunológica alvo baseada em VLP (HERVAS-STUBBS et al., 2007). Obviamente, isto complica as etapas *downstream*, se caso os baculovírus recombinantes e as VLPs tiverem tamanhos dentro da mesma ordem de grandeza (VICENTE et al., 2011a).

Dadas às características particulares e desafiadoras de cada VLP projetada e sua aplicação clínica final, é necessário simplificar o processo *downstream*. Além disso, questões críticas associadas a cada sistema de produção de VLP devem ser superadas o mais cedo possível no processo; por exemplo, degradação do produto devido à atividade proteolítica ou estabilidade diminuída devido à falta de uma determinada proteína estrutural no projeto da VLP (VICENTE et al., 2011a).

Os princípios gerais da purificação de VLP são bem conhecidos e incluem os seguintes passos: 1- a lise da célula para transferir as VLPs sintetizadas para a solução, se necessário; 2- o processo de clarificação para assegurar a remoção de detritos celulares e outros grandes agregados; 3- o passo de concentração e 4- o passo de polimento (*polishing*) para remover o hospedeiro residual ou impurezas derivadas do produto alvo (VICENTE et al., 2011b).

A lise celular é um passo muito importante na purificação de VLP. No entanto, muitos sistemas de células de mamíferos e insetos asseguram a secreção da VLP no sobrenadante da cultura, portanto o passo de lise celular nem sempre é necessário (VICENTE et al., 2011a)

A etapa de clarificação é projetada para remover eficientemente detritos celulares e agregados grandes, mantendo e protegendo a qualidade do produto (GOTOH et al., 2001).

Já a concentração é um passo crítico, onipresente para o processamento *downstream* das VLPs. O volume do fluxo deve ser reduzido o mais cedo possível, a fim de reduzir o investimento inicial no equipamento, nos consumíveis e tampões gerais (VICENTE et al., 2011a). Assim, o passo intermediário de ultracentrifugação é importante para concentrar o material.

Como o BV é usado para a produção de VLPs, é necessário planejar uma estratégia adequada para remover, pelo menos, a maioria dos baculovírus recombinantes. Isso pode ser muito desafiador, especialmente no caso de VLPs com tamanhos muito semelhantes (VICENTE et al., 2011a).

No caso de VLPs da raiva produzidas pelo sistema de baculovírus recombinantes, há relatos de que as VLPs da raiva tenham tamanho similar ao do vírus  $\approx 180$  a  $200$  nm (KANG et al., 2015), embora LIU; HUANG; YANG (2015) relataram VLPs de raiva de tamanho  $\approx 80$  a  $90$  nm, já os BVs apresentam o tamanho de  $\approx 250$  a  $300$  nm (HERNIOU et al., 2003; JEHLE et al., 2006; OKANO et al., 2006), com essas características as VLPs são concentradas e purificadas utilizando diferentes etapas de processos.

Após o passo de clarificação por centrifugação e filtração, as VLPs precisam ser concentradas e purificadas, as partículas maiores, como as VLPs e BVs são capazes de passar através do colchão de sacarose e sedimentar no fundo do tubo com base na sua densidade. As proteínas livres irão sedimentar a uma taxa mais lenta, portanto, esta etapa também purifica parcialmente as VLPs de contaminantes menores, tais como proteínas celulares livres que não foram removidas durante a clarificação (THOMPSON, 2013).

Purificações em escala laboratorial podem necessitar de uma purificação adicional das VLPs por ultracentrifugação em gradientes, como por exemplo o gradiente de sacarose. Essa etapa muitas vezes é suficiente para obter preparações adequadas para aplicações subsequentes, especialmente quando se aplicam ciclos sucessivos de centrifugação a baixa e alta velocidade (VICENTE et al., 2011a). Esse procedimento funciona colocando soluções com diferentes concentrações de sacarose com a finalidade de formar o gradiente, seguida de uma ultracentrifugação. Cada concentração do gradiente tem uma densidade diferente, e as VLPs migram para a zona com a mesma densidade, purificando-as de outros detritos que não puderam ser removidos nas etapas anteriores (THOMPSON, 2013).

Vacinas baseadas em VLP produzidas por meio do BVs recombinantes tem recebido grande atenção, graças ao caso bem-sucedido da VLP do vírus do papiloma humano. Assim, nosso trabalho descreve a obtenção de VLP do vírus da raiva em células de inseto.

### 3 Objetivos

#### 3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste projeto é estabelecer um sistema de produção eficiente de *virus-like particles*, formadas pela proteína de matriz (RVM) e pela glicoproteína de membrana (RVGP) do vírus da raiva, utilizando o sistema de baculovírus recombinantes em células de inseto *Spodoptera frugiperda* (Sf9).

#### 3.2 Objetivos específicos

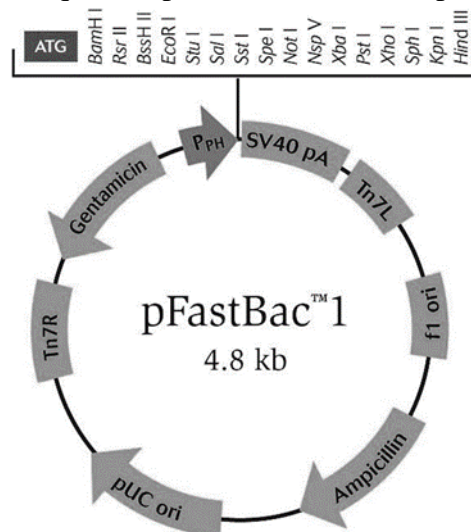
- Construção de vetores para obtenção de baculovírus (BVs) recombinantes contendo o gene para a proteína de matriz (RVM) e para a glicoproteína de membrana (RVGP) do vírus da raiva.
- Estabelecer método de titulação/quantificação dos baculovírus recombinantes para otimizar a infecção viral.
- Padronizar os métodos de coinfeção dos BVM e BVG em células Sf9 para a obtenção das *virus-like particles*.
- Purificar e caracterizar as VLPs produzidas.

## 4 Material e Método

### 4.1 Sistema de expressão Bac-to-Bac e esquema de desenvolvimento do projeto

Para o desenvolvimento do projeto nós escolhemos como sistema de expressão o baculovírus recombinante. Nós usamos o Kit Bac-to-Bac™ *Baculovirus Expression System* para construção dos vetores que carregaram os genes de interesse. Esse sistema possui um vetor doador (para o nosso projeto selecionamos o vetor pFastBac™1), esse vetor possui uma região de replicação, gene de resistência à antibióticos (ampicilina – gene de resistência para transformação em bactéria *E. coli*; gentamicina – permite a seleção do bacmídeo recombinante em *E. coli* DH10Bac), regiões de transposição Tn7 e o promotor da poliedrina, o gene de interesse é clonado no locus da poliedrina entre as extremidades 5' e 3' da região Tn7 (LIFE TECHNOLOGIES, 2015) (Figura 7).

**Figura 7.** Mapa dos elementos que compõem o vetor doador pFastBac™1



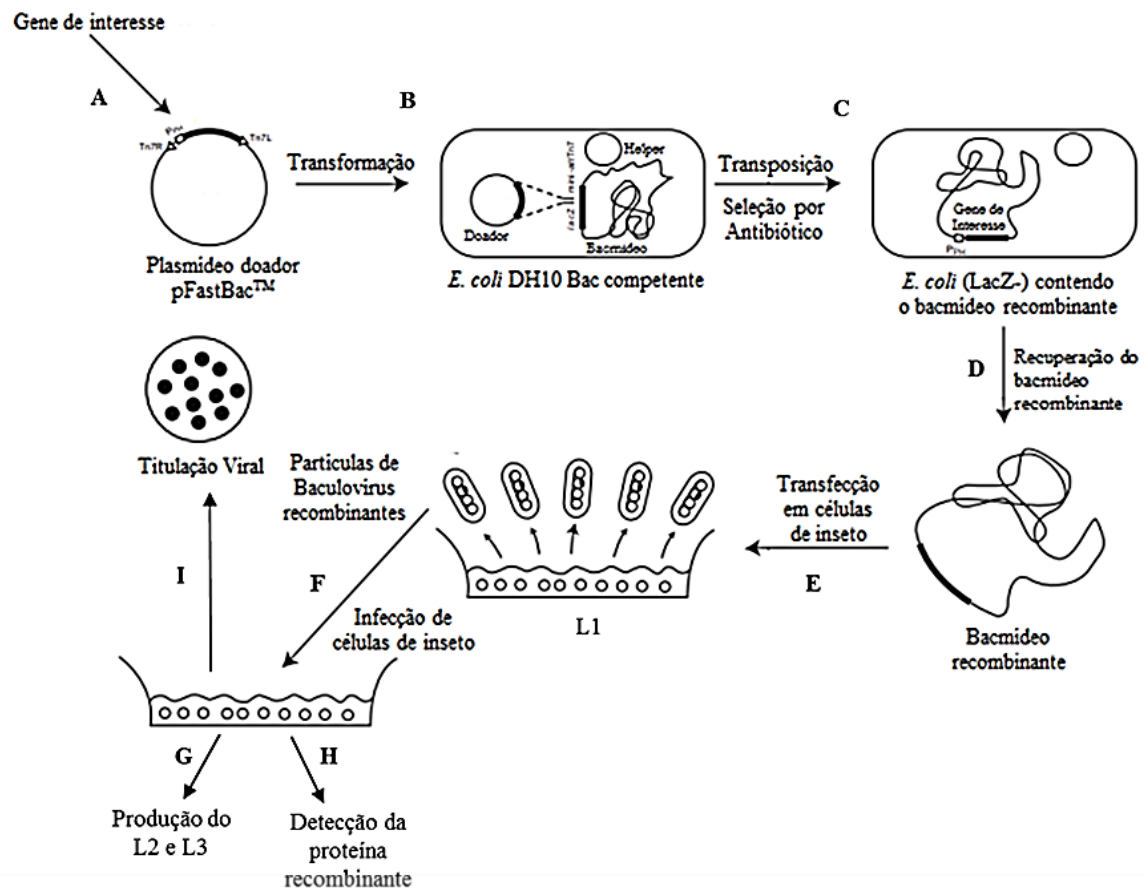
pPH- Promotor da poliedrina, seguido por uma sequência ATG e sítio múltiplo de clonagem (permite a clonagem mediada por enzimas de restrição do seu gene de interesse); Tn7L e Tn7R- regiões que permitem a transposição específica do sítio do gene de interesse para o genoma do baculovírus; pUC e F1- origens de replicação; SV40 pA- sinal de poliadenilação (permite a terminação eficiente da transcrição e a poliadenilação do RNA mensageiro); ampicilina (do inglês *ampicilin*)- gene de resistência para transformação em bactéria *E. coli*; gentamicina (do inglês *gentamicin*)- permite a seleção do bacmídeo recombinante em *E. coli* DH10Bac. Fonte: (LIFE TECHNOLOGIES, 2015).

Uma vez que foram geradas as construções pFastBac™ recombinantes, foi realizada a transformação em *E. coli* DH10Bac. Após a seleção de um clone, o bacmídeo recombinante foi recuperado e utilizado para transfecção em células de inseto. A produção do primeiro lote viral

## MATERIAL E MÉTODO

(L1) foi utilizado para a infecção de células e produção dos lotes seguintes (L2 foi utilizado para a produção do L3). O lote 3 de cada BV recombinante foi utilizado para os ensaios de infecção e coinfeccção para a expressão das proteínas de interesse e ensaios de titulação em placa utilizando as células Sf9 *Easy Titer* (Figura 8).

**Figura 8.** Geração de baculovírus recombinante e a expressão do gene de interesse usando o Sistema de Expressão Baculovírus Bac-to-Bac®



(A) O gene de interesse é inserido no vetor doador, pFastBac™1. (B) Este plasmídeo recombinante é usado para transformação em *E. coli* DH10Bac. (C) Durante esse processo ocorre a transposição do gene de interesse para o bacmídeo, por meio das regiões Tn7. É feita a seleção do clone por meio de antibióticos e rompimento do gene LacZα. (D) O bacmídeo recombinante é recuperado após a realização de uma lise alcalina. (E) O bacmídeo recombinante é utilizado para transfectar células de inseto utilizando o reagente cellfectina, produzindo o lote 1 (L1) de baculovírus recombinante. (F) L1 é utilizado para infectar células de inseto. (G) Recuperação dos lotes 2 e 3 (L2 e L3) de baculovírus recombinantes. (H) O sobrenadante e as células infectadas foram coletados e utilizados para detecção da proteína recombinante. (I) O lote de BVs recombinantes L3 foi titulado utilizando as células Sf9 ET. Fonte: Adaptado de LIFE TECHNOLOGIES (2015).

Para facilitar a leitura e entendimento da nomenclatura utilizada para cada um dos vetores utilizados nesse projeto, apresentamos na tabela 5 o significado de cada abreviatura e qual a proteína que cada vetor transporta.

**Tabela 5.** Descrição dos vetores utilizados no projeto

pFastBac-RVM	Plasmídeo intermediário que carrega o gene da proteína de matriz do vírus da raiva
pFastBac-RVGP	Plasmídeo intermediário que carrega o gene da glicoproteína do vírus da raiva
Bac-M	Bacmídeo recombinante que contém o gene que codifica a proteína RVM
Bac-G	Bacmídeo recombinante que contém o gene que codifica a glicoproteína RVGP
BVM	Baculovírus que carregam o gene para codificar a proteína de matriz do vírus da raiva
BVG	Baculovírus que carregam o gene para codificar a glicoproteína do vírus da raiva

#### 4.1.1 Construção do vetor *pFastBac-RVM* e do bacmídeo recombinante *Bac-M*

O gene que codifica a proteína de matriz do vírus da raiva (RVM) foi obtido na forma sintética através da técnica do *gBlocks Gene Fragments* (IDT Technologies (*Integrated DNA Technologies*, Iowa, EUA)). Essa técnica se baseia em fragmentos de DNA sintetizados que podem ter um tamanho de até 3000 pares de bases. Os fragmentos de gene *gBlocks* são sintetizados utilizando produtos químicos de síntese de alta fidelidade.

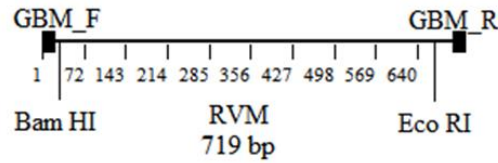
Para a síntese da RVM pelo *gBlocks*, nosso trabalho se baseou na sequência depositada no *genebank* (NC\_001542.1) por TORDO et al. (1986) e a essa sequência foram introduzidas duas regiões de oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do gene da RVM (Tabela 6) .

**Tabela 6.** Pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação da proteína de matriz do vírus da raiva

Oligonucleotídeos iniciadores	Proteína	Sequência (5' - 3')
GBM_F	Proteína de Matriz	GAC ACG CTT GTA CTC GAG CAT
GBM_R		CTC TGT GGC ACT CCG AGA GAA

Além dos oligonucleotídeos iniciadores, também foram inseridos na sequência sintetizada da RVM, dois sítios de restrições, *Bam* HI e *Eco* RI, para clonagem no vetor de interesse, pFastBac<sup>TM</sup>1 (Figura 9). Assim como, foram adicionados uma sequência ATG no início do gene para codificação da proteína e uma sequência TAA (*stop códon*) no final (ver apêndice A).

**Figura 9.** Representação do fragmento sintetizado por *gBlocks Gene Fragments* para expressão da proteína RVM



GBM\_F: oligonucleotídeo iniciador senso; GBM\_R: oligonucleotídeo iniciador antisenso; *Bam* HI e *Eco* RI sítios de enzimas de restrição. Mapa construído usando o programa BioEdit. Fonte: Elaborada pela autora.

Para a amplificação do fragmento RVM foi necessária a padronização da PCR convencional, no qual foram utilizados: 5  $\mu$ L do tampão de reação 10 $\times$  da enzima Taq Pfx DNA polimerase (Platinum® Pfx Taq DNA Polymerase Kit, Invitrogen), 1  $\mu$ L de MgSO<sub>4</sub> (solução estoque 50 mM), 2  $\mu$ L da mistura dos dNTPs (solução estoque 10 mM), 1,5  $\mu$ L dos oligonucleotídeos GBM\_F e GBM\_R (0,75  $\mu$ L de cada oligonucleotídeo - solução estoque 10  $\mu$ M), 1  $\mu$ L do DNA (~3,4 ng/ $\mu$ L), 2 U (unidades) da enzima Platinum® Pfx Taq DNA Polymerase e água miliQ (volume final da reação foi de 50  $\mu$ L). O ciclo de amplificação utilizado foi: 94 °C/10 min s, 38 ciclos de 94 °C/15 s, 55 °C/30 s, 68 °C/1 min e 68 °C/10 min para o término da extensão. O resultado da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% de acordo com o protocolo descrito em SAMBROOK; RUSSEL (2001).

Após a amplificação, o fragmento que corresponde a RVM foi purificado do gel de agarose 0,6% utilizando o kit “*Promega Wizard Gel and PCR clean up system*” (Promega, Wisconsin, EUA) seguindo instruções do fabricante.

Após a purificação, o gene da RVM e o vetor pFastBac™1 foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Eco* RI e os fragmentos foram utilizados em reação de ligação utilizando a enzima T4 DNA ligase (Promega) seguindo protocolo do fabricante.

O produto da ligação foi usado para transformação em bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$  quimio-competentes comerciais por choque térmico (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Os clones resultantes foram selecionados pela resistência ao antibiótico ampicilina.

O plasmídeo pFastBac-RVM foi recuperado após a realização de uma lise alcalina descrita por SAMBROOK; RUSSEL (2001).

A confirmação da clonagem foi realizada pelo padrão de restrição gerado pelas enzimas *Bam* HI/*Eco* RI e *Bgl* I e por sequenciamento gênico.

O plasmídeo gerado (pFastBac-RVM) foi utilizado para transposição no bacmídeo recombinante, através da transformação em bactérias quimio-competentes *E. coli* DH10Bac™ seguindo protocolo do fabricante. Após a transformação, células bacterianas DH10Bac™ foram incubadas em placas de Petri a 37°C por 48 h contendo os seguintes antibióticos: tetraciclina

## MATERIAL E MÉTODO

(10 µg/mL), gentamicina (7 µg/mL) e Canamicina (50 µg/mL); e também os marcadores de seleção IPTG (40 µg/mL) e X-Gal ou Bluo-Gal (100 µg/mL). As colônias brancas foram isoladas e os bacmídeos (Bac-M) foram recuperados após a realização de uma lise alcalina (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Para verificar a presença do gene de interesse no bacmídeo recombinante foi realizada uma PCR convencional seguindo o protocolo descrito pelo fabricante (LIFE TECHNOLOGIES, 2015). O DNA do bacmídeo recombinante tem um tamanho superior a 135 kb, esse tamanho dificulta a análise por restrição, dessa forma o fabricante sugere realizar a PCR com oligonucleotídeos específicos que se anelam nas regiões que flanqueiam o sítio mini-attTn7 dentro da região de complementação lacZα. A confirmação da transposição é feita pelo tamanho do fragmento formado pela amplificação da PCR. Para o vetor pFastBac™1 + RVM há a amplificação de um fragmento de ≈ 2300 bp + 719 bp, já o bacmídeo vazio há a amplificação de uma banda de ≈ 300 bp.

O bacmídeo recombinante que apresentou o gene da RVM foi usado para transfecção em células de insetos *Spodoptera frugiperda* 9.

### 4.1.2 Construção do vetor pFastBac-RVGP e Bac-G

Para a obtenção da construção do baculovírus recombinante contendo o gene da glicoproteína do vírus da raiva (RVGP), amplificamos o gene da RVGP a partir do vetor pMTGPV-Hygro (LEMOS et al., 2009) utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos (Tabela 7).

**Tabela 7.** Pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação da glicoproteína do vírus da raiva

Oligonucleotídeos iniciadores	Proteína	Sequência (5' - 3')
<b>MTF</b>	Glicoproteína de membrana do vírus da raiva	CAT CTC AGT GCA ACT AAA
<b>BGHR</b>		CCT CGA CTG TGC CTT CTA

O gene da RVGP tem uma sequência ATG no início do gene para codificação da proteína e uma sequência TGA (*stop códon*) no final (ver apêndice B).

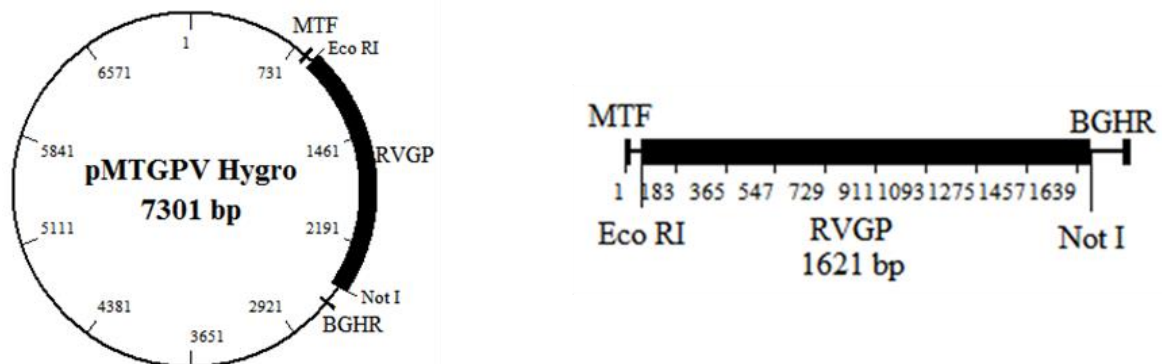
Para a amplificação do fragmento RVGP (Figura 10) foi utilizado um protocolo já padronizado no laboratório: 5 µL do tampão de reação 10× da enzima Taq Pfx DNA polimerase (Platinum®



## MATERIAL E MÉTODO

Pfx Taq DNA Polymerase Kit, Invitrogen), 1  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgSO}_4$  (solução estoque 50 mM), 3  $\mu\text{L}$  da mistura de dNTPs (solução estoque 10 mM), 3  $\mu\text{L}$  dos oligonucleotídeos MTF e BGHR (1,5  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleotídeo - solução estoque 10  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{L}$  do DNA (~50 ng/ $\mu\text{L}$ ), 2 U (unidades) da enzima Platinum<sup>®</sup> Pfx Taq DNA Polymerase e água miliQ (volume final da reação foi de 50  $\mu\text{L}$ ). O seguinte ciclo de amplificação foi utilizado: 95 °C/10 min s, 38 ciclos de 95 °C/30 s, 50 °C/30 s, 68 °C/3 min e 68 °C/10 min para o término da extensão. O resultado da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% de acordo com o protocolo descrito em SAMBROOK; RUSSEL (2001).

**Figura 10.** Representação do fragmento de DNA da glicoproteína do vírus da raiva utilizado para a clonagem no pFastBac<sup>TM</sup>1



MTF: oligonucleotídeo iniciador senso específico para amplificação do gene da RVGP; BGHR: oligonucleotídeo iniciador antisense específico para amplificação do gene da RVGP; *Eco* RI e *Not* I sítios de enzimas de restrição. Mapa construído usando o programa BioEdit. Fonte: Elaborada pela autora.

Após a amplificação, o fragmento da RVGP foi purificado do gel de agarose 0,6% com o kit “*Promega Wizard Gel and PCR clean up system*” (Promega) seguindo instruções do fabricante. Após a purificação, o gene de interesse e o vetor pFastBac<sup>TM</sup>1 foram digeridos com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Not* I, os fragmentos da RVGP e o vetor pFastBac<sup>TM</sup>1 foram utilizados em reação de ligação utilizando a enzima T4 DNA ligase (Promega) seguindo protocolo do fabricante.

O produto da ligação foi usado para transformação em bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$  quimio-competentes comerciais por choque térmico (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Os clones resultantes foram selecionados pela resistência ao antibiótico ampicilina.

O plasmídeo pFastBac-RVGP foi recuperado após a realização de uma lise alcalina descrita por SAMBROOK; RUSSEL (2001).

A confirmação da clonagem do pFastBac-RVGP foi realizada pelo padrão de restrição gerado pelas digestões das enzimas *Eco* RI e *Not* I, *Dra* I, *Xho* I, *Pvu* I e *Kpn* I e também por sequenciamento gênico.

O plasmídeo gerado foi utilizado para transposição no bacmídeo recombinante, através da transformação em bactérias quimio-competentes *E. coli* DH10Bac™ seguindo protocolo do fabricante. As células bacterianas DH10Bac™ foram incubadas em placas de Petri a 37°C por 48 h contendo os seguintes antibióticos: tetraciclina (10 µg/mL), gentamicina (7 µg/mL) e canamicina (50 µg/mL); e também os marcadores de seleção IPTG (40 µg/mL) e X-Gal ou Bluo-Gal (100 µg/mL). A colônia branca foi isolada e o bacmídeo, Bac-RVGP, foi recuperados após a realização de uma lise alcalina (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Para verificar a presença do gene de interesse no bacmídeo recombinante foi realizada uma PCR convencional seguindo o protocolo do fabricante (LIFE TECHNOLOGIES, 2015). A confirmação da transposição é feita pelo tamanho do fragmento formado pela amplificação da PCR, para o vetor pFastBac™1 + RVGP há a amplificação de um fragmento de ≈ 2300 bp + 1621 bp, já o bacmídeo vazio há a amplificação de uma banda de ≈ 300 bp.

O bacmídeo recombinante foi usado para transfecção em células de insetos *Spodoptera frugiperda* 9.

#### 4.2 Células

Células de ovário da lagarta *Spodoptera frugiperda* clone 9 (Sf9) foram cultivadas em frascos de 25 cm<sup>2</sup> com volume de trabalho de 5 mL e em frascos de 75 cm<sup>2</sup> com volume de trabalho de 12 mL em meio de cultura SF900 III (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) em câmara de B.O.D. à 28 °C. Essa linhagem celular foi utilizada para os ensaios de transfecções dos bacmídeos recombinantes e também para os ensaios de propagação, infecção e coinfeção dos baculovírus recombinantes.

Células Sf9 *Easy Titer* (Sf9 ET) foram gentilmente cedidas pelos Prof.º Dr. Ralph F. Hopkins e Prof.º Dr. Dominic Esposito do laboratório de Expressão de Proteínas do Instituto Nacional do Câncer de Frederick, *Maryland*, USA, por meio de um acordo de transferência. Esta linhagem celular foi utilizada para a titulação dos lotes virais de BVs recombinantes utilizados nesse projeto. Estas células foram cultivadas em frasco de 25 cm<sup>2</sup> com volume de trabalho de 5 mL e em frascos de 75 cm<sup>2</sup> com volume de trabalho de 12 mL em meio de cultura SF900 III em câmara de B.O.D. à 28 °C.

As células Sf9 ET foram criadas a partir da transfecção de células Sf9 selvagens com um plasmídeo contendo o gene da proteína eGFP (Proteína Fluorescente Verde – “*Enhanced Green Fluorescent Protein*”) sob o controle do promotor de poliedrina de baculovírus. Estas células não infectadas não expressam eGFP detectável, enquanto que a infecção com partículas de baculovírus resultam na produção de proteínas virais precoces que ativam a expressão de eGFP que está integrada ao promotor da poliedrina. A liberação de partículas virais e a infecção de células adjacentes resultam em pequenos focos de células verdes que são facilmente detectados usando um microscópio de fluorescência invertido (HOPKINS; ESPOSITO, 2009).

#### *4.3 Transfecção dos bacmídeos recombinantes (Bac-M e Bac-G) para a produção dos lotes virais de baculovírus recombinante e análise do efeito citopático na cultura celular*

A transfecção dos bacmídeos recombinantes contendo: o gene que codifica a proteína RVM (Bac-M) ou o gene que codifica a proteína RVGP (Bac-G), foi realizada utilizando o reagente de transfecção *Cellfectin* (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. Foram adicionados  $1 \times 10^6$  células Sf9 para cada poço, o experimento foi realizado em placa de 6 poços para melhorar a eficiência de transfecção. Cada poço foi mantido com meio de cultura SF900 III por 1 h à 28 °C para deposição das células, após a aderência celular foi realizado o processo de transfecção.

Para cada transfecção foi utilizado 1 µg do Bac-M ou Bac-G para 8 µL de *cellfectin*, em um volume final de 1 mL. A solução, DNA/lipossomo, foi mantida a temperatura ambiente por 20 min e posteriormente incubamos a cultura celular com essa solução por 3 h à 28 °C. Após esse período foi adicionado 1 mL de meio SF900 III e a cultura foi mantida por 96 h. O sobrenadante das células foi coletado por centrifugação (500 g por 5 min) gerando o primeiro lote (L1) de BVM ou de BVG.

Para a produção de L2 foram adicionados  $5 \times 10^6$  células Sf9 para cada frasco de 25 cm<sup>2</sup>. Estas garrafas foram mantidas com meio de cultura SF900 III por 1 h à 28 °C para deposição das células, após a aderência celular foi realizado o processo de infecção com BVM ou BVG. Para a produção de L2 foi utilizado 500 µL do L1. O sobrenadante foi coletado 96 h.p.i por centrifugação (500 g por 5 min).

Para a produção de L3 foram adicionados  $1 \times 10^7$  células Sf9 para cada frasco de 75 cm<sup>2</sup>. Estas garrafas foram mantidas com meio de cultura SF900 III por 1 h à 28 °C para deposição das células, após a aderência celular foi realizado o processo de infecção com BVM.

Para a produção de L3 foi utilizado 1 mL do L2. O sobrenadante foi coletado 120 h.p.i. por centrifugação (500 g por 5 min).

A infecção dos baculovírus recombinante e a morfologia das células Sf9 foram visualizadas e fotografadas utilizando microscopia de luz invertida (CK2, Olympus<sup>®</sup>, Tóquio, Japão).

#### *4.4 Titulação Viral dos lotes virais de BVM e BVG*

Nos ensaios de titulação dos BVs recombinantes nós utilizamos o protocolo descrito abaixo. Vale ressaltar que foram titulados apenas os lotes de L3 de BVM e BVG.

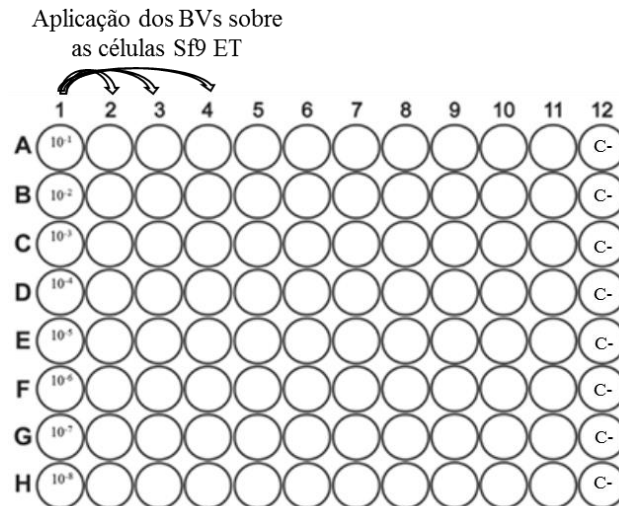
Células Sf9 ET foram semeadas em uma placa de 96 poços (Colunas 2- 12) numa densidade de  $8 \times 10^4$  células por poço (volume final de 180  $\mu$ L por poço). Estas placas foram mantidas com meio de cultura SF900 III por 1 h à 28 °C para deposição das células, após a aderência celular foi realizado o processo de infecção com os lotes de BVs recombinantes, BVM ou BVG.

Os lotes virais (L3) foram diluídos seriadamente, e após a diluição, 20  $\mu$ L do vírus diluído foram aplicados sobre a cultura celular, com exceção da última coluna que foi utilizada como controle negativo do experimento (Figura 11). A cultura celular foi incubada por 96 h à 28 °C, após esse período as células foram observadas em microscópio de fluorescência invertido (Eclipse TE300, Nikon, Melville, New York). Para confirmação do processo de infecção, nós observamos se há focos de fluorescência em cada diluição.

O título viral foi determinado usando métodos estatísticos para calcular as doses infectantes para 50% da cultura de tecido (TCID<sub>50</sub>) segundo O'REILLY; MILLER; LUCKOW (1994) que pode ser convertida em pfu/mL pela seguinte relação estatística (DEE; SHULER, 1997):

$$\text{pfu/mL} = 0,69 \times \text{TCID}_{50}/\text{mL}$$

**Figura 11.** Titulação dos lotes de baculovírus recombinantes (BVM ou BVG) utilizando células Sf9 ET



Coluna 1 diluição seriada (fator de diluição 10×) do lote viral. Colunas 2-11 células Sf9 ET infectadas com BV recombinante. 12 células Sf9 ET não infectadas (C-). Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.5 Cinética da expressão de VLP da raiva

A fim de verificar o melhor tempo para coleta das VLPs da raiva e o melhor MOI (Multiplicidade de Infecção - “*Multiplicity Of Infection*”) foi realizado um ensaio cinético de expressão de VLPs.

Para esses tipos de ensaios é importante determinar a proporção entre a quantidade de baculovírus recombinantes que serão inoculados e a quantidade de células no momento da coinfeção (O’REILLY; MILLER; LUCKOW, 1994). Assim, nós utilizamos os MOI de 0,01, 0,1 e 1.

O MOI foi calculado da seguinte maneira:

$$\text{Inóculo (mL)} = \frac{\text{MOI} \left( \frac{\text{pfu}}{\text{célula}} \right) \times \text{número total de células}}{\text{título do estoque viral} \left( \frac{\text{pfu}}{\text{mL}} \right)}$$

Para este experimento, células Sf9 foram incubadas em frascos tipo *Schott* de 100 mL (Schott, Mogúncia, Alemanha) na densidade de  $1 \times 10^6$  células Sf9/ mL em um volume final de 20 mL. Foram feitos os seguintes ensaios de infecção: células Sf9 infectadas somente com BVM ou BVG nos diferentes MOIs; células Sf9 coinfectadas, com BVM e BVG, com os diferentes MOIs. Como controle negativo utilizamos células Sf9 selvagens.

Os frascos foram mantidos sob agitação de 80 rpm à 28 °C por 1 h (protocolo preestabelecido no laboratório) e posteriormente a agitação foi mantida à 100 rpm. As amostras de sobrenadante celular foram coletadas nos tempos de 72, 96, 120 e 144 h.p.i..

Para análise da expressão das proteínas, coletamos 2 mL do sobrenadante celular. O sobrenadante foi centrifugado 30.000 g por 20 min a temperatura de 25 °C seguido de filtração em filtro de corte de 0,45 µm, para a remoção de células e outros detritos. Após essas etapas o sobrenadante foi ultracentrifugado à 268.000 g/ 1 h a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 500 µL de PBS 1×, as amostras foram armazenadas em -80 °C para posterior análise de expressão.

#### *4.6 Purificação e concentração das VLPs utilizando gradiente de sacarose*

Após determinar o melhor tempo de coleta das VLPs p.i. e melhor MOI, células Sf9 foram incubadas em frascos *Schotts* de 100 mL, na densidade celular de  $1 \times 10^6$  células Sf9/mL em um volume final de 20 mL. Após a montagem dos cultivos celulares, estes foram infectados com MOI 0,1 de BVM ou BVG ou coinfectados. Como controle negativo utilizamos células Sf9 não infectadas. Este ensaio foi realizado em duplicata, a fim de aumentar a quantidade de VLPs no processo de purificação e concentração.

A maior parte dos protocolos de processamento para a separação dos BVs das VLPs apresenta um passo inicial de clarificação e concentração, seguidos por um passo de purificação. O sobrenadante clarificado foi concentrado por ultracentrifugação 188.700 g/ 1h 30 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em 500 µL de PBS 1×. Posteriormente, as amostras foram purificadas em colchão de sacarose de 25% em uma rotação de 233.000 g/ 2 h, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em 200 µL de PBS 1×. Nessas duas etapas nós utilizamos a ultracentrífuga Optima™ MAX-XP Ultracentrifuge (Beckman Coulter® – Califórnia- EUA) e o rotor fixo MLA 50 (Beckman Coulter®).

Em seguida, as amostras purificadas por colchão de sacarose foram submetidas a um passo de purificação e separação das VLPs de partículas contaminantes, tais como os BVs recombinantes. Para isso, as VLPs foram purificadas por um gradiente descontínuo de sacarose. Com auxílio de um refratômetro (Atago Abbe Refractometer – Washington – EUA) efetuamos as leituras das soluções de sacarose. Após algumas padronizações de gradiente, nós optamos pelas seguintes frações 10%, 30% e 50% de sacarose, 1,2 mL de cada fração foi gotejada em

## MATERIAL E MÉTODO

tubos de  $\approx 4$  mL de capacidade. Por fim, gotejamos a amostra sobre o gradiente de sacarose. Os tubos foram ultracentrifugados 268.000 g/ 3 h a 4 °C em rotor tipo *swing* MLS 50 (Beckman Coulter®).

Foram coletadas 500  $\mu$ L de cada fração, sendo que houve a formação de um halo e um precipitado, este foi ressuspensionado na última fração do gradiente de sacarose. As amostras foram armazenadas à -80 °C para posterior análise.

Alternativamente, para remover o tampão de sacarose das amostras realizamos uma ultracentrifugação 149.100 g/ 1h 30 min em rotor fixo, ao fim do processo as amostras foram ressuspensionadas 400  $\mu$ L em PBS 1 $\times$  e armazenadas à -80 °C para posterior análise por ELISA.

### 4.7 Análise da expressão das proteínas recombinantes

Para os ensaios de detecção de ambas as proteínas recombinantes de interesse (RVM e RVGP), nós utilizamos os métodos de *SDS-Page*, *Dot Blot* e *Western Blot*, e utilizamos o método ELISA exclusivamente para detecção da RVGP. Para os ensaios de imunodeteção os anticorpos utilizados nestes ensaios estão descritos na Tabela 8.

**Tabela 8.** Anticorpos utilizados para os ensaios de imunodeteção

Anticorpo	Empresa	Concentração	Diluição
Anticorpo primário policlonal anti-proteína de Matriz do vírus rábico produzido em coelho (Anti-RVM)	Cusabio Biotech, CSB-PA322192LA01RAI, Texas, EUA	2 mg/mL	1:2000
Anticorpo primário monoclonal <i>Anti-Rabies Virus Glycoprotein</i> (Anti-RVGP)	LifeSpan BioSciences, LSBio-C75309, Seattle, EUA	7,2 mg/mL	1:4000
Anticorpo secundário HRP anti-coelho	Thermo Fisher Scientific, 656120	1 mg/mL	1:5000
Anticorpo secundário HRP anti- <i>mouse</i>	Thermo Fisher Scientific, G21040	1 mg/mL	1:5000

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.7.1 Análise da expressão das proteínas recombinantes por *Dot Blot*

A membrana de nitrocelulose (GE HealthCare Life Science) foi disposta num aparelho de *dot* (Bio-Dot™ Apparatus, BioRad, São Paulo, Brasil) de 96 poços. Para amostras de

sobrenadante foi utilizado 100-200  $\mu\text{L}$  de volume de amostra. Como controle positivo foi utilizado vírus inativado da raiva provindo do Instituto Pasteur da França ( $\approx 25$  ng de proteína RVGP).

Após a sucção do volume com auxílio da bomba de vácuo a membrana foi lavada  $3 \times$  com 100  $\mu\text{L}$  de PBS  $1 \times$  e bloqueada com solução de PBS  $1 \times$  e 3% de leite em pó desnatado por 1 h. Em seguida, a membrana foi lavada  $3 \times$  em PBS  $1 \times$  por 10 min e incubadas em PBS  $1 \times$  + BSA 1% com seu respectivo anticorpo primário por 1h sob agitação (tabela 8). Retirou-se a solução e a membrana foi lavada  $3 \times$  com PBS  $1 \times$  por 10 min e incubada em solução de PBS  $1 \times$  + BSA 1% por 2 h com seu respectivo anticorpo secundário (descrito na tabela 8). Retirou-se a solução e a membrana foi lavada  $3 \times$  com PBS  $1 \times$  por 10 min e a revelação foi realizada com o *Kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Fisher Scientific), seguindo instruções do fabricante. As imagens foram analisadas por transiluminador Alliance 2.7 (Uvitec Cambridge – United Kingdom).

#### **4.7.2 Análise da expressão das proteínas recombinantes por Western Blot**

A confirmação da expressão das proteínas recombinantes foi feita analisando-se o sobrenadante de células Sf9 infectadas e coinfectadas pelos baculovírus recombinantes. Para esta confirmação realizamos ensaios de *western blot*, as amostras não foram reduzidas e nem fervidas. Como controle positivo foi utilizado vírus inativado da raiva provinda do Instituto Pasteur da França ( $\approx 25$  ng de proteína RVGP).

Os géis de *SDS-Page* foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose (GE HealthCare Life Science) para a realização dos ensaios de imunodeteção.

Com auxílio do aparato *Mighty small II* (GE Healthcare LifeScience) as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose nas seguintes condições: 30 V por 16h. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com solução de PBS  $1 \times$  e 3% de leite em pó desnatado por 1 h. Em seguida, as membranas foram lavadas  $3 \times$  em PBS  $1 \times$  por 10 min e incubadas em PBS  $1 \times$  + BSA 1% com seu respectivo anticorpo primário por 1h sob agitação (ver tabela 8). Retirou-se a solução do anticorpo primário e a membrana foi lavada  $3 \times$  com PBS  $1 \times$  por 10 min e incubada em solução de PBS  $1 \times$  + BSA 1% por 1 h com seu respectivo anticorpo secundário (descrito na tabela 7). Retirou-se a solução e a membrana foi lavada  $3 \times$  com PBS  $1 \times$  por 10 min e a revelação foi realizada com o *Kit SuperSignal West Pico*



*Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific), seguindo instruções do fabricante. As imagens foram analisadas por transiluminador Alliance 2.7 (Uvitec).

#### **4.7.3 Análise da expressão da glicoproteína recombinantes RVGP por ELISA**

Foi utilizado o kit “*Rabies Glycoprotein Enzyme Immunoassay*” (Instituto Pasteur, Paris) para a dosagem de RVGP trimérica em amostras de células Sf9 coinfetadas e sobrenadante celular contendo as VLPs, segundo padronizações realizadas anteriormente em nosso laboratório (ASTRAY et al., 2008). Nesse método são utilizados anticorpos que reconhecem especificamente a glicoproteína trimérica.

O ELISA aqui descrito baseia-se na capacidade dos anticorpos monoclonais se ligarem especificamente à proteína RVGP nativa (lembrando que a RVGP nativa está localizada no envelope do vírus da raiva e na membrana plasmática das células infectadas antes do brotamento do vírus). O anticorpo monoclonal D1 reconhece o domínio antigênico III da RVGP, sendo este um epítipo conformacional da proteína (SEIF et al., 1985; NAGARAJAN; MARISSSEN; RUPPRECHT, 2014).

No dia anterior ao experimento a placa foi sensibilizada com anticorpo monoclonal anti-RVGP (diluição 1:2000, mAb-D1, Instituto Pasteur, França), específico para o sítio III antigênico da RVGP em seu estado trimérico, em seguida a placa foi incubada 20 h à 4 °C. No momento do uso, as placas foram bloqueadas com solução de bloqueio e incubadas por 30 min à 37 °C, sendo lavadas 5× com tampão de lavagem. O antígeno de referência foi diluído em tampão de diluição nas concentrações de 15,6 ng/mL, 31,2 ng/mL, 62,5 ng/mL, 125 ng/mL, 250 ng/mL, 500 ng/mL e 1000 ng/mL, para definição da curva padrão do experimento.

Para esse ensaio foi utilizado células Sf9 não infectadas (como controle negativo) e células Sf9 coinfetadas com MOI 0,1 de cada BV. As amostras de *pellet* celular e de sobrenadante foram lisadas com tampão de lise (50 mM TRIS, 150 mM NaCl e 1% Nonidet P-40). As amostras foram incubadas por 1 h à 4 °C e homogeneizadas a cada 15 min. Após a lise, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 min para separação dos *debris* celulares. As amostras e os padrões foram aplicados na placa e incubados por 1 h à 37 °C, para permitir a ligação da RVGP aos anticorpos aderido à placa. Em seguida, a placa foi lavada 5× com tampão de lavagem e o anticorpo monoclonal anti-RVGP conjugado com peroxidase foi adicionado, e a reação foi incubada por 1 h à 37 °C. Em seguida a placa foi lavada 6× com tampão de lavagem e foi adicionado tampão citrato (pH 5,6) contendo substrato peróxido de hidrogênio e composto

cromógeno (OPD). A reação foi então incubada no escuro (30 min à 22°C), desenvolvendo coloração alaranjada após a adição da solução de parada. A absorbância foi lida no comprimento de onda de 492 nm em leitor de microplacas (Multiskan MJ-Labsystems). Os cálculos para a obtenção da concentração de RVGP presente em cada amostra foram realizados através da comparação da absorbância das amostras com a curva de referência.

#### *4.8 Análise por contrastação negativa das VLPs da raiva e dos BVs recombinantes por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)*

As análises de microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas em parceria com a Dra. Marta Maria Antoniazzi do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan com auxílio da técnica Ms. Simone Gonçalves Silva Jared, seguindo os protocolos preestabelecidos pelo laboratório.

Para realizar esse experimento nós utilizamos a condição de coinfeção descrita no tópico 5.6. E as condições de purificação e concentração descritas também no tópico 5.6.

Neste experimento nós avaliamos a presença de VLPs do vírus da raiva e BVs recombinantes no sobrenadante celular, assim como a separação destes através do gradiente de sacarose.

Nós analisamos as amostras da fração do gradiente de sacarose no qual formou halo (fração 6 do gradiente de sacarose) e a última fração do gradiente no qual foi ressuspendido o *pellet* (fração 8 do gradiente de sacarose).

As amostras (diluídas 50× em PBS 1×) purificadas foram processadas pela técnica de contrastação negativa para visualização das VLPs do vírus da raiva e dos BVs recombinantes. Para isto, 5 µL das amostras foram gotejadas sobre a superfície da grade de cobre cobertas por um filme de carbono (CF300-CU- Carbon Film, Copper, EMS, Hatfield, EUA) em seguida foi adicionado 10 µL de tampão de uranila 2%, que permite a contrastação negativa. O excesso de cada solução aplicada foi removido com papel filtro. As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss Leo 906 E Kv (máximo): 120 Kv, Oberkochen, Alemanha) e as imagens foram capturadas pelo programa ITEM.

#### 4.9 Análise do perfil de brotamento das VLPs da raiva e dos BVs recombinantes por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para análise do brotamento das VLPs da raiva e dos BVs recombinantes, um total de  $5 \times 10^6$  células Sf9 foram separadas para cada condição. As células foram coinfectadas com MOI 0,1 de cada BV recombinante.

Para análise do brotamento de BV recombinante as células Sf9 foram coletadas 48 h.p.i., já para a análise do brotamento da VLP da raiva as células Sf9 foram coletadas 96 h.p.i..

As análises de microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas em parceria com a Dra. Marta Maria Antoniazzi do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan com auxílio da técnica Ms. Simone Gonçalves Silva Jared, seguindo os protocolos preestabelecidos pelo laboratório.

As células foram fixadas com solução contendo aldeído glutárico 2,5%, paraformaldeído 2% em tampão de cacodilato 0,1M pH 7,2 por 16 h à 20 °C. Em seguida foi realizada a pós-fixação do material com uma solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M por 1 h a temperatura ambiente.

Após este procedimento o material foi desidratado em um gradiente crescente de etanol (70% a 100%), cada etapa de desidratação foi mantida por 15 min. Na etapa final de desidratação o material ficou imerso em óxido de propileno + resina Epon® (*Electron Microscopy Science*, PA, EUA) (1:1) durante 4 h. A mistura foi substituída por resina Epon® pura (*Electron Microscopy Science*), permanecendo as células nesta solução por 12 h.

A inclusão das células foi feita em formas de silicone preenchidas com a mesma resina, sendo esta polimerizada após 72 h em estufa a 65 °C. Seções ultrafinas foram cortadas utilizando ultramicrótomo.

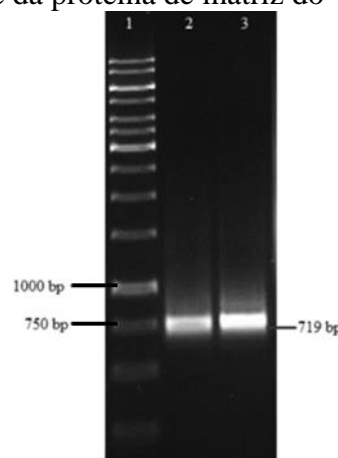
O material foi contrastado em uma solução de acetado de uranila 4% por 30 min, posteriormente lavados em água destilada e colocados em uma solução de citrato de chumbo 10%. Após serem novamente lavados, retirou-se o excesso de água destilada e as telas de cobre foram acondicionadas e mantidas em ambiente resfriado. O material foi analisado e fotografado ao microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss Leo 906 E) e as imagens foram capturadas pelo programa ITEM.

## 5 Resultados

### 5.1 Confirmação da obtenção do plasmídeo *pFastBac-M* e bacmídeo recombinante *Bac-M*

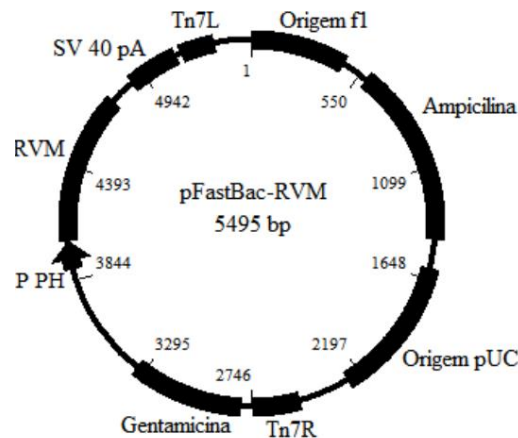
O gene da proteína de matriz do vírus da raiva foi amplificado por PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos, gerando um fragmento de  $\approx 719$  bp como pode ser visualizado na Figura 12.

**Figura 12.** Amplificação do gene da proteína de matriz do vírus da raiva por PCR



1 – Marcador de fragmentos de DNA GeneRuler 1 Kb (ThermoFisher). 2 e 3 - Amplificação do gene da proteína RVM por PCR (719 bp).

Após a purificação, o fragmento gerado pela PCR foi digerido com as enzimas *Bam* HI e *Eco* RI e clonadas através da enzima T4 DNA ligase, no vetor *pFastBac* 1, gerando o plasmídeo *pFastBac-RVM* (Figura 13).

**Figura 13.** Representação da construção do plasmídeo pFastBac-RVM

pPH - Promotor da poliedrina; RVM – gene da proteína de matriz do vírus da raiva ; Tn7L e Tn7R – regiões de transposição; pUC e F1 origens de replicação; SV40 pA- sinal de poliadenilação. Ampicilina e Gentamicina – genes de seleção por resistência a antibióticos. Mapa construído usando o programa BioEdit. Fonte: Elaborada pela autora.

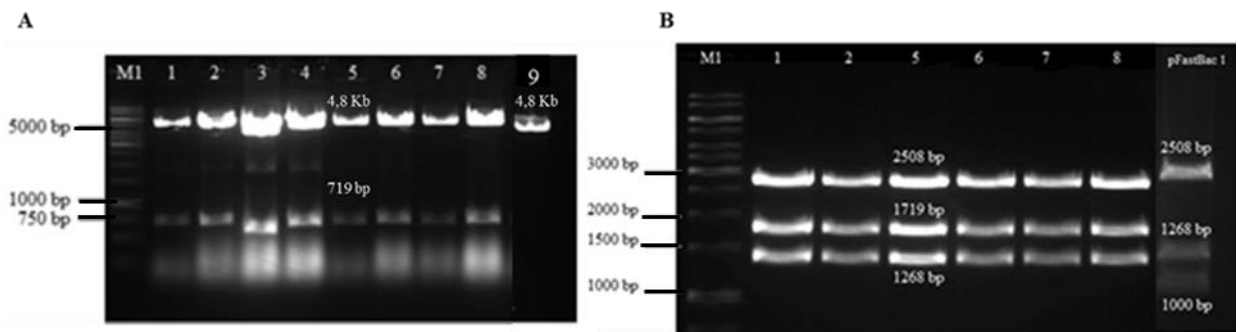
Após a transformação do plasmídeo pFastBac-RVM em bactéria *E. coli* DH5 $\alpha$  a clonagem foi confirmada por padrões de restrição do DNA recombinante. Foram selecionados 8 clones, e a confirmação da clonagem foi feita utilizando as enzimas de restrição *Bam* HI/*Eco* RI e *Bgl* I (Figura 14).

O resultado para a digestão enzimática do plasmídeo pFastBac-RVM com as enzimas *Bam* HI e *Eco* RI foi a formação de 2 fragmentos de DNA, um fragmento com 719 bp e outro fragmento de 4,8 Kb. Já para o vetor sem o gene de interesse observamos um fragmento de 4,8 Kb (Figura 14A). A partir do resultado obtido com a digestão das enzimas *Bam* HI e *Eco* RI selecionamos as colônias 1, 2, 5, 6, 7 e 8 que apresentaram os padrões de restrição esperados. Para a confirmação da clonagem esses clones foram digeridos com a enzima *Bgl* I. Essa digestão formou os seguintes fragmentos de DNA: pFastBac-RVM - 2508 bp, 1719 bp e 1268 bp, e para o pFastBac 1 - 2508 bp, 1268 bp e 1000 bp (Figura 14B). Podemos observar que os clones 1, 2, 5, 6, 7 e 8 apresentaram o padrão de restrição esperado, confirmando, assim, a correta inserção do gene da RVM no plasmídeo pFastBac1. Além dos padrões de restrição, a clonagem foi confirmada por sequenciamento (Apêndice A).

A partir destes resultados o clone 5 foi escolhido para a transformação e transposição em DH10Bac.

## RESULTADOS

**Figura 14.** Confirmação da clonagem do plasmídeo pFastBac-RVM por digestão com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Eco* RI e *Bgl* I



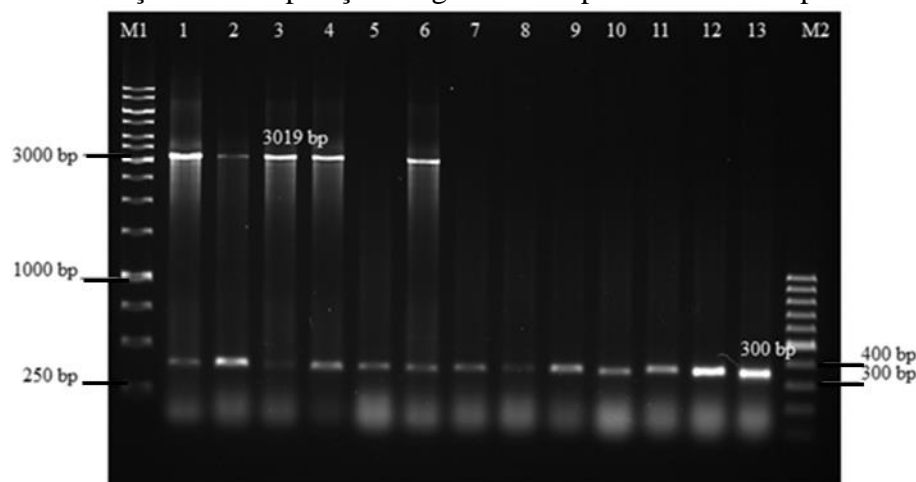
(A) M1- Marcador de fragmentos de DNA GeneRuler 1 Kb. 1 a 8 clones selecionados pós-transformação em *E. coli* DH5 $\alpha$ ; 9 pFastBac1. 1 a 9 digeridos com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Eco* RI.

(B) M1- Marcador de fragmentos de DNA GeneRuler 1 Kb. 1, 2, 5, 6, 7 e 8 e o vetor pFastBac 1 digeridos com a enzima de restrição *Bgl* I.

Posterior a transformação, colônias brancas foram selecionadas para a confirmação da transposição através da técnica de PCR (Figura 15).

O bacmídeo com a transposição apresenta um fragmento de 2300 bp + o tamanho do inserto, no caso do gene da RVM 719 bp, totalizando um tamanho de 3019 bp. Já o bacmídeo que não apresenta a transposição há a amplificação de um fragmento de 300 bp.

**Figura 15.** Confirmação da transposição do gene RVM para o bacmídeo por PCR



M1- Marcador de peso molecular de DNA GeneRuler 1 Kb. M2 – Marcador de peso molecular de DNA 100bp. 1-12 Amplificação da região de transposição dos bacmídeos de colônias que apresentaram coloração branca. 13 – Amplificação da região de transposição do bacmídeo da colônia que apresentou coloração azul.

Obtivemos 13 colônias brancas, destas apenas 5 apresentavam o bacmídeo com a inserção do gene da proteína RVM (1, 2, 3, 4 e 6). Selecionamos o bacmídeo da colônia 3 para

## RESULTADOS

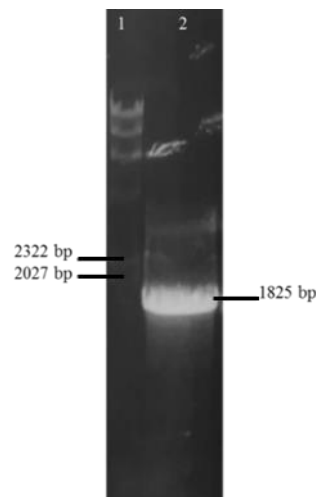
---

os ensaios de transfecção em células de inseto e para a produção dos lotes de baculovírus recombinantes contendo o gene da proteína RVM (BVM).

### 5.2 Confirmação da obtenção do plasmídeo *pFastBac-RVGP* e bacmídeo recombinante *Bac-G*

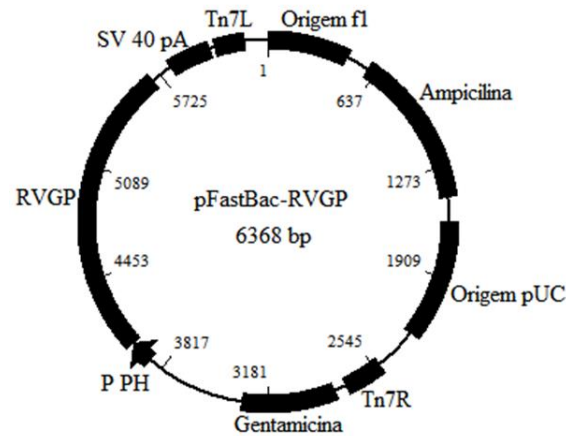
O gene da glicoproteína de membrana do vírus da raiva foi amplificado por PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos, gerando um fragmento de  $\approx 1825$  bp como pode ser visualizado na Figura 16.

**Figura 16.** Amplificação do gene da glicoproteína de membrana RVGP do vírus da raiva por PCR



1 – Marcador de peso molecular de DNA  $\lambda$  Hind III. 2 - Amplificação do gene da glicoproteína RVGP por PCR.

Após a purificação, a RVGP foi digerida com as enzimas *Eco* RI e *Not* I e clonadas através da enzima T4 DNA ligase, no vetor *pFastBac 1*, gerando o plasmídeo *pFastBac-RVGP* (Figura 17).

**Figura 17.** Representação da construção do plasmídeo pFastBac-RVGP

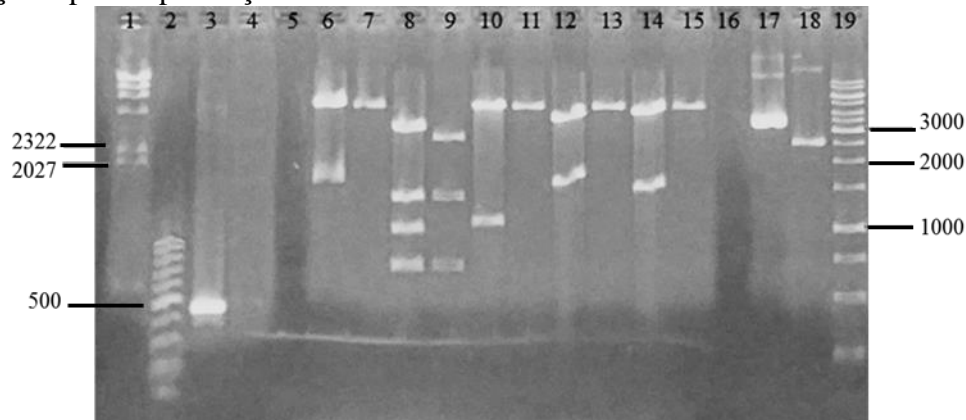
pPH - Promotor da poliedrina; RVGP – gene da glicoproteína de membrana do vírus da raiva ; Tn7L e Tn7R – regiões de transposição; pUC e F1 origens de replicação; SV40 pA- sinal de poliadenilação. Ampicilina e Gentamicina – genes de seleção por resistência a antibióticos. Mapa construído usando o programa BioEdit. Fonte: Elaborada pela autora.

Após a transformação do plasmídeo pFastBac-RVGP em bactéria *E. coli* DH5 $\alpha$ , obtivemos 1 único clone. A clonagem foi confirmada por análise de padrões de restrição do DNA recombinante (Figura 18), realizado com diferentes enzimas de restrição (Tabela 9). Além dos padrões de restrição, a clonagem também foi verificada pela amplificação da região da RVGP de 500 bp, usando oligonucleotídeos iniciadores específicos para a RVGP (BERNARDINO, 2015).



## RESULTADOS

**Figura 18.** Confirmação da clonagem do plasmídeo pFastBac-RVGP por digestão com enzimas de restrição e por amplificação da RVGP



1 – Marcador de peso molecular de DNA  $\lambda$  Hind III. 2 – Marcador de peso molecular de DNA 100 bp. 3 - Amplificação do gene da proteína RVGP por PCR (503 bp). 4 - H<sub>2</sub>O. Em 6 pFastBac-RVGP e 7 pFast Bac1 digeridos com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Not* I. Em 8 pFastBac-RVGP e 9 pFast Bac1 digeridos com a enzima de restrição *Dra* I. Em 10 pFastBac-RVGP e 11 pFast Bac1 digeridos com a enzima de restrição *Xho* I. Em 12 pFastBac-RVGP e 13 pFast Bac1 digeridos com a enzima de restrição *Pvu* I. Em 14 pFastBac-RVGP e 15 pFast Bac1 digeridos com a enzima de restrição *Kpn* I. 17 – pFastBac-RVGP circular. 18 – pFastBac1 circular. 19 – Marcador de peso molecular de DNA GeneRuler 1Kb.

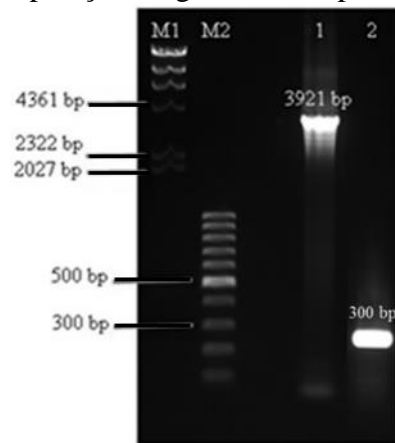
**Tabela 9.** Padrões de restrição esperados para o vetor pFastBac-RVGP

	<i>Eco</i> RI/ <i>Not</i> I (bp)	<i>Dra</i> I (bp)	<i>Xho</i> I (bp)	<i>Pvu</i> I (bp)	<i>Kpn</i> I (bp)
<b>pFastBac1</b>	4740 - 36	2695 - 1370 - 692	4776	4776	4776
<b>pFastRVGP</b>	4770 - 1628	3289 - 1370 - 998 - 692	5249 - 1119	4534 - 1834	4717 - 1604 - 53

Podemos observar que o clone apresentou o padrão de restrição esperado para cada um dos ensaios de digestão, confirmando, assim, a correta inserção do gene da RVGP no plasmídeo pFastBac1. Além dos padrões de restrição, a clonagem foi confirmada por sequenciamento (Apêndice B).

A partir destes resultados o clone foi selecionado para a transformação e transposição em DH10Bac. Posterior a transformação, uma colônia branca foi selecionada para a confirmação da transposição através da técnica de PCR (Figura 19).

O bacmídeo com a transposição apresenta um fragmento de 2300 bp + o tamanho do inserto, no caso da RVGP 1621 bp, totalizando um tamanho de 3921 bp.

**Figura 19.** Confirmação da transposição do gene RVGP para o bacmídeo por PCR

M1 – Marcador de peso molecular de DNA  $\lambda$  Hind III. M2 – Marcador de peso molecular de DNA 100 bp.

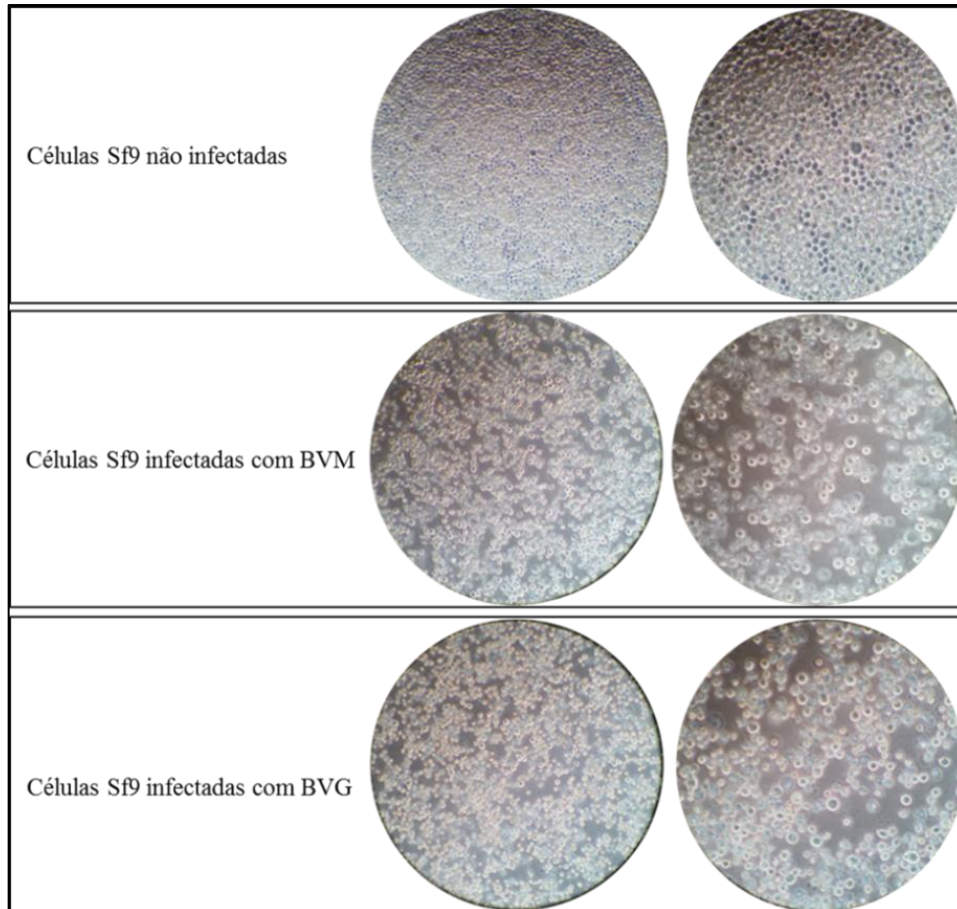
1- Amplificação da região de transposição do bacmídeo da colônia que apresentou coloração branca. 2- Amplificação da região de transposição do bacmídeo da colônia que apresentou coloração azul.

Obtivemos 1 colônia branca e esta apresentava o bacmídeo com a inserção do gene da RVGP. Selecionamos o bacmídeo desta colônia para os ensaios de transfecção em células de inseto e para a produção dos lotes de BVG.

### 5.3 Efeito citopático da cultura celular e titulação dos lotes dos baculovírus recombinantes

Durante a produção dos lotes virais (BVM e BVG) houve mudança morfológica das células infectadas com os vírus recombinantes. As células ficaram arredondadas e com o núcleo hipertrofiado, essas mudanças são características de infecção viral (Figura 20).

**Figura 20.** Efeito citopático da infecção por diferentes BV recombinantes em células Sf9 - 120 h.p.i.



Representação dos lotes 3 de baculovírus recombinantes (BVM e BVG). Coluna esquerda – Aumento de 10×. Coluna direita – Aumento de 20×.

Durante o desenvolvimento do projeto nós obtivemos dois lotes de L3 de BVM e BVG. Esses lotes foram titulados utilizando as células Sf9 ET (imagens não mostradas) e obtivemos títulos de  $\cong 6,9 \times 10^6$  pfu/mL de BVM e de  $\cong 1,9 \times 10^7$  pfu/mL de BVG no L3.

Foi realizado um ensaio de produção de L4, porém não observamos um aumento do título nesses lotes, dessa forma optamos por realizar os ensaios de infecção e coinfecção com lotes L3 dos BVs recombinantes.

#### 5.4 Cinética da expressão de VLP da raiva

Este estudo teve como finalidade definir a melhor quantidade de BVs recombinantes para a produção de VLPs da raiva. O MOI é um parâmetro importante para a produção de VLPs, assim é importante analisar a melhor condição de produção.

Para tanto, realizamos ensaios com diferentes MOIs e as amostras do sobrenadante celular foram analisadas por *dot blot* (Figura 21).

Pôde-se observar que os controles utilizados proporcionaram segurança na interpretação dos resultados, tanto na membrana marcada com anticorpo anti-RVM (Figura 21A), quanto na membrana marcada com anticorpo anti-RVGP (Figura 21B). O controle negativo atestou ausência de contaminação, ou de possíveis ligações inespecíficas durante a execução do ensaio de *dot blot*.

Neste ensaio pudemos verificar a especificidade dos anticorpos utilizados, no qual o anticorpo anti-RVM apresentou marcação somente no sobrenadante de células infectadas com BVM e o anticorpo anti-RVGP apresentou marcação somente no sobrenadante de células infectadas com BVG. Além disso, podemos sugerir que as células infectadas com BVM ou com BVG, após sofrerem lise celular, acabam liberando para o sobrenadante celular as proteínas RVM e RVGP, visto que houve a detecção dessas proteínas no sobrenadante das células infectadas. Nos ensaios de coinfeção podemos levantar duas hipóteses para a detecção das proteínas, a primeira delas seria em decorrência da lise celular, por isso detectamos as proteínas, e a segunda seria pela formação de VLPs, que é o esperado.

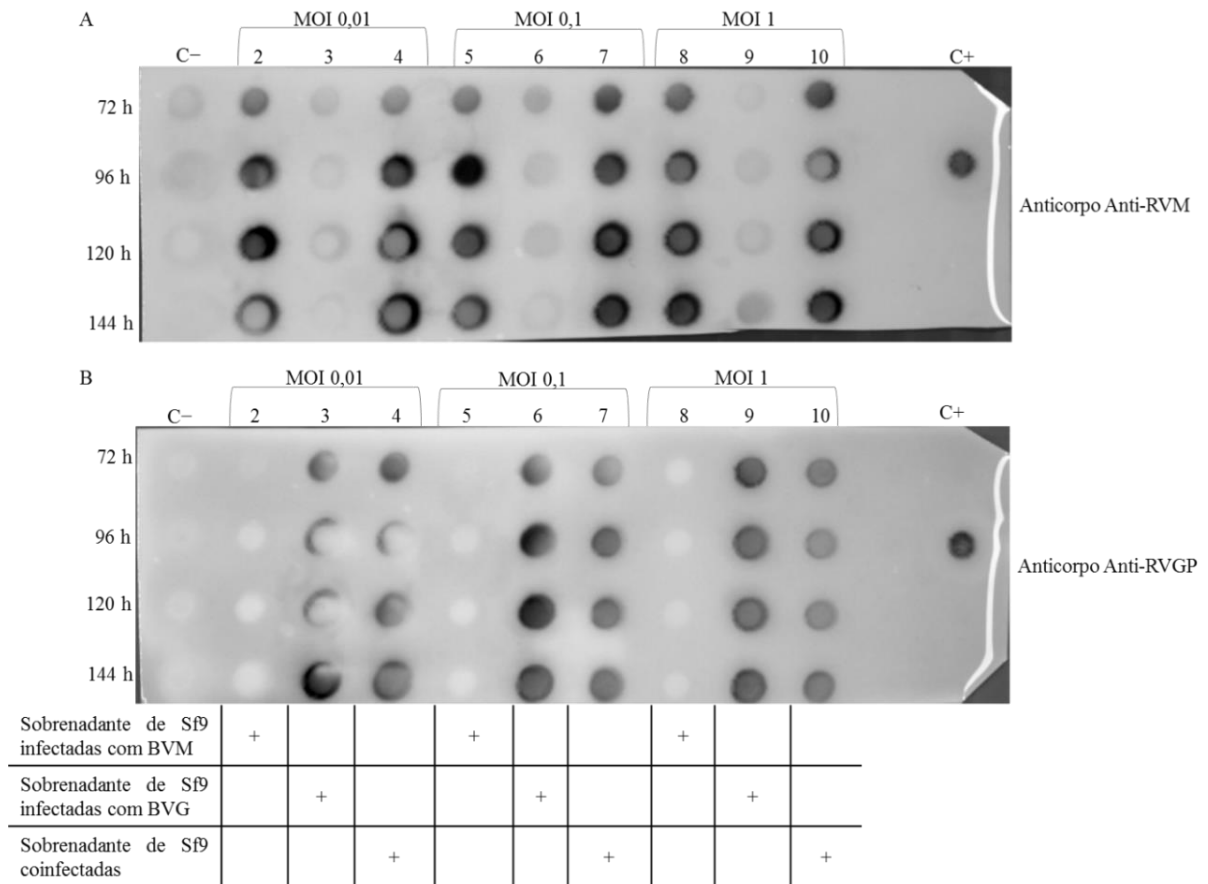
Ao analisar a produção de VLPs em células Sf9 coinfectadas foi possível detectar a produção das proteínas a partir de 72 h.p.i. Baseado em resultados preliminares (dados não mostrados) e dados descritos na literatura, tempos anteriores à 72 h não há detecção das proteínas, desta forma optamos por realizar o ensaio de cinética produção de VLPs com coletas a partir deste tempo.

Entre as condições testadas todas as amostras de coinfeção geraram sinais visíveis na membrana. A análise de *dot blot* revelou que o MOI de 0,1 no tempo de 96 h.p.i nos mostrou melhor resultado para a detecção destas proteínas no sobrenadante celular. Vale ressaltar que a cultura celular no tempo de 96 h apresentou viabilidade celular de  $\approx 70\%$ .

Por essa razão, a condição de coinfeção com MOI 0,1 de cada BV recombinante e coleta do sobrenadante de 96 h.p.i. foi escolhida para a realização dos demais ensaios.

## RESULTADOS

**Figura 21.** Análise por *Dot Blot* da produção de VLPs do vírus da raiva produzidas em células de inseto

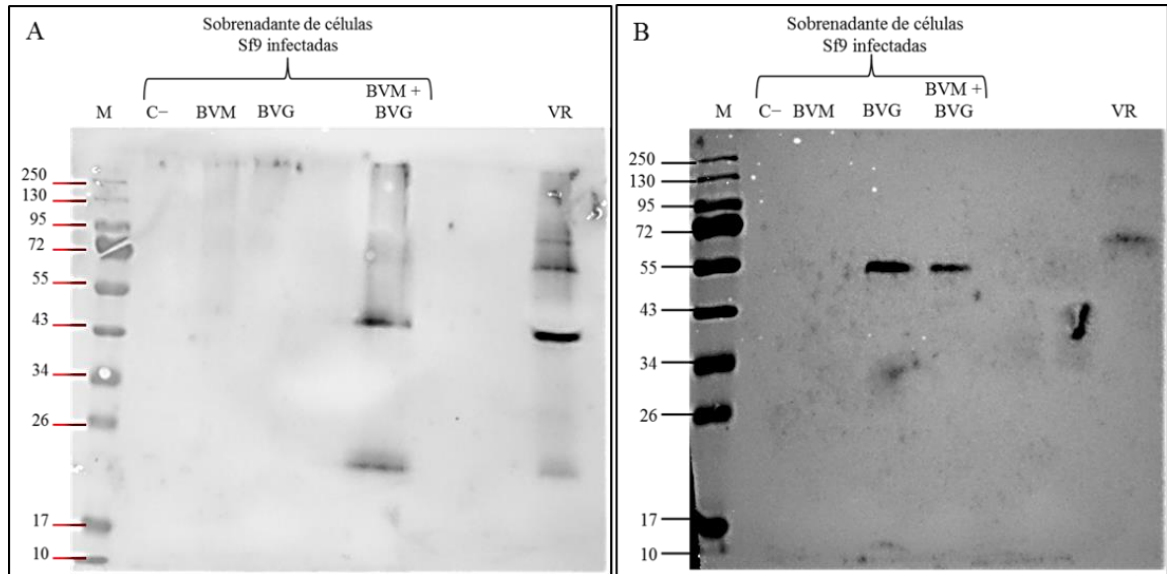


*Dot blot* do sobrenadante de células Sf9 infectadas e coinfectadas com BVM e/ou BVG em diferentes tempos pós-infecção e diferentes MOIs. C- - células Sf9 não infectadas. Coluna 2 células Sf9 infectadas com MOI 0,01 de BVM. Coluna 3 células Sf9 infectadas com MOI 0,01 de BVG. Coluna 4 células Sf9 coinfectadas com MOI 0,01 de cada BV recombinante. Coluna 5 células Sf9 infectadas com MOI 0,1 de BVM. Coluna 6 células Sf9 infectadas com MOI 0,1 de BVG. Coluna 7 células Sf9 coinfectadas com MOI 0,1 de cada BV recombinante. Coluna 8 células Sf9 infectadas com MOI 1 de BVM. Coluna 9 células Sf9 infectadas com MOI 1 de BVG. Coluna 10 células Sf9 coinfectadas com MOI 1 de cada BV recombinante. C+ - vírus da raiva inativado. Em A membrana marcada com anticorpo Anti-RVM e em B membrana marcada com anticorpo Anti-RVGP.

### 5.5 Detecção das proteínas recombinantes por Western Blot

Os sobrenadantes dos cultivos das células Sf9 infectadas com BVM ou BVG ou coinfectadas foram testados com anticorpos específicos para proteína RVM e para a RVGP, anti-RVM e anti-RVGP (Figura 22).

**Figura 22.** Análise por *Western Blot* da expressão das proteínas das VLPs de raiva produzidas em células de inseto



*Western blot* do sobrenadante de células Sf9 infectadas (MOI 0,1) com BVM ou BVG e coinfectadas com os BVs recombinantes coletados 96 h.p.i.. M- Marcador de peso molecular (Page Ruler Plus – Thermo Fisher Scientific). C- - células Sf9 não infectadas. BVM- células Sf9 infectadas com MOI 0,1 de BVM. BVG- células Sf9 infectadas com MOI 0,1 de BVG. BVM + BVG- células Sf9 coinfectadas com MOI 0,1 de cada BV recombinante. VR- vírus da raiva inativado. Em A membrana marcada com anticorpo Anti-RVM e em B membrana marcada com anticorpo Anti-RVGP.

Através dessa técnica, foi possível detectar uma banda para a proteína RVM (Figura 22A) no sobrenadante de células Sf9 coinfectadas. Esse sinal foi detectado no tamanho de  $\approx 25$  kDa, que corresponde a proteína RVM. Também foi detectado um sinal de  $\approx 45$  kDa, que pode nos sugerir que há a formação de VLPs no sobrenadante das células coinfectadas, já que o vírus rábico inativado também apresenta uma marcação nesse tamanho.

Igualmente, foi possível detectar uma banda para a proteína RVGP (Figura 22B), tanto no sobrenadante das células infectadas com BVG quanto nas células coinfectadas. Esses sinais foram detectados em  $\approx 55$  kDa, que corresponde a proteína RVGP expressa em células de insetos (SANTOS et al., 2016a).

Podemos observar que o controle positivo (vírus da raiva inativado) a marcação para a RVGP acontece em  $\approx 65$  kDa, uma vez que o vírus é produzido em células de mamíferos, é possível que haja diferenças no padrão de glicosilação.

### 5.6 Análise da produção de VLPs do vírus da raiva após as etapas de purificação

As amostras do sobrenadante de células Sf9 coinfetadas foram coletadas e após as etapas de purificação (clarificação, concentração, colchão e gradiente de sacarose) das partículas virais foi possível observar a formação de um halo branco no terço inferior do gradiente (Figura 23).

**Figura 23.** Foto do gradiente de sacarose utilizado para purificar BVs recombinantes e VLPs do vírus da raiva



Tubo de ultracentrífuga contendo gradiente de sacarose (10-50%) após centrifugação para purificar BVs e VLPs provenientes de células Sf9 coinfetadas com BVs recombinantes (MOI 0,1). Observa-se a formação de somente um halo branco no terço inferior do gradiente (seta).

Apesar de somente uma banda ser visível no gradiente (esperava-se ver duas bandas no gradiente, uma correspondente as VLPs e outra aos BVs), 500  $\mu$ L de cada fração do gradiente foram coletadas e avaliadas por *dot blot*, para visualizar a detecção da expressão em cada etapa de purificação. Também foi utilizado a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, objetivando ver o padrão e a possibilidade de separação das partículas, assim como a técnica de *Western Blot*, na expectativa de mostrar a especificidade das VLPs.

Com auxílio do refratômetro, observamos que em aproximadamente 40% de sacarose houve a formação do halo, essa região foi representada pela fração 6 do gradiente de sacarose. As demais concentrações de cada fração estão descritas na tabela 10.

**Tabela 10.** Valores das frações do gradiente do gradiente

<b>Fração do Gradiente de Sacarose</b>	<b>Células Sf9 não infectadas Valores das Frações (%)</b>	<b>Células Sf9 coinfectadas Valores das Frações (%)</b>
<b>1</b>	9	8
<b>2</b>	11	11,5
<b>3</b>	17	17
<b>4</b>	24,5	25
<b>5</b>	31	32
<b>6</b>	41	41
<b>7</b>	49,5	49,5
<b>8</b>	49,5	49,5

### 5.6.1 Análise da produção de VLPs por Dot Blot

As frações do gradiente de sacarose foram analisadas com anticorpos específicos para RVM e a RVGP (Figura 24). Observou-se a detecção dessas proteínas em todas as etapas realizadas para a purificação.

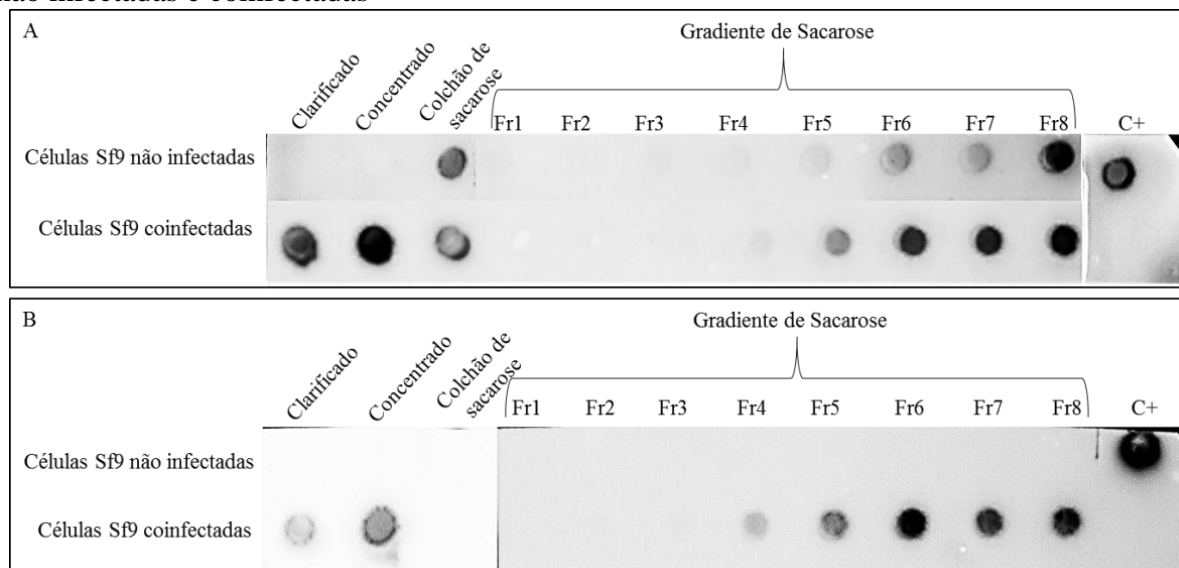
Também é possível visualizar que entre as etapas de ultraconcentração e o colchão de sacarose a detecção do sinal foi diminuída, tanto na membrana marcada com anticorpo anti-RVM (Figura 24A) quanto na membrana marcada com anticorpo anti-RVGP (Figura 24B). Com relação as frações do gradiente de sacarose, detectamos a marcação das proteínas RVM e RVGP nas 4 últimas frações do gradiente, sendo que na fração 6 (Figura 24 – Fr6) esse sinal foi mais intenso quando comparado aos demais.

Vale ressaltar que neste ensaio houve a marcação das 4 últimas frações do gradiente com o anticorpo anti-RVM. Essa inespecificidade observada pode ser devido à origem policlonal do anticorpo anti-RVM. Desta forma, realizamos um ensaio de *Western blot* para separação das proteínas a fim de confirmar esta inespecificidade.



## RESULTADOS

**Figura 24.** Análise das etapas de purificação das VLPs a partir de sobrenadante de células Sf9 não infectadas e coinfetadas



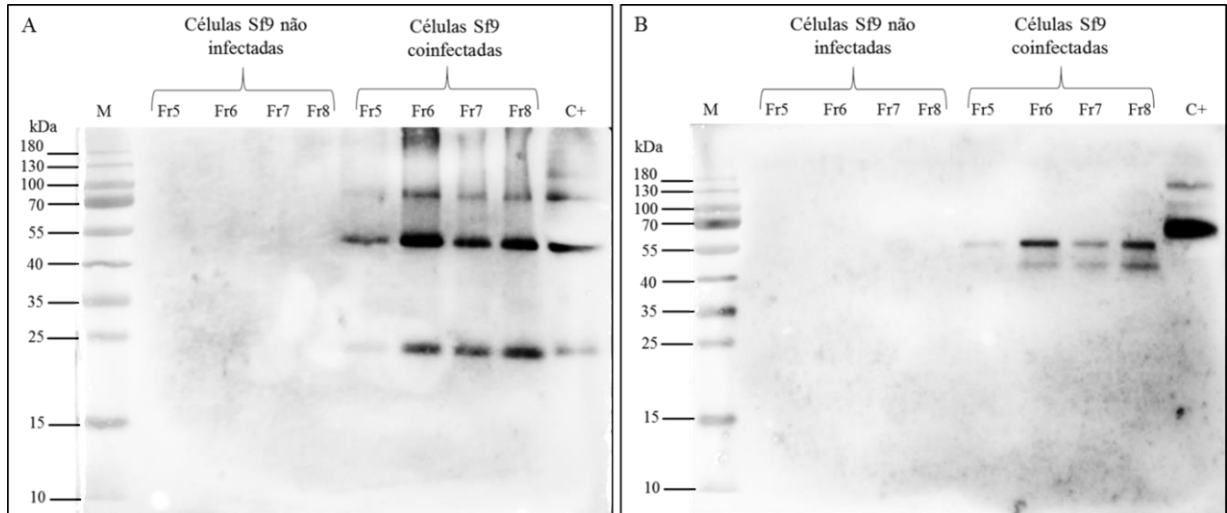
*Dot blot* das etapas de purificação das amostras de sobrenadante de células Sf9 não infectadas e coinfetadas (MOI 0,1 de cada BV recombinante) coletadas 96 h.p.i.. A- Membrana Marcada com anticorpo Anti-RVM; B- Membrana Marcada com anticorpo Anti-RVGP. Fr- Frações do gradiente de sacarose. Controle Positivo (C+)- vírus da raiva inativado.

### 5.6.2 Análise da produção de VLPs por Western Blot

Uma vez que detectamos proteínas nos resultados de *dot blot*, nós selecionamos as 4 últimas frações do gradiente de sacarose (Frações 5, 6, 7 e 8) para realizar o imunoenensaio de *Western Blot* (Figura 25).

## RESULTADOS

**Figura 25.** Análise das 4 últimas frações do gradiente de sacarose a partir de sobrenadante de células Sf9 coinfetadas utilizando a técnica de *Western Blot*



*Western blot* das 4 últimas frações do gradiente de sacarose das amostras de sobrenadante de células Sf9 não infectadas e coinfetadas (MOI 0,1 de cada BV recombinante) coletadas 96 h.p.i.. M - Marcador de peso molecular (*Page Ruler Prestained Protein Ladder* – Thermo Fisher Scientific). Fr5 - fração 5 do gradiente de sacarose de células Sf9 não infectadas ou células Sf9 coinfetadas. Fr6 - fração 6 do gradiente de sacarose de células Sf9 não infectadas ou células Sf9 coinfetadas. Fr7 - fração 7 do gradiente de sacarose de células Sf9 não infectadas ou células Sf9 coinfetadas. Fr8 - fração 8 do gradiente de sacarose de células Sf9 não infectadas ou células Sf9 coinfetadas. Em A - membrana marcada com anticorpo Anti-RVM e em B - membrana marcada com anticorpo Anti-RVGP.

O experimento mostrou que o sinal detectado no ensaio de *dot blot* em células Sf9 não infectadas não foi detectado em *western blot*, confirmando que as proteínas detectadas no ensaio anterior não era a proteína de matriz do vírus da raiva, RVM (Figura 25A). Nesse ensaio detectamos a RVM no tamanho esperado de  $\approx 25$  kDa, e também bandas maiores (55 e 70 kDa) que podem nos sugerir a formação de VLPs da raiva. Assim como foi detectado um sinal para a RVGP, este se mostrou no tamanho esperado de  $\approx 55$  kDa.

Além disso, esse ensaio consolida os resultados de que na fração 6 há uma detecção mais intensa do sinal para as proteínas RVM (Figura 25A) e para a RVGP (Figura 25B).

### 5.6.3 Análise da RVGP por ELISA

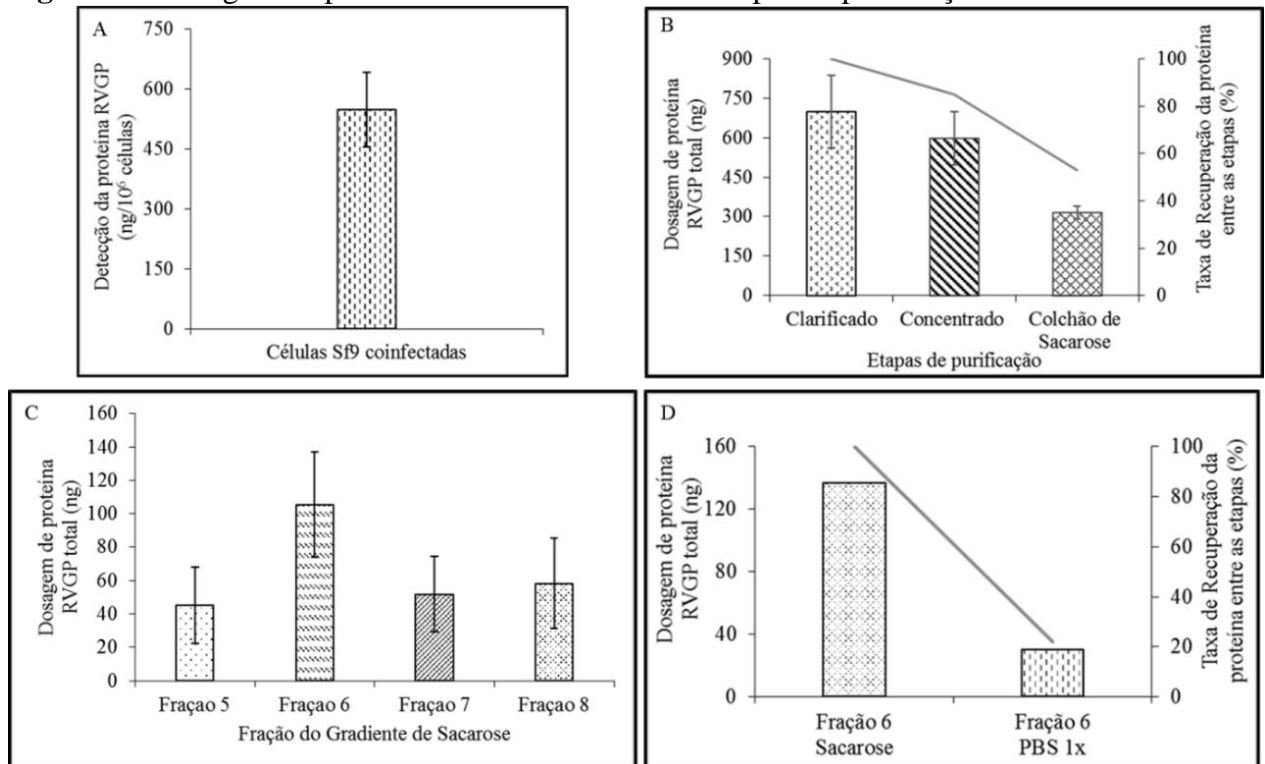
A quantificação da glicoproteína RVGP foi feita pelo método de ELISA. Tanto as células coinfetadas com MOI 0,1 de cada BV recombinante, quanto o sobrenadante da cultura celular coletado 96 h.p.i. foram dosados, a fim de verificar o rendimento dessa proteína em cada etapa do processo de purificação (Figura 26).

Com esse ensaio pudemos verificar que a expressão da RVGP nas células Sf9 foi de  $\approx 545 \text{ ng}/10^6$  células (Figura 26A). Vale lembrar que o nosso sistema utiliza 2 baculovírus, dessa forma é possível que exista células Sf9 infectadas só com BVG ou só com BVM, portanto o resultado mostrado pode representar tanto as células Sf9 infectadas quanto coinfectedas.

Observando o gráfico das primeiras etapas de purificação (Figura 26B) constatamos que há uma diminuição na detecção da proteína RVGP entre as etapas. Da etapa de clarificação ( $\approx 700 \text{ ng}$  totais) para a etapa de concentração ( $\approx 600 \text{ ng}$  totais) conseguimos recuperar 85% da proteína. A maior perda, porém, foi detectada entre a etapa de concentração e colchão de sacarose ( $\approx 316 \text{ ng}$  totais) obtivemos uma recuperação de 53% da proteína, que representa uma perda de 32% da proteína.

Com base no gráfico do gradiente de sacarose (Figura 26C) evidencia-se que a fração 6 apresenta maior concentração de RVGP quando comparada as demais frações. Na fração 6 a quantificação de RVGP foi de  $\approx 105,4 \text{ ng}$  totais, o que representa  $\approx 2\times$  mais proteínas que as demais frações. Esse resultado fortalece os resultados já apresentados (*dot blot* e *western blot*) de que há uma concentração da proteína RVGP na fração 6 do gradiente de sacarose.

Na expectativa de uma fácil troca do tampão de sacarose para tampão PBS 1 $\times$ , nós realizamos um ensaio de ultracentrifugação e ressuspensão em PBS 1 $\times$  (Figura 26D), no entanto obtivemos uma perda significativa da proteína RVGP após essa etapa, cerca de 88% da proteína RVGP não foi detectada após a ultracentrifugação.

**Figura 26.** Dosagem da proteína RVGP nas diferentes etapas de purificação

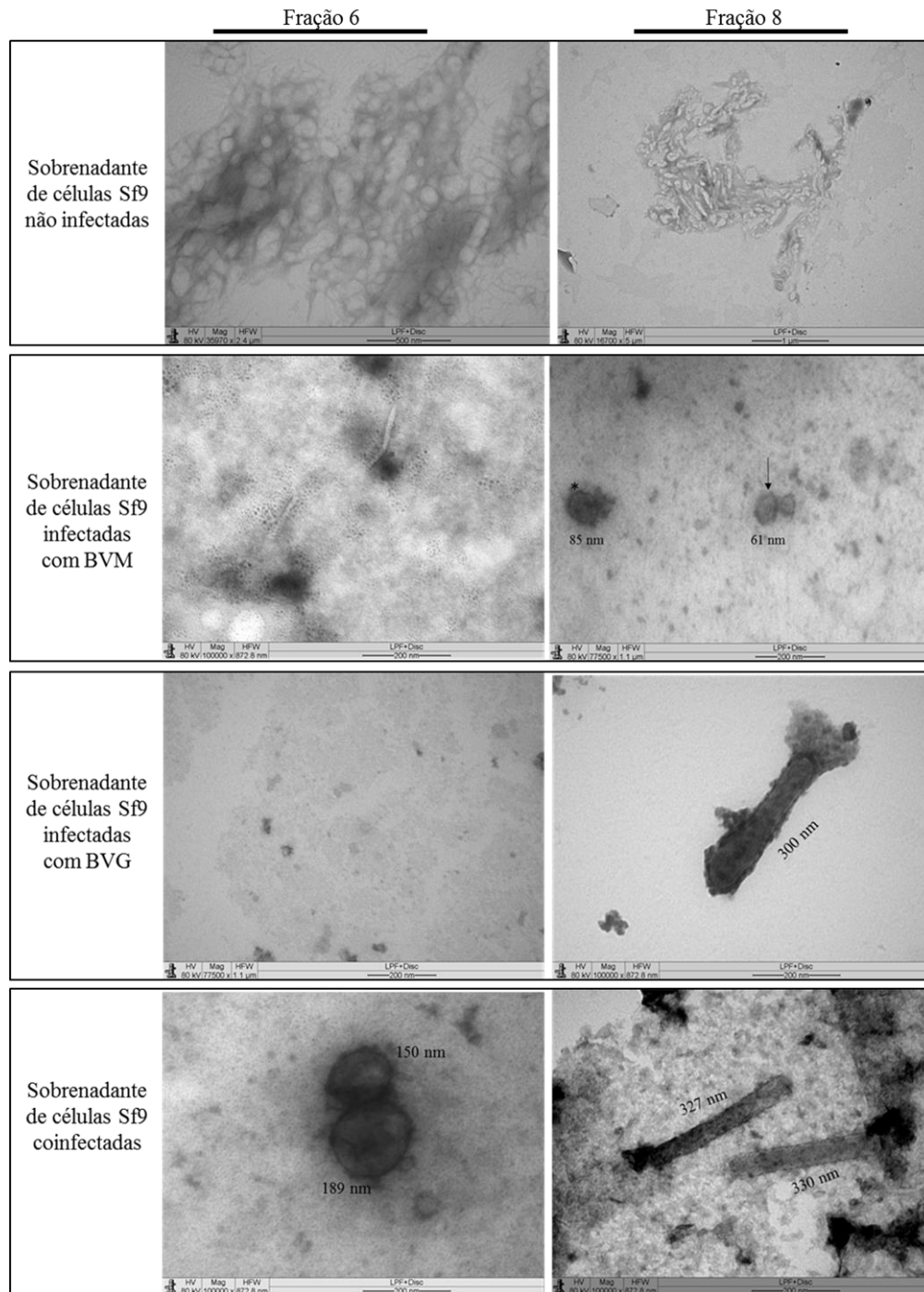
Dosagem da proteína RVGP nas diferentes etapas do processo de purificação dos sobrenadante de células Sf9 coinfectadas com MOI 0,1 de cada BV recombinante 96 h.p.i.. Em A – expressão da RVGP (ng/10<sup>6</sup> células) em células Sf9 coinfectadas. Em B – expressão da RVGP (ng totais) nas etapas de clarificação, concentração e colchão de sacarose. Em C – expressão da RVGP (ng totais) nas frações 5, 6, 7 e 8 do gradiente de sacarose. Em D – expressão da RVGP (ng totais) nas frações do gradiente de sacarose após remoção da sacarose das amostras.

### 5.6.4 Análise das partículas virais por contrastação negativa

As partículas purificadas nas frações 6 e 8 do gradiente de sacarose foram analisadas por microscopia eletrônica utilizando a contrastação negativa (Figura 27).

Na fração 6 de células não infectadas ou infectadas com BVM ou BVG não observamos estruturas que se assemelhassem as VLPs de raiva. Com relação a fração 6 de células coinfectadas nós observamos corpos esféricos que se assemelham as VLPs de raiva com tamanho variado entre 150 e 189 nm. Além disso, na fração 6 dos diferentes ensaios (células não infectadas, infectadas com BVM ou BVG e células coinfectadas) não foi observado partículas de BVs recombinantes.

A fração 8 dos ensaios de infecção com BVM ou BVG e coinfecção foram observadas as partículas de BVs recombinantes com tamanho de  $\approx 300$  nm de comprimento e 61 nm de diâmetro. E nas células Sf9 não infectadas não visualizamos partículas de baculovírus.

**Figura 27.** Contrastação negativa das partículas purificadas por gradiente de sacarose

Contrastação negativa das partículas purificadas do gradiente de sacarose, com ênfase nas frações 6 e 8. Amostras diluídas 50 $\times$ .

### 5.6.5 Análise do brotamento das partículas virais

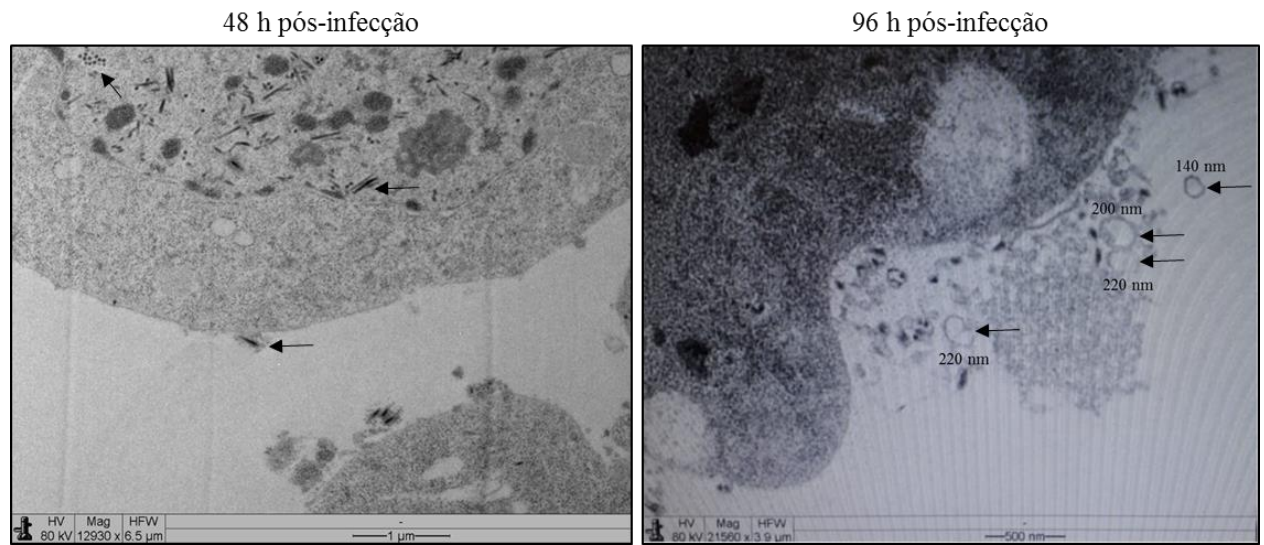
As células coinfectadas foram fixadas e infiltradas em resina para análise do brotamento dos BVs e das VLPs (Figura 28).

**RESULTADOS**

Na imagem de 48 h.p.i. identificamos estruturas com a morfologia do baculovírus (indicado pelas setas). Essas estruturas são encontradas em grande quantidade no núcleo da célula e também brotando pela membrana plasmática.

Com relação a imagem de 96 h.p.i. foram visualizadas estruturas arredondadas e bem delineadas fora da célula (indicado pela seta). Essas estruturas têm tamanho de 200-220 nm.

**Figura 28.** Análise do brotamento dos BVs e das VLPs por contrastação negativa



As células Sf9 foram coinfectadas com MOI 0,1 de cada BV recombinante, foram coletadas 48 e 96 h.p.i. e preparadas para análise do brotamento das partículas virais.

---

## 6 Discussão

Uma ampla variedade de candidatos a vacinas baseadas em VLPs têm sido gerados em diferentes sistemas de expressão (KANG et al., 2015). Ao longo de mais de três décadas as VLPs têm sido desenvolvidas como alternativas de tratamento e prevenção de uma série de doenças humanas e animais. A primeira delas foi baseada no vírus da hepatite B e a partir destas muitas outras vacinas de VLPs foram desenvolvidas ou ainda estão em desenvolvimento, como do vírus da imunodeficiência 1, do vírus da dengue, norovírus, rotavírus e influenza A (CHROBOCZEK; SZURGOT; SZOLAJSKA, 2014).

Recentemente, foi desenvolvida uma vacina de VLPs para raiva capaz de induzir resposta imune de anticorpos específicos, sendo capaz de proteger camundongos contra o desafio do vírus da raiva (FONTANA et al., 2015). Porém, a tecnologia usada por FONTANA et al. (2015) para a obtenção de VLPs de raiva baseou-se na transfecção de células de mamíferos com vetores de expressão, apresentando portanto, custos mais elevados para a produção. Por outro lado, o sistema de expressão de baculovírus em células de inseto permite a expressão de quantidades elevadas de proteína recombinante e tem se tornado uma plataforma interessante para a produção de VLPs (LIU et al., 2013; VICENTE et al., 2011).

Entre os sistemas utilizados para a produção de VLPs, o sistema de expressão de baculovírus recombinantes em células de insetos tem sido descrito como uma ótima ferramenta para produzir proteínas complexas e proporcionar um acesso rápido a proteínas biologicamente ativas. Esta plataforma de produção de proteína tem sido amplamente explorada para a produção de antígenos virais e parasitários (VAN OERS, 2006) e, mais recentemente, algumas vacinas foram comercializadas, demonstrando seu potencial como uma tecnologia de fabricação comercial (MENA; KAMEN, 2011).

Os baculovírus são capazes de expressar diversas proteínas em células de insetos, produzindo altos níveis de proteínas recombinantes. Além de seguro, esse sistema é vantajoso por ser um ambiente eucariótico, permitindo a expressão de proteínas complexas, além da coexpressão de dois ou mais genes (O'REILLY; MILLER; LUCKOW, 1994).

As células de insetos têm a capacidade de realizar muitas das modificações pós-traducionais, como glicosilação, formação de ligações dissulfeto e fosforilação, necessárias para a atividade biológica de muitas proteínas complexas (KOST; CONDREAY; JARVIS, 2005; VAN OERS; PIJLMAN; VLAK, 2015). Tais modificações são importantes para a preservação da antigenicidade da glicoproteína do vírus da raiva (ASTRAY; JORGE; PEREIRA, 2017). A RVGP é um importante antígeno do Vírus da raiva capaz de conferir

imunidade protetora, por essa razão essa proteína tem sido obtida em diferentes sistemas de expressão.

PREHAUD et al. (1989), por exemplo, produziram a RVGP em células de inseto Sf9 com boas características estruturais, quando comparada a RVGP do vírus, além disso essa RVGP recombinante foi imunogênica quando foi administrada em camundongos, ainda ancorada na membrana citoplasmática de células infectadas por baculovírus recombinantes.

SAKAMOTO et al. (1999) expressaram a RVGP em levedura *Saccharomyces cerevisiae*, eles obtiveram uma quantidade de 30-40 ng/mL da proteína RVGP das culturas de células de levedura. Porém, essa proteína expressa em levedura não apresentou imunidade protetora para camundongos.

YOKOMIZO et al. (2007) expressaram a RVGP em células de inseto *Drosophila melanogaster Schneider 2* (S2) em frascos *Schott*. Os estudos do grupo mostraram que a expressão de RVGP em lisados e sobrenadantes celulares atingiram concentrações de 300 ng/mL, ensaios *in vivo* mostraram que a RVGP produzida pelas células S2 foi imunogênica e protetiva em camundongos contra o desafio pelo vírus da raiva.

VENTINI et al. (2010) cultivaram células S2 que expressam a proteína RVGP em biorreator de 1L, eles obtiveram uma produtividade de 1,5-2 µg de RVGP/ 10<sup>7</sup> células. No trabalho descrito por SANTOS et al., (2016) eles realizaram o enriquecimento da população de células S2 (mesma linhagem utilizada por VENTINI et al., 2010) e obtiveram uma quantificação de ≈6 µg de RVGP/ 10<sup>7</sup> células.

Nosso trabalho obteve uma quantificação de 4,5 µg de RVGP/10<sup>7</sup> células Sf9 (453 ng de RVGP/10<sup>6</sup> células). Esses dados reforçam que o sistema de baculovírus é interessante para se expressar proteínas de membrana.

A maioria dos trabalhos descritos na literatura apresenta a capacidade de células expressarem a glicoproteína do vírus da raiva ancorada na membrana, dessa forma a proteína se apresenta na forma insolúvel, o que dificulta a sua purificação e a utilização para vacinas humanas. O diferencial do nosso trabalho é a produção de VLPs de raiva que apresenta a RVGP na sua forma solúvel, facilitando o processo de purificação e sua utilização como agente vacinal.

No caso da produção de VLPs de raiva, há poucos trabalhos publicados quanto a produção e caracterização dessas partículas, assim como não há trabalho sobre a estabilidade estrutural dessas VLPs usando diferentes meios de cultura para produção e diferentes temperaturas de armazenamento. Há descrito estudos para avaliar a sua imunogenicidade e método de purificação (FONTANA et al., 2015; KANG et al., 2015; LIU; HUANG; YANG, 2015).



O sistema de expressão de baculovírus em células de inseto permite a expressão de quantidades elevadas de proteína recombinante e tem se tornado uma plataforma interessante para a produção de VLPs (LIU et al., 2013; VICENTE et al., 2011).

A coexpressão usando baculovírus policistrônicos vem sendo utilizada como uma estratégia para superar as limitações inerentes à coinfeção, tais como a distribuição desigual de infecções de vírus individuais em populações de células de insetos (CHAABIHI et al., 1993). No entanto, o uso desses baculovírus requer a amplificação e o manuseio de menos estoques virais, já que são muitas vezes instáveis e a manipulação individual de cada carga de genes não é possível (PALOMARES; RAMÍREZ, 2009).

Uma vantagem dos vírus monocistrônicos é que, se necessário, eles podem ser construídos rapidamente se surgirem novos genótipos, e apenas um ou dois baculovírus seriam substituídos (PALOMARES; RAMÍREZ, 2009). ROLDÃO et al. (2006) realizaram ensaios de infecção e coinfeção usando baculovírus policistrônicos e/ou monocistrônicos em células Sf9. Como principal resultado, o grupo verificou que as taxas de replicação e transcrição de DNA viral é mais lenta nos experimentos multigênicos quando comparados com os experimentos monocistrônicos. Além disso, a estratégia monocistrônica oferece maior flexibilidade para a expressão de proteínas recombinantes do que a estratégia policistrônica, uma vez que podemos realizar a manipulação do MOI.

Baseados nos dados da literatura selecionamos o uso do vetor monocistrônico para a construção dos baculovírus recombinantes BVM e BVG. Esses baculovírus recombinantes foram utilizados para os ensaios de infecção e coinfeção de células de inseto para a otimização da relação de MOIs durante o processo de coinfeção para a melhor produção de VLPs da raiva.

Após a produção dos lotes virais, a etapa de titulação foi realizada com a utilização das células Sf9 *Easy titer* (HOPKINS; ESPOSITO, 2009). Existe uma ampla variedade de ensaios que podem ser utilizados para detectar e quantificar o título viral (ALMEIDA, 2010). Um desses métodos que vem sendo muito utilizado é o ensaio da diluição do ponto final (*end-point dilution assay*), é um método de avaliação qualitativa utilizado para identificar células infectadas, especialmente quando possuem proteínas de fácil detecção como a  $\beta$ -galactosidase e eGFP (MENA; RAMÍREZ; PALOMARES, 2003).

Esse método apresenta algumas vantagens em relação aos outros métodos já descritos na literatura. O uso das células marcadas com eGFP é muito menos ambíguo do que marcar a morte celular; os resultados do ensaio são obtidos em apenas 4 dias, em contraste com os 6-8 dias necessários para o método por observação ao efeito citopático; a linhagem celular Sf9 ET permite uma quantificação fácil de baculovírus recombinantes, evitando assim a necessidade

de coexpressar outros genes repórteres junto com a proteína de interesse, desta forma em comparação com sistemas de ensaios alternativos para quantificar estoques de baculovírus, o método *Easy Titer* é sensível, rápido e específico (HOPKINS; ESPOSITO, 2009).

Nossos lotes virais alcançaram títulos de  $6,9 \times 10^6$  pfu/mL para BVM e  $1,9 \times 10^7$  pfu/mL para BVG em cultura de frascos de 75 cm<sup>2</sup>. KWANG; ZENG; WANG (2016) observaram que em cultura de escala média, 10 L, pode-se produzir títulos de baculovírus recombinantes acima de  $2 \times 10^8$  pfu/mL. FERRIS et al. (2011) obtiveram títulos de baculovírus recombinantes de  $1,7 \times 10^8$  pfu/mL em cultura de média escala, 3 L. Esses resultados corroboram que nossos títulos estão dentro do padrão de título viral para cultura de pequena escala.

Visto que obtivemos sucesso na construção dos bacmídeos recombinantes e titulação dos BVs recombinantes, e levando em consideração que os principais parâmetros de otimização em um processo de infecção ou coinfeção são o tempo de infecção (TOI), a multiplicidade de infecção (MOI) e o tempo de coleta (TOH) (WONG et al., 1996; MARANGA; BRAZÃO; CARRONDO, 2003), realizamos um ensaio de cinética de expressão das proteínas recombinantes.

O MOI ideal é dependente do produto alvo (expressão de proteína única ou múltipla, secretada ou não secretada), da estratégia de produção (única ou coinfeção) e do título viral. Para a expressão múltipla de proteínas, a automontagem de complexos proteicos é altamente correlacionada com a estratégia de produção; assim, várias combinações de MOI podem maximizar a formação de produtos (ROLDÃO et al., 2014).

Com base em dados da literatura, utilizamos baixos MOIs para o ensaio de cinética. Em MOIs inferiores, apenas uma fração das células é inicialmente infectada (infecção primária). O restante continuará a crescer como células não infectadas, estas células serão infectadas mais tarde (infecção secundária) quando as células infectadas na infecção primária começarem a liberar os vírus da progênie. Portanto, para alcançar a produção ideal ao usar baixos MOIs, as células devem ser infectadas em uma densidade celular menor do que o rendimento celular ótimo (WONG et al., 1996; ZHANG; MERCHUK, 2004).

LICARI; BAILEY (1991) observaram que ao infectarem células com MOI extremamente alto, estas foram infectadas de forma síncrona (infecção primária) e, em MOIs inferiores, apenas uma subpopulação foi infectada. No caso do MOI baixo (por exemplo, MOI 0,1), devido ao tempo de infecção precoce, uma infecção secundária ocorrerá, minimizando assim a diferença nos títulos do produto final. A ligeira diminuição nos títulos finais de  $\beta$ -galactosidase observada para valores de MOI superiores a 1 em culturas infectadas precocemente é o resultado da infecção síncrona de massa. Assim, o número total de células

infectadas com elevado MOI será menor do que o número total de células infectadas com um baixo MOI, levando a uma ligeira diminuição nos títulos finais do produto.

NGUYEN et al. (1993) constataram que a infecção de células de inseto com um baixo MOI (MOI 0,05) demonstrou ser a melhor condição para a produção de rhNGF (Fator de crescimento nervoso humano recombinante). Isto é particularmente conveniente e rentável, uma vez que apenas uma pequena quantidade do estoque viral é necessária para cada ensaio de produção da proteína recombinante. Nos experimentos em que os autores empregaram altos MOIs para infectar culturas de células de insetos de alta densidade, os rendimentos totais de rhNGF foram uniformemente menores. Assim, em baixos MOI, uma porção das células se multiplicou antes da infecção, resultando em um aumento líquido de células infectáveis totais.

LIU et al. (2015) produziram VLPS de influenza H7N9 em células de inseto Sf9 utilizando BVs recombinantes. As células foram coinfectedas com MOI de 0,5 de cada BV recombinante expressando os genes H7, N9 e M1. O grupo titulou as VLPs pelo ensaio de hemaglutinação, as VLPs exibiram alta atividade de hemaglutinação de título (HAU = 2048 por 0,40 mg / ml de proteína VLP total).

SMITH et al. (2017) geraram uma vacina recombinante de partícula semelhante a vírus da influenza (VLP). Células Sf9 foram coinfectedas com um MOI de 0,5 de cada BV recombinante expressando os genes H3, H5, N1, N2 e M1.

Desta forma, aparentemente, é mais viável infectar a cultura celular no início da fase exponencial com um baixo MOI e obter concentrações do produto final na mesma ordem de grandeza. Utilizando um MOI mais baixo e considerando a infecção secundária da cultura, a quantidade de vírus estoque necessária será substancialmente reduzida (LICARI; BAILEY, 1991).

O tempo de infecção da cultura celular é muito importante, sabe-se que as infecções realizadas no final da fase de crescimento exponencial levam a grandes reduções na produtividade específica das células, correlacionadas com a limitação de nutrientes (RADFORD; REID; GREENFIELD, 1997). Dessa forma, sempre optamos por realizar a infecção em baixa concentração celular e no meio da fase exponencial da cultura celular, além de substituir o meio de cultura, para que dessa forma as células não viessem a sofrer por falta de nutrientes, fato que poderia levar a diminuição ou má produção das nossas VLPs de raiva.

A degradação do produto devido à lise celular pode influenciar fortemente o tempo ideal de coleta (TOH). Em diferentes MOIs, o melhor TOH também dependerá do MOI (exceto nos altos MOIs). MARANGA; BRAZÃO; CARRONDO (2003) observaram que nos MOIs de 2 e 5 o melhor TOH estava situado em uma pequena janela, ou seja, essa características de infectar

as células em massa permite poucas alterações de horários e/ou ajustes no tempo de coleta das VLPs. Isso se deve a relação de uma alta taxa de células infectadas, que produzirá as VLPs em pouco tempo, impedindo que novas células sejam infectadas. Eles também observaram que em baixos MOIs essa janela de coleta é mais ampla. Desta forma, o grupo pôde concluir que o tempo ótimo de coleta é altamente dependente do MOI e, como tal, é altamente dependente do rendimento máximo de células. Assim, é possível prever o tempo ideal de coleta, mesmo com baixos MOIs, e definir com precisão a janela de tempo ideal para realizar tais operações, minimizando as perdas de produto.

Nosso trabalho realizou a coexpressão das proteínas RVM e RVGP, e os dados da literatura corroboraram com os resultados obtidos no ensaio de cinética (Figura 23), no qual a detecção das proteínas RVM e RVGP apresentaram melhor sinal no MOI 0,1 e coleta após 96 h.p.i. Depois disso, a detecção das proteínas diminuiu com o MOI mais alto e com tempo superior a 96 h. Com o aumento da morte celular após a infecção, a degradação das proteínas é aumentada (ROLDÃO et al., 2014), tal fato pode ocorrer por conta das proteases celulares que poderiam degradar as VLPs.

Vale ressaltar, que nossos experimentos foram realizados em pequena escala (frascos *Schotts* com 20 mL de volume de trabalho) e que possivelmente esses dados terão que ser adaptados para utilização em um sistema de larga escala.

Nossos dados também demonstraram a expressão de ambas as proteínas do vírus independentemente. Tanto a RVM quanto a RVGP se apresentaram nos tamanhos conformacionais esperados, 25 kDa e 55 kDa, respectivamente. LIU; HUANG; YANG (2015) expressaram as proteínas RVGP e RVM recombinantes em células Sf9 em sistema de baculovírus e foi possível detectar as proteínas por imunotransferência nos tamanhos de 57 kDa RVGP e 26 kDa RVM. Embora proteínas recombinantes expressas em BVs recombinantes possam apresentar padrões de glicosilação diferentes das proteínas nativas, a ligação específica do anticorpo primário confirma o correto dobramento das proteínas RVM e RVGP expressas em células Sf9 (RAMYA et al., 2011).

O fato de detectarmos as proteínas, RVM e RVGP, no sobrenadante da cultura celular infectadas nos permite levantar algumas questões. Por exemplo, no caso da proteína RVM observamos a sua detecção no ensaio de *dot blot*, diferentemente do ensaio de *western blot* no qual não detectamos a sua marcação no ensaio de infecção, somente no ensaio de coinfeção. Assim, a primeira questão a ser levantada é a de que temos uma pequena quantidade de RVM no sobrenadante celular após a lise causada pelos baculovírus recombinantes.

A segunda questão é em relação a detecção da RVGP, por ser uma proteína de membrana assumimos que ela fica ancorada na membrana e após a lise celular causada pelo BVs ela é liberada para o sobrenadante celular.

Devido à natureza lítica dos baculovírus e a utilização de baculovírus monocitrônicos, esses resultados já eram esperados, uma vez que a utilização dos 2 BVs recombinantes não nos garante que uma célula seja coinfetada.

Como foi possível a detecção das proteínas RVM e RVGP nos ensaios de coinfecção utilizando o *western blot*, esse dado nos sugere que temos a formação de VLP no sobrenadante celular e que a concentração dessas proteínas é maior do que nos ensaios de infecção.

Dessa forma, esses dados podem sugerir que a proteína RVM seja capaz de formar uma partícula semelhante a vírus (ROSE; WHITT, 2001), mas que a presença da RVGP na membrana celular seja essencial para o seu brotamento (MEBATION; KONIG; CONZELMANN, 1996; MEBATION; WEILAND; CONZELMANN, 1999). Por outro lado, a RVGP fica retida na membrana, pela presença do seu domínio citoplasmático, e necessita da presença da proteína RVM para auxiliar no brotamento, produzindo as VLPs.

Existem alguns trabalhos publicados em que se procedeu com sucesso a produção de VLPs da raiva. KANG et al. (2015) realizaram uma coinfecção com 3 BVs recombinantes que transportavam os genes da RVM, da RVGP e o gene do fator de estimulação de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF). Os autores verificaram que a VLP foi capaz de induzir resposta imune com anticorpos neutralizantes específicos para o Vírus da raiva. Estes resultados sugerem que a VLP por eles produzidas tem potencial para ser uma nova vacina candidata para a prevenção e controle da raiva animal.

LIU; HUANG; YANG (2015) também realizaram uma infecção de um baculovírus recombinante portador dos genes da proteína RVM e RVGP, porém neste estudo ambos os genes, da RVM e da RVGP, foram inseridos num mesmo vetor sob ação de promotores diferentes. Os dados obtidos permitiram a produção e caracterização das VLPs. Além da caracterização, os autores sugeriram que as VLPs foram facilmente purificadas por ultrafiltração e centrifugação por gradiente.

Alguns estudos foram conduzidos com diferentes métodos para separação e purificação das VLPs dos BVs, tais como cromatografia de exclusão de tamanho e cromatografia de afinidade, mas esses métodos foram ineficazes para VLPs grandes e envelopadas (caso da VLP de raiva) (HU et al., 1999). O método convencional para purificação de VLPs é por ultracentrifugação utilizando gradiente de sacarose.

Em nosso experimento foi demonstrado que ao utilizar ultracentrifugação em gradiente de sacarose foi possível separar as VLPs dos BVs provenientes de células de inseto coinfectadas, percebendo que as duas partículas se concentraram em densidades diferentes do gradiente de sacarose. KANG et al. (2015) obtiveram sucesso na separação VLPs de raiva dos BVs recombinantes. Assim, como estes autores nossas VLPs se concentraram na fração de 30-50%, sendo que na fração de 40% foi detectada a maior concentração das VLPs.

Nosso grupo possui um método bem estabelecido e confiável para dosagem da proteína RVGP produzida em diferentes sistemas de expressão (ASTRAY et al., 2008). Com auxílio da técnica de ELISA foi possível visualizar que entre os passos de clarificação e concentração do sobrenadante contendo as VLPs e BVs conseguimos recuperar 85% das partículas virais. Porém, essa taxa de recuperação é diminuída para 53% após a realização do colchão de sacarose. Nesse ensaio ficou nítido que a etapa de colchão de sacarose não foi bem padronizado, sendo necessárias alterações das condições de concentração, para que assim a taxa de recuperação das partículas virais seja maior do que a que obtivemos nesses ensaios.

Além desses resultados, nossos ensaios de gradiente de sacarose mostraram eficiência em separar e concentrar maior parte das VLPs na fração de 40%, podemos considerar que as VLPs se apresentam de forma heterogênea e isso faz com que elas se dispersem nas 4 últimas frações do gradiente, uma vez que as proteínas RVM e RVGP detectadas nessas frações. Ressalta-se que a recuperação da VLP após este ensaio, levando em consideração os valores obtidos nas 4 últimas frações do gradiente, chegamos a um valor de 260 ng de proteína RVGP total, sendo que partimos de 315 ng proteínas totais no colchão de sacarose.

Visando o escalonamento do processo de produção de VLPs, no intuito de aumentar a produtividade, devem ser feitas melhorias no processo *downstream*, a fim de obtermos uma recuperação mais eficiente das VLPs, para que assim possamos realizar ensaios *in vivo*.

Os trabalhos que expressam VLPs de raiva seja em sistema de baculovírus (KANG et al., 2015; LIU; HUANG; YANG, 2015) ou em células de mamíferos (FONTANA et al., 2014), não demonstraram essas taxas de produção e recuperação das VLPs em cada etapa de purificação, esse é um diferencial do nosso trabalho quando comparado aos demais.

Outro dado importante foi demonstrado no ensaio de contrastação negativa. Pelas imagens obtidas, nossos ensaios de purificação foram suficientes para separar as VLPs dos BVs, uma vez que visualizamos as partículas virais em diferentes frações do gradiente de sacarose. Esse foi um resultado importante, pois a principal limitação do uso do sistema de baculovírus é a etapa de purificação, devido à coprodução das partículas virais e as condições aplicadas para a purificação se mostraram eficientes para a separação.

Ensaio para detectar o brotamento das VLPs e dos BVs após a coinfeção foram realizados, nas imagens obtidas conseguimos visualizar a produção de BVs recombinantes e de estruturas que nos sugerem ser VLPs. As VLPs da raiva em nosso estudo não apresentaram a morfologia típica do vírus da raiva. KANG et al. (2015) obtiveram VLPs que também não apresentaram o formato típico do vírus da raiva, as VLPs apresentaram o formato arredondado. Uma hipótese levantada para justificar essa aparência das nossas VLPs pode estar ligada a ausência da ribonucleoproteína (RNP). MEBATSION; WEILAND; CONZELMANN (1999) infectaram células de mamíferos com vírus defeitivo para a proteína RVM, os autores visualizaram que no sobrenadante celular não continha as típicas partículas do vírus da raiva em forma de “bala de revólver”, os vírus se apresentaram em forma de bastonete, demonstrando um grave comprometimento no processo de formação do vírus. A complementação com a RVM, com plasmídeo recombinante, resgatou a morfologia dos rhabdovirus. Esses resultados mostram a importância da RVM na condensação da RNP, e que esse passo pode ser importante para manter o formato típico do vírus da raiva (TORDO et al., 1986; AMEYAMA et al., 2003; GE et al., 2010; KHALIFA et al., 2016). Dessa forma, podemos dizer que nossos resultados estão de acordo com os descritos na literatura para produção de VLPs de raiva em cultura de insetos.

Para afirmar que essas estruturas são VLPs de raiva e que são constituídas pela proteína RVM quanto pela glicoproteína RVGP é necessário realizar ensaios de imunomarcção dessas proteínas com anticorpo conjugado com ouro (dados a serem analisados).

Infelizmente não conseguimos tempo hábil para realizar ensaios *in vivo* para verificar a resposta imune das VLPs produzidas. Devemos lembrar que durante a montagem das VLPs na membrana celular, elas podem carregar as proteínas GP64 do baculovírus que estão presentes na superfície da membrana (THOMPSON et al., 2015; CHAVES; RIBEIRO; BLISSARD, 2018), assim como os BVs recombinantes também podem carregar a RVGP da raiva que também está presente na superfície da membrana celular (GRABHERR; ERNST, 2010). Sabe-se que a GP64 é imunogênica e pode desencadear uma resposta imune específica (CHAVES; RIBEIRO; BLISSARD, 2018). Esses estudos deverão ser realizados, analisados e discutidos em publicações futuras.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, foi demonstrada a eficácia da técnica na produção e purificação de VLPs de raiva, assim, como na sua quantificação. Vale ressaltar que não foram observados BVs em uma amostra de VLPs purificadas.

Este trabalho incentiva o desenvolvimento de novos projetos de VLPs de raiva, como uma candidata promissora para uma vacina anti-rábica.

---

## 7 Conclusão

Este trabalho descreve o estabelecimento de um sistema de produção de baculovírus recombinantes capazes de transportar o gene da RVM (BVM) e da RVGP (BVG).

Obtivemos sucesso na titulação dos lotes virais de BVM e BVG com auxílio das células Sf9 ET, o que nos ajudou na otimização do MOI adequado para a coinfeção.

Detectamos a expressão das proteínas RVM e RVGP por diferentes técnicas, tais como *dot blot*, *western blot*, além de dosar a RVGP total por ELISA.

Estabelecemos uma melhor condição de produção das VLPs da raiva, MOI 0,1 de cada BV recombinante e tempo de coleta 96 h.p.i..

Obtivemos êxito na separação das VLPs utilizando o gradiente de sacarose.



**Referência<sup>1</sup>**

AGNANDJI, S. T. et al. First Results of Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Children. **The New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 20, p. 1863–1875, 2011.

AIRENNE, K. J. et al. Baculovirus: An Insect-Derived Vector for Diverse Gene Transfer Applications. **Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 21, n. 4, p. 739–749, 2013.

ALBERTINI, A. A. V.; RUIGROK, R. W. H.; BLONDEL, D. Chapter 1 - Rabies Virus Transcription and Replication. In: JACKSON, A. C. (Ed.). **Advances in Virus Research**. Research Advances in Rabies. 1. ed. Estados Unidos: Academic Press, 2011. 79p. 1–22.

ALMEIDA, A. F. **Estratégias de Produção in vitro de Bioinseticida Viral: Influências do Isolado, da Cinética e do Modo de Operação**. 2010. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2010. Disponível em: <[https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/18558/1/AndreaFA\\_TESE.pdf](https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/18558/1/AndreaFA_TESE.pdf)>. Acesso em: 16 ago. 2017.

ALVES, C. C. **Vírus, Cancro e Vacinas – Efeitos adversos da vacina contra o Vírus do Papiloma Humano**. 2011. Universidade Fernando Pessoa, Portugal, 2011. Disponível em: <<https://bdigital.ufp.pt/handle/10284/2487>>. Acesso em: 22 maio. 2018.

AMEYAMA, S. et al. Monoclonal Antibody #3-9-16 Recognizes One of the Two Isoforms of Rabies Virus Matrix Protein That Exposes Its N-Terminus on the Virion Surface. **Microbiology and Immunology**, v. 47, n. 9, p. 639–651, 2003.

ANDERSON, A.; SHWIFF, S. A. The Cost of Canine Rabies on Four Continents. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 62, n. 4, p. 446–452, 2015.

ASHRAF, S. et al. High Level Expression of Surface Glycoprotein of Rabies Virus in Tobacco Leaves and Its Immunoprotective Activity in Mice. **Journal of Biotechnology**, v. 119, n. 1, p. 1–14, 2005.

ASTRAY, R. M. et al. Analytical Approach for the Extraction of Recombinant Membrane Viral Glycoprotein from Stably Transfected Drosophila Melanogaster Cells. **Biotechnology Journal**, v. 3, n. 1, p. 98–103, 2008.

ASTRAY, R. M.; JORGE, S. A. C.; PEREIRA, C. A. Rabies Vaccine Development by Expression of Recombinant Viral Glycoprotein. **Archives of Virology**, v. 162, n. 2, p. 323–332, 2017.

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

BANYARD, A. C. et al. Bats and Lyssaviruses. In: JACKSON, A. C. (Ed.). **Advances in Virus Research**. Research Advances in Rabies. [s.l.] Academic Press, 2011. 79p. 239–289.

BERNARDINO, T. C. **Expressão da glicoproteína rábica utilizando pseudopartículas virais**. 2015. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-04092015-150538/>>. Acesso em: 22 maio. 2018.

---

<sup>1</sup>De acordo com a ABNT NBR 6023 2002.

BIERNAT, M. A. et al. A Baculovirus Photolyase with DNA Repair Activity and Circadian Clock Regulatory Function. **Journal of Biological Rhythms**, v. 27, n. 1, p. 3–11, 2012.

BLISSARD, G. W.; THEILMANN, D. A. Baculovirus Entry and Egress from Insect Cells. **Annual Review of Virology**, v. 5, n. 1, p. 27, 2018.

BOVIER, P. A. Recent Advances with a Virosomal Hepatitis A Vaccine. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 8, n. 8, p. 1177–1185, 2008.

BRASIL. **Esquema de profilaxia da raiva humana** Ministério da Saúde, , 2014. . Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/marco/15/01---Esquema-de-profilaxia-da-raiva-humana.pdf>>. Acesso em: 16 maio. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação da Raiva no Brasil**, 2015. Disponível em: <<http://saude.sp.gov.br/resources/instituto-pasteur/pdf/wrd2015/situacaodaraivanobrasil-eduardopachecodecaldas.pdf>>. Acesso em: 2 ago. 2018.

BRASIL. Secretaria de Saúde do estado de São Paulo. **NORMA TÉCNICA DO PROGRAMA DE IMUNIZAÇÃO**, p. 85, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Casos de Raiva Humana por Região administrativa e Unidades Federadas no período de 2010 a 2018.**, 2019a. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/31/03---Tabela-1.pdf>>. Acesso em: 12 fev. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Raiva humana por espécie agressora de 1990 a 2018**, 2019b. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/31/09---Tabela-6.pdf>>. Acesso em: 31 jul. 2018.

BRAUN, M. et al. Virus-like Particles Induce Robust Human T-Helper Cell Responses. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 2, p. 330–340, 2012.

BRÄUTIGAM, S.; SNEZHKOVA, E.; BISHOP, D. H. L. Formation of Poliovirus-like Particles by Recombinant Baculoviruses Expressing the Individual VP0, VP3, and VP1 Proteins by Comparison to Particles Derived from the Expressed Poliovirus Polyprotein. **Virology**, v. 192, n. 2, p. 512–524, 1993.

BROWN, C. S. et al. Assembly of empty capsids by using baculovirus recombinants expressing human parvovirus B19 structural proteins. **Journal of Virology**, v. 65, n. 5, p. 2702–2706, 1991.

BUONAGURO, L. et al. High efficient production of Pr55gag virus-like particles expressing multiple HIV-1 epitopes, including a gp120 protein derived from an Ugandan HIV-1 isolate of subtype A. **Antiviral Research**, v. 49, n. 1, p. 35–47, 2001.

BUONAGURO, L. et al. Developments in Virus-like Particle-Based Vaccines for HIV. **Expert Review of Vaccines**, v. 12, n. 2, p. 119–127, 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **The Rabies Virus - Rabies-Prevention**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/rabies/transmission/virus.html>>. Acesso em: 15 maio. 2018.

CHACKERIAN, B. Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development. **Expert Review of Vaccines**, v. 6, n. 3, p. 381–390, 2007.

- CHAVES, L. C. de S. **Uso de baculovírus como ferramenta para produção de antígenos vacinais e “virus like particles” (VLPs)**. 2016. Universidade de Brasília, Brasília, 2016. Disponível em: <<http://repositorio.unb.br/handle/10482/21421>>. Acesso em: 22 maio. 2018.
- CHAVES, L. C. S.; RIBEIRO, B. M.; BLISSARD, G. W. Production of GP64-free virus-like particles from baculovirus-infected insect cells. **Journal of General Virology**, v. 99, n. 2, p. 265–274, 2018.
- CHESHENKO, N. et al. A Novel System for the Production of Fully Deleted Adenovirus Vectors That Does Not Require Helper Adenovirus. **Gene Therapy**, v. 8, n. 11, p. 846–854, 2001.
- CHROBOCZEK, J.; SZURGOT, I.; SZOLAJSKA, E. Virus-like Particles as Vaccine. **Acta Biochimica Polonica**, v. 61, n. 3, p. 531–539, 2014.
- CRAWFORD, S. E. et al. Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. **Journal of Virology**, v. 68, n. 9, p. 5945–5952, 1994.
- CRISCI, E.; BÁRCENA, J.; MONTOYA, M. Virus-like particles: The new frontier of vaccines for animal viral infections. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 148, n. 3, p. 211–225, 2012.
- DANQUAH, J. O. et al. Direct Interaction of Baculovirus Capsid Proteins VP39 and EXON0 with Kinesin-1 in Insect Cells Determined by Fluorescence Resonance Energy Transfer-Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. **Journal of Virology**, v. 86, n. 2, p. 844–853, 2012.
- DAVIS, B. M.; RALL, G. F.; SCHNELL, M. J. Everything You Always Wanted to Know About Rabies Virus (But Were Afraid to Ask). **Annual Review of Virology**, v. 2, n. 1, p. 451–471, 2015.
- DEE, K. U.; SHULER, M. L. Optimization of an Assay for Baculovirus Titer and Design of Regimens for the Synchronous Infection of Insect Cells. **Biotechnology Progress**, v. 13, n. 1, p. 14–24, 1997.
- DI MARTINO, B.; MARSILIO, F.; ROY, P. Assembly of feline calicivirus-like particle and its immunogenicity. **Veterinary Microbiology**, v. 120, n. 1, p. 173–178, 2007.
- ERTL, H. C. J. Novel Vaccines to Human Rabies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 9, p. e515, 2009.
- ESTADOS UNIDOS DA AMERICA. **Food and Drug Administration**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/biologicsbloodvaccines/vaccines/approvedproducts/ucm421396.htm>>. Acesso em: 18 maio. 2018.
- ETESSAMI, R. et al. Spread and pathogenic characteristics of a G-deficient rabies virus recombinant: an in vitro and in vivo study. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 9, p. 2147–2153, 2000.
- FAVORETTO, S. R. et al. The Emergence of Wildlife Species as a Source of Human Rabies Infection in Brazil. **Epidemiology & Infection**, v. 141, n. 7, p. 1552–1561, 2013.

- FERRIS, M. M. et al. Evaluation of the Virus Counter® for rapid baculovirus quantitation. **Journal of virological methods**, v. 171, n. 1, p. 111–116, 2011.
- FINKE, S.; CONZELMANN, K.-K. Dissociation of Rabies Virus Matrix Protein Functions in Regulation of Viral RNA Synthesis and Virus Assembly. **Journal of Virology**, v. 77, n. 22, p. 12074–12082, 2003.
- FINKE, S.; MUELLER-WALDECK, R.; CONZELMANN, K.-K. Rabies Virus Matrix Protein Regulates the Balance of Virus Transcription and Replication. **The Journal of General Virology**, v. 84, n. 6, p. 1613–1621, 2003.
- FONTANA, D. et al. Rabies Virus-like Particles Expressed in HEK293 Cells. **Vaccine**, v. 32, n. 24, p. 2799–2804, 2014.
- FONTANA, D. et al. Immunogenic Virus-like Particles Continuously Expressed in Mammalian Cells as a Veterinary Rabies Vaccine Candidate. **Vaccine**, v. 33, n. 35, p. 4238–4246, 2015.
- FOOKS, A. R. et al. Current status of rabies and prospects for elimination. **The Lancet**, v. 384, n. 9951, p. 1389–1399, 2014.
- FUENMAYOR, J.; GÒDIA, F.; CERVERA, L. Production of virus-like particles for vaccines. **New Biotechnology**, European Congress of Biotechnology - ECB 2016. v. 39, p. 174–180, 2017.
- GAUDIN, Y. et al. Rabies Virus Glycoprotein Is a Trimer. **Virology**, v. 187, n. 2, p. 627–632, 1992.
- GE, P. et al. Cryo-EM Model of the Bullet-Shaped Vesicular Stomatitis Virus. **Science (New York, N.Y.)**, v. 327, n. 5966, p. 689–693, 2010.
- GHOSH, S. et al. Baculovirus as Mammalian Cell Expression Vector for Gene Therapy: An Emerging Strategy. **Molecular Therapy**, v. 6, n. 1, p. 5–11, 2002.
- GOMES, A. P. et al. Raiva Humana. **Rev Bras Clin Med**, v. 10, n. 4, p. 334–340, 2012.
- GOTOH, T. et al. Investigation of Sequential Behavior of Carboxyl Protease and Cysteine Protease Activities in Virus-Infected Sf-9 Insect Cell Culture by Inhibition Assay. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 5–6, p. 742–749, 2001.
- GOVERNO DO ESTADO DE SANTA CATARINA. **Santa Catarina registra primeiro caso de raiva humana em 38 anos**. Disponível em: <<https://www.sc.gov.br/index.php/noticias/temas/saude/santa-catarina-registra-primeiro-caso-de-raiva-humana-em-38-anos>>. Acesso em: 9 maio. 2019.
- GRABHERR, R.; ERNST, W. Baculovirus for Eukaryotic Protein Display. **Current Gene Therapy**, v. 10, n. 3, p. 195–200, 2010.
- GRGACIC, E. V. L.; ANDERSON, D. A. Virus-like Particles: Passport to Immune Recognition. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 40, n. 1, p. 60–65, 2006.
- GSK. **ENGERIX B [Hepatitis B Vaccine (Recombinant)]**. Disponível em: <[https://www.gsksource.com/engerix\\_b](https://www.gsksource.com/engerix_b)>. Acesso em: 5 jul. 2018.

- GUO, Y. et al. Early events in rabies virus infection—Attachment, entry, and intracellular trafficking. **Virus Research**, v. 263, p. 217–225, 2019.
- GUPTA, P. K. et al. Immunogenic and Antigenic Properties of Recombinant Soluble Glycoprotein of Rabies Virus. **Veterinary Microbiology**, v. 108, n. 3–4, p. 207–214, 2005.
- HERNIOU, E. A. et al. The Genome Sequence and Evolution of Baculoviruses. **Annual Review of Entomology**, v. 48, p. 211–234, 2003.
- HERVAS-STUBBS, S. et al. Insect Baculoviruses Strongly Potentiate Adaptive Immune Responses by Inducing Type I IFN. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 178, n. 4, p. 2361–2369, 2007.
- HERZOG, C. et al. Eleven Years of Inflexal V-a Virosomal Adjuvanted Influenza Vaccine. **Vaccine**, v. 27, n. 33, p. 4381–4387, 2009.
- HITCHMAN, R. B.; POSSEE, R. D.; KING, L. A. Baculovirus Expression Systems for Recombinant Protein Production in Insect Cells. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 46–54, 2009.
- HOPKINS, R.; ESPOSITO, D. A Rapid Method for Titrating Baculovirus Stocks Using the Sf-9 Easy Titer Cell Line. **BioTechniques**, v. 47, n. 3, p. 785–788, 2009.
- HORTON, H. M.; BURAND, J. P. Saturable Attachment Sites for Polyhedron-Derived Baculovirus on Insect Cells and Evidence for Entry via Direct Membrane Fusion. **Journal of Virology**, v. 67, n. 4, p. 1860–1868, 1993.
- HU, C.-M. J. et al. Multi-antigen avian influenza a (H7N9) virus-like particles: particulate characterizations and immunogenicity evaluation in murine and avian models. **BMC Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 2, 2017.
- HU, Y. C. et al. Chimeric Infectious Bursal Disease Virus-like Particles Expressed in Insect Cells and Purified by Immobilized Metal Affinity Chromatography. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 63, n. 6, p. 721–729, 1999.
- HUHTI, L. et al. A Comparison of Methods for Purification and Concentration of Norovirus GII-4 Capsid Virus-like Particles. **Archives of Virology**, v. 155, n. 11, p. 1855–1858, 2010.
- JACKSON, A. C. **Rabies: Scientific Basis of the Disease and Its Management**. 3. ed. [s.l.] Academic Press, 2013.
- JARVIS, D. L. Baculovirus Expression Vectors. In: **The Baculoviruses**. The Viruses. [s.l.] Springer, Boston, MA, 1997. p. 389–431.
- JEHLE, J. A. et al. On the Classification and Nomenclature of Baculoviruses: A Proposal for Revision. **Archives of Virology**, v. 151, n. 7, p. 1257–1266, 2006.
- JEONG, H.; SEONG, B. L. Exploiting Virus-like Particles as Innovative Vaccines against Emerging Viral Infections. **Journal of Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 220–230, mar. 2017.
- KANG, H. et al. Chimeric Rabies Virus-like Particles Containing Membrane-Anchored GM-CSF Enhances the Immune Response against Rabies Virus. **Viruses**, v. 7, n. 3, p. 1134–1152, 2015.

- KANG, S.-M.; KIM, M.-C.; COMPANS, R. W. Virus-like particles as universal influenza vaccines. **Expert review of vaccines**, v. 11, n. 8, p. 995–1007, 2012.
- KAPCZYNSKI, D. R. et al. Vaccination with virus-like particles containing H5 antigens from three H5N1 clades protects chickens from H5N1 and H5N8 influenza viruses. **Vaccine**, v. 34, n. 13, p. 1575–1581, 2016.
- KAPLAN, C. **Rabies**. 2. ed. [s.l.] Oxford University Press, 1986.
- KARACOSTAS, V. et al. Human Immunodeficiency Virus-like Particles Produced by a Vaccinia Virus Expression Vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 22, p. 8964–8967, 1989.
- KASSIS, R. et al. Lyssavirus Matrix Protein Induces Apoptosis by a TRAIL-Dependent Mechanism Involving Caspase-8 Activation. **Journal of Virology**, v. 78, n. 12, p. 6543–6555, 2004.
- KASTURI, L.; CHEN, H.; SHAKIN-ESHLEMAN, S. H. Regulation of N-Linked Core Glycosylation: Use of a Site-Directed Mutagenesis Approach to Identify Asn-Xaa-Ser/Thr Sequons That Are Poor Oligosaccharide Acceptors. **The Biochemical Journal**, v. 323 ( Pt 2), p. 415–419, 1997.
- KATAOKA, C. et al. Baculovirus GP64-Mediated Entry into Mammalian Cells. **Journal of Virology**, v. 86, n. 5, p. 2610–2620, 2012.
- KHALIFA, Y. B. et al. The Matrix Protein of Rabies Virus Binds to RelAp43 to Modulate NF- $\kappa$ B-Dependent Gene Expression Related to Innate Immunity. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep39420>>. Acesso em: 21 maio. 2018.
- KING, A. et al. **Virus Taxonomy - 1st Edition**. 1. ed. Estados Unidos: Elsevier, 2012.
- KIRNBAUER, R. et al. Papillomavirus L1 Major Capsid Protein Self-Assembles into Virus-like Particles That Are Highly Immunogenic. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 24, p. 12180–12184, 1992.
- KIRNBAUER, R. et al. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. **Journal of Virology**, v. 67, n. 12, p. 6929–6936, 1993.
- KLEPFER, S. R. et al. Characterization of Rabies Glycoprotein Expressed in Yeast. **Archives of Virology**, v. 128, n. 3–4, p. 269–286, 1993.
- KOMAROVA, A. V. et al. Rabies Virus Matrix Protein Interplay with EIF3, New Insights into Rabies Virus Pathogenesis. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 5, p. 1522–1532, 2007.
- KOST, T. A.; CONDREAY, J. P.; JARVIS, D. L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. **Nature biotechnology**, v. 23, n. 5, p. 567–575, 2005.
- KOTAIT, I.; CARRIERI, M. L.; TAKAOKA, N. Y. Raiva – Aspectos gerais e clínica. **Manual Técnico do Instituto Pasteur**, v. 8, p. 57, 2009.
- KUSHNIR, N.; STREATFIELD, S. J.; YUSIBOV, V. Virus-like Particles as a Highly Efficient Vaccine Platform: Diversity of Targets and Production Systems and Advances in Clinical Development. **Vaccine**, v. 31, n. 1, p. 58–83, 2012.

- KWANG, T. W.; ZENG, X.; WANG, S. Manufacturing of AcMNPV baculovirus vectors to enable gene therapy trials. **Molecular Therapy. Methods & Clinical Development**, v. 3, p. 15050, 2016.
- LACKAY, S. N.; KUANG, Y.; FU, Z. F. Rabies in small animals. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 38, n. 4, p. 851–ix, 2008.
- LAHAYE, X. et al. Functional Characterization of Negri Bodies (NBs) in Rabies Virus-Infected Cells: Evidence That NBs Are Sites of Viral Transcription and Replication. **Journal of Virology**, v. 83, n. 16, p. 7948–7958, 2009.
- LAHAYE, X. et al. Hsp70 Protein Positively Regulates Rabies Virus Infection. **Journal of Virology**, v. 86, n. 9, p. 4743–4751, 2012.
- LANDRY, N. et al. Preclinical and Clinical Development of Plant-Made Virus-like Particle Vaccine against Avian H5N1 Influenza. **PloS One**, v. 5, n. 12, p. e15559, 2010.
- LARROUS, F. et al. Two Overlapping Domains of a Lyssavirus Matrix Protein That Acts on Different Cell Death Pathways. **Journal of Virology**, v. 84, n. 19, p. 9897–9906, 2010.
- LEE, N.-H. et al. A review of vaccine development and research for industry animals in Korea. **Clinical and Experimental Vaccine Research**, v. 1, n. 1, p. 18–34, 2012.
- LEMOIS, M. A. N. et al. Rabies Virus Glycoprotein Expression in Drosophila S2 Cells. I: Design of Expression/Selection Vectors, Subpopulations Selection and Influence of Sodium Butyrate and Culture Medium on Protein Expression. **Journal of Biotechnology**, v. 143, n. 2, p. 103–110, 2009.
- LICARI, P.; BAILEY, J. E. Factors Influencing Recombinant Protein Yields in an Insect Cell-Baculovirus Expression System: Multiplicity of Infection and Intracellular Protein Degradation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, n. 3, p. 238–246, 1991.
- LIFE TECHNOLOGIES. **Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System An efficient site-specific transposition system to generate baculovirus for high-level expression of recombinant proteins**, 2015. Disponível em: <[https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/bactobac\\_man.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/bactobac_man.pdf)>. Acesso em: 7 maio. 2018.
- LIU, F. et al. Use of Baculovirus Expression System for Generation of Virus-like Particles: Successes and Challenges. **Protein Expression and Purification**, v. 90, n. 2, p. 104–116, 2013.
- LIU, X.; HUANG, X.; YANG, X. Rabies Virus-like Particles Comprised of G and M Proteins Protect BALB/c Mice from Lethal Dose Challenging. **Journal of Applied Virology**, v. 4, n. 2, p. 14–29, 2015.
- LIU, Y. V. et al. Recombinant virus-like particles elicit protective immunity against avian influenza A(H7N9) virus infection in ferrets. **Vaccine**, v. 33, n. 18, p. 2152–2158, 2015.
- LÓPEZ-MACÍAS, C. et al. Safety and Immunogenicity of a Virus-like Particle Pandemic Influenza A (H1N1) 2009 Vaccine in a Blinded, Randomized, Placebo-Controlled Trial of Adults in Mexico. **Vaccine**, v. 29, n. 44, p. 7826–7834, 2011.
- LUA, L. H. L. et al. Bioengineering Virus-like Particles as Vaccines. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 3, p. 425–440, 2014.

LUCKOW, V. A. et al. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. **Journal of Virology**, v. 67, n. 8, p. 4566–4579, 1993.

LUDWIG, C.; WAGNER, R. Virus-like Particles-Universal Molecular Toolboxes. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 537–545, 2007.

MADHAN, S.; PRABAKARAN, M.; KWANG, J. Baculovirus as Vaccine Vectors. **Current Gene Therapy**, v. 10, n. 3, p. 201–213, 2010.

MAEDA, S. Expression of Foreign Genes in Insects Using Baculovirus Vectors. **Annual Review of Entomology**, v. 34, p. 351–372, 1989.

MÄKELÄ, A. R.; OKER-BLOM, C. Baculovirus Display: A Multifunctional Technology for Gene Delivery and Eukaryotic Library Development. **Advances in Virus Research**, v. 68, p. 91–112, 2006.

MANGHANI, D. K. et al. Pleomorphism of fine structure of rabies virus in human and experimental brain. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 75, n. 2, p. 181–193, 1986.

MARANGA, L.; BRAZÃO, T. F.; CARRONDO, M. J. T. Virus-like Particle Production at Low Multiplicities of Infection with the Baculovirus Insect Cell System. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 84, n. 2, p. 245–253, 2003.

MATSUMOTO, S. et al. Further Studies on the Replication of Rabies and Rabies-Like Viruses in Organized Cultures of Mammalian Neural Tissues. **Journal of Virology**, v. 14, n. 4, p. 981–996, 1974.

MEBATSION, T.; KONIG, M.; CONZELMANN, K. K. Budding of Rabies Virus Particles in the Absence of the Spike Glycoprotein. **Cell**, v. 84, n. 6, p. 941–951, 1996.

MEBATSION, T.; WEILAND, F.; CONZELMANN, K. K. Matrix Protein of Rabies Virus Is Responsible for the Assembly and Budding of Bullet-Shaped Particles and Interacts with the Transmembrane Spike Glycoprotein G. **Journal of Virology**, v. 73, n. 1, p. 242–250, 1999.

MEDICAGO. **Medicago Announces Phase 3 Study of VLP Quadrivalent Influenza Vaccine**. Disponível em: <<https://www.prnewswire.com/news-releases/medicago-announces-phase-3-study-of-vlp-quadrivalent-influenza-vaccine-647905263.html>>. Acesso em: 5 jul. 2018.

MENA, J. A.; KAMEN, A. A. Insect Cell Technology Is a Versatile and Robust Vaccine Manufacturing Platform. **Expert Review of Vaccines**, v. 10, n. 7, p. 1063–1081, 2011.

MENA, J. A.; RAMÍREZ, O. T.; PALOMARES, L. A. Titration of Non-Occcluded Baculovirus Using a Cell Viability Assay. **BioTechniques**, v. 34, n. 2, p. 260–262, 264, 2003.

MERCK & CO., INC. **RECOMBIVAX HB® Hepatitis B Vaccine (Recombinant) Suspension for intramuscular injection**, 1983. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines/vaccines/approvedproducts/UCM110114.pdf>>. Acesso em: 5 jul. 2018.

MERCK & CO., INC. **GARDASIL® [Human Papillomavirus Quadrivalent (Types 6, 11, 16, and 18) Vaccine, Recombinant]**. Disponível em:



<[https://www.merck.com/product/usa/pi\\_circulars/g/gardasil/gardasil\\_pi.pdf](https://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/g/gardasil/gardasil_pi.pdf)>. Acesso em: 5 jul. 2018.

MERCK & CO., INC. **Six-year Efficacy Data for GARDASIL® 9**. Disponível em: <<http://investors.merck.com/news/press-release-details/2017/Six-year-Efficacy-Data-for-GARDASIL-9-Presented-at-EUROGIN-2017-Congress/default.aspx>>. Acesso em: 5 jul. 2018a.

MERCK & CO., INC. **Six-year Efficacy Data for GARDASIL® 9**. Disponível em: <<http://investors.merck.com/news/press-release-details/2017/Six-year-Efficacy-Data-for-GARDASIL-9-Presented-at-EUROGIN-2017-Congress/default.aspx>>. Acesso em: 5 jul. 2018b.

METZ, S. W. et al. Effective Chikungunya Virus-like Particle Vaccine Produced in Insect Cells. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3, p. e2124, 2013.

MOHSEN, M. O. et al. Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. **Seminars in Immunology**, Interaction of nanoparticles with the immune system: advantages and disadvantages. v. 34, p. 123–132, 2017.

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

MORIMOTO, K.; KAWAI, A.; MIFUNE, K. Comparison of Rabies Virus G Proteins Produced by CDNA-Transfected Animal Cells That Display Either Inducible or Constitutive Expression of the Gene. **The Journal of General Virology**, v. 73 ( Pt 2), p. 335–345, 1992.

MOSCARDI, F. et al. Baculovirus Pesticides: Present State and Future Perspectives. In: AHMAD, I.; AHMAD, F.; PICHTEL, J. (Ed.). **Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications**. New York, NY: Springer New York, 2011. p. 415–445.

MURPHY, F. A. et al. **Veterinary Virology**. 3. ed. California: Elsevier, 1999.

NAGARAJAN, T.; MARISSSEN, W.; RUPPRECHT, C. Monoclonal antibodies for the prevention of rabies: Theory and clinical practice. **Antibody Technology Journal**, v. 4, p. 1, 2014.

NAKAHARA, T. et al. Characterization of a Slow-Migrating Component of the Rabies Virus Matrix Protein Strongly Associated with the Viral Glycoprotein. **Microbiology and Immunology**, v. 47, n. 12, p. 977–988, 2003.

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

NEEVEL, A. M. G. et al. A Research Agenda to Reinforce Rabies Control: A Qualitative and Quantitative Prioritization. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 5, p. e0006387, 2018.

NGUYEN, B. et al. Fed-Batch Culture of Insect Cells: A Method to Increase the Yield of Recombinant Human Nerve Growth Factor (RhNGF) in the Baculovirus Expression System. **Journal of Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 205–217, 1993.

NIEDERHÄUSER, S. et al. A Synthetic Peptide Encompassing the G5 Antigenic Region of the Rabies Virus Induces High Avidity but Poorly Neutralizing Antibody in Immunized Animals. **Vaccine**, v. 26, n. 52, p. 6749–6753, 2008.

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

NOVAVAX. **Novavax NanoFlu™ Vaccine Demonstrates Improved Immune Responses Compared to Egg-Based, High-Dose Flu Vaccine**. Disponível em: </news-releases/news-release-details/novavax-nanoflutm-vaccine-demonstrates-improved-immune-responses>. Acesso em: 5 jul. 2018.

OKANO, K. et al. Conserved molecular systems of the Baculoviridae. **Virology**, Virology 50th Anniversary Issue. v. 344, n. 1, p. 77–87, 2006.

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual**. [s.l.] Oxford University Press, 1994.

PACHECO, S. M. et al. Morcegos Urbanos: Status Do Conhecimento e Plano de Ação Para a Conservação No Brasil. **Chiroptera Neotropical**, v. 16, n. 1, p. 629–647, 2010.

PALOMARES, L. A. et al. Glycobiotechnology of the Insect Cell-Baculovirus Expression System Technology. In: **SpringerLink**. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. [s.l.] Springer, Berlin, Heidelberg, 2018. p. 1–22.

PALOMARES, L. A.; RAMÍREZ, O. T. Challenges for the production of virus-like particles in insect cells: The case of rotavirus-like particles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, n. 3, p. 158–167, 2009.

PELUSO, R. W.; MOYER, S. A. Viral proteins required for the in Vitro replication of vesicular stomatitis virus defective interfering particle genome RNA. **Virology**, v. 162, n. 2, p. 369–376, 1988.

PERRIN, P.; THIBODEAU, L.; SUREAU, P. Rabies Immunosome (Subunit Vaccine) Structure and Immunogenicity. Pre- and Post-Exposure Protection Studies. **Vaccine**, v. 3, n. 3, p. 325–332, 1985.

PINHEIRO, R. R. et al. Desenvolvimento de dot-blot para detecção de anticorpos para o vírus da Artrite Encefalite Caprina em caprinos. p. 6, 2006.

POLLIN, R. et al. Membrane and Inclusion Body Targeting of Lyssavirus Matrix Proteins. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 200–212, 2013.

PONTERIO, E. et al. Detection of serum antibodies to hepatitis E virus in domestic pigs in Italy using a recombinant swine HEV capsid protein. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 1, p. 133, 2014.

POSSEE, R. D. Baculoviruses as expression vectors. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, n. 5, p. 569–572, 1997.

PREHAUD, C. et al. Immunogenic and Protective Properties of Rabies Virus Glycoprotein Expressed by Baculovirus Vectors. **Virology**, v. 173, n. 2, p. 390–399, 1989.

- PROFFITT, A. **First HEV vaccine approved.** Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nbt0412-300a>>. Acesso em: 5 jul. 2018.
- PROTEIN SCIENCES CORPORATION. **Influenza Vaccine - Package Insert - BLA STN 125285,** 2018. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines/vaccines/approvedproducts/ucm336020.pdf>>. Acesso em: 13 jul. 2018.
- RADFORD, K. M.; REID, S.; GREENFIELD, P. F. Substrate Limitation in the Baculovirus Expression Vector System. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, n. 1, p. 32–44, 1997.
- RAGHUNANDAN, R. Virus-like Particles: Innate Immune Stimulators. **Expert Review of Vaccines**, v. 10, n. 4, p. 409–411, 2011.
- RAMYA, R. et al. Expression and Solubilization of Insect Cell-Based Rabies Virus Glycoprotein and Assessment of Its Immunogenicity and Protective Efficacy in Mice. **Clinical and vaccine immunology: CVI**, v. 18, n. 10, p. 1673–1679, 2011.
- RODRÍGUEZ-LIMAS, W. A. et al. Molecular and Process Design for Rotavirus-like Particle Production in *Saccharomyces Cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 10, p. 33, 2011.
- ROHRMANN, G. **Baculovirus Molecular Biology**. 3. ed. [s.l.: s.n.]v. 1
- ROHRMANN, G. F. Structural proteins of baculovirus occlusion bodies and virions. In: **Baculovirus Molecular Biology**. 3. ed. Estados Unidos: National Center for Biotechnology Information (US), 2013b. p. 1–68.
- ROLDÃO, A. et al. Intracellular dynamics in rotavirus-like particles production: Evaluation of multigene and monocistronic infection strategies. **Process Biochemistry**, From Biochemical Engineering to Systems Biology. v. 41, n. 10, p. 2188–2199, 2006.
- ROLDÃO, A. et al. Virus-like particles in vaccine development. **Expert Review of Vaccines**, v. 9, n. 10, p. 1149–1176, 2010.
- ROLDÃO, A. et al. Industrial Large Scale of Suspension Culture of Insect Cells. In: **Industrial Scale Suspension Culture of Living Cells**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2014. p. 348–389.
- ROSE, J. K.; WHITT, M. A. Rhabdoviridae: The Viruses and Their Replication. In: 4. ed. [s.l.: s.n.]
- RUPPRECHT, C. E.; HANLON, C. A.; HEMACHUDHA, T. Rabies Re-Examined. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 2, n. 6, p. 327–343, 2002.
- SAKAMOTO, S. et al. Studies on the Structures and Antigenic Properties of Rabies Virus Glycoprotein Analogues Produced in Yeast Cells. **Vaccine**, v. 17, n. 3, p. 205–218, 21 jan. 1999.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition**. 3rd edition ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SANTOS, N. G. L. et al. Impact of Recombinant *Drosophila* S2 Cell Population Enrichment on Expression of Rabies Virus Glycoprotein. **Cytotechnology**, v. 68, n. 6, p. 2605–2611, 2016a.

- SANTOS, N. G. L. et al. Impact of Recombinant *Drosophila* S2 Cell Population Enrichment on Expression of Rabies Virus Glycoprotein. **Cytotechnology**, v. 68, n. 6, p. 2605–2611, 2016b.
- SARI, D. et al. The MultiBac Baculovirus/Insect Cell Expression Vector System for Producing Complex Protein Biologics. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 896, p. 199–215, 2016.
- SCHNEIDER, M. C. et al. Rabies Transmitted by Vampire Bats to Humans: An Emerging Zoonotic Disease in Latin America? **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 25, p. 260–269, 2009.
- SEIF, I. et al. Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. **Journal of Virology**, v. 53, n. 3, p. 926–934, 1985.
- SEQUEIRA, D. P. et al. Combining stable insect cell lines with baculovirus-mediated expression for multi-HA influenza VLP production. **Vaccine**, Vaccine Technology VI. v. 36, n. 22, p. 3112–3123, 2018.
- SHAKIN-ESHLEMAN, S. H.; WUNNER, W. H.; SPITALNIK, S. L. Efficiency of N-Linked Core Glycosylation at Asparagine-319 of Rabies Virus Glycoprotein Is Altered by Deletions C-Terminal to the Glycosylation Sequon. **Biochemistry**, v. 32, n. 36, p. 9465–9472, 1993.
- SINGH, R. et al. RABIES, A VACCINE PREVENTABLE DISEASE: CURRENT STATUS, EPIDEMIOLOGY, PATHOGENESIS, PREVENTION AND CONTROL WITH SPECIAL REFERENCE TO INDIA. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, v. 6, n. 1, p. 62–86, 2018.
- SMITH, G. E. et al. Neuraminidase-based recombinant virus-like particles protect against lethal avian influenza A(H5N1) virus infection in ferrets. **Virology**, v. 509, p. 90–97, 2017.
- SODRÉ, M. M.; GAMA, A. R. da; ALMEIDA, M. F. de. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 2, p. 75–81, 2010.
- SOULIÉ, J. C. et al. Immunogenicity and Safety in Newborns of a New Recombinant Hepatitis B Vaccine Containing the S and Pre-S2 Antigens. **Vaccine**, v. 9, n. 8, p. 545–548, 1991.
- SUN, Y. et al. Protection against lethal challenge by Ebola virus-like particles produced in insect cells. **Virology**, v. 383, n. 1, p. 12–21, 2009.
- TAKEDA. **Serologic Assay Validation, Proficiency Testing, Safety and Immunogenicity of Norovirus GI.1/GII.4 Bivalent Virus-Like Particle Vaccine**. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02475278>>. Acesso em: 5 jul. 2018.
- TAO, P. et al. Virus-Like Particle Vaccine Comprised of the HA, NA, and M1 Proteins of an Avian Isolated H5N1 Influenza Virus Induces Protective Immunity Against Homologous and Heterologous Strains in Mice. **Viral Immunology**, v. 22, n. 4, p. 273–281, 2009.
- THOMPSON, C. M. **DEVELOPMENT OF A PRODUCTION PROCESS FOR A VIRUS LIKE PARTICLE BASED VACCINE IN CELL CULTURE**. 2013. UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL, Montreal, 2013. . Acesso em: 17 ago. 2016.

- THOMPSON, C. M. et al. Critical assessment of influenza VLP production in Sf9 and HEK293 expression systems. **BMC Biotechnology**, v. 15, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4432999/>>. Acesso em: 21 maio. 2019.
- THOMSEN, D. R.; MEYER, A. L.; POST, L. E. Expression of feline leukaemia virus gp85 and gag proteins and assembly into virus-like particles using the baculovirus expression vector system. **Journal of General Virology**, v. 73, n. 7, p. 1819–1824, 1992.
- TORDO, N. et al. Walking along the Rabies Genome: Is the Large G-L Intergenic Region a Remnant Gene? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 11, p. 3914–3918, 1986.
- TUCHIYA, K. et al. Characterization of Rabies Virus Glycoprotein Expressed by Recombinant Baculovirus. **Virus Research**, v. 25, n. 1–2, p. 1–13, 1992.
- ÜSTÜN-AYTEKIN, Ö. et al. Monitoring of the effects of transfection with baculovirus on Sf9 cell line and expression of human dipeptidyl peptidase IV. **Cytotechnology**, v. 66, n. 1, p. 159–168, 2014.
- VAN OERS, M. M. Vaccines for Viral and Parasitic Diseases Produced with Baculovirus Vectors. **Advances in Virus Research**, v. 68, p. 193–253, 2006.
- VAN OERS, M. M. et al. Active DNA Photolyase Encoded by a Baculovirus from the Insect *Chrysodeixis Chalcites*. **DNA repair**, v. 7, n. 8, p. 1309–1318, 2008.
- VAN OERS, M. M. Opportunities and Challenges for the Baculovirus Expression System. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 107 Suppl, p. S3-15, 2011.
- VAN OERS, M. M.; PIJLMAN, G. P.; VLAK, J. M. Thirty Years of Baculovirus-Insect Cell Protein Expression: From Dark Horse to Mainstream Technology. **The Journal of General Virology**, v. 96, n. Pt 1, p. 6–23, 2015.
- VELEZ, R. A. et al. Expression of Chikungunya Virus-like Particles. **Microscopy and Microanalysis**, v. 18, n. S5, p. 59–60, 2012.
- VENTINI, D. C. et al. Recombinant Rabies Virus Glycoprotein Synthesis in Bioreactor by Transfected *Drosophila Melanogaster* S2 Cells Carrying a Constitutive or an Inducible Promoter. **Journal of Biotechnology**, v. 146, n. 4, p. 169–172, 2010.
- VICENTE, T. et al. Large-Scale Production and Purification of VLP-Based Vaccines. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 107 Suppl, p. S42-48, 2011a.
- VICENTE, T. et al. Rational Design and Optimization of Downstream Processes of Virus Particles for Biopharmaceutical Applications: Current Advances. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 869–878, 2011b.
- WADA, M. Y.; ROCHA, S. M.; MAIA-ELKHOURY, A. N. S. Situação da Raiva no Brasil, 2000 a 2009. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 4, p. 509–518, 2011.
- WAGNER, R. R.; ROSE, J. K. **Rhabdoviridae: the viruses and their replication**. 3. ed. Lippincott-Raven, New York: B. N. Fields and D. M. Knipe, Fields Virology, 1996. v. 1
- WANG, S.; BALASUNDARAM, G. Potential Cancer Gene Therapy by Baculoviral Transduction. **Current Gene Therapy**, v. 10, n. 3, p. 214–225, 2010.

WARFIELD, K. L.; AMAN, M. J. Advances in Virus-like Particle Vaccines for Filoviruses. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 204 Suppl 3, p. S1053-1059, nov. 2011.

WEYER, J. et al. A case of human survival of rabies, South Africa. **Southern African Journal of Infectious Diseases**, v. 31, n. 2, p. 66–68, 2016.

WHO. **Rabies\_slides\_Aug\_2010.pdf**. Disponível em: <[http://www.who.int/immunization/Rabies\\_slides\\_Aug\\_2010.pdf](http://www.who.int/immunization/Rabies_slides_Aug_2010.pdf)>. Acesso em: 18 maio. 2018.

WHO. **Global\_distribution\_risk\_humans\_contracting\_rabies\_2013.png (3504×2476)**. Disponível em: <[http://www.who.int/rabies/Global\\_distribution\\_risk\\_humans\\_contracting\\_rabies\\_2013.png?ua=1](http://www.who.int/rabies/Global_distribution_risk_humans_contracting_rabies_2013.png?ua=1)>. Acesso em: 18 maio. 2018.

WHO. **Malaria**. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/media/rtss-phase-3-trial-qa/en/>>. Acesso em: 22 ago. 2018.

WHO. **Rabies**. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rabies>>. Acesso em: 7 ago. 2018a.

WHO. **WHO Expert Consultation on Rabies**. 3. ed. Geneva: Who Technical Report Serie, 2018b. v. 1

WOJCZYK, B. S. et al. N-Glycosylation at One Rabies Virus Glycoprotein Sequon Influences N-Glycan Processing at a Distant Sequon on the Same Molecule. **Glycobiology**, v. 15, n. 6, p. 655–666, 2005.

WONG, K. T. et al. Low Multiplicity Infection of Insect Cells with a Recombinant Baculovirus: The Cell Yield Concept. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, n. 6, p. 659–666, 1996.

WUNNER, W. H. et al. Antigenic Variants of CVS Rabies Virus with Altered Glycosylation Sites. **Virology**, v. 140, n. 1, p. 1–12, 1985.

YAMADA, A. et al. A Comparative Review of Prevention of Rabies Incursion between Japan and Other Rabies-Free Countries or Regions. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, 2018. Disponível em: <[https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/advpub/0/advpub\\_JJID.2018.431/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/advpub/0/advpub_JJID.2018.431/_article)>. Acesso em: 8 mar. 2019.

YAMAJI, H. et al. Efficient Production of Japanese Encephalitis Virus-like Particles by Recombinant Lepidopteran Insect Cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 1071–1079, 2013.

YAMAJI, H. Suitability and Perspectives on Using Recombinant Insect Cells for the Production of Virus-like Particles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 5, p. 1963–1970, 2014.

YELVERTON, E. et al. Rabies Virus Glycoprotein Analogs: Biosynthesis in Escherichia Coli. **Science (New York, N.Y.)**, v. 219, n. 4585, p. 614–620, 1983.

YOKOMIZO, A. Y. et al. Rabies Virus Glycoprotein Expression in Drosophila S2 Cells. I. Functional Recombinant Protein in Stable Co-Transfected Cell Line. **Biotechnology Journal**, v. 2, n. 1, p. 102–109, 2007a.

- YOKOMIZO, A. Y. et al. Rabies Virus Glycoprotein Expression in Drosophila S2 Cells. I. Functional Recombinant Protein in Stable Co-Transfected Cell Line. **Biotechnology Journal**, v. 2, n. 1, p. 102–109, 2007b.
- YOUNG, K. R. et al. Virus-like particles: Designing an effective AIDS vaccine. **Methods, Particle-based Vaccines**. v. 40, n. 1, p. 98–117, 2006.
- ZAN, J. et al. Rabies virus inactivates cofilin to facilitate viral budding and release. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 477, n. 4, p. 1045–1050, 2016.
- ZELTINS, A. Construction and Characterization of Virus-like Particles: A Review. **Molecular Biotechnology**, v. 53, n. 1, p. 92–107, 2013.
- ZHANG, Y.-H.; MERCHUK, J. C. A Mathematical Model of Baculovirus Infection on Insect Cells at Low Multiplicity of Infection. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, v. 36, n. 11, p. 729–740, 2004.

## Apêndice A – Sequenciamento do gene da proteína RVM no vetor pFastBac

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                4060      4070      4080      4090      4100
RVM      --GSGKGGSS SSGGWWWCS GGTTSAMAW TAGCGGGCCG CACTGCTAGC
pFast-RVM TCGAGCATTG TAGAGGATCC G--TCGACA- TAGCGG-CCG CACTGCTAGC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                4110      4120      4130      4140      4150
RVM      ATGAACTTCC TGAGAAAAAT CGTCAAGAAC TGCAGAGACG AAGACACGCA
pFast-RVM ATGAACTTCC TGAGAAAAAT CGTCAAGAAC TGCAGAGACG AAGACACGCA

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                4160      4170      4180      4190      4200
RVM      GAAGCCCTCT CCCGTTAGTG CACCTCTTGA CGACGACGAT CTTTGGTTGC
pFast-RVM GAAGCCCTCT CCCGTTAGTG CACCTCTTGA CGACGACGAT CTTTGGTTGC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                4210      4220      4230      4240      4250
RVM      CCCCTCCCGA GTATGTGCCT CTCAAAGAGC TCACGAGCAA GAAGAACCCT
pFast-RVM CCCCTCCCGA GTATGTGCCT CTCAAAGAGC TCACGAGCAA GAAGAACCCT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                4260      4270      4280      4290      4300
RVM      CGCAACTTCT GCATAAACGG AGGTGTTAAA GTGTGCTCCC CAAACGGATA
pFast-RVM CGCAACTTCT GCATAAACGG AGGTGTTAAA GTGTGCTCCC CAAACGGATA

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                4310      4320      4330      4340      4350
RVM      CAGCTTCGGC ATCCTCCGCC ACATCCTCCG CAGCTTCGAC GAGATCTATT
pFast-RVM CAGCTTCGGC ATCCTCCGCC ACATCCTCCG CAGCTTCGAC GAGATCTATT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                4360      4370      4380      4390      4400
RVM      CCGGTAACCA CCGTATGGTA GGCTTGGTCA AGGTCGTGAT CGGCTTGGCA
pFast-RVM CCGGTAACCA CCGTATGGTA GGCTTGGTCA AGGTCGTGAT CGGCTTGGCA

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                4410      4420      4430      4440      4450
RVM      CTTTCTGGTG CGCCCGTACC CGAGGGCATG AACTGGGTGT ACAAGCTGAG
pFast-RVM CTTTCTGGTG CGCCCGTACC CGAGGGCATG AACTGGGTGT ACAAGCTGAG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                4460      4470      4480      4490      4500
RVM      GCGTACATTG ATTTTCCAGT GGGCGGATTC TCGTGGTCCC TTGGAGGGTG
pFast-RVM GCGTACATTG ATTTTCCAGT GGGCGGATTC TCGTGGTCCC TTGGAGGGTG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                4510      4520      4530      4540      4550
RVM      AAGAGCTGGA GTACTCTCAG GAGATCACAT GGGACGATAA CACAGAGTTC
pFast-RVM AAGAGCTGGA GTACTCTCAG GAGATCACAT GGGACGATAA CACAGAGTTC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                4560      4570      4580      4590      4600
RVM      GTGGGACTCC AAATTAGAGT AAGCGCCAAG CAGTGCCATA TTAGAGGTCC
pFast-RVM GTGGGACTCC AAATTAGAGT AAGCGCCAAG CAGTGCCATA TTAGAGGTCC

```



## APÊNDICES

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          4610          4620          4630          4640          4650
RVM      CATCTGGTGC ATCAACATGA ACTCAAGAGC AGGACAGCTT TGGAGCGACA
pFast-RVM CATCTGGTGC ATCAACATGA ACTCAAGAGC AGGACAGCTT TGGAGCGACA

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          4660          4670          4680          4690          4700
RVM      TGTCACTGCA GACACAGAGA TCTGAGGAAG ACAAAGACAG CTCATTGCTG
pFast-RVM TGTCACTGCA GACACAGAGA TCTGAGGAAG ACAAAGACAG CTCATTGCTG

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          4710          4720          4730          4740          4750
RVM      CTGGAATAAG AATTCAATAA -----
pFast-RVM CTGGAATAAG AATTCAATAA GCTTATAGGT ACCCTGCAGT TCTCTCGGAG

```

## APÊNDICES

## Apêndice B – Sequenciamento do gene da proteína RVGP no vetor pFastBac

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                4010      4020      4030      4040      4050
RVGP          -----CSGGKS SSSSGGAWT CGGTCCGAAG
pFast-RVGP  GGATTATTCA TACCGTCCCA CCATCGGGCG C---GGATCC CGGTCCGAAG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                4060      4070      4080      4090      4100
RVGP          CGCGCGGAAT TCGAGCTCGG TACCCTTCTA GAGCCACCAT GGTTCCTCAG
pFast-RVGP  CGCGCGGAAT TCGAGCTCGG TACCCTTCTA GAGCCACCAT GGTTCCTCAG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                4110      4120      4130      4140      4150
RVGP          GCTCTCCTGT TTGTACCCCT TCTGGTTTTT CCATTGTGTT TTGGGAAATT
pFast-RVGP  GCTCTCCTGT TTGTACCCCT TCTGGTTTTT CCATTGTGTT TTGGGAAATT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                4160      4170      4180      4190      4200
RVGP          CCCTATTTAC ACGATACCAG ACAAGCTTGG TCCCTGGAGC CCGATTGACA
pFast-RVGP  CCCTATTTAC ACGATACCAG ACAAGCTTGG TCCCTGGAGC CCGATTGACA

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                4210      4220      4230      4240      4250
RVGP          TACATCACCT CAGCTGCCCA AACAAATTTGG TAGTGGAGGA CGAAGGATGC
pFast-RVGP  TACATCACCT CAGCTGCCCA AACAAATTTGG TAGTGGAGGA CGAAGGATGC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                4260      4270      4280      4290      4300
RVGP          ACCAACCTGT CAGGGTTCTC CTACATGGAA CTTAAAGTTG GATACATCTC
pFast-RVGP  ACCAACCTGT CAGGGTTCTC CTACATGGAA CTTAAAGTTG GATACATCTC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                4310      4320      4330      4340      4350
RVGP          AGCCATAAAA ATGAACGGGT TCACTTGCAC AGGCGTTGTG ACGGAGGCTG
pFast-RVGP  AGCCATAAAA ATGAACGGGT TCACTTGCAC AGGCGTTGTG ACGGAGGCTG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                4360      4370      4380      4390      4400
RVGP          AAACCTACAC TAACTTCGTT GGTATGTCA CAACCACGTT CAAAAGAAAG
pFast-RVGP  AAACCTACAC TAACTTCGTT GGTATGTCA CAACCACGTT CAAAAGAAAG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                4410      4420      4430      4440      4450
RVGP          CATTTCCGCC CAACACCAGA TGCATGTAGA GCCGCGTACA ACTGGAAGAT
pFast-RVGP  CATTTCCGCC CAACACCAGA TGCATGTAGA GCCGCGTACA ACTGGAAGAT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                4460      4470      4480      4490      4500
RVGP          GGCCGGTGAC CCCAGATATG AAGAGTCTCT ACACAATCCG TACCCTGACT
pFast-RVGP  GGCCGGTGAC CCCAGATATG AAGAGTCTCT ACACAATCCG TACCCTGACT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                4510      4520      4530      4540      4550
RVGP          ACCACTGGCT TCGAACTGTA AAAACCACCA AGGAGTCTCT CGTTATCATA
pFast-RVGP  ACCACTGGCT TCGAACTGTA AAAACCACCA AGGAGTCTCT CGTTATCATA

```

## APÊNDICES

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          4560          4570          4580          4590          4600
RVGP      TCTCCAAGTG TGGCAGATTT GGACCCATAT GACAGATCCC TTCACTCGAG
pFast-RVGP TCTCCAAGTG TGGCAGATTT GGACCCATAT GACAGATCCC TTCACTCGAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          4610          4620          4630          4640          4650
RVGP      GGTCTTCCCT GGCGGGAAGT GCTCAGGAGT AGCGGTGTCT TCTACCTACT
pFast-RVGP GGTCTTCCCT GGCGGGAAGT GCTCAGGAGT AGCGGTGTCT TCTACCTACT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          4660          4670          4680          4690          4700
RVGP      GCTCCACTAA CCACGATTAC ACCATTTGGA TGCCCGAGAA TCCGAGACTA
pFast-RVGP GCTCCACTAA CCACGATTAC ACCATTTGGA TGCCCGAGAA TCCGAGACTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          4710          4720          4730          4740          4750
RVGP      GGGATGTCTT GTGACATTTT TACCAATAGT AGAGGGAAGA GAGCATCCAA
pFast-RVGP GGGATGTCTT GTGACATTTT TACCAATAGT AGAGGGAAGA GAGCATCCAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          4760          4770          4780          4790          4800
RVGP      AGGGAGTGAG ACTTGCGGCT TTGTAGATGA AAGAGGCCTA TATAAGTCTT
pFast-RVGP AGGGAGTGAG ACTTGCGGCT TTGTAGATGA AAGAGGCCTA TATAAGTCTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          4810          4820          4830          4840          4850
RVGP      TAAAAGGAGC ATGCAAATC CAGTTATGTG GAGTTCTCGG ACTTAGACTT
pFast-RVGP TAAAAGGAGC ATGCAAATC CAGTTATGTG GAGTTCTCGG ACTTAGACTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          4860          4870          4880          4890          4900
RVGP      ATGGATGGAA CATGGGGTCT CGATGCAAAC ATCAAATGAA ACCAAATGGT
pFast-RVGP ATGGATGGAA CATGGG-TCT CGATGCAAAC ATCAAATGAA ACCAAATGGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          4910          4920          4930          4940          4950
RVGP      GCCCTTCCCG GTCAGATGAT CAAGTTTTGC ACGAACATTT TTCG-----
pFast-RVGP GCCCT-CCCG GTCAGTTGAT CAA--TTTGC ACGA-C---T TTCGCTCAGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          5210          5220          5230          5240          5250
RVGP      -----CGAA TTAGCAGTAA -ACCT--CTA
pFast-RVGP TCATGTAAAC GGGGTATTTT TCAATG-GTA TAAT-ATTAG GACCTGACGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          5260          5270          5280          5290          5300
RVGP      CAATGTGGTA -TGGCTGATT ATG-----AT CC----TCTA GTA-CTTCTC
pFast-RVGP CAATGTCTTA ATCCAGAG- ATGCAATCAT CCCTCCTCCA GCAACATATG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          5310          5320          5330          5340          5350
RVGP      GACAAGCTTG GTACCGCATG CCTCGAGACT GCAGGCTCTA GATTCGAAAG
pFast-RVGP GAGTTG-TTG GTA-----T- CCTCGGTTAT CC---CCCTT -ATGCACCCC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          5360          5370          5380          5390          5400
RVGP      C-GGCCGCC C-TCGGTACC CATT-CTAGA TCACAGTCCG GTCTCACCCC
pFast-RVGP CTGGCAGACC CGTC--TACC GTTTTCAAGA ACGGTGACGA GGCTGAG---
```

## APÊNDICES

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                5410      5420      5430      5440      5450
RVGP          CGCTCTTGTA TGA--TTC-C CATGAAGATA TGATCTTCCC GCTTTGGGGA
pFast-RVGP   -GATTTTGT- TGAAGTTCAC CTTCCCGATG TGCACGAACG GATCTCAGGA

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                5460      5470      5480      5490      5500
RVGP          GT-GACTGAC ACCTCCCTCC CTGTCCCTCT GAGATTGTGT T---GKGT--
pFast-RVGP   GTTGACTIONG GTCTCCCGAA CTGGGGGA-- -AGTATGTAT TACTGAGTGC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                5510      5520      5530      5540      5550
RVGP          AGGTTCC--G A-----TCGA T--TGACTCT TCTCCAGCAT GTCAT-CAGG
pFast-RVGP   AGGGGCCCTG ACTGCCTTGA TGTTGATAAT TTTCCCTG-AT GACATGCTGG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                5560      5570      5580      5590      5600
RVGP          AAAATTATCA ACATCAAGGC AGTCAGGGCC CCTGCACTCA GTAATACATA
pFast-RVGP   AGAAGAGTCA A--TC---G- A-TC--GGAA CCTACAC--- --AACACAAT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                5610      5620      5630      5640      5650
RVGP          CTTCCCC--- CAGTTCGGGA GACCCAAGTC AACTCCTGAG ATCCGTTTCGT
pFast-RVGP   CTCAGAGGGA CAGGGAGGGA GGTGTCAGTC A-CTCCCCAA AGCGGGAAGA

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                5660      5670      5680      5690      5700
RVGP          GCACATCGGG AAGGTGAACT TCWACAAAAT CC----TCAG CCTCRTCACC
pFast-RVGP   TCATATCTTC ATGG-GAA-T CATAAAGAG CGGGGGTGAG AC-CGG-ACT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                5710      5720      5730      5740      5750
RVGP          GTGATCTTGA AAACGGTA-- GACGGGTCTG CCAGGGGGTG CATA-AGGG-
pFast-RVGP   GTGATCTAGA ATG-GGTACC GAGGGG-CGG CC-GCTTTCG AATCTAGAGC

```

## Apêndice C – Artigo Publicado

**Artigo 1** - LEMOS, M. A. N.; PATIÑO, S. F. S.; BERNARDINO, T. C.; COROADINHA, A. S.; SOARES, H.; ASTRAY, R. M.; PEREIRA, C. A.; JORGE, S. A. C. Intracellular Delivery of HCV NS3p gene using vectored particles. *Journal of Biotechnology*, v. 274, p. 33–39, 2018.



## Intracellular Delivery of HCV NS3p gene using vectored particles

Marcos Alexandre Nobre Lemos<sup>a,1</sup>, Sandra Fernanda Suarez Patiño<sup>a,1</sup>,  
Thaissa Consoni Bernardino<sup>a</sup>, Ana Sofia Coroadinha<sup>b</sup>, Hugo Soares<sup>b</sup>, Renato Mancini Astray<sup>a</sup>,  
Carlos Augusto Pereira<sup>a</sup>, Soraia Attie Calil Jorge<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Butantan, Avenida Vital Brasil, 1500, São Paulo, Brasil

<sup>b</sup> Cell Line Development and Molecular Biotechnology Laboratory, IBET - Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Av. República, Qu. do Marquês, Oeiras Portugal

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Hepatitis C  
qPCR titration  
Transfection  
Electroporation of HEK-293T cells  
Vectored particles (VP)

### ABSTRACT

Viral hepatitis caused by the hepatitis C virus (HCV) affects millions of people worldwide. The non-structural protein 3 (NS3), one of the most conserved proteins in HCV, is the target of many therapeutic studies. The NS3 protease domain (NS3p) has a range of cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitopes, and synthesizing the protein inside the cells is the most appropriate way to present it to the immune system. We developed a tool to study this kind of presentation, using two vectored particle (VP) systems, one based on the Semliki Forest virus (SFV) and the other on HCV pseudoparticles (HCVpp), both carrying the protease domain of the NS3 gene. In addition to producing the particles, we developed a method to quantify these VPs using qRT-PCR. We produced batches of approximately  $2.4 \times 10^6$  SFV-NS3p/μL and  $4.0 \times 10^2$  HCVpp-NS3p/μL. Huh-21 and Huh-7 cells treated with the VPs expressed the NS3 protein, thus showing the functionality of this system.

### 1. Introduction

Around 170 million people worldwide are currently infected with the human hepatitis C virus (HCV), and approximately 60% of HCV-infected people will develop chronic hepatitis C (CHC) and eventually liver cirrhosis, making CHC a global health concern (Alter and Seeff, 2000; Pearlman, 2004; World Health Organization, 2013; Chou et al., 2012, 2013; Mehta et al., 2013).

The hepatitis C virus is a member of the *Hepacivirus* genus (Flaviviridae family), measuring between 55 and 65 nm in diameter (Kaito et al., 1994; Lindenbach and Rice, 2001; Shukla et al., 1995). HCV is formed by a lipid envelope containing the viral glycoproteins E1 and E2, a core, and the viral genome (linear + sRNA) (Imbert et al., 2004; Lindenbach and Rice, 2001). The viral RNA consists of approximately 9400 nucleotides, with a single open reading frame encoding a polyprotein approximately 3000 amino acids long that is cleaved by cellular and viral proteases, generating three structural proteins (Core, E1, and E2) and seven non-structural proteins (p7, NS2, NS3, NS4A, NS5A, and NS5B) (Chou et al., 2013; Di Lorenzo et al., 2011; Lindenbach and Rice, 2001; Mancini et al., 2009; Mello et al., 2009).

Knowledge of the pathophysiology of hepatitis C, as well as the improvement of diagnostic procedures, therapy, and prevention, has enabled considerable advances in the quality of life of patients with

HCV-related liver disease (Rasi, 2015). In the last decade, treatment using a combination of pegylated interferon (PegIFNα) and ribavirin has been considered the care standard (SOC) in CHC. This standard protocol enables a sustained viral response (SVR) in infected HCV genotype 1, 2, and 3 patients (Alexopoulou and Papatheodoridis, 2012). The SVR is mainly characterized by a cellular immune response with endogenous interferon production (Abbas and Lichtman, 2007). In 2011, two direct-acting antivirals (DAAs), telaprevir and boceprevir (HCV NS3-4A serine protease inhibitors) were licensed for use in combination with PegIFNα and ribavirin in patients infected with HCV-1. Moreover, novel HCV DAAs have recently been licensed and other DAAs are in development (Pawlotsky et al., 2015). However, these very expensive treatments have many side effects and do not ensure a sustainable immune response. Unfortunately, there is still no effective vaccine against HCV.

Several studies of different viral diseases have developed virus-like particles (VLPs) to stimulate cells in order to achieve diverse goals, including triggering immune responses (Ashfaq et al., 2011; Baumert et al., 1998; Benmaamar et al., 2009; Berger et al., 2009; Brinster et al., 2002; Deest et al., 2013; Hourieux et al., 2007; Liljestrom and Garoff, 1991; Wen et al., 2013). VLPs against HCV have been employed to improve the host immune response (Deng et al., 2013; Bellier and Klatzmann, 2013) in strategies to deliver the full NS3 gene. Therefore,

\* Corresponding author at: Instituto Butantan, Laboratório de Imunologia Viral, Av. Vital Brasil, 1500, São Paulo CEP 05503-900, Brasil.

Email address: soraia.jorge@butantan.gov.br (S.A.C. Jorge).

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work.

## Apêndice D – Artigo Publicado

**Artigo 2:** BERNARDINO, T. C.; ASTRAY, R. M.; PEREIRA, C. A.; JORGE, S. A. C. Production of Rabies Virus-like Particles in Insect Cells. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 73, p. 380, 2018.

380

Abstracts / *International Journal of Infectious Diseases* 735 (2018) 3–398

**Conclusion:** Sofosbuvir has been operative and efficacious with attainment of virological response with no resistance in genotype 3. The reason for relapse cases may be the presence of quasi species, which could be further verified by sequencing the relapse cases. The promising outcome of dual antiviral therapy may eradicate HCV. Subjects will be monitored additionally for investigation of relapse cases. Keeping all the investigative parameters inline and moving forward with appropriate option of antiviral therapy (dual/triple) eradication of HCV could be accomplished.

<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.04.4272>

UMP. 794

#### Estimating the burden of disease and the economic cost attributable to Zika, Colombia, 2016

M. Hurtado, N. Collazos-Zapata<sup>a</sup>, A.F. Martínez-Hurtado, C. Cortes-Tabares, D.A. Gualteros-Restrepo, M. Ramírez-Echeverri, J.A. Cardona-Ospina, A.J. Rodríguez-Morales

Public Health and Infection Research Group, Faculty of Health Sciences, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Risaralda, Colombia

**Background:** Zika virus (ZIKV) disease have emerged in the Americas causing significant morbidity in 48 countries. In addition, it is expected to be a considerable cause of disability and economic burden especially in the region developing countries, given its subacute and chronic sequelae, particularly its Guillain-Barre syndrome and the Congenital Zika Syndrome (CZS, including microcephaly). In this setting, there is a lack of studies assessing ZIKV burden and costs in Latin America.

**Methods & Materials:** We estimated incidence rates for ZIKV during the 2016 outbreak in Colombia using surveillance epidemiological data provided by the Colombian National Institute of Health (that include RT-PCR diagnosed cases), as well using demographic data from the National Administrative Department of Statistics (DANE) (calculated as cases/100,000 pop). The burden of disease was estimated through Disability Adjusted Life Years (DALYs) lost (according 2004 WHO methodology) and the costs (direct and indirect) were estimated based on the national recommendations for ZIKV acute and chronic phase attention.

**Results:** There was a total of 106,659 cases (9.2% confirmed by RT-PCR), with incidence rates ranging from 0 to 1,490.3 cases/100,000 population (San Andres islands) in different departments. All departments were affected. An estimate was made of total DALYs of 6.44 years lost/100,000 population (lower limit of the 95%CI). The 2016 outbreak estimated costs were at least US\$ 23.9 million (COP\$ 71,914,802,929) (currency exchange for Dec. 31, 2016) (lower limit of the 95%CI), which were 67.2% due to diagnosis and management of suspected and confirmed cases of CZS.

**Conclusion:** Our estimates raise concerns about the effects of continued ZIKV spread in Colombia and other Latin-American countries. The lack of effective transmission control for this disease and potential for spread means that there will be significant acute and chronic disability and related costs in the short and long term for Latin American health care systems. In addition is important to mention that in 2017 ZIKV is still transmitted with 1,746 cases up to October 21 (231 among pregnant women).

<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.04.4273>

UMP. 795

#### Production of rabies virus-like particles in insect cells

T.C. Bernardino<sup>a</sup>, R.M. Astray, C.A. Pereira, S.A.C. Jorge

Instituto Butantan, Laboratório de Imunologia Viral, São Paulo, Brazil

**Background:** Rabies is a zoonotic disease responsible for more than 60,000 human deaths annually. The main method to prevent the rabies is the vaccination. The virus encodes 5 proteins: nucleoprotein (N), phosphoprotein (P), matrix protein (RVM), glycoprotein (RVGP) and polymerase (L). The RVGP is the only protein exposed on the virus surface and it is able to induce neutralizing antibodies that make it interesting to be expressed in many systems. It's assumed that the RVM constitutes major structural components of the rabies virus, and it has an important role in virus assembly and budding. Different vaccines proposals have been studied in order to establish an immune response mediated by neutralizing antibodies more effective and improve the level of cellular immune response, among them, the use of virus-like particles (VLPs). Therefore, the production of rabies VLPs would be system safer and cheaper vaccine candidates. Our interesting is to produce recombinant baculovirus bearing RVM and RVGP and to produce rabies VLPs.

**Methods & Materials:** The gene encoding RVM protein was cloned in the pFastBac1, and the product was transformed into DH5 $\alpha$ , for further processing in DH10 Bac. The same process was performed to the RVGP. Sf9 cells were transfected with 1  $\mu$ g recombinant bacmid. The baculovirus recombinant, the matrix gene (BVM) or the RVGP gene (BVRVGP), were collected 96 h post transfection (Lot 1). The supernatant (L1) was used to infect Sf9 cells to produce L2 and, consequently, L3. The batches are titration using Sf9 Easy Titer cells. Sf9 cells infected with BVM or BVG or coinfect showed typical cytopathic effects. After 96 h post infection the supernatant and cells were collected and analyzed by western blotting.

**Results:** In our studies, rabies VLPs including G and M protein were constructed and the BVM and the BVRVGP are able to express the proteins in their conformational structure. The coinfection showed that the RVM and the RVGP were expressed and found in the supernatant cell culture.

**Conclusion:** It's our expectancy that this assay produce VLP with RVGP in its native form and its be able to produce neutralizing antibodies.

<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.04.4274>

UMP. 796

#### Antiviral activity of Tripartite-Motif 2 protein against New World Arenaviruses

N. Sarute<sup>1,\*</sup>, B. Medegan Fagla<sup>2</sup>, N. Ibrahim<sup>3</sup>, M. Lavanya<sup>3</sup>, S. Ross<sup>2</sup>

<sup>1</sup> University of Illinois at Chicago, Microbiology, Chicago, IL, United States

<sup>2</sup> University of Illinois at Chicago, Microbiology, Chicago, United States

<sup>3</sup> University of Pennsylvania, Microbiology, Philadelphia, United States

**Background:** New World Arenaviruses (NWA) are single-stranded bisegmented RNA viruses that cause viral hemorrhagic fevers in humans. NWAs are endemic in New World rodents and

## Apêndice E – Artigo Publicado

**Artigo 3** - SUÁREZ-PATIÑO, S. F. et al. Semliki Forest Virus Replicon Particles Production in Serum-Free Medium BHK-21 Cell Cultures and Their Use to Express Different Proteins. *Cytotechnology*, 2019.

Cytotechnology  
<https://doi.org/10.1007/s10616-019-00337-y>



ORIGINAL ARTICLE

## Semliki Forest Virus replicon particles production in serum-free medium BHK-21 cell cultures and their use to express different proteins

Sandra Fernanda Suárez-Patiño · Thaissa Consoni Bernardino · Eutímio Gustavo Fernández Núñez · Renato Mancini Astray · Carlos Augusto Pereira · Hugo R. Soares · Ana S. Coroadinha · Soraia Attie Calil Jorge

Received: 13 February 2019 / Accepted: 13 August 2019  
 © Springer Nature B.V. 2019

**Abstract** The production of biopharmaceuticals as vaccines in serum-free media results in reduced risk of contamination and simpler downstream processing. The production of enveloped viruses and viral vectors such as Semliki Forest Virus (SFV) typically requires lipids that are provided by supplementation with animal serum, so production under serum-free conditions is challenging. In this work, the capacity to deliver genetic material of SFV-viral replicon particles (SFV-VRPs) produced in BHK-21 cells adapted to serum-free medium (BHK/SFM) was evaluated. Three transgenes were evaluated: GFP used as a model

protein, while hepatitis C virus nonstructural protein 3 protease domain (HCV-NS3p) and rabies virus glycoprotein (RVGP) were selected based on their distinct nature (enzyme and glycoprotein, respectively). BHK/SFM cells produced a sevenfold higher number of SFV-VRPs, as determined by qRT-PCR. These particles showed similar capacities of infecting BHK/FBS or BHK/SFM cells. GFP expression was evaluated by flow cytometry, HCV-NS3p activity by enzymatic assay, and RVGP expression by ELISA and Western Blot. Expression analysis revealed higher levels of GFP and HCV-NS3p in BHK/SFM, while the levels of RVGP were similar for BHK/SFM and BHK/FBS. In conclusion, the BHK/SFM cells showed increased SFV-VRP production yields, without affecting vector infectivity or heterologous gene expression, hence validating the use of BHK/SFM for industrial applications.

Carlos Augusto Pereira—Died October 27th, 2017.

S. F. Suárez-Patiño · T. C. Bernardino · R. M. Astray · C. A. Pereira · S. A. C. Jorge (✉)  
 Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil 1500, São Paulo 05503-900, Brazil  
 e-mail: soraia.jorge@butantan.gov.br

E. G. F. Núñez  
 Grupo de Engenharia Bioquímica, Escola de Artes, Ciências e Humanidades (EACH), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

H. R. Soares · A. S. Coroadinha  
 iBET, Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Apartado 12, Oeiras, Portugal

H. R. Soares · A. S. Coroadinha  
 Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade Nova de Lisboa, Av. da República, Oeiras, Portugal

**Keywords** BHK-21 cells · Hepatitis C virus nonstructural protein 3 protease domain · Rabies virus glycoprotein · Serum-free medium · Semliki Forest Virus · Viral replicon particles

### Abbreviations

SFV-VRPs	Viral replicon particles of Semliki Forest Virus
BHK/FBS	BHK-21 cells grown in DMEM supplemented with 10% of fetal bovine serum

Published online: 17 August 2019

Springer

**Apêndice F** – Artigo Submetido

**Artigo 4** - Thaissa Consoni Bernardino, Sandra Fernanda Patiño Suarez, Carlos Augusto Pereira, Renato Mancini Astray, Ana Sofia Coroadinha, Hugo Soares, Soraia Attie Calil Jorge. Virus hybrid vectored particles carrying an RNA coding for rabies virus glycoprotein. **Molecular Biotechnology**.

1

Virus hybrid vectored particles carrying an RNA coding for rabies virus glycoprotein

**Thaissa Consoni Bernardino<sup>1</sup>, Sandra Fernanda Patiño Suarez<sup>1</sup>, Carlos Augusto Pereira<sup>1</sup>, Renato Mancini Astray<sup>1</sup>, Flávia Ferreira Barbosa<sup>1</sup>, Ana Sofia Coroadinha<sup>2</sup>; Hugo Soares<sup>2</sup>; Soraia Attie Calil Jorge<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Butantan, São Paulo-SP, Brazil

<sup>2</sup>Cell Line Development and Molecular Biotechnology Laboratory, Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Oeiras, Portugal

**\*Corresponding author at: Imunologia Viral, Instituto Butantan, Avenida Vital Brasil, 1500, 05503-900, Brasil, (5511) 26279622; Email address: soraia.jorge@butantan.gov.br (SAC Jorge)**

**Abstract**

The aim of this study was to establish a system for the production of virus hybrid vectored particles (VHVP) capable of carrying the RNA of the rabies virus glycoprotein (VHVP-RVGP). To produce VHVP-RVGP, HEK 293T cells were co-transfected with pCMV-Gag-Pol (from leukemia murine virus), pCMV-E1E2 (glycoproteins of hepatitis C virus), and pCMV-RVGP. VHVP-RVGP were collected 48 h post co-transfection, and titrated by quantitative RT-PCR (RTq-PCR). The RVGP expression was detected by ELISA in lysates of Huh-7 cells treated with VHVP-RVGP. RT-qPCR assays conducted to detect the cell attachment and entry of VHVP-RVGP showed that only a small part was able to enter Huh-7 cells, indicating a limitation in the transduction process. Western blotting assays showed that production