



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR**

**Expressão de antígenos virais
fusionados a uma proteína formadora
de corpos de oclusão de um vírus de
inseto**

Leonardo Assis da Silva

Orientador: Bergmann Morais Ribeiro

Brasília, 2016



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR**

Expressão de antígenos virais fusionados a uma proteína formadora de corpos de oclusão de um vírus de inseto

Leonardo Assis da Silva

Orientador: Bergmann Morais Ribeiro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular - Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular.

Brasília, 2016

“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente de qualquer jeito”.

[Martin Luther King](#)

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo”.

[Martin Luther King](#)

“If you can dream it, you can do it”.

“Follow your dreams, work hard, practice and persevere”.

A minha família
A minha amiga e namorada Brenda R. de Camargo
Aos meus sogros
Ao professor Bergmann M. Ribeiro
A minha vontade de vencer e superar as dificuldades da vida, com muita
alegria de perseverança.
Dedico

Agradeço a minha família, minha fantástica família (minha irmã, Luciana; meus irmãos, Dê e Moca; minha mãe, Vera e meu pai Zé) por todo apoio nessa grande caminhada. Vocês sabem o quanto foi difícil esta busca! As minhas avós que moldaram meu caráter, exemplos de mulher (Tereza e Inácia, *in memoriam*)

A minha namorada, Brenda Rabello de Camargo, pela amizade, companheirismo, parceria, por me ensinar muitas coisas a cada dia, por me apoiar e e respeitar minhas decisões, obrigado por estar ao meu lado, sou muito feliz ao seu lado, te amo!

Agradeço ao meu professor e orientador, em quem me espelho e respeito como homem e profissional, prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro. Homem íntegro, ético, profissional, de índole inquestionável e sábio. É bom poder contar com o senhor sempre; com sua confiança e torcida. Espero nunca o decepcionar!

A minha segunda família, fantástica como a biológica (minha mãe-sogra, dona Mara, meu pai-sogro, seu Rabello, minha cunhada, Bia e cunhado, Alê). Obrigado pelo apoio emocional e auxílio por esses últimos anos, família que admiro, respeito e me espelho.

Ao meu grande amigo Marcelo Eiras, por ter depositado toda a confiança, expectativa, e inspiração para me tornar um grande pesquisador. Obrigado pela amizade e confiança!

Ao meu grande amigo-irmão Daniel, que admiro muito e me espelho, como pessoa e profissional, exemplo de vida e profissionalismo. Obrigado por ser meu amigo e ter me ensinado nesses anos todos sobre ciência e vida!

Aos meus amigos do laboratório de baculovírus e de vida: Roberto, Fabrício, Fernando, Ana Maria, Athos, Rayane e Mariana. É bom poder contar sempre com vocês!

Agradeço a prof^a. Dr^a. Anamélia Lorezenti Bocca e seus alunos Márcio e Raffael pelo apoio e ajuda nos experimentos imunológicos. Obrigado pela força!

Aos meus amigos da Wageningen University: Methap (Turquia), Lucrécia (Itália), Han (China), Fenqgiao (China), Giel (Holanda), Ioana (România/Itália), Mark (Holanda), Sandra (Holanda), Marleen (Holanda), Corien (Holanda), Corinne (Holanda), Els (Holanda), Dick (Holanda), Jhon (Quênia), Tanya (Rússia), Fernando (Rio de Janeiro), Liz (São José dos Campos), Angel (Espanha), Sander (Holanda), Juliano (Florianópolis). Pelos momentos maravilhosos que passei na minha caminhada pela Europa! Obrigado pela paciência e ajuda!

Ao pessoal do Instituto Adolfo Lutz e Instituto Biológico por despertar e iniciar meu amor pela pesquisa!

Agradeço aos componentes da banca de ambos qualificação e de defesa de tese.

Agradeço a minha supervisora de doutorado sanduíche prof.dr. MM (Monique) van Oers, a todos os pesquisadores do laboratório de virologia e a Wageningen University (WUR) Holanda por me receber durante meu período sanduíche.

Agradeço a Universidade de Brasília por ter-me aberto esta porta para o fantástico e apaixonante mundo da ciência.

Ao CNPq.

Ao Brasil, meu fantástico país.

Sumário

Índice de figuras.....	vii
Lista de tabelas.....	viii
Abreviações e símbolos utilizados.....	viii
Resumo	xiii
Abstract.....	xiv
Capítulo 1. Introdução geral	15
Baculovírus – Uma Introdução	15
Baculovírus e Aplicações.....	19
Agente de biocontrole.....	19
Sistema de expressão heteróloga	19
Capítulo 2. Hepatite B.....	24
O vírus da hepatite B (HBV)	24
Introdução	24
Ciclo de Replicação viral.....	26
Transmissão	26
Diagnóstico	27
Tratamento	30
Justificativa	31
Objetivos.....	32
Objetivo geral.....	32
Objetivos específicos	32
Materiais e Métodos.....	33
Vírus e Células.....	33
Obtenção e clonagem do antígeno sHBsAg.....	34
Clonagem do gene sHBsAg na região 3' do gene <i>polh</i> do AcMNPV e em um vetor contendo um gene <i>polh</i> extra	34
Obtenção de baculovírus recombinantes para expressão da região sHBsAg fusionada à poliedrina	35
Produção <i>in vitro</i> da proteína quimera sHBsAg	36
Análises microscópicas.....	36
Análise da expressão e purificação das proteínas recombinantes em larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> e em cultura de células de insetos	37
Imunização e produção de antissoro	39
Imunoensaio.....	39
Resultados	40
Obtenção e clonagem antígeno sHBsAg.....	40

Construção do vetor de transferência pFastAcPH3-sHBsAg e pFastBac1/AccI-PSX-6xHis-sHBsAg-AcPH.....	41
Construção do vírus contendo as fusões PH3sHBsAg e AccI-PSX-6xHis-sHBsAg-AcPH.....	43
Análise da expressão da proteína recombinante e estrutural de possíveis cristais da proteína quimera sHBsAg em insetos.....	44
Imunoensaio com Kit comercial Anti HBsAg.....	47
Discussão e Conclusão.....	49
Capítulo 3. Efeitos imunológicos de um peptídeo da glicoproteína do vírus da raiva pela estimulação de camundongo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	53
Introdução	53
A Raiva	53
Vacina anti-rábica	58
Vacinas e sistema imune.....	59
Justificativa	60
Objetivo.....	60
Materiais e Métodos.....	61
Vírus, células e insetos.....	61
Obtenção e clonagem do pept/G.....	61
Clonagem do pept/G na região 5' do gene da <i>polh</i> do AcMNPV	62
Obtenção de baculovírus recombinante para expressão do pept/G fusionada à poliedrina	62
Produção <i>in vitro</i> da proteína quimérica pept/G fusionada à poliedrina	63
Análises da expressão da proteína recombinante em células de inseto e análise ultraestrutural de possíveis cristais recombinantes	63
Análise da expressão das proteínas recombinantes em larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> e em cultura de células de insetos.....	65
Imunização, produção de anticorpos e citocinas <i>in vivo</i>	66
Ensaio de cultivo e proliferação de esplenócitos.....	67
Dosagem de citocinas	68
Resultados	68
Obtenção e clonagem do pept/G.....	68
Análise da expressão da proteína recombinante	70
Análise da purificação dos cristais recombinantes	72
Ensaio de proliferação celular e análises de citocinas	74
Discussão	75
Perspectivas.....	78
Hepatite	78
Raiva	78

Índice de figuras

Figura 1. O ciclo de infecção de um baculovírus do grupo nucleopoliedrovírus (NPV) em um hospedeiro lepidóptero.....	17
Figura 2. Esquema mostrando o sistema Bac-to-Bac da Invitrogen	23
Figura 3. Esquema do HBV.....	24
Figura 4. Representação esquemática da organização do genoma HBV.	25
Figura 5. Marcadores sorológicos e molecular da infecção pelo HBV.....	29
Figura 7. Esquema das duas regiões usadas para fusão da região 'small' do antígeno HBsAg à poliedrina.	35
Figura 8. Esquema mostrando a sequência de construção do vetor pGem-HBsAg.....	41
Figura 9. Construção do vetor de transferência pFastAcPH3sSHBsAg.	42
Figura 10. (a, b e c) Esquema da construção do vetor de transferência pFastBac1/Accl-PSX-6xHis-sHBsAg-AcPH (com o gene extra da poliedrina do AcMNPV).....	42
Figura 11. Confirmação da construção do bacmídeo vAcPHHBs.....	43
Figura 12. Confirmação da construção do bacmídeo bacvAcHBsPH2.	44
Figura 13. Análise do efeito citopático da infecção de células Tn5B com diferentes baculovírus a 72h.p.i.	45
Figura 14. Análise da expressão da proteína recombinante sHBsAg em células de inseto infectadas com o baculovírus recombinante vAcPHHBs e vAcHBsPH2.....	46
Figura 15. Análise ultraestrutural dos corpos de oclusão derivados de larvas de <i>S. frugiperda</i> infectadas pelos vírus recombinantes.	47
Figura 16. ELISA utilizando Kit Laboratorial Anti HBsAg Qualitativo e Quantitativo da empresa Wama Diagnóstica.	48
Figura 17. Ciclos epidemiológicos de transmissão da raiva no Brasil.	56
Figura 18. Esquemas dos genes usados para fusão da <i>polh</i> com o <i>pept/G</i> e sequências de aminoácidos deduzidas a partir da sequência do DNA.. ...	69
Figura 19. Confirmação da construção do vírus vAc-pept/G- <i>polh</i>	70

Figura 20. Análise do efeito citopático da infecção de células Tn5B com diferentes baculovírus a 72h.p.i.	71
Figura 21. Análise da expressão de proteínas recombinantes em células de inseto infectadas com diferentes baculovírus recombinantes.....	72
Figura 22. Purificação e análise ultraestrutural dos corpos de oclusão derivados de insetos infectados pelos baculovirus recombinantes vAc-6xHis-polh e vAcPEP/polh.	73
Figura 23. Análise da expressão de proteínas recombinantes.	73
Figura 24. Ensaio de proliferação celular pelo método CFSE.	74

Lista de tabelas

Tabela 1. Genótipos e distribuição geográfica do HBV (adaptado de ARAUZ-RUIZ et al., 2002).....	Error! Bookmark not defined.
Tabela 2. Iniciadores utilizados no trabalho	44
Tabela 3. Iniciadores utilizados no trabalho	62

Abreviações e símbolos utilizados

%	por cento
<	menor que
°C	grau <i>Celsius</i>
6xHis	cauda de hexa-histidina
AcMNPV	Baculovírus <i>Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus</i>
AcPH	poliedrina do baculovírus AcMNPV
Ad	adenovírus
AdC	adenovírus de chimpanzés
AgMNPV	Baculovírus <i>Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus</i>
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
Bac	do inglês, “Bacterial artificial chromosome”

BCIP	sigla do inglês, “5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate”
BmNPV	Baculovírus <i>Bombyx mori nucleopolyhedrovirus</i>
BSA	albumina sérica bovina
BTI-Tn5B1-4	linhagem derivada do lepidóptero <i>T. ni</i>
BV	do inglês, “budded vírus”
CFSE	citoplasmático fluorecente 5,6-carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster
CHC	Carcinoma Hepatocelular
cm ²	centímetro quadrado
CMV	Citomegalovirus
ConA	Concanavalina A
CsCl	Cloreto céσιο
D.O.	Densidade óptica
ddH ₂ O	Água bidestilada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECV	do inglês, “extracellular vírus”
EIA	do inglês, “enzyme immunoassays”
ELISA	do inglês, “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
ERIG	Imunoglobulina anti-rábica Equina
F	primer “ <i>Foward</i> ”
<i>g</i>	grama
GP64	Glicoproteína de 64 kilodaltons (proteína de envelope viral)
GLICOPROTEÍNA G	Glicoproteína viral
GVs	Granulovirus
h	horas
h p. i.	horas pós-infecção
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
HAV	Vírus Hepatite A
HB	Hepatite B
HBcAg	antígeno do <i>core</i> do HBV
HBeAg	antígeno do envelope do HBV
HBsAg	antígeno de superfície do HBV
HBV	Vírus da Hepatite B

HCV	Vírus da Hepatite C
HLA-G	Antígeno leucocitário humano G
HRIG	Imunoglobulina específica do vírus da raiva de origem humana
IFN- γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulinas G
IgM	Imunoglobulinas M
IL	Interleucina
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
kb	kilobases
kDa	kiloDalton
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
kpb	kilo-pares de bases
kV	kilovolts
L	Litro
LACEN-DF	Laboratório Central do Distrito Federal
LB	Luria-Bertani
M	Molar
m. o. i.	do inglês, “multiplicity of infection”
MAbs	Anticorpos monoclonais
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
min	minuto
mini-attTn7	sítio alvo de inserção do transposon Tn7
mL	Microlitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MNPV	<i>Multiple nucleopolyhedrovirus</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
NBT	do inglês “nitro-blue tetrazolium chloride”

ng	nanogramas
NO	Óxido Nítrico
NPVs	<i>Nucleopolyhedrovirus</i>
OB	do inglês, “occlusion body”
ODV	do inglês, do inglês “occluded vírus”
ORFs	do inglês, “open reading frame”
p/v	relação peso por volume
PAGE	do inglês, “polyacrylamide gel electrophoresis”
pb	pares de bases
PBS	do inglês, “Phosphate buffered saline”
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pg/ml	relação picograma por mililitro
pH	concentração de íon hidroxônio livre
PIB	do inglês, „polyhedral inclusion bodies”
PSX	P – poliedrina; S – promotor Syn; X – promotor XIV
<i>Att</i>	do inglês, “attachment”
pSyn	promotor sintético da fase tardia
pXIV	promotor da poliedrina modificado
R	primer “Reverse”
Pept/G	peptídeo imunogênico da glicoproteína do vírus da Raiva
RIG	Imunoglobulina específica do vírus da raiva
RLR	do inglês, “RIG-I-like receptors”
RNA	ácido ribonucleico
RPMI	do inglês, “Roswell Park Memorial Institute médium”
POLH	Poliedrina
S	do inglês, “small”
SDS	do inglês, “sodium dodecyl sulfate”
SDS-PAGE	do inglês, “sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”
SNC	sistema nervoso central
SNPV	<i>Single nucleopolyhedrovirus</i>
SP6	promotor de uma RNA polimerase de fago
SV40	do inglês, “Simian vacuolating virus 40”
T7	promotor do fago T7

TLR	do inglês, “Toll-like receptors”
Tn7	braço homólogo marcador do transposon Tn7
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Tris	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
Tris-HCl	TRIS hidrocloreto
U	Unidade de enzima
UTR	Região não-traduzida
UV	ultravioleta
V	Volts
v/v	relação volume/volume
vAc	recombinante da espécie AcMNPV
HBV	Vírus da hepatite B
VLP	do inglês, “virus-like particles”
V-RG	estirpe de vírus vaccínia de Copenhagen
w/v	relação peso por volume
x <i>g</i>	velocidade de sedimentação gravitacional
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactopiranosídeo
μ g	micrograma
μ L	microlitro
μ m	micrômetro

Resumo

Baculovírus são vírus de DNA de dupla fita circular que infectam insetos, inicialmente utilizados apenas como controle biológico por serem capazes de eliminar insetos-praga associados à agricultura. Nas décadas de 70 e 80, seu potencial como ferramenta para expressão de proteínas heterólogas começou a ser explorado. Hoje, os baculovírus têm sido utilizados amplamente para expressar antígenos de uso vacinal ou diagnóstico e até mesmo utilizados como potenciais vetores de terapia gênica e vacinas de DNA. Sua biossegurança é garantida pelo fato de não serem capazes de se replicar em células de mamífero. Entretanto, são capazes de penetrar nessas células, além de apresentarem propriedades imunoestimulatórias. Deste modo, inúmeras proteínas de importância médica e econômica foram expressas em níveis elevados aplicando desse sistema. Atualmente, não existem indústrias ou empresas nacionais disponíveis para a produção escalonável do antígeno de superfície HBsAg. Perante disso, os insumos são importados tanto para fins vacinais como para o diagnóstico. A vacina anti-rábica atualmente é constituída por suspensões de vírus purificados e inativados com β -propiolactona, representando um risco de manipulação. Portanto, a produção de proteínas virais recombinantes permitiu o desenvolvimento e métodos de diagnóstico e vacinas mais seguras. Neste trabalho foram construídos baculovírus recombinantes contendo os genes do antígeno HBsAg de HBV e de um peptídeo imunogênico derivado da glicoproteína do vírus da Raiva (Pept/G), fusionados à proteína poliederina (POLH) do baculovírus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV). As proteínas recombinantes foram expressas em inseto e culturas de células na forma de agregados protéicos cristalinos. A proteína recombinante contendo o antígeno HBSAg foi reconhecida por anticorpos anti-HBsAg em testes de imunoenensaio (EIA) comerciais. A proteína recombinante contendo o Pept/G foi capaz de estimular o sistema immune de camundongos com sucesso, verificado por meio da proliferação celular *in vitro*. Desta forma, é possível concluir que proteínas recombinantes derivadas de vírus humanos fusionadas à proteína POLH de baculovírus são uma alternativa para a produção destes antígenos.

Palavras Chaves: HBV, HBsAg, ELISA, Virus da Raiva, BEVS.

Abstract

Baculovirus are circular double-stranded DNA viruses that infect insects and initially used only as biological control agents for being able to eliminate insect pests associated with agriculture. In the 1970s and 1980s, its potential as a tool for the expression of heterologous proteins began to be explored. Today, baculoviruses have been used extensively to express antigens for vaccine production, diagnostics and even as potential vectors for gene therapy and DNA vaccines. Their biosafety is guaranteed by the fact that baculoviruses are not able to replicate in mammalian cells. However, they can enter these cells and present immunostimulatory abilities. In this way, numerous proteins of medical and economic importance have been expressed at high levels applying this system. Currently, there are no Brazilian-based companies available to produce HBsAg surface antigen in a large scale, and the supplies to produce both vaccines and diagnostic kits are imported from other countries. The rabies vaccine currently consists of purified and inactivated virus suspensions with β -propiolactone, representing a health risk from its manipulation. Therefore, the use of recombinant proteins from viruses allowed the development of safer diagnostic methods and vaccines. In addition, this strategy may reduce the cost of vaccine manufacturing and eventually, contribute towards disease control. In this work, we constructed two recombinant baculoviruses; one containing of sHBsAg antigen gene of HBV and second recombinant containing an immunogenic peptide derived from the rabies virus glycoprotein (Pept/G). Both were fused to the polyhedrin protein (POLH) of the baculovirus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV). Recombinant proteins were expressed in insect cells and in insects in the form of crystalline protein aggregates. The recombinant protein containing the HBsAg antigen was used in commercial immunoassay (EIA) tests and was recognized by the anti-HBsAg antibodies. A recombinant protein containing Pept/G could successfully stimulate the immune system of mice which was verified by cell proliferation *in vitro*. Thus, it is possible to conclude that recombinant proteins derived from human viruses fused to the baculovirus POLH protein are an alternative to produce diagnostic tests and possible subunit vaccines.

Key Words: HBV, HBsAg, ELISA, Rabies Virus, BEVS.

Capítulo 1. Introdução geral

Baculovírus – Uma Introdução

Baculoviridae (King et al, 2012) é uma família de vírus de insetos cujo membros tem sido encontrados infectando mais de 700 espécies em todo o mundo (revisado por Miller (1997)). Embora os baculovírus possam infectar insetos das ordens Diptera e Hymenoptera, a maioria dos relatos envolve a ordem Lepidoptera. Em geral, membros desta família são altamente patogênicos e específicos; uma perfeita combinação que tornou-os úteis como agentes de controle biológico, como por exemplo, no controle da lagarta na cultura da soja (*Aticarsia gemmatalis*), da mariposa das maçãs e peras (*Cydia pomonella*), do complexo de mariposas da batata (*Phthorimaea Operculella*), da lagarta do cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*) e da lagarta da mandioca (*Erinnyis ello*) (revisado por Haase et al. (2015)). Há mais de 30 anos, os baculovírus vêm sendo usados como vetores de expressão de proteínas heterólogas, tanto em inseto como em cultura de células. Os baculovírus são utilizados também como uma importante ferramenta para aplicações biotecnológicas, como produção de vacinas, diagnóstico e terapia gênica (Ribeiro, 2015; van Oers et al, 2015).

Baculovírus possuem o formato de bastão, DNA dupla fita covalentemente circular e com tamanho variando entre 80 e 180 kpb, codificando entre 90 a 180 *open reading frames* (ORFs) (revisado por Rohrmann (2013)) . Durante uma típica infecção de células de insetos, os baculovírus levam a produção de dois fenótipos virais infectivos diferentes, porém geneticamente idênticos. O vírus extracelular ou brotado (ECV ou BV, do inglês, *extracellular virus* ou *budded virus*, respectivamente) que medeia a disseminação da infecção célula a célula, e o vírus derivado da oclusão (ODV, do inglês, *occluded derived virus*) o qual está envolvido na transmissão horizontal de inseto para inseto. O BV consiste em um único nucleocapsídeo envelopado que brota por meio da membrana das células infectadas para disseminar a infecção entre células ou via hemolinfa para outros tecidos. Em contraste, o ODV também é envelopado, mas adquire seu envelope no núcleo da célula infectada a partir de membranas derivadas da membrana interna do núcleo. Os ODVs podem conter um único nucleocapsídeo

por envelope (SNPV, do inglês *single nucleopolyhedrovirus*) ou múltiplos (MNPV, do inglês *multiple nucleopolyhedrovirus*). Estes ODVs são embebidos em uma matriz cristalina chamada de corpo de oclusão (do inglês: *occlusion body*, OB) variando de 0.6 a 2 μm de diâmetro, que protege os vírions no meio ambiente, fora do corpo do inseto hospedeiro (Rohrmann, 2013a). Essa matriz proteica é predominantemente e basicamente moldada por um único tipo de proteína: poliedrina ou granulina, dependendo do gênero viral (veja abaixo). Os OBs são extremamente estáveis e podem se manter por anos no meio ambiente (Thomas et al, 1972), permitindo que o vírus persista na ausência do hospedeiro por um longo período de tempo.

A transmissão horizontal ocorre por meio da ingestão de OBs pelo inseto (Figura 1, fases 1 e 2). O pH alcalino do intestino médio dissolve a matriz proteica do OB, liberando os ODVs e enzimas (Figura 1, fases 3 e 4). Estes ODVs, com o auxílio das enzimas rompem e cruzam a membrana peritrófica do lúmen intestinal, que é uma camada composta por quitina e proteína (Hegedus et al, 2009), estabelecendo assim a infecção de células epiteliais do intestino médio (Clem & Passarelli, 2013; Miller, 1997). Depois do primeiro ciclo de replicação viral no núcleo dessas células, a produção de BVs se inicia (Figura 1, fase 5). Entretanto, vários estudos sugerem que BVs podem também ser produzidos simplesmente pelo reempacotamento de nucleocapsídeo derivado dos ODVs, antes da replicação viral. Isso ocorre quando mais de uma partícula viral entra no núcleo da célula e uma delas é enviada ao núcleo e a outra para a região basolateral da célula do intestino por transcitose. A partícula que foi endereçada ao núcleo perde seu capsídeo e o DNA viral é reconhecido pela RNA polimerase celular, que transcreve alguns genes virais. Um desses genes é o da proteína de envelope viral chamada gp64, que é sintetizada no retículo endoplasmático da célula e endereçada à membrana da região basolateral da célula. Nessa região a gp64 é reconhecida pela partícula viral que não entrou no núcleo e ocorre o brotamento dessa partícula para a hemolinfa ou célula do sistema traqueal do inseto. (Granados & Lawler, 1981; Washburn et al, 2003a; Washburn et al, 2003b). Em sequência, BVs são transportados para outros tecidos via hemolinfa (sistema circulatório) e traquéia (sistema respiratório), disseminando a infecção para todo o inseto. Em momentos tardios de infecção, a produção de OBs ocorre no núcleo das células infectadas. Após o inseto ter sido completamente

infectado, ocorre o rompimento das estruturas internas pelas enzimas virais, tais como quitinase e catepsina, provocando a ruptura total da carcaça (Hawtin et al, 1997), garantindo a liberação de OBs recém-formados no ambiente. Dependendo da espécie e do estágio de desenvolvimento do hospedeiro, pode ocorrer a produção de mais de 10^{10} OBs por larva (Entwistle P.F., 1985).

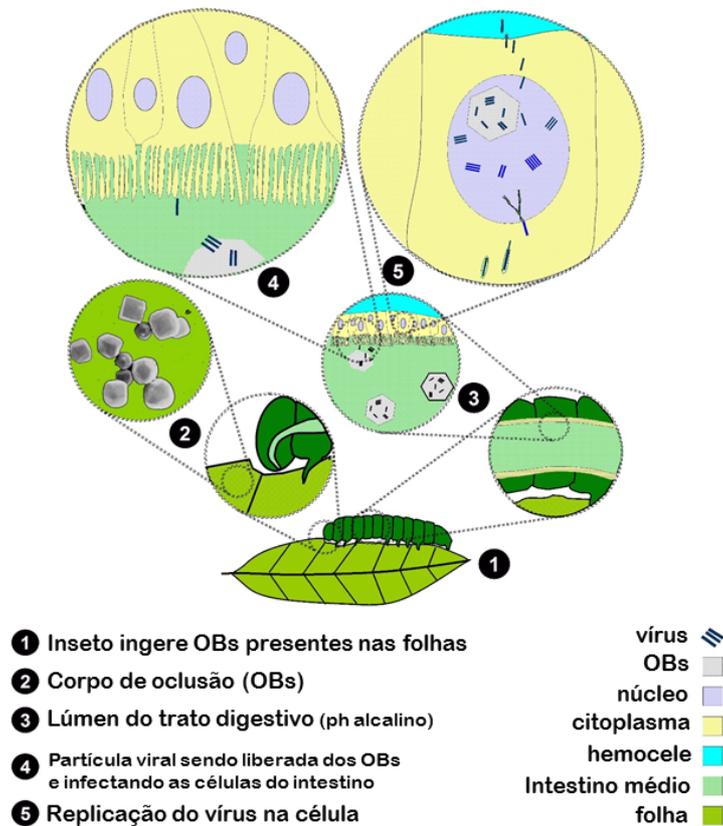


Figura 1. O ciclo de infecção de um baculovírus do grupo nucleopoliedrovírus (NPV) em um hospedeiro lepidóptero. Na fase 1 e 2 ocorre a ingestão de OBs pelo inseto; nas fases 3 e 4, devido ao pH alcalino do intestino médio, ocorre a dissolução da matriz proteica do OB e liberação dos ODVs e enzimas. Estes ODVs, com auxílio das enzimas, rompem e cruzam a membrana peritrófica do lúmen intestinal, estabelecendo assim, a infecção de células epiteliais do intestino médio. Na fase 5, após ocorrer o primeiro ciclo de replicação viral no núcleo dessas células, a produção de BVs se inicia, e em sequência, BVs são transportados para outros tecidos, via hemolinfa e traqueia, espalhando a infecção para todo o inseto.

Os baculovírus compartilham uma longa história coevolutiva com seus insetos hospedeiros (Herniou et al, 2004). A análise filogenética (datação molecular) de baculovírus e nudivírus sugere que esses vírus estavam presentes na terra infectando insetos há mais de 310 milhões de anos (Theze et al, 2011), o que torna a família *Baculoviridae* uma das mais antigas famílias de vírus de DNA conhecidas. Isso ocorreu após a diversificação de insetos holometabólicos

(insetos que sofrem metamorfose completa) e parece ter ocorrido no mesmo período de tempo em que ocorreu a diversificação de baculovírus (Herniou et al, 2004; Theze et al, 2011). Contudo, em menor escala, a filogenia de baculovírus não mostra exatamente a filogenia de seus hospedeiros, o que sugere que estes vírus podem ter colonizado novos hospedeiros de inseto muitas vezes durante a sua evolução (Theze et al, 2011).

Baseada na análise filogenética de proteínas virais, os baculovírus são divididos em quatro gêneros: (i) *Alphabaculovirus*, com vírus específicos para insetos da ordem lepidoptera, também conhecido como nucleopoliedrovírus (NPVs) de lepidópteros, (ii) *Betabaculovirus*, com vírus também específicos para insetos da ordem lepidoptera, também conhecidos como granulovírus (GVs) de lepidóptera, (iii) *Gammabaculovirus*, com vírus específicos para insetos da ordem himenoptera, também conhecidos como nucleopoliedrovírus (NPVs) de himenóptera, e (iv) *Deltabaculovirus*, com vírus específicos pra insetos da ordem díptera, também conhecidos como nucleopoliedrovírus (NPVs) de diptera (Jehle et al, 2006). Membros do gênero *Alphabaculovirus* são divididos em grupo I e grupo II NPVs (Zanotto et al, 1993). Ambos compreendem *single* NPVs (SNPVs), contendo um único nucleocapsídeo dentro de um ODV, e *multiple* NPVs (MNPVs) contendo múltiplos nucleocapsídeos dentro de um ODV (revisado por (Blissard, 1996)). Estes dois fenótipos (SNPVs e MNPVs) não têm nenhum significado taxonômico e a base genética para esses fenótipos são desconhecidas. Os termos nucleopoliedrovírus (NPVs) e granulovírus (GVs) se referem aos antigos nomes dados aos dois gêneros da família *Baculoviridae* aceitos pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) entre 1993 a 2008 (revisado por Rohrmann (2013)).

Baculovírus e Aplicações

Agente de biocontrole

Os Baculovírus têm um papel importante no controle de populações de insetos. Esses vírus têm sido amplamente aplicados nas últimas seis décadas como agentes de biocontrole contra as pragas florestais e agrícolas, devido a sua eficácia, alta especificidade e a segurança em relação aos organismos não-alvo (Moscardi, 1999). Baculovírus são considerados seguros para os vertebrados e nenhum caso de patogenicidade para estas espécies foi relatado (Bocca et al, 2013; Krieg et al, 1980). A sua especificidade de hospedeiro é geralmente muito estrita e muitas vezes limitada a uma única espécie de insetos. O interesse em baculovírus como agentes de biocontrole está crescendo, devido ao desenvolvimento de resistência dos insetos a inseticidas químicos (Moulton et al, 2002). No entanto, existem vários inconvenientes que limitam a utilização de baculovírus, como por exemplo sua baixa velocidade de ação em relação a produtos químicos na mortalidade dos insetos-praga e as limitações em sua produção em larga escala. A velocidade de ação dos baculovírus é relativamente lenta (dias ou semanas) comparada com muitos inseticidas químicos (<dias). Esses fatores fizeram a engenharia genética de baculovírus um importante campo de investigação nos últimos 25 anos. Reduzir o tempo que leva para o baculovírus estabelecer a infecção e matar o seu hospedeiro é um dos principais focos, como por exemplo a utilização deste vírus para a expressão de genes heterólogos, tais como toxinas de inseto-específicas derivada de escorpião (*Androctonus australis*) e aranha (*Brachypelma Albiceps*) (Ardisson-Araújo et al, 2013a; Maeda et al, 1991); deleção e inserção de genes virais relacionados com a virulência do baculovírus(Oreilly & Miller, 1991; Ribeiro, 2001).

Sistema de expressão heteróloga

A regulação da expressão gênica em baculovírus é baseada em estudos com o vírus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) e células de *Spodoptera frugiperda* e pode ser dividida em duas fases principais: fase precoce (*early*) e fase tardia (*late*). Essas fases podem ser subdivididas em

fase precoce imediata (*immediately early*), cujos genes são expressos nas primeiras horas de infecção, e fase muito tardia (*very late*), que representa os genes que são expressos após 18-24 horas de infecção (Rohrmann, 2013a). A fase precoce imediata se inicia a partir de aproximadamente 20 minutos até 8 horas pós-infecção e corresponde basicamente à síntese de fatores de transcrição, bem como as proteínas pertencentes à maquinaria de replicação viral (Friesen, 1997). Quando o DNA viral começa a ser replicado, inicia-se a fase tardia. Nessa fase há intensa produção de proteínas responsáveis pela construção de partículas virais extracelulares (BV). Essa fase se estende até 24 h.p.i. (horas pós-infecção) (Lu & Miller, 1997). Na última fase da infecção, a poliedrina (POLH), uma proteína de aproximadamente 30kDa, é produzida em grande quantidade (Rohrmann, 1986). A poliedrina, codificada pelo gene *polh*, é a principal constituinte dos corpos de oclusão viral (OBs), que ao serem ingeridos pelo inseto são dissolvidos no intestino médio devido ao pH alcalino (Funk et al, 1997). Essa proteína compreende mais de 95% de todas as proteínas dos OBs (Jarvis, 1997). Entretanto, o gene *polh* não é essencial para a replicação viral em cultura de células. Por isso, a região do gene da poliedrina e seu promotor são usados para a construção de baculovírus recombinantes para expressão de proteínas heterólogas (Rohrmann, 1986).

Os Baculovírus tem sido amplamente aplicados em biotecnologia como vetores para a produção de proteínas recombinantes em células de insetos devido ao alto nível de expressão de genes heterólogos usando promotores de genes baculovirais envolvidos no processo de oclusão (van Oers, 2011). A principal vantagem da utilização de células de inseto quando comparadas às células bacterianas e de leveduras é que elas proporcionam modificações pós-traducionais (glicosilação e fosforilação, por exemplo) mais próximas às que ocorrem em células de mamíferos, tornando-as adequadas para a produção de vacinas, potencial uso como vetor de terapia gênica, e a segurança inerente do processo de produção. A maioria dos sistemas de expressão em células de inseto usando baculovírus, disponíveis comercialmente, baseiam-se na espécie tipo, AcMNPV. Os genes envolvidos no processo de formação de OBs e transcritos em fases tardias da infecção (poliedrina e *p10*) têm uma atividade transcricional extremamente elevada (cerca de 25% de mRNA total de células infectadas) nesse período e não são essenciais para a produção de BV fazendo

com que esses promotores sejam escolhidos para comandar a transcrição dos genes heterólogos em células de inseto (Condreay & Kost, 2007). Como os genes poliedrina (*polh*) e *p10* não são essenciais para replicação viral em células de inseto, eles podem ser substituídos pelos genes heterólogos. No entanto, existem outros vetores de expressão disponíveis que utilizam promotores que são menos ativos transcricionalmente ou estão ativos no início do processo de infecção (Condreay & Kost, 2007; Ribeiro, 2015).

O primeiro trabalho que relatou o uso de baculovírus como vetor para expressão de proteínas heterólogas, do inglês *baculovirus expression vector system* (BEVS) foi descrito por Smith et al. (1983), com a expressão da proteína beta interferon em células de inseto infectadas por um baculovírus geneticamente modificado. Para tanto, foi utilizado o promotor da *polh* do AcMNPV para comandar a expressão do gene heterólogo.

Nos últimos anos, a utilização de BEVS vêm sendo aprimorada, como a produção de linhagens de células de inseto transgênicas capazes de modificar proteínas com alterações pós-traducionais de células de mamíferos, como por exemplo a glicosilação com resíduos de ácido siálico. Os baculovírus também são usados como vetores de entrega gênica em células de mamíferos, e apresentadores de antígenos (Jarvis, 2009; Kost et al, 2005). Além disso, esse sistema resultou na produção de vacinas contra doenças virais baseadas em *virus-like particles* (VLP) Cervarix® (Papilomavirus humano) e Ingelvac® Circoflex™ (circovirus suíno) (Mena & Kamen, 2011).

O método mais usado para a construção de baculovírus recombinantes hoje em dia é o sistema comercial Bac-to-Bac (Invitrogen). Esta estratégia baseia-se na transposição sítio específica em cassete de expressão no genoma de um baculovírus (bacmídeo) propagado em *E. coli* (Luckow et al, 1993). Este cassete contém uma origem de replicação mini-F para baixo número de cópias, um marcador de resistência à canamicina, e segmento de DNA que codifica o peptídeo LacZ α , no qual o sítio para a transposição bacteriana mini-att Tn7 foi inserido no *locus* do gene *polh* (sítio não interrompe a ORF do peptídeo) foi inserido no genoma do baculovírus.

O sistema Bac-to-Bac utiliza das vantagens das propriedades de transposição específica Tn7 para acelerar o processo de geração do bacmídeo recombinante. Para isso, a reação de transposição requer dois componentes: a)

um vetor de transferência (pFastBac™) em que o gene (s) de interesse vai ser clonado. Dependendo do vetor pFastBac™ selecionado, a expressão do gene (s) de interesse é controlada pelo promotor da poliedrina de AcMNPV ou promotor do gene *p10*. Este cassete de expressão é flanqueado pelo sitio Tn7R e TN7L, além de um gene de resistência à gentamicina e um sinal de poliadenilação (SV40) para formar um mini-Tn7; b) uma linhagem de *E. coli* (DH10Bac™) que é utilizada para receber o vetor pFastBac™. As células DH10Bac™ contém o genoma do baculovírus AcMNPV (bacmídeo) com um sitio de destino de transposição mini-att Tn7 e um plasmídeo auxiliar (*helper*). Uma vez que o plasmídeo de expressão pFastBac™ é transformado em células DH10Bac™, a transposição ocorre entre o elemento mini-Tn7 no vetor pFastBac™ e o sitio mini-att Tn7 alvo no bacmídeo para gerar um bacmídeo recombinante. Esta reação de transposição ocorre na presença do plasmídeo auxiliar, que codifica uma transposase e confere resistência à tetraciclina. O plasmídeo auxiliar fornece a função de transposição Tn7 em trans no transposon Tn7 durante a transposição (Barry, 1988).

Após a transposição, o bacmídeo propaga-se em *E. coli* DH10Bac™ como um grande plasmídeo que confere resistência a canamicina. Dessa forma a bactéria pode ser cultivada para posterior extração de DNA e subsequente transfecção de células de inseto. Assim, serão geradas as partículas infecciosas de baculovírus recombinantes (Luckow et al, 1993; Yao et al, 2007) (Figura 2).

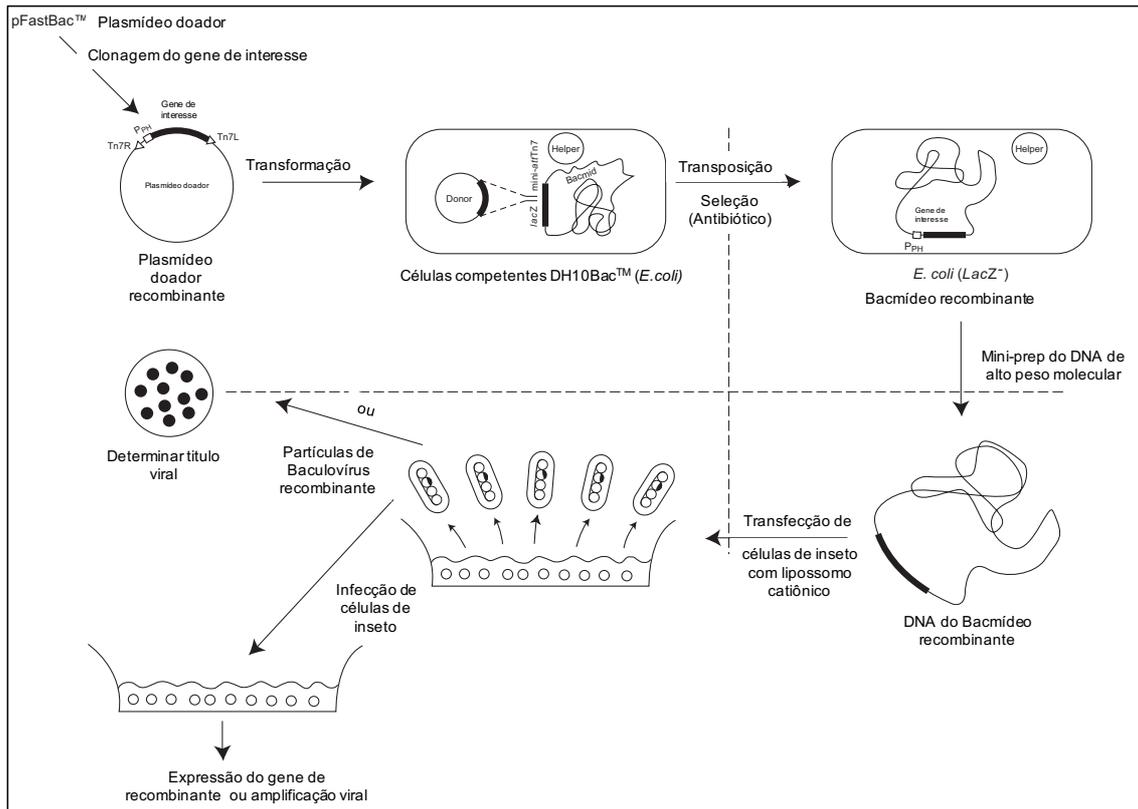


Figura 2. Esquema mostrando o sistema Bac-to-Bac da Invitrogen. O gene de interesse clonado no vetor de transferência é transformado em células de *E. coli* (DH10Bac, Invitrogen) que possui o genoma do vírus AcMNPV na forma de um grande plasmídeo (denominado de bacmídeo). O gene de interesse está flanqueado por regiões de transposição do transposon TN7 (regiões TN7L e TN7R). O bacmídeo possui o sítio alvo de inserção do transposon TN7, onde será inserido o gene de interesse sob o comando do promotor da *polh* e o gene do antibiótico gentamicina. Essa transposição é feita com a ajuda de um outro plasmídeo ('helper'), presente nas células DH10Bac que codifica para a enzima transposase. A transposição é confirmada através da seleção por antibióticos e a α complementação da β -galactosidade (ver texto). Depois de uma lise alcalina em pequena escala (miniprep) para obtenção do DNA, é realizado a transfecção de células de inseto com a ajuda de lipossomos catiônicos, onde o DNA do baculovírus por si só infecta as células de inseto. O sobrenadante da transfecção contendo os vírus no fenótipo BV é utilizado para amplificação viral através da infecção de células de inseto ou para determinação do título viral. Fonte: Manual Bac-to-bac.

Capítulo 2. Hepatite B

O vírus da hepatite B (HBV)

Introdução

O vírus da hepatite B (HBV) é um membro da família de vírus chamada *Hepadnaviridae*. Apresenta DNA envelopado, e se caracteriza pela capacidade de infectar as células hepáticas. Esse vírus infecta mamíferos e se replica nos hepatócitos por transcrição reversa, a partir de um RNA pré-genômico (El Khouri & Santos, 2004; Lee, 1997; Seeger & Mason, 2000).

A partícula infecciosa do HBV (vírion) é denominada de partícula de Dane (Figura 3). Esta partícula apresenta-se de forma esférica com diâmetro de aproximadamente 42 nm, a qual possui estrutura complexa com envoltório externo lipoproteico e interno. O envoltório externo é formado pela proteína da membrana viral HBs (s de *surface*) que constitui o antígeno de superfície do HBV (HBsAg). Internamente ao envelope viral tem-se a proteína HBc (c de *core*) que possui 30 a 34 nm de diâmetro, o antígeno do *core* do vírus (HBcAg), o antígeno “e” (HBeAg), o genoma viral e as enzimas DNA-polimerase e transcriptase reversa (Zhang & Cao, 2011) (Figura 3).

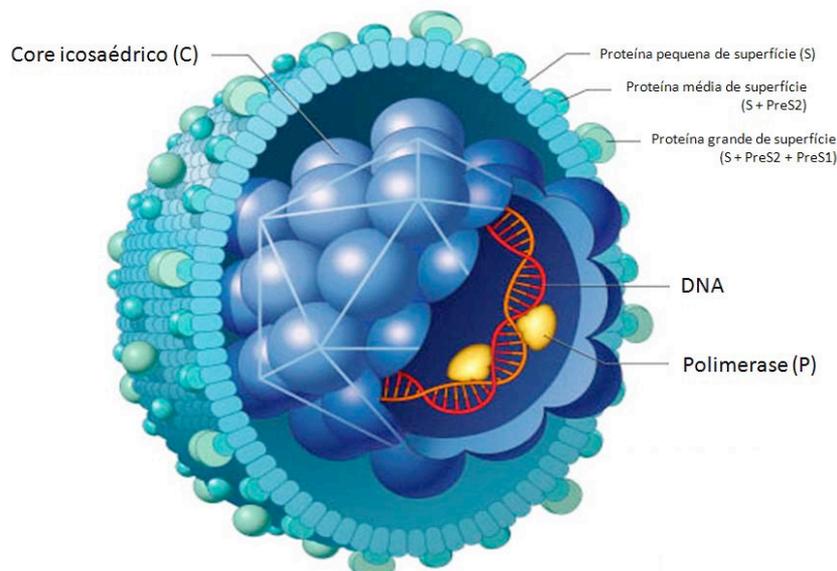


Figura 3. Esquema do HBV. No esquema estão sendo mostrados o nucleocapsídeo icosaédrico constituído por proteínas do core (C). O vírus é revestido por um envelope que contém três tipos de proteínas relacionadas entre si, as glicoproteínas S, Pré S1e S2 de membrana que formam o antígeno de superfície mais imunogênico do HBV, o HBsAg. Fonte: <http://www.hepcentro.com.br/images/HBV.gif>

O HBV apresenta um material genético compacto; uma molécula de DNA circular de fita dupla incompleta, com o tamanho de 3,2 kb (Hatzakis et al, 2006). O seu genoma está organizado em duas cadeias de polaridades invertidas, uma menor e incompleta de polaridade positiva, e outra maior e completa de polaridade negativa (Beck & Nassal, 2007; Bruss, 2004), apresentando quatro ORFs (Seeger & Mason, 2000) designadas de: a) Pré S1\Pré-S2\S com a função de codificação das proteínas que formam o HBsAg e as proteínas L (large), M (middle) e S (small) (Tian et al, 2007); b) Pré-C\C que sintetiza as proteínas do HBcAg e HBeAg (Ganem & Prince, 2004); c) P, responsável pela síntese da DNA polimerase (Lee, 1997) e d) X, com a função de síntese da proteína X, que está provavelmente envolvida na replicação viral e no surgimento do Carcinoma Hepatocelular (Grob, 1998; Liang, 2000) (Figura 4).

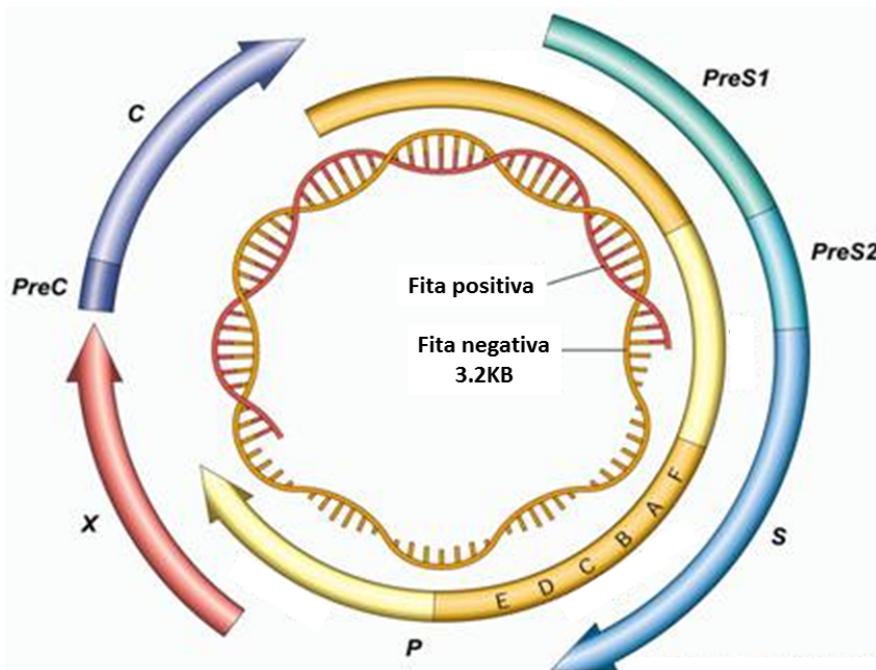


Figura 4. Representação esquemática da organização do genoma HBV. O círculo interno representa o DNA viral, indicado por duas fitas, uma contínua (amarela) de polaridade negativa e de tamanho 3,2kb, e uma descontínua (vermelha) de polaridade positiva. Pode ser observado também as regiões de fase aberta de leitura (ORF): pré- S/S (contém as regiões pré S1, S2 e S), pré-C/C, P e X. Fonte: <http://www.drthuthuy.com/images/genotype02.jpg> (modificado).

Na década de 80, o vírus da hepatite B foi classificado em subtipos de acordo com mudanças específicas de aminoácidos na proteína S, sendo associado com as regiões geográficas de ocorrência. Em 2000, através do sequenciamento da porção S do genoma viral, a classificação resultou em oito grupos genômicos (A a H), que se mantém até os dias de hoje. Na América do Sul é frequentemente encontrado o grupo F (Arauz-Ruiz et al, 2002).

Ciclo de Replicação viral

O ciclo de replicação do VHB se inicia quando o vírus se liga à membrana da célula hospedeira mediado pelas proteínas de envelope. Estudos demonstram que o VHB se liga por meio do domínio Pré-S1 da proteína de envelope à um receptor na membrana plasmática de hepatócitos humanos. Posteriormente, a membrana viral é fundida com a membrana celular, liberando o genoma no interior das células. A polimerase viral converte o dsDNA (DNA de fita dupla) parcial em forma circular dupla covalentemente fechada (cccDNA). Este DNA é transcrito pela RNA Polimerase-II do hospedeiro, e o DNA resultante serve como molde para a propagação de RNA pré-genômico e RNA sub-genômico (Beck & Nassal, 2007). O RNA pré-genômico é bifuncional, servindo tanto como molde para a síntese de DNA viral como mRNA para a tradução do pré-C, C e P. Os RNAs sub-genômicos funcionam exclusivamente para a tradução das proteínas de envelope e da proteína X (Ganem & Prince, 2004; Hatzakis et al, 2006; Neurath et al, 1986).

Transmissão

A transmissão do HBV ocorre principalmente pela via sanguínea como por exemplo exposição parenteral, exposição percutânea (lesões provocadas por instrumentos perfurantes e cortantes), sexual e vertical (Rizzetto & Ciancio, 2008; Shapiro, 1993). O sangue é considerado o fluido corpóreo com maior incidência de transmissão. No entanto, a transmissão percutânea pode ocorrer, devido ao vírus ser bastante resistente à agentes físicos, como o calor e ser estável à temperatura ambiente por mais de sete dias. Além disso, a sua inoculação indireta também pode ocorrer por meio do compartilhamento de escovas de dente, lâminas de barbear ou de depilar, canudo e cachimbo para uso de drogas, entre outros (Locarnini, 2003; Rapparini et al, 2000).

Apenas uma partícula do HBV é suficiente para infectar o ser humano (Fonseca, 2007), sendo o HBV considerado dez vezes mais infectante que o HCV e 100 vezes mais que o HIV (Komatsu et al, 2010). Estudos revelam que o

sangue e os outros fluidos orgânicos de um portador do HBV podem ser infectantes duas a três semanas anteriormente do surgimento dos primeiros sinais da hepatite B, mantendo-se assim durante a fase aguda e crônica da doença (BRASIL, 2008a; Komatsu et al, 2010).

O HBV pode apresentar-se em níveis elevados no sangue e em concentrações inferiores nos outros fluidos orgânicos (Hollinger & Liang, 2001; Margolis et al, 1991), tais como saliva (Davison et al, 1987; Jenison et al, 1987), sêmen (Zhang et al, 1994), secreção vaginal (Darani & Gerber, 1974; Yue et al, 2004), urina (Hourani et al, 1978; Irwin et al, 1975; Tripatzis, 1972), colostro ou leite materno (Lu et al, 2008) e fezes (Davison et al, 1987; Villarejos et al, 1974). Contudo, há a necessidade de uma investigação mais detalhada com relação à transmissão do HBV por meio do aleitamento materno (Zheng et al, 2011).

Diagnóstico

O diagnóstico da infecção pelo vírus da hepatite B é realizado por meio de exames clínicos e laboratoriais. Dentre os exames laboratoriais, as dosagens bioquímicas das aminotransferases (níveis de alanina aminotransferase-ALT ou transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) e de aspartato aminotransferase-AST ou transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) são de grande importância, não só para o diagnóstico como também para acompanhamento clínico e tratamento da doença. Entretanto, a detecção dos marcadores sorológicos do HBV é uma importante ferramenta para a confirmação da infecção (Nascimento et al, 2012).

Testes sorológicos foram desenvolvidos para a identificação dos antígenos virais (HBsAg e HBeAg) e anticorpos (anti-HBs, anti-HBe, anti-HBc total e anti-HBc IgM) (Lai et al, 2003; Peter, 1997). Mais recentemente, testes de biologia molecular para detecção do DNA viral, como a PCR em tempo real, permitem a pesquisa qualitativa e quantitativa do genoma viral (Moreira et al, 2010). Os testes mais utilizados no diagnóstico sorológico são os ensaios imunoenzimáticos (Pawlotsky et al, 2008).

Os achados sorológicos variam nas fases de evolução da doença, e a

dinâmica da presença dos marcadores reflete a replicação do vírus e a resposta imune dos infectados (Hoofnagle, 1983). Em indivíduos recentemente infectados, o antígeno de superfície (HBsAg) é o primeiro marcador sorológico a surgir, sendo detectável durante o período de incubação, cerca de duas a sete semanas antes dos sintomas, persistindo por um período de até 180 dias, desaparecendo cerca de quatro a cinco meses após a exposição (da Silva et al, 2012).

Na recuperação da infecção, os títulos de HBsAg desaparecem após seis meses, e emerge o anticorpo específico (anti-HBs) que se mantém detectável no soro por toda a vida do paciente, funcionando como o anticorpo protetor da hepatite B (marcador de imunidade). A positividade para o anti-HBs e a negatividade de todos os outros marcadores correspondem à resposta imune à vacina contra o HBV (Liang, 2000; Okanoué & Minami, 2006; Van Der Eijk et al, 2006). No período denominado de “janela imunológica”, compreendido entre a clarificação do HBsAg e o surgimento do anti-HBs, ambos permanecem indetectáveis, somente o anti-HBc está presente (Gonçales Júnior, 2002).

O antígeno HBc (HBcAg), proteína estrutural do capsídeo viral, presente nos hepatócitos infectados, não é comumente detectado no soro, é um potente imunógeno que induz a formação de anti-HBc e aparece logo após o surgimento do HBsAg (Custer et al, 2004). O anti-HBc total é detectável em pacientes que foram expostos ao HBV, não é um anticorpo protetor, e representa as frações IgM e IgG que são importantes na distinção da infecção atual e passada pelo vírus: a) o anti- HBc IgM é marcador de infecção recente, o único que define a etiologia da infecção como hepatite B aguda e é o primeiro anticorpo a ser detectado cerca de um mês após o aparecimento do HBsAg, e é detectável por cerca de seis meses; b) o anti- HBc IgG é um marcador de longa duração, presente nas infecções agudas, crônicas ou na infecção antiga pelo vírus B já curada, representa contato prévio com o HBV e memória imunológica (Hollinger, 2008). O anti-HBc total é considerado um marcador de infecção pregressa do HBV e pode persistir com anti- HBs em pacientes com quadros de infecção passada com consequente imunidade ao HBV (Gonçales & Cavalheiro, 2006).

Na hepatite crônica, ocorre a persistência de positividade do HBsAg, associada à detecção do antígeno HBeAg que está relacionado à intensa replicação viral e à infecciosidade, e sua presença usualmente se associa à positividade do DNA do HBV, no soro, com alto risco de transmissão da infecção. Pode persistir por dez semanas na fase aguda e, em pacientes crônicos, está associado a um mau prognóstico, refletindo a persistência da infecção viral e maior taxa de transmissão (El Khouri & Santos, 2004). O desaparecimento do HBeAg e o surgimento do anti-HBe sugerem diminuição ou ausência da replicação viral e se associam à negatificação do HBV-DNA no soro e à normalização das aminotransferases (Hadziyannis & Vassilopoulos, 2001) (Figura 5)

Afirma-se que a infecção crônica é resolvida quando o paciente apresenta história prévia de hepatite crônica, positividade sorológica para anti-HBc total, HBsAg negativo, níveis normais de ALT e DNA-HBV sérico indetectável, com ou sem soroconversão para anti-HBs (Fonseca, 2007; Paraná et al, 2006).

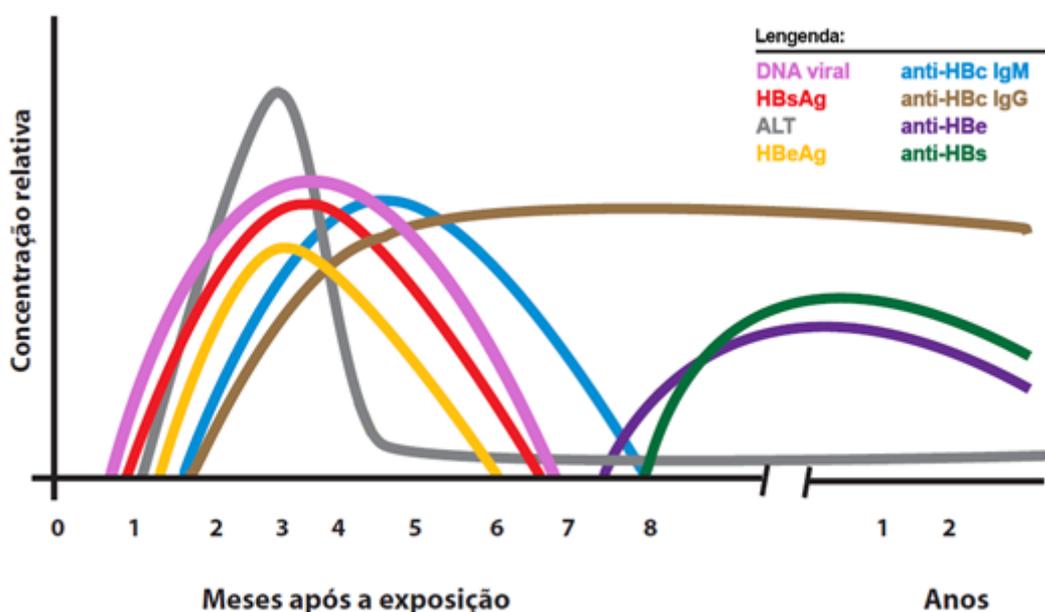


Figura 5. Marcadores sorológicos e molecular da infecção pelo HBV. O primeiro marcador a ser detectado é o DNA viral. Dentre os marcadores sorológicos, o HBsAg é o primeiro que circula, aparecendo aproximadamente um mês após a exposição e desaparecendo cerca de 6 meses para as infecções com cura. Após o HBsAg, aparece o anti-HBc IgM. O anti-HBc IgG aparece em seguida ao anti-HBc IgM e pode ser detectável por muitos anos após a doença. Neste mesmo período agudo aparece o HBeAg, que indica replicação viral. Nesta fase inicial da infecção também estão aumentados os níveis de alanina aminotransferase (ALT), enzima que indica lesão no fígado. Após o desaparecimento dos antígenos, surgem os anticorpos, representado pelo aparecimento do anti-HBe e o anti-HBs. <http://www.saude.gov.br/bvs>.

Tratamento

O tratamento para HBV tem como objetivo prevenir o desenvolvimento da cirrose hepática e/ou Carcinoma Hepatocelular (CHC), por meio da antecipação da soroconversão do HBeAg-positivo em anti-HBe. Diante disso, o tratamento consiste em dois tipos de agentes terapêuticos: Interferon e os análogos de nucleosídeos ou de nucleotídeos (AN). Os interferons compreendem o interferon convencional, de difícil emprego no tratamento da HBV devido à necessidade de altas dosagens diárias, e o interferon peguilado. Os AN compreendem aos medicamentos lamivudina (LVD), o adefovir (ADV) e o entecavir (ETV), que são inibidores de replicação viral, porém o seu uso por longo tempo pode selecionar cepas resistentes.

Varios avanços ocorreram nas últimas décadas no que se refere à prevenção e ao controle das hepatites virais, tais como: melhoras na identificação dos agentes virais, o desenvolvimento de testes laboratoriais específicos, maior eficácia no rastreamento dos indivíduos infectados e o surgimento de vacinas protetoras (Roberto, 2007).

A vacina contra o HBV é a forma mais eficaz para a prevenção da hepatite B e tem proporcionado grande avanço no controle desta enfermidade. (Carvalho & Araújo, 2008). A primeira vacina disponível para prevenir hepatite viral foi contra o HBV, desenvolvida no início dos anos 1980 e feita com plasma humano. Posteriormente, foi substituída por vacinas produzidas por meio da técnica do DNA recombinante. O antígeno utilizado nas vacinas disponíveis atualmente é um HBsAg recombinante produzido em fungo. Esta proteína recombinante é purificada e adsorvida em hidróxido de alumínio, sendo que o produto final contém mais de 95% de proteína HBsAg, menos de 5% de proteínas derivadas do fungo e nenhum DNA do fungo detectável na vacina (Ferreira & Silveira, 2004).

Justificativa

Os baculovírus têm sido utilizados amplamente como vetores de expressão de genes heterólogos em células de inseto e extensivamente pela área médica nos últimos anos. Deste modo, inúmeras proteínas de importância médica e econômica foram expressas em níveis elevados aplicando esse sistema (Miller, 1997; van Oers et al, 2015).

A produção do antígeno de superfície HBsAg fusionado à proteína poliedrina do baculovírus é uma estratégia promissora para expressão e purificação destas proteínas em larga escala para fins biomédicos.

O HBsAg tem um papel fundamental no diagnóstico e prevenção da hepatite B. Este antígeno é o marcador sorológico indicativo de infecção presente pelo HBV, bem como, o único componente da vacina contra o HBV.

Atualmente, não existem indústrias ou empresas nacionais disponíveis para a produção escalonável do HBsAg. Perante isso, os insumos são importados tanto para fins vacinais como para o diagnóstico. Assim, a expressão da porção 'small' do antígeno HBsAg (sHBsAg) em células de inseto proposto por este projeto poderá ajudar no desenvolvimento de kits diagnósticos para a Hepatite B no país, e ser um interessante passo para se pensar uma alternativa de produção de antígeno vacinal nacional.

Araújo (2011), trabalhando com o HBV, obteve sucesso na construção de um baculovírus recombinante expressando a sHBsAg fusionada à região 5' do gene da poliedrina do baculovírus AcMNPV (AcPH), porém não obteve o sucesso na fusão à região 3' do gene da poliedrina. A análise da expressão da proteína recombinante em células de inseto infectadas revelou que a proteína recombinante sHBsAgAcPH foi produzida tanto *in vitro* (células de inseto em cultura) como *in vivo* (larvas de *Spodoptera frugiperda*). Os testes utilizando extratos de células de inseto com o vírus recombinante contendo a proteína sHBsAgAcPH e corpos de oclusão purificados em gradiente de sacarose a partir de cadáveres de insetos, foram capazes de ser reconhecidos em kits de diagnósticos no Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF). Entretanto, esses corpos de oclusão não possuíam uma forma definida e sua purificação livre de contaminantes não foi possível. Desta forma,

a construção de vetores para formação de novos corpos de oclusão com forma parecida com a do vírus selvagem seria importante para melhorar sua purificação e para posterior uso nos testes de imuno-ensaio (EIA), realizados no LACEN-DF.

Diante desta abordagem testada, além da fusão na região 5' do gene da poliedrina para o sHBsAg foram pensadas novas estratégias para melhorar a produção e purificação dos insumos.

Assim, neste trabalho novas estratégias de fusão dos genes sHBsAg e *polh*, bem como a expressão de uma cópia extra do gene *polh* do baculovírus AcMNPV foram testadas. Esta segunda estratégia teve como objetivo permitir que os corpos de oclusão apresentem o formato próximo do selvagem, além disso, tornem-se mais fáceis de serem purificados por centrifugação em gradiente de sacarose com redução de contaminantes. A facilidade de produção, isolamento de poliedros recombinantes contendo proteínas de interesse e a natureza estável dos poliedros sugerem que essa abordagem poderá ser uma excelente ferramenta alternativa para vacinação e uso em diagnóstico de vertebrados.

Outra aplicação para estas construções será a utilização como imunomoduladores. Os corpos de oclusão de baculovírus recombinantes, quando em contato com células de mamíferos *in vivo*, são capazes de ativar a resposta imunológica, de maneira antígeno específica (Bocca et al, 2013).

Objetivos

Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi produzir novos antígenos derivados do HBV em insetos e culturas de células e avaliá-los em testes diagnósticos comumente utilizados nos laboratórios de análises clínicas.

Objetivos específicos

- ❖ Construir baculovírus recombinantes contendo o gene *sHBsAg* fusionado ao gene da poliedrina do baculovírus AcMNPV na região 3' e outros dois vetores (fusionado em ambos os lados da poliedrina) com mais uma cópia do gene da poliedrina selvagem visando a produção de um corpo de oclusão mais próximo dos produzidos pelo vírus selvagem.
- ❖ Analisar a expressão das proteínas recombinantes fusionadas (sHBsAg) em insetos e culturas de células de inseto;
- ❖ Padronizar um método de purificação de corpos de oclusão contendo as proteínas heterólogas a partir de cadáveres de insetos infectados pelo vírus recombinantes;
- ❖ Testar os antígenos produzidos em testes diagnósticos comumente utilizados nos laboratórios de análises clínicas, que consistem nos testes imunoenzimáticos (ELISA).

Materiais e Métodos

Vírus e Células

Os vírus AcMNPV e o baculovírus recombinante vAc-6xHis-sHBsAg-AcPH, contendo o gene sHBsAg fusionado à região 5' do gene *polh* de AcMNPV (Araujo, 2011), e os baculovírus recombinantes construídos nesse trabalho, todos derivados do bacmídeo bMON14272 (Bac-to-Bac “Baculovirus Expression System”, Invitrogen) foram utilizados. Os vírus foram propagados em cultura de células *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4 ou Tn5B) (Granados et al, 1994) e/ou larvas de *Spodoptera frugiperda*, no terceiro instar. Essas células foram mantidas em meio TC-100 (Gibco-BRL) com 10 % de soro fetal bovino a 28 °C e as larvas a 25°C, com dieta artificial (Greene et al, 1976).

Células de *Escherichia coli* DH10 β (Invitrogen) foram utilizadas como hospedeiras para maioria dos plasmídeos utilizados no presente trabalho. No entanto, experimentos envolvendo Bac-to-Bac “Baculovirus Expression System” (Invitrogen), foram utilizadas células *Escherichia coli* DH10Bac (Invitrogen).

Obtenção e clonagem do antígeno sHBsAg

Foram inseridos, por meio de iniciadores específicos, sítios para a enzima de restrição *Nco* I em ambas as extremidades do gene, de modo a permitir a fusão do epítipo do HBV na região 3' da poliedrina. As reações de PCR foram realizadas em termociclador marca Swift Max (ESCO[®]), analisadas por eletroforese em gel de agarose (Joseph & David, 2001) e fotografadas em um fotodocumentador (Alfa Innotec). Os fragmentos observados foram cortados do gel com auxílio de uma lâmina e purificados utilizando-se 'GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit' (GE Healthcare). Os fragmentos purificados foram clonados no vetor pGem[®]-T easy (Promega) de acordo com instruções do fabricante. Posteriormente, os plasmídeos obtidos foram sequenciados (Macrogen Inc., Coreia do Sul) usando iniciadores T7 e SP6 que se pareiam em regiões presentes no plasmídeo comercial usado.

Clonagem do gene sHBsAg na região 3' do gene *polh* do AcMNPV e em um vetor contendo um gene *polh* extra

Um plasmídeo doador, previamente construído, foi utilizado para clonagem do gene sHBsAg. Esse plasmídeo é derivado do vetor comercial pFastBac1[®] (Invitrogen), que permite fusão de genes de interesse à região 3' (pFastAcPH3) da poliedrina do AcMNPV (Araujo, 2011). Este vetor apresenta o gene da poliedrina com o códon de terminação natural deletado, um sítio de restrição para *Nco* I e uma cauda de hexa-histidina em fase, ambos na região carboxi-terminal da proteína (Figura 7-a). O plasmídeo pGem-sHBsAg contendo o gene de interesse foi digerido com *Nco* I, submetido a reação eletroforética e a banda liberada foi purificada e utilizada para clonagem no plasmídeo doador pFastAcPH3 previamente digeridos com a mesma enzima e defosforilado. O plasmídeo resultante foi confirmado por PCR com iniciadores específicos, por digestão e sequenciamento (Macrogen, Coreia do Sul). Depois da construção do vetor contendo o gene sHBsAg fusionado ao gene da poliedrina do AcMNPV, o gene quimera foi amplificado utilizando oligonucleotídeos específicos e clonado

no vetor de clonagem pGEM®-T easy como descrito acima. O plasmídeo foi amplificado em *E. Coli* DH10β (Invitrogen) e o fragmento contendo o gene químera removido do plasmídeo utilizando enzimas de restrição específica e clonados no vetor pFastBac1/AccI-PSX (Ardisson-Araújo et al, 2013b). O vetor pFastBac1/AccI-PSX é derivado do vetor comercial pFastBac1 e possui uma cópia do gene da poliedrina e um sítio de multiclonagem para clonagem de genes heterólogos sob o comando do promotor híbrido pSyn/pXIV (Figura 7-b) (Wang et al, 1999).

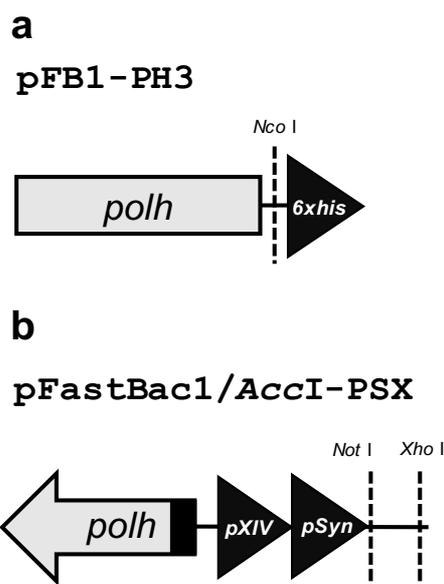


Figura 6. Esquema das duas regiões usadas para fusão da região 'small' do antígeno HBsAg à poliedrina. (a) Região de interesse do plasmídeo de fusão pFastAcPH3, mostrando o sítio de *Nco* I para clonagem do antígeno e a cauda de hexa-histidina. (b) Região de interesse do plasmídeo de fusão pFastBac1/AccI-PSX, mostrando o gene extra da poliedrina, os promotores híbridos pSyn/pXIV e o sítio de *Not* I e *Xho* I para clonagem do antígeno sHBsAg.

Obtenção de baculovírus recombinantes para expressão da região sHBsAg fusionada à poliedrina

Os plasmídeos de fusão gerados contendo os genes químericos (genes de interesse fusionado a *polh* na região 3' ou plasmídeo com gene extra da poliedrina selvagem) foram utilizados para construção de baculovírus recombinante via sistema Bac-to-bac (Invitrogen), conforme instruções do fabricante.

Produção *in vitro* da proteína quimera sHBsAg

Um micrograma (μg) do DNA plasmidial dos bacmídeos recombinantes gerados, foram utilizados para transfectar 10^6 células de inseto (Tn5B). Foi adicionado um volume de 10 microlitros (μL) de DNA plasmidial dos bacmídeos (1 μg) em 90 μL de meio de cultura TC-100 sem soro (Gibco-BRL) em placas de 35mm e misturado. Posteriormente, foram adicionados 6 μL de lipossomos catiônico da marca FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega). A mistura contendo os lipossomos/DNA de cada bacmídeo foram misturados e incubados por 15 min à temperatura ambiente.

Placas com 10^6 células em dois mL foram incubadas com a mistura lipossomos/DNA de cada bacmídeo por 4 horas a 28°C. Após 4 horas, a placa foi recomposta com mais dois mililitro (mL) de meio de cultura TC-100 contendo 10% de soro fetal bovino e incubada a 28°C por sete dias. As células de inseto que foram transfectadas com o DNA do baculovírus recombinante foram capazes de produzir vírus, pois como é sabido que o DNA nu do baculovírus é infectivo (Burand et al, 1980). Em uma nova placa de 75 cm², contendo 5×10^6 células de inseto Tn5B foram adicionados 500 μL do sobrenadante da transfecção para amplificação dos vírus recombinantes. O DNA viral foi purificado pelo método de mini preparação como descrito por (O'Reilly et al, 1992). O DNA extraído foi utilizado para confirmação por meio de uma reação de PCR para os genes heterólogos.

Analises microscópicas

Monocamadas de células Tn5B (aproximadamente 10^5 células) foram incubadas com meio contendo multiplicidade de infecção (termo geralmente abreviado por m. o. i., do inglês, *multiplicity of infection* que representa o número de partículas virais maduras e infectivas [vírions] para cada célula) de 10 vírus/célula com os vírus recombinantes. As células infectadas foram observadas e fotografadas a 72 h p.i. em um microscópio de luz invertida Axiovert 100 (Zeiss). Para microscopia eletrônica de varredura (MEV), os possíveis cristais purificados de cadáveres de inseto foram lavados com PBS

1X. Posteriormente, as amostras foram desidratadas com uma série ascendente de acetona para serem secas ao ponto crítico (Balzer CPD30) e cobertas com ouro no aparelho “sputter coater” (Balzer SCD 050). As amostras foram, então, analisadas no microscópio de varredura JEOL JSM 840 a 10 kV.

Análise da expressão e purificação das proteínas recombinantes em larvas de *Spodoptera frugiperda* e em cultura de células de insetos

Aproximadamente 10 µL do sobrenadante de células Tn5B (96 h p.i.) infectadas com o vírus recombinantes (10^6 vírus em forma de fenótipo BV) foram injetados em larvas de *Spodoptera frugiperda* quarto instar, no segundo par de falsas patas por meio de uma agulha e seringa de 1mL. As larvas foram separadas individualmente para que não houvesse canibalismo e alimentadas com dieta artificial preparada segundo (Hoffmann-Campo et al, 2003). Após 5 dias, as larvas já apresentavam estágio avançado de infecção, tais como perda do apetite, clareamento da epiderme devido ao acúmulo de vírus nos núcleos das células epidermais e adiposas, parada no desenvolvimento larval e letargia (Federici, 1997). No sexto dia pós-infecção, as larvas estavam mortas ou em processo de morte. Após a morte, os cadáveres foram homogeneizados com o mesmo volume de PBS (p/v), filtrado com gaze e centrifugado a 7.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento (“pellet”) ressuscitado em um volume de 5% Triton X-100 e centrifugado a 7,000 x g por 10 min (duas vezes). O último “pellet” foi ressuscitado em 0,5 M NaCl, centrifugado como descrito acima, e ressuscitado com PBS. Todas as soluções continham inibidor de protease que inibe serina, cisteína e metaloproteases (Protease Inhibitor Cocktail -Sigma). As soluções ressuscitadas foram colocadas em um gradiente descontínuo de sacarose (40-80% de sacarose em Phosphate Buffered Saline [PBS], 137,0 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,0 mM Na₂HPO₄, 2,0 mM KH₂PO₄, pH 7,4) e centrifugada a 130.000 x g por 75 min. As bandas que continham os possíveis cristais foram removidas do gradiente, diluídas em ddH₂O, e centrifugadas a 7.000 x g por 10 min, o “pellet” foi ressuscitado em um mL de PBS e estocados a -20°C.

Uma alíquota de 10 µL desses possíveis cristais purificados de larvas foram analisados por eletroforese em dois géis desnaturantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% (Green & Sambrook, 2012). Um dos géis foi corado e fixado em solução de 40 % de metanol e 10 % de ácido acético e azul de Coomassie 0,1 %, por cerca de 16 h e descorado em solução de 40 % de metanol e 10% de ácido acético por 4 h, sob leve agitação. O outro gel foi utilizado para transferência das proteínas para uma membrana de Nitrocelulose (GE Healthcare), para o experimento de imuno-deteccção de proteínas (“Western-blot”) abaixo descrito. As proteínas foram transferidas para membrana de Nitrocelulose, usando-se o aparato de transferência da Bio-Rad (Trans-Blot® SD – Semi Dry Transfer Cell, para transferência semi-seca), de acordo com o protocolo do fabricante e com tampão de transferência Bjerrum and Schafer-Nielsen (48 mM de Tris; 39 mM de glicina; 20 % metanol, pH 9,2). Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução de PBS 1X e 3 % de leite em pó desnatado por 16 h a 4°C, sendo em seguida processada para a imuno-marcação. O primeiro passo foi lavar a membrana por 3 vezes com PBS Tween (0,05 %) para retirar toda a solução de bloqueio e em seguida colocar a membrana em uma solução de PBS/albumina bovina (BSA) 0,5 % adicionada do anticorpo primário anti-6xHIS (GE Healthcare) de coelho por 1 h. Essa solução foi então descartada e a membrana foi lavada novamente por 3 vezes em PBS Tween (0,05 %) sob agitação suave. A seguir, a membrana foi colocada em uma solução de PBS/BSA 0,5 % contendo o anti-IgG de coelho conjugado à enzima fosfatase alcalina (Sigma) por mais uma 1 h sob agitação suave. Esta solução foi então, retirada e a membrana é lavada novamente com PBS Tween (0,05%) por 3 vezes e com o tampão da enzima fosfatase alcalina por 5 min com agitação suave. O revelador foi adicionado logo a seguir, trata-se de uma solução de NBT/BCIP (Promega). A combinação de NBT (cloreto de tetrazólio nitro-azul) e BCIP (sal de 5-bromo-4-cloro-3'-p-toluidina indolil fosfato) produz um insolúvel precipitado negro-púrpura intensa quando reage com fosfatase alcalina, que é uma popular enzima conjugada para sondas de anticorpo. A reação precisa ser interrompida com sucessivas lavagens com água destilada para que não ocorra marcação inespecífica ou dano à qualidade do resultado obtido.

Imunização e produção de antissoro

Os cristais de Polh de AcMNPV e os possíveis cristais fusionados com HBsAg na amino-terminal (6xhis-HBsAg-Polh) purificados de células de insetos/larva por gradiente de sacarose foram dissolvidos por uma hora a 37 °C em 0.1 M de Na₂CO₃ ou até a dissolução de todos os cristais, neutralizados com 0.1 M de Tris-HCl (pH 7.6), e submetidos a quantificação de proteína total utilizando Quant-iT™ assay kit (Thermo Scientific) seguindo as instruções do fabricante. Os cristais de POLH e os cristais recombinantes previamente quantificados por sua totalidade proteica e utilizados para imunização em Camundongos Balb/c de 6-8 semanas por via subcutânea, foram utilizados a concentração de 100µg de proteína total em um volume final de 200µL em intervalos de 15 dias entre cada imunização. A primeira inoculação foi ministrada com adjuvante incompleto de Freund (Sigma Aldrich) na proporção de 1:1, a segunda e a terceira imunização foi ministrada somente com os cristais. Após 15 dias da última imunização, os camundongos foram sacrificados e o sangue periférico obtido por retroorbital para obtenção do soro.

Imunoensaio

Os possíveis cristais fusionados com sHBsAg purificados de larva por gradiente de sacarose foram quantificados utilizando Quant-iT™ assay kit (Thermo Scientific) seguindo as instruções do fabricante. Foram realizados testes sorológicos imunoenzimáticos, ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) direto do tipo *sanduíche*, método que se baseia na interação anticorpo-antígeno. As cavidades da placa de ELISA foram cobertas com 50µL (0,5ng/mL) antígeno sHBsAg fusionada a poliedrina (proteína recombinante). Pós incubação de uma hora por 37°C, utilizamos como controle positivo, soro/plasma contendo anticorpos anti-HBsAg comercial e controle negativo, soro/plasma sem anticorpos anti-HBsAg comercial (Wama Diagnóstica) que foram adicionadas 50µL às cavidades juntamente com um conjugado HBsAg marcado com peroxidase, porém o “branco” continha soro/plasma sem anticorpos anti-HBsAg e conjugado. Após a incubação de uma hora por 37°C, ocorre a formação de um complexo antígeno-anticorpo-antígeno representado pelo conjugado HBsAg

marcado com peroxidase, pelo anticorpo anti-HBsAg da amostra e pelo antígeno HBsAg ligado à cavidade da microplaca. O material não ligado é removido por lavagem de cinco vezes com tampão salino-fosfato (PBS), pH 7,4, contendo Tween 20 como detergente. Um substrato (Tetrametilbenzidina [TMB] + peróxido de hidrogênio) foi adicionado, o qual desenvolve cor azul nas cavidades onde a enzima peroxidase estiver presente, indicando a presença do anticorpo anti-HBsAg. A adição de uma solução de parada da reação enzimática (ácido sulfúrico H₂SO₄ 1,0 M), produz uma mudança de cor da solução para amarela. A absorbância foi então medida a 450 nm em leitor de placa de ELISA. A concentração do anticorpo anti-HBsAg é diretamente proporcional a intensidade da cor da reação. Os resultados foram calculados em relação aos soros controles e densidade óptica (D.O.), cujo valor final é obtido subtraindo da leitura da D.O. do “branco”. O resultado deve ser interpretado de acordo os controles negativos, onde divide se o valor da D.O. da amostra pelo valor do *cut-off*. O teste é considerado reagente se o valor for duas vezes o valor do controle negativo.

Resultados

Obtenção e clonagem antígeno sHBsAg

O fragmento contendo a região codificadora da proteína sHBsAg (Figura 8-A) foi amplificada por PCR a partir do DNA viral de células de inseto transfectado com o vírus recombinante vAc-6xHis-sHBsAg-AcPH (Araujo, 2011), utilizando os pares de *iniciadores* pFast-AminoR e pFast-AminoF (Tabela 2), gerando um fragmento de 1.452 pares de base (Figura 8-B). Esse fragmento foi purificado do gel e ligado no vetor de clonagem pGem®-T easy gerando o pGEM-sHBsAg-AcPH com 4.482pb (Figura 8-C). O plasmídeo recombinante foi obtido e sua sequência confirmada por digestão e sequenciamento.

A

6xHis-sHBsAg

```

ATGCAATCATCATCATCATCCATGGAGAACATCACATCAGGATTCCTAGGACCCCTGC TCGTGTTCAGGCGGGGTTTCTCTGTTGACAAGAAATCCCTACAATA
CCGCAAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTCTAGGGGGATCACC CGTGTGTC TTGGCCAAATTCGACGTCC CCAACCTC CAATCACT CACCAACCTCC
TGTCC TCCAATTTGTCC TGGT TATCGCTGGATG TGTCTGCGGGT TTTATCATATTCCTCTTCATCCTGCTGCTATGCTCATCTCTTATTGGTTC TTCTGGATTAT
CAAGGTATGTTGCCCGT TTTGTCTCTAAT TCCAGGAT CAACAACAACCA GTACGGGACCAT GCAAACCTGCACGACTCCTGCTCAAGGCAACTCTAAGTTTCCCTCA
TGTGCTGTACAAACC TACGGATGGAAA TTGCACCTGTAT TCCCATCCATC GTCC TGGGCTTTCGCAAAATACCTATGGGAGT GGGCTCAGTCCGTTTCTCTTGG
CTCAGTTTACTAGTGCATTTGTT CAGTGGTTC GTAGGGCTTTCCCCCACTGT TTGGCTTT CAGCTATA TGGATGATGTGGTATTGGGGCCAAGTCTGTACAGCATC
GTGAGTCCCTTTA TACCGCTGTACCAATTTCTTTTGTCTCTGGGTATACATTTCCATGG
  
```

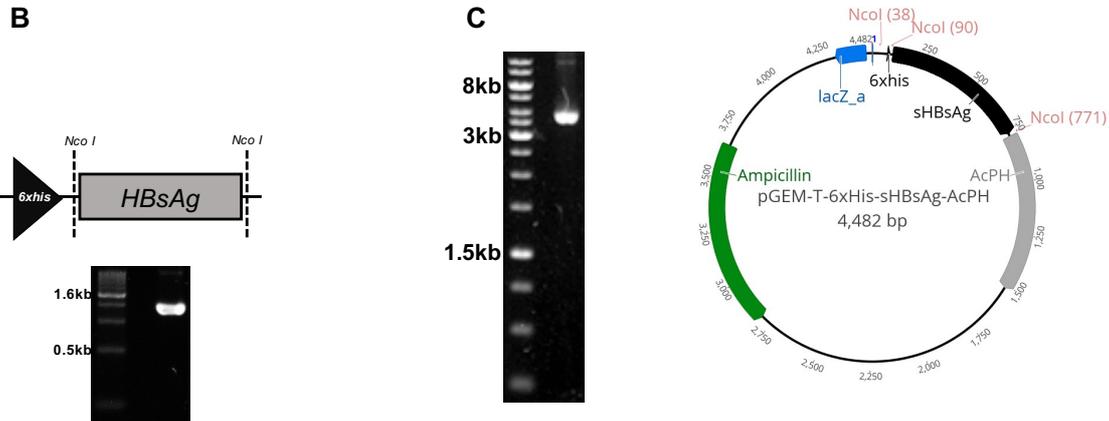


Figura 7. Esquema mostrando a sequência de construção do vetor pGem-HBsAg. (A) Sequência nucleotídica do gene 6xHis-sHBsAg. (B) esquema do fragmento do gene HBsAg e gel de agarose 0,8% com o fragmento de PCR apresentando 1.452pb, resultado da reação de PCR com os iniciadores pFast-AminoR e pFast-AminoR, e (C) gel de agarose 0,8% mostrando o fragmento de DNA correspondente ao o pGEM-sHBsAg-AcPH com 4.482pb e o mapa do plasmídeo recombinante derivado do vetor pGem®-T easy gerado.

Construção do vetor de transferência pFastAcPH3-sHBsAg e pFastBac1/Accl-PSX-6xHis-sHBsAg-AcPH

Para a construção do pFastAcPH3-sHBsAg e pFastBac1/Accl-PSX-6xHis-sHBsAg-AcPH o pGEM-T-6xHisHBsAg foi digerido com a enzima *Nco* I liberando um fragmento de aproximadamente 700 pb que representa o gene sHBsAg (Figura 9-a e A), para ligação no pFastAcPH3 (Figura 9-b e B), e com *Xho* I/*Eco*R I, gerando um fragmento de aproximadamente 1.473pb da fusão sHBsAg-AcPH (Figura 10-a e A) para ligação no pFastBac1/Accl-PSX (Figura 10-b e B). Após eletroforese em gel de agarose a 0,8%, as bandas foram eluídas e ligadas aos seus respectivos vetores previamente digeridos com *Nco* I ou *Xho* I/*Eco*R I, dando origem ao plasmídeo pFastAcPH3-sHBsAg (Figura 9-c e C). Esses plasmídeos foram sequenciados e para confirmação da orientação da clonagem, o pFastAcPH3-sHBsAg foi digerido com a enzima *Hind* III (~1.297bp)

(Figura 9-D) e o pFastBac1/Accl-PSX-6xHis-sHBsAg-AcPH foi digerido com *Hind* III (Figura 10-C).

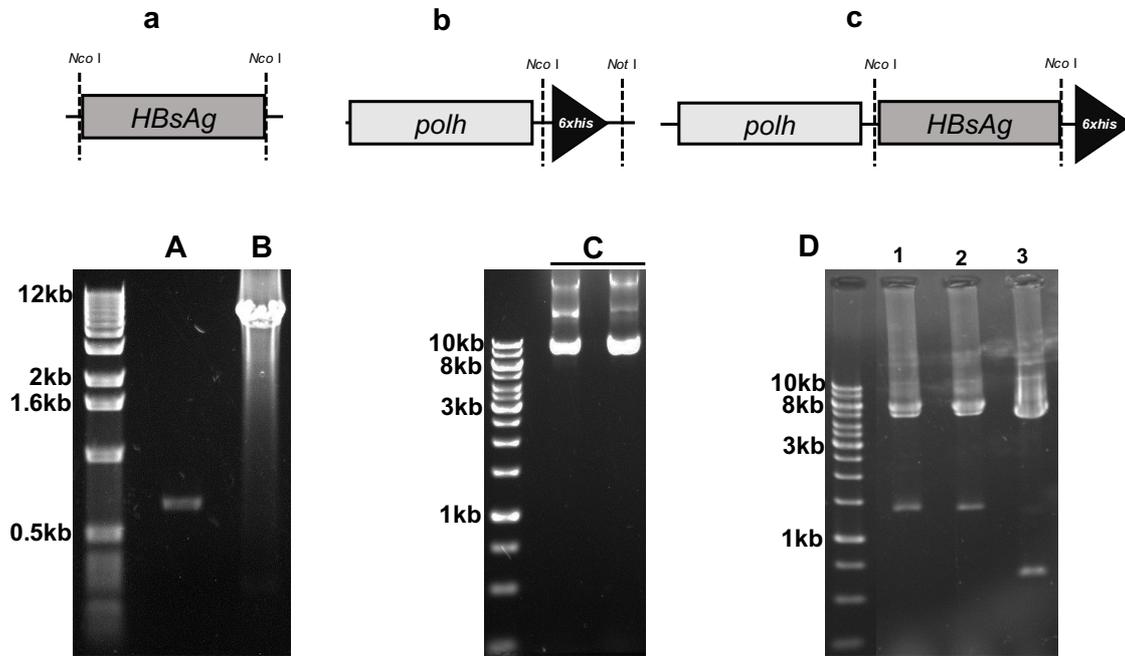


Figura 8. Construção do vetor de transferência pFastAcPH3sSHBsAg. a, b e c mostram os esquemas dos genes HBsAg, *polh* e fusão *polh*-HBsAg, respectivamente, com a posição dos sítios para as enzimas de restrição *Nco* I e *Not* I. (A) Gel de agarose 0,8% mostrando fragmento de 700 pb que foi purificado a partir da digestão do DNA do plasmídeo pGEM-T-6xHisHBsAg com a enzima *Nco* I. (B) Fragmento de DNA do plasmídeo pFastAcPH3 digerido com a enzima *Nco* I e desforilado. (C) DNA do plasmídeo de transferência pFastAcPH3sSHBsAg e (D) o mesmo vetor digerido com a enzima *Hind* III, (1 e 2) orientação correta liberando um fragmento de aproximadamente 1.297bp e (3) orientação errada. Em b e c, 6xhis representa seis histidinas.

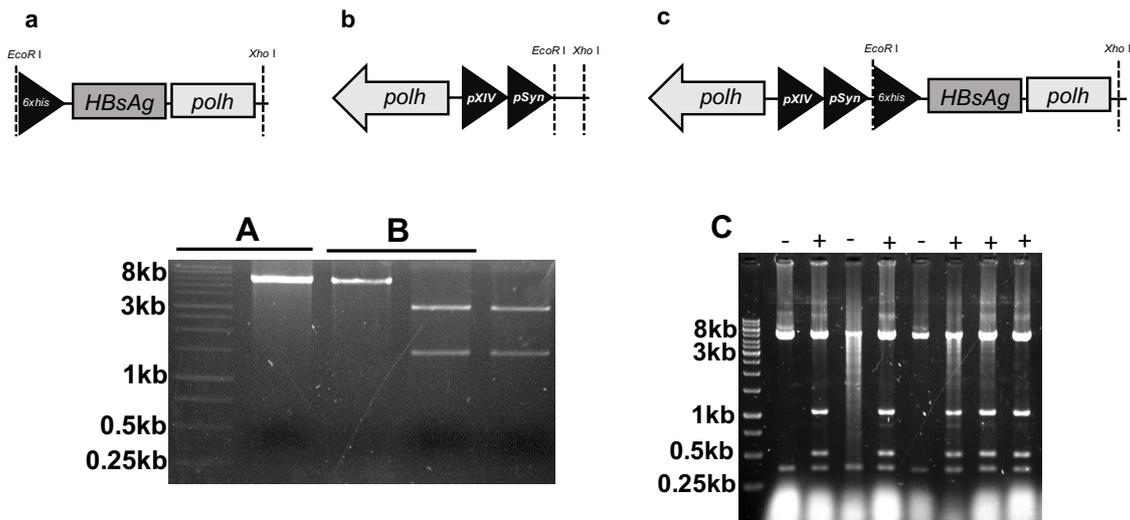


Figura 9. (a, b e c) Esquema da construção do vetor de transferência pFastBac1/Accl-PSX-6xHis-sHBsAg-AcPH (com o gene extra da poliedrina do AcMNPV). (A) Vetor pGEM-T-6xHisHBsAg foi digerido com a enzima *Xho* I/*Eco*R I liberando um fragmento de aproximadamente 1.473pb do sHBsAg-AcPH. (B) pFastBac1/Accl-PSX digerido com a enzima *Xho* I/*Eco*R I. (C) o mesmo vetor agora nomeado pFastBac1/ Accl-PSX-6xHis-sHBsAg-AcPH

digerido com a enzima *Hind* III, sendo a orientação correta liberando quatro fragmentos de 5.100, 1.284, 440 e 356 pb e a orientação errada somente dois fragmentos de 5.100 e 356 pb referente ao vetor vazio. (+) orientação correta e (-) orientação errada.

Construção do vírus contendo as fusões PH3sHBsAg e Accl-PSX-6xHis-sHBsAg-AcPH

Os vírus contendo as fusões gênicas PH3sHBsAg e Accl-PSX-6xHis-sHBsAg-AcPH foram gerados utilizando o sistema Bac-to-bac (Invitrogen), conforme instruções do fabricante, sendo denominados vAcPHHB1 e vAcHBsPH2. O DNA do possível vAcPHHBs foi confirmado por PCR utilizando os iniciadores M13F e R, gerando uma banda de aproximadamente 3.500pb (Figura 11 A, poço 4) e o vAcHBsPH2 foi confirmado utilizando os iniciadores HBSAgRNco ICOMHIS e M13F (Tabela 2), gerando uma banda de 3.298pb (Figura 12-A, poços 3, 4 e 6).

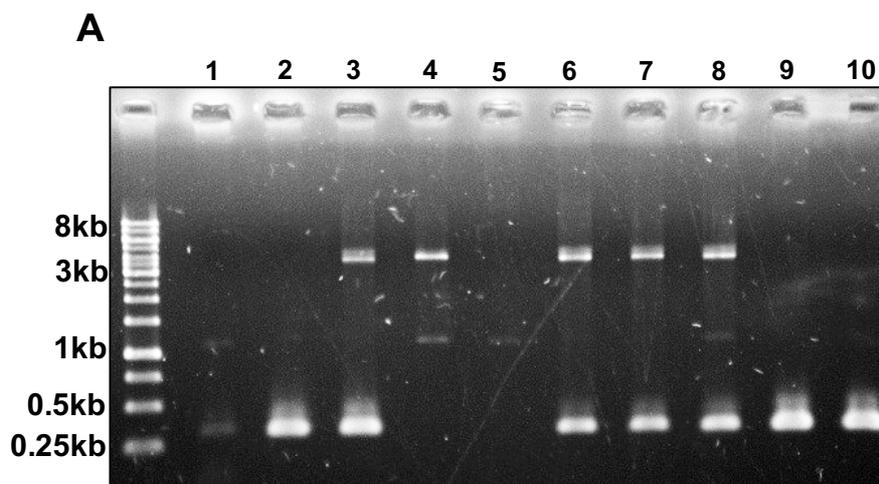


Figura 10. Confirmação da construção do bacmídeo vAcPHHBs. (A) gel de agarose a 0,8% mostrando resultado da PCR de possíveis clones contendo o bacmídeo recombinante. O plasmídeo pFastAcPH3sHBsAg contendo o gene HBsAg foi transformado em células DH10-Bac. Além do gene sHBsAg, o cassete contém um gene de resistência a gentamicina, o promotor da poliedrina, o gene da poliedrina em fusão com o gene sHBsAg e uma cauda de 6 histidinas. O cassete foi transposto para o bacmídeo interrompendo o peptídeo lacZ- α e evitando a α -complementação da enzima β -galactosidase e denominado vAcPHHB1. Após coleta das colônias recombinantes, a presença do gene sHBsAg foi confirmada por PCR utilizando os iniciadores M13F e M13R gerando um fragmento de tamanho de 3.500pb. A amostra de número quatro foi selecionada para continuar com os experimentos.

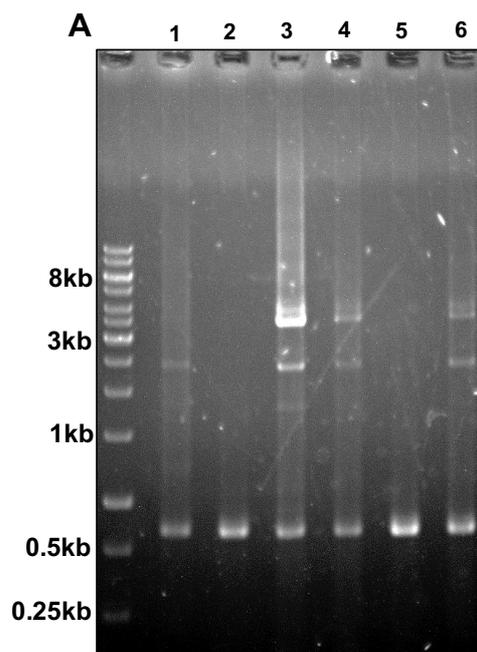


Figura 11. Confirmação da construção do bacmideo bacvAcHBsPH2. (A) O plasmídeo Accl-PSX-6xHis-sHBsAg-AcPH contendo o gene sHBsAg-AcPH foi transformado em células DH10-Bac. O cassete contém o gene sHBsAg fusionado na região 5' do AcPH (sHBsAg-AcPH), mais um gene extra da poliedrina do AcMNPV, um gene de resistência a gentamicina e uma cauda de 6 histidinas. O cassete foi transposto para o bacmídeo interrompendo o peptídeo lacZ- α evitando a α -complementação da enzima β -galactosidase e denominado bacvAcHBsPH2. Após coleta das colônias recombinantes, a presença do gene sHBsAg-AcPH foi confirmada por PCR utilizando os iniciadores HBSAgRNco ICOMHIS e M13R gerando um fragmento de tamanho de 3.298pb.

Tabela 1. Iniciadores utilizados no trabalho

Iniciadores	Sequência de nucleotídeos (5' → 3')
pFast-AminoF	GGATCCCATATGCATCATCATCATCATTCCATGG
pFast-AminoR	GGATCCCTCGAGTTAATACGCCGGACCAGTGAACAGA
M13-F	GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
M13-R	CACAGGAAACAGCTATGACCATGATT
HBSAgRNco ICOMHIS	CCATGGAAATGTATACCCAGAGACAA

Análise da expressão da proteína recombinante e estrutural de possíveis cristais da proteína quimera sHBsAg em insetos

Monocamadas de células Tn5B (aproximadamente 10^5 células) foram incubadas em meio de cultura contendo 10 vírus/célula com vAc-6xHis-sHBsAg-AcPH (Araújo, 2011) denominado vAcHBsPHs e os dois vírus construídos nesse

trabalho. Após um período de 72 h.p.i, as células apresentaram o núcleo hipertrofiado, rugoso, com presença de possíveis poliedros (Figura 13). Extratos dessas células (Tn5B) infectadas com os vírus recombinantes 72 h.p.i foram analisados por eletroforese em dois géis desnaturantes de poliácridamida (SDS-PAGE) a 12% (Green & Sambrook, 2012) (Figura 14-A) e as proteínas transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare), para o experimento de imuno-deteção de proteínas (“Western-blot”). As proteínas foram detectadas usando anticorpo anti-hexa-histidina (anti-6xHis) (Figura 14-B) e anticorpos produzidos em camundongos contra a Polh-AcMNPV (Figura 14-C) e anti-6xHis-sHBsAg-AcPH (Figura 14-D). Uma banda imunorreativa de 53,7 kDa foi detectada, referente a fusão do sHBsAg com a POLH, os anticorpos produzidos em camundongos (Polh-AcMNPV e anti-6xHis-sHBsAg-AcPH) também reagiram contra a POLH sendo observada uma banda imunoreativa de aproximadamente 30 kDa, como o esperado, por conta da fusão com a POLH (Figura 14 C e D).

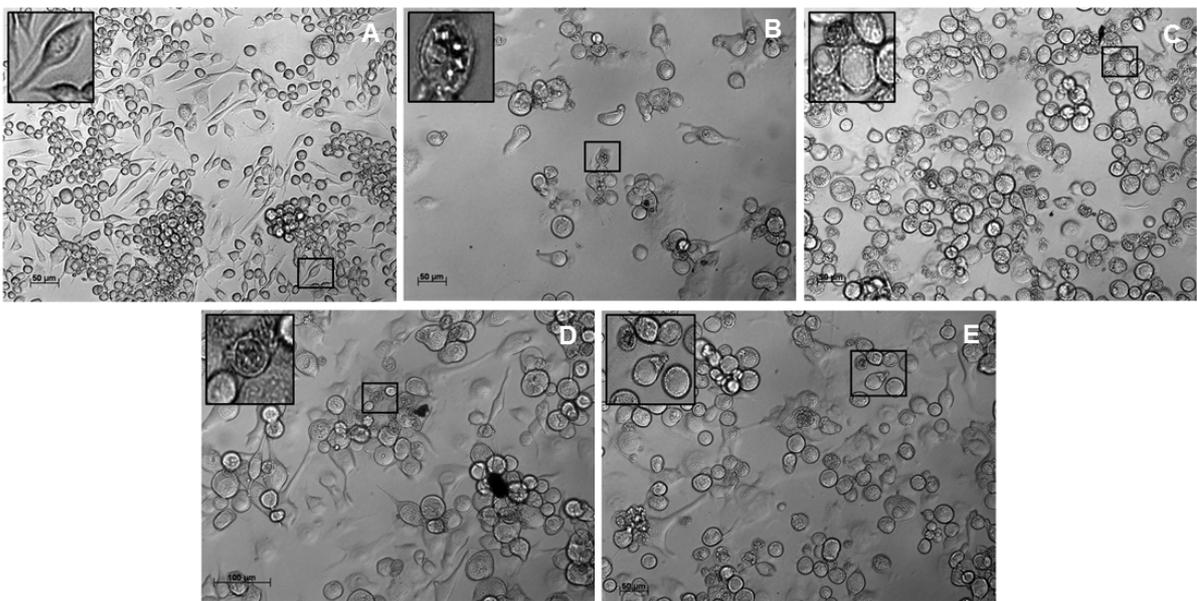


Figura 12. Análise do efeito citopático da infecção de células Tn5B com diferentes baculovírus a 72h.p.i. Células de inseto Tn5B não infectadas (A) ou infectadas (B, C, D e E) com diferentes recombinantes ou vírus selvagem. Células infectadas com o vírus AcMNPV (B); com vAcPH3 (C), vAcPHB1 (D) e vAcPHB2 (E). OBs ou poliedros são mostrados no núcleo das células B e corpos de oclusão de morfologia disforme e em agregados C, D e E.

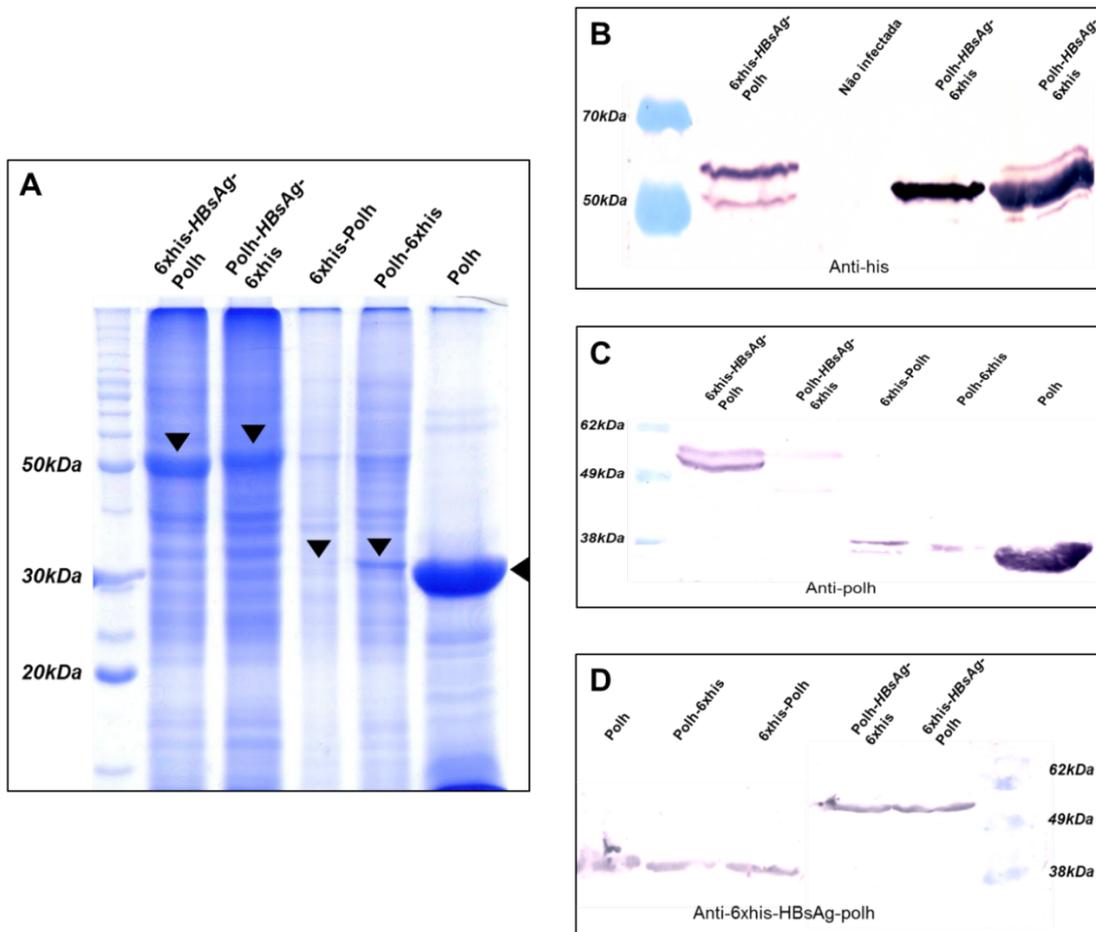


Figura 13. Análise da expressão da proteína recombinante sHBsAg em células de inseto infectadas com o baculovírus recombinante vAcPHHBs e vAcHBsPH2. (A) SDS-PAGE 12 % de extratos de células de inseto infectados com diferentes baculovírus recombinants. Análise de Western blot de extratos de células de inseto infectados com diferentes baculovírus recombinants: (B) A membrana foi imunomarcada com anti-6xHIS (Promega), (C) anti-*Polh* e (D) anti-6xhis-*HBsAg-Polh* como anticorpo primário, incubadas com anti-IgG de coelho conjugado a enzima fosfatase-alcalina (Invitrogen) e a proteína foi detectada utilizando o substrato NBT / BCIP (Promega). A mesma banda de 53,7 kDa do SDS-PAGE gel é observada na membrana, que foi reconhecida pelos anticorpos.

Lagartas de *Spodoptera frugiperda* foram infectadas no quinto instar por injeção de sobrenadante das células Tn5B infectadas pelos vírus recombinantes, após 5 dias, as lagartas mortas foram coletadas e os possíveis cristais derivados da fusão da proteína poliedrina com sHBsAg foram purificados em gradiente de sacarose e observados em MEV, podendo ser vistos corpos de oclusão de morfologia disforme e em agregados (Figura15).

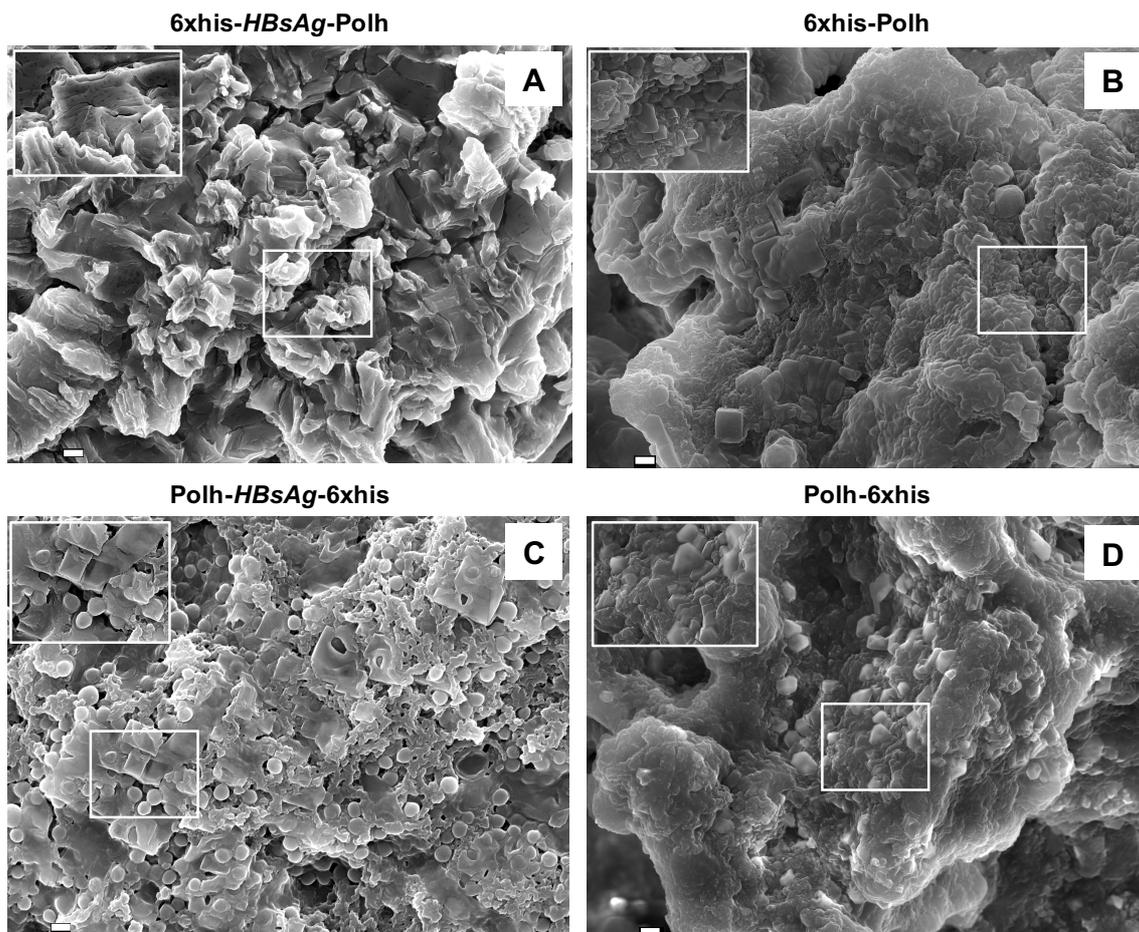


Figura 14. Análise ultraestrutural dos corpos de oclusão derivados de larvas de *S. frugiperda* infectadas pelos vírus recombinantes. Possíveis cristais de 6xhis-HBsAg-Polh (A), 6xhis-Polh (B), Polh-HBsAg-6xhis (C) e Polh-6xhis (D) de cadáveres *S. frugiperda* foram purificados por gradiente de sacarose. OBs foram coletados do gradiente de sacarose e preparados para MEV. É possível observar um acúmulo de uma estrutura cristalina sem forma definida (barra = 1 µm).

Imunoensaio com Kit comercial Anti HBsAg

Corpos de oclusão produzidos em lagartas *Spodoptera frugiperda* infectadas com os vírus recombinantes (Figura 16) foram testadas contra o Kit Laboratorial anti HBsAg qualitativo e quantitativo da empresa Wama Diagnóstica. Para o teste qualitativo foram avaliadas cinco concentrações diferentes das proteínas totais produzidas neste trabalho (100ng, 200ng, 300ng, 400ng e 500ng), sensibilizadas na cavidade da microplaca de ELISA da marca Costar. Todas as cinco concentrações testadas contra o controle positivo (soro humano positivo para anti-HBsAg) disponível no kit, obtiveram reação positiva. A concentração de 100ng de proteína total dos OBs recombinantes foi selecionada para determinar o valor mínimo detectável em relação a

concentração de anticorpo anti-HBsAg em soro (10, 20, 40, 80 e 160 mUI/mL), disponíveis no Kit Laboratorial Anti HBsAg Quantitativo. Utilizamos como controle positivo, soro contendo anticorpos anti-HBsAg e controle negativo, soro sem anticorpos anti-HBsAg disponível no Kit. Todas as cinco concentrações de anticorpo anti-HBsAg em soro testadas reagiram com as proteínas sensibilizadas em microplaca (Figura16).

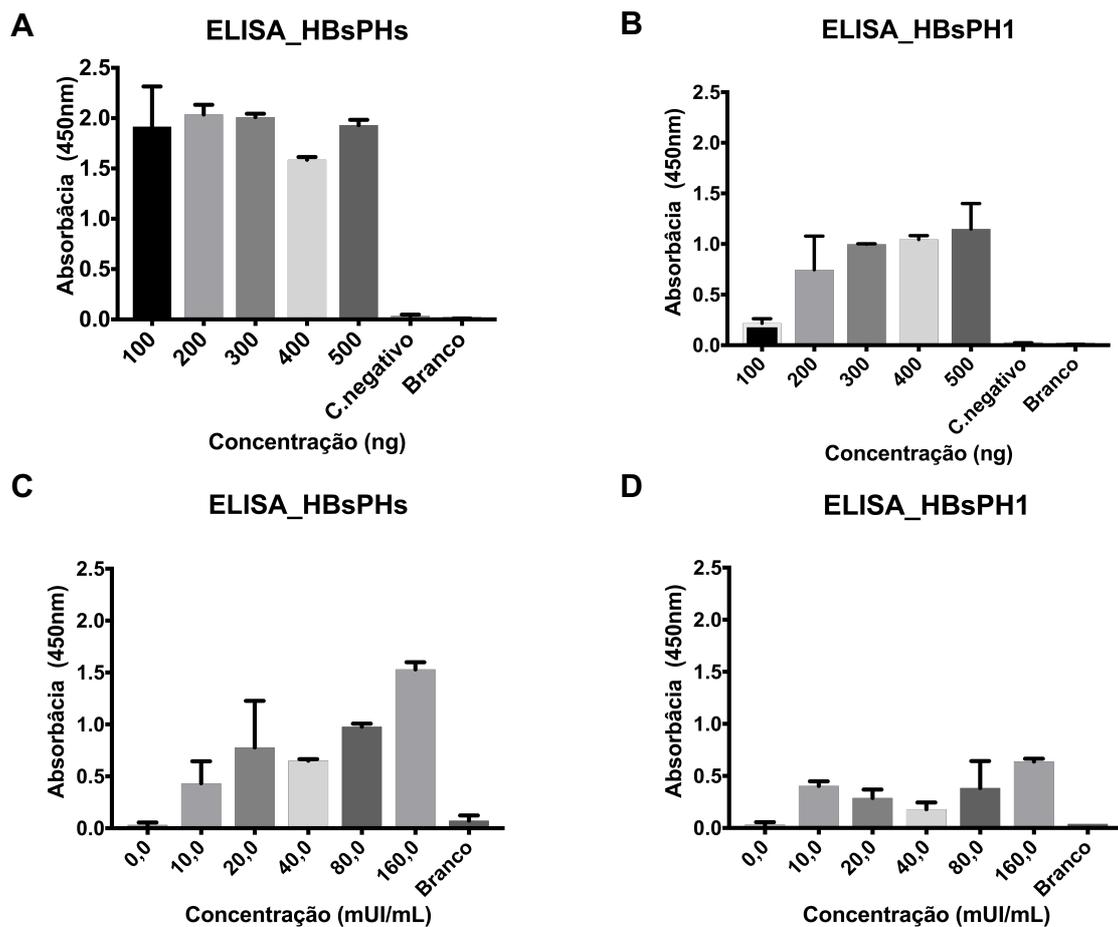


Figura 15. ELISA utilizando Kit Laboratorial Anti HBsAg Qualitativo e Quantitativo da empresa Wama Diagnóstica. Gráfico apresenta o resultado da absorbância (450nm) do imunoensaio contendo os OBs recombinantes (HBsPHs e HBsPH1). ELISA qualitativo (A e B) com diferentes concentrações da proteína recombinante e quantitativo (C e D) com diferentes concentrações de anti HBsAg em soro comercial. Soro controle negativo (soro humano negativo para anti-HBsAg presente no Kit) e branco (somente substrato cromógeno) Absorbância lida em leitor óptico (spectramax) a 450nm.

Discussão e Conclusão

Foram construídos neste trabalho dois baculovírus recombinantes: o vAcPHHBs, que apresenta o gene *sHBsAg* fusionado na região 3' do gene *polh* do AcMNPV e o vAcHBsPH2, que apresenta o gene *sHBsAg* fusionado na região 5' do *polh* e uma cópia do gene *polh* do AcMNPV.

Ji e colaboradores em 2010, mostraram que a região 3' da poliedrina é essencial para a formação dos corpos de oclusão e que a fusão de genes heterólogos na região 3' prejudicaria a montagem da poliedrina. No presente trabalho com a na construção do baculovírus recombinante foi demonstrado que a fusão do *sHBsAg* na região 3' da *polh* não resultou na produção de corpos de oclusão semelhantes aos produzidos pelo vírus selvagem. Corroborando com o trabalho anterior citado, foi possível observar a produção de uma massa proteica sem forma definida no núcleo e citoplasma das células infectadas. A formação de uma massa proteica sem forma definida quando ocorre a fusão da proteína *HbsAg* e outras proteínas com a *polh* já havia sido demonstrado em trabalhos anteriores (Araujo, 2011; Ardisson-Araújo et al, 2013b; Barros, 2011). Como uma outra alternativa para melhorar a produção e formação de poliedros semelhante aos selvagens, foi construído um novo vírus recombinante contendo, além da fusão das proteínas *HBsAg* e *POLH*, uma cópia extra do gene *polh*. No entanto, essa estratégia privilegiou a maior produção de *POLH* selvagem em relação à proteína de fusão (dados não amostrados).

A glicoproteína de membrana *HBsAg* presente no envelope do vírus *HBV* como descrito por Ganem & Schneider (2001) é codificada pelo gene pré *s/S* que contém as regiões pré *S1*, pré *S2* e *S*. A maior subunidade que compõe o *HBsAg* é a *large S*, com códon de iniciação localizado no início da região pré *S1*; a subunidade de tamanho intermediário designada de *middle S* é codificada pelas regiões pré *S2* e *S*; a menor subunidade, *small S*, é sintetizada a partir do códon de iniciação localizado no início da região *s* do *HBsAg* que é altamente imunogênico. Enquanto na maioria dos kits diagnóstico é utilizado a proteína inteira composta pelas 3 subunidades. Neste trabalho somente a subunidade *small S* foi utilizada. A subunidade *small S* foi reconhecida pelos anticorpos anti-*HBsAg* comerciais nos testes de imunoensaio. Lanford et al. (1998), construiu baculovírus (AcMNPV) recombinantes para expressão de proteínas antigênicas

de superfície do vírus da hepatite B, com e sem a região pré-S, fusionado e não fusionado. Para fusão foi utilizado um vetor que contém o *polh* flanqueada por genes *up stream* e *down stream* para facilitar a recombinação homóloga e permitindo a fusão na região 5' da *polh*. A proteína fusionada foi purificada por gradiente de Cloreto de cério (CsCl), a não fusionada e não secretada foi purificada de membrana por cromatografia de afinidade com coluna anti-HBsAg IgG. As proteínas foram testadas quanto a modificações pós-traducionais, antigenicidade e imunogenicidade. Não foi observada diferença dos polipeptídeos fusionados e não fusionados, no que diz respeito a antigenicidade e imunogenicidade quando comparadas com HBsAg derivado de plasma comercial do kit ELISA (Organon Teknica Corporation; Nuclear Medical Laboratories).

A utilização de proteínas recombinantes para a produção de teste de detecção antígeno-específica e produção de vacinas vêm sendo ampliada devido a sua segurança e facilidade. Price et al. (1989), utilizou o sistema de expressão baseado em baculovírus AcMNPV e células de inseto para expressar o antígeno de superfície do HBV, HBsAg, e uma glicoproteína do envelope do vírus Influenza A, neuraminidase (NA). As proteínas recombinantes produzidas por recombinação homóloga sob o comando do promotor *polh*, foram testadas em imunossaios e sua antigenicidade foi comprovada com sucesso.

O diagnóstico laboratorial específico confirmatório utilizado hoje para detecção de infecção pelo HBV é realizado por meio de testes sorológicos como o ensaio imunoenzimático (EIA) e Radioimunoensaio (RIA) que buscam identificar no soro humano, os antígenos HBsAg e HBeAg e os anticorpos anti-HBcAg, anti-HBeAg e anti-HBsAg. Os laboratórios clínicos, devido à alta demanda de diagnóstico para HBV, têm procurado utilizar kits prontos para realizar os testes diagnósticos poupando tempo e diminuindo os custos. Os laboratórios de referência como os Laboratórios Centrais chegam a realizar mais de mil exames dia para HBV, e isso faz com que a necessidade de utilização de kit de fácil execução, baixo risco de manipulação e menor custo aumente significativamente, incentivando as empresas a buscarem novas técnicas (Roberto, 2007). O teste para detecção de HBsAg é estendido para além de casos de pacientes com suspeita de HBV, mas também para acompanhamento da progressão da doença e para segurança de todo sangue doado nos

Hemocentros e Bancos de sangue. A produção de HBsAg utilizando o sistema de expressão em baculovírus é uma ferramenta com potencial para ser utilizada na criação de kits diagnóstico para detecção de HBsAg e Anti-HBs, pois, sua produção é simples e não oferece risco de contaminação viral, como demonstrado nesse trabalho.

A imunodeteção realizada neste trabalho foi testada com sucesso utilizando padrões tais como conjugado HBsAg marcado com peroxidase, substrato cromógeno, solução de parada (*stop*) e soro/plasma como controle negativo e positivo do kit anti HBsAg da empresa Wama Diagnóstica. Além disso, não foi usada do kit somente a placa com 96 poços de poliestireno para ELISA, que foi sensibilizada com a massa proteica fusionada com sHBsAg. Esse resultado demonstra que o sHBsAg produzido em inseto e culturas de células é capaz de ser reconhecido por soro contendo anticorpos anti-HBsAg comercial, por ensaio imunoenzimático (ELISA), revelando uma alternativa promissora para produção de kits diagnóstico anti- HBsAg. Isso possibilitaria a produção desses Kits pela indústria nacional, por um menor custo, para utilização em larga escala nos laboratórios e centros de referência.

A proteína recombinante sHBsAg produzido neste trabalho, pelo sistema de expressão baseado em baculovírus e inseto e culturas de células de inseto, pode ser utilizada para produzir testes diagnósticos do tipo ELISA (EIA) diretos ou indiretos, quantitativos e qualitativos. A proteína recombinante sHBsAg pode ser fixada em placa de ELISA e servir de antígeno para ligação dos anticorpos presentes no soro dos pacientes infectados pelo HBV, ou, por meio da inoculação do sHBsAg recombinante em cobaias e produção de anticorpos, para serem usados no fundo do poço da placa de ELISA para detectar antígenos presentes no soro de pacientes infectados com o HBV. Takehara et al. (1988) em seu trabalho, produziu dois testes de ELISA utilizando a co-expressão das regiões inteiras dos genes HBcAg e HBsAg produzido pelo sistema de expressão em baculovírus, sob o comando do promotor da poliedrina. O vírus com genes HBcAg e HBsAg expressou níveis elevados de HBcAg (40% das proteínas celulares) e níveis baixos do HBsAg (2% das proteínas celulares corados).

Como o HBV é um agente biológico de risco 3, com risco a saúde humana principalmente dos trabalhadores que ficam expostos ao vírus como, pesquisadores, agentes de saúde e todos os profissionais que participam dos

estudos e produção de manufaturas como kits diagnóstico e vacinas, é preconizado pelo Parlamento Europeu e conselho da União Europeia (7° diretiva especial nos termos do n° 1 do artigo 16° da diretiva 89/391/CEE) que devem ser sempre mantidas as atualizações de melhora e aperfeiçoamento da proteção da saúde e segurança dos trabalhadores por meio de manipulação de vírus recombinantes ou partículas virais mais seguros. O sistema de expressão em baculovírus também proporciona a criação de kits diagnóstico seguros, pois, o baculovírus não é patogênico para o homem, sendo ele incapaz de infectar células humanas, mesmo sendo capaz de transduzir células de mamíferos e fazer entrega gênica (van Oers, 2011; van Oers et al, 2015).

A construção do baculovírus recombinante vAcPHHB1, contendo o gene da região `Small S` do antígeno HBsAg de HBV fusionado ao gene *polh* do baculovírus AcMNPV na sua região 3' foi bem sucedida. A análise da expressão da proteína recombinante em células de inseto infectadas mostrou que a proteína recombinante sHBsAg fusionada com a poliedrina do vírus AcMNPV, tanto amino-terminal quanto na carboxi-terminal está sendo produzida corretamente tanto *in vitro* como *in vivo*. Além disso, o teste feito utilizando corpos de oclusão purificados em gradiente de sacarose foram reconhecidos como antígenos pelos anticorpos comerciais Anti-HBsAg dos testes de imunoenensaio (EIA) comerciais, observando ainda que a sHBsAg fusionado na região 5' do gene *polh* do AcMNPV (HBsPHs) apresentou níveis maiores de absorvância em relação a fusão na região 3' do *polh* (HBsPH1), podendo ser explicada pela razão que a região 3' do *polh* é essencial para montagem da poliedrina. Porém para uma melhor análise da proteína construída é necessário testar esta proteína contra soro de pacientes infectados com HBV e novos testes utilizando a técnica de ELISA com os anticorpos agora reconhecendo e diferenciando soro de pacientes infectados com Vírus da hepatite A, B, C (HAV, HBV e HCV) e Citomegalovirus CMV.

Capítulo 3. Efeitos imunológicos de um peptídeo da glicoproteína do vírus da raiva pela estimulação de camundongo *in vivo* e *in vitro*

Introdução

A Raiva

O vírus da raiva ou *rabies virus* (RABV) é um agente neurotrópico causador de encefalomielite em quase todas as espécies mamíferas, uma vez sintomáticos, a evolução nos animais e seres humanos é fatal (WHO, 2016). A Organização Mundial de Sanidade Animal estima que aproximadamente 70.000 pessoas morrem anualmente em decorrência da raiva em todo o mundo, predominantemente em países subdesenvolvidos. Os continentes com maiores índices de mortalidade de humana no mundo, são a Ásia e a África, representando 95% de casos fatais. Estas regiões são as que apresentam menores índices de controle de raiva canina no mundo (OIE, 2016).

Casos positivos de raiva humana causadas por mordedura de cães ainda acontecem na América Latina, com regiões consideradas críticas como Haiti, Peru, Honduras, República Dominicana, Guatemala, Bolívia e alguns Estados do Brasil, por exemplo: Maranhão, Piauí, Ceará e Mato Grosso do Sul (Vigilato et al, 2013; WHO, 2016). Contudo, a incidência de raiva canina e raiva humana transmitida por cães, diminuiu drasticamente nas últimas décadas na América Latina. Isto ocorreu graças aos intensos programas nacionais de controle da Raiva em vários países da América Latina a partir dos anos 80, exemplificados pelas vacinações massivas em cães, profilaxia pré e pós-exposição, melhorias no diagnóstico da doença e vigilância intensiva (Vigilato et al, 2013).

O RABV pertence ao gênero *Lyssavirus* e família *Rhabdoviridae*, juntamente com as famílias *Paramyxoviridae*, *Filoviridae* e *Bornaviridae*, constituem a ordem *Mononegavirales* (ICTV, 2015). O RABV é um vírus com

genoma RNA de fita simples, não segmentado com polaridade negativa e envelopado (Smith et al, 1996; Wunner, 2007). Por ser envelopado, o torna mais sensível a detergentes e solventes lipídicos como éter e clorofórmio, sendo assim muito baixa sua infectividade fora do hospedeiro (Dietzgen et al, 2012).

O vírion, que é a partícula completa do RABV, apresenta um formato de projétil, sendo constituído pela ribonucleoproteína (RNP) e pelo envelope viral que envolve a RNP (Dietzgen et al, 2012). O envelope viral é composto por uma bicamada lipídica à qual estão associadas a proteína M – Proteína Matriz e pela proteína G – Glicoproteína. A proteína M une o envelope do vírus à RNP interna e está envolvida na montagem e liberação viral (Mebatsion, 2001). A glicoproteína G é proteína mais imunogênica do RABV, sendo responsável pela produção de anticorpos neutralizantes, especialmente por sua região externa ao envelope, denominada domínio antigênico ou ectodomínio, além de importante papel na adsorção viral a receptores específicos nas células do hospedeiro (Wunner, 2007). A glicoproteína G é ainda capaz de estimular, em conjunto com as proteínas N e P, células T auxiliares e citotóxicas, gerando uma resposta imune celular, além de participar do processo de brotamento de novos vírions (Kawano et al, 1990; Tordo et al, 1988). A expressão da glicoproteína G parece estar associada à indução de apoptose e à inibição da atividade da proteína N no transporte axoplásmico, ou seja, quanto maior a expressão de G em determinada amostra viral, mais apoptose e maior inibição do transporte viral nos neurônios, resultando em menor patogenicidade (Morimoto et al, 1999).

A RNP apresenta-se sob a forma de um complexo helicoidal constituído de RNA de fita simples, sentido negativo, associado a uma proteína N – Nucleoproteína e uma proteína P – Fosfoproteína, assim como a uma proteína L – do inglês Large - Proteína RNA-polimerase (Wunner et al, 1988). A proteína N está associada ao RNA viral, protegendo-o da ação de ribonucleases, sendo esta a mais conservada dentre as proteínas dos Lyssavirus (Tordo et al, 1986). Devido a esta característica importante, o gene da proteína N tem sido a mais utilizada para a detecção do vírus da raiva por RT-PCR (Wunner, 2007). A proteína P interage com as proteínas N e L e acredita-se que atue como co - fator da RNA polimerase, sendo multifuncional, ligando-se a outras proteínas

virais para auxiliar na replicação do genoma viral e interagir com fatores celulares, provavelmente na disseminação e patogênese viral (Mebatsion, 2001). A proteína L possui função de RNA polimerase RNA dependente (Tordo et al, 1986).

As correlações filogenéticas e sorológicas contribuem para a formação de dois filogrupos principais dentro do gênero *Lyssavirus*. O filogrupo I inclui o Rabies virus (RABV), Duvenhage virus (DUVV), European bat lyssavirus – tipo 1 e tipo 2 (EBLV 1 e 2), Australian bat lyssavirus (ABLV), Aravan virus (ARAV), Khujand virus (KHUV), Irkut virus (IRKV) e Bokeloh bat lyssavirus (BBLV). O filogrupo II inclui Lagos bat virus (LBV), Mokola virus (MOKV) e Shimoni bat virus (SHIBV). Baseado nas características filogenéticas e sorológicas, o West Caucasian bat virus (WCBV) e Ikoma lyssavirus (IKOV) não podem ser incluídos em nenhum destes filogrupos (Banyard et al, 2013; ICTV, 2015). Em estudo realizado por Badrane et al. (2001) com camundongos, com o intuito de verificar as diferenças de patogenicidade e imunopatogenicidade entre as espécies do filogrupo I e do filogrupo II, demonstraram que os vírus do filogrupo I são mais patogênicos quando comparados com os do filogrupo II.

No Brasil, o ciclo epidemiológico da raiva pode ser dividido didaticamente em quatro ciclos: urbano, rural, silvestres terrestre e aéreo, sendo que os reservatórios animais mais importantes são os morcegos da Ordem Carnivora e Chiroptera (Figura 1). No ciclo urbano, a principal fonte de infecção é o cão doméstico. No Brasil, o morcego é o principal responsável pela manutenção do ciclo silvestre. Outros reservatórios silvestres são: macaco, raposa, coiote, chacal, gato-do-mato, jaritataca, guaxinim e mangusto (Kotait et al, 2007). As principais formas de transmissão são por mordedura, arranhadura e lambedura, ou seja, por meio da saliva contaminada com o vírus (BRASIL, 2008b).

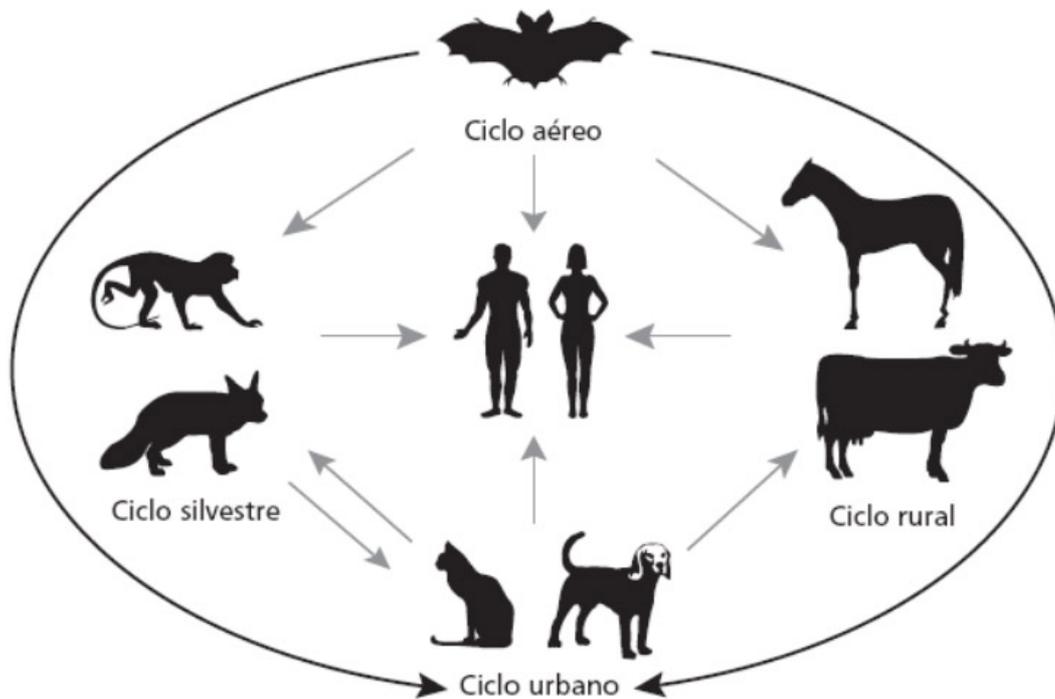


Figura 16. **Ciclos epidemiológicos de transmissão da raiva no Brasil.** Fonte: <http://www.medicinanet.com.br/imagens/20090808142432.jpg>

O painel de anticorpos monoclonais anti-nucleoproteína estabelecido pelo CDC (Centers for Disease Control – Atlanta – EUA), para estudos de isolados do RABV nas Américas, estabelecido por Diaz et al. (1994), demonstrou a existência de 12 variantes antigênicas, das quais 5 já foram identificadas no Brasil, que são: as variantes 1 e 2 com perfis antigênicos compatíveis com cães domésticos (*Canis familiaris*), variante 3 compatível com morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*, variante 4 compatível com morcegos insetívoros *Tadarida brasiliensis* e variante 6 compatível com morcegos insetívoros *Lasiurus cinereus*. Foi encontrado também perfis não compatíveis com o painel de monoclonais pré-estabelecido para o estudo das estirpes isoladas nas Américas por Diaz et al. (1994), especialmente as variantes isoladas de sagui do tufo branco (*Callithrix jacchus*) e as de cachorro do mato (*Cerdocyon thous*) (Favoretto et al, 2002; Favoretto et al, 2006; Favoretto et al, 2001).

Diaz et al. (1994), demonstrou a existência de 12 variantes antigênicas de RABV nas Américas, das quais 5 já foram identificadas no Brasil, que são: as variantes 1 e 2 com perfis antigênicos compatíveis com cães domésticos (*Canis familiaris*), variante 3 compatível com morcegos hematófagos *Desmodus*

rotundus, variante 4 compatível com morcegos insetívoros *Tadarida brasiliensis* e variante 6 compatível com morcegos insetívoros *Lasiurus cinereus*. Foram também encontrados perfis não compatíveis com o painel de monoclonais pré-estabelecido pelo CDC (Centers for Disease Control – Atlanta – EUA) e Diaz et al. (1994) para o estudo das estirpes isoladas nas Américas, tais como: variantes isoladas de sagui do tufo branco (*Callithrix jacchus*) e as de cachorro do mato (*Cerdocyon thous*) (Favoretto et al, 2002; Favoretto et al, 2006; Favoretto et al, 2001).

As manifestações clínicas da raiva podem ser bem diferentes nas espécies infectadas, desde de forma paralítica e furiosa (Dietzgen et al, 2012). As variantes virais do RABV, além de serem classificadas por suas características moleculares e antigênicas da nucleoproteína e da glicoproteína G, podem também ser identificadas de acordo com suas manifestações clínicas, origem geográfica e espécie de hospedeiro reservatório. A manifestação da raiva furiosa é mais frequente em variantes do RABV encontrada em morcegos carnívoros domésticos e selvagens na região nordeste do Brasil (Carnieli et al, 2006). Já a raiva com sinais clínicos de paralisia é mais comum em isolados relacionados com morcegos hematófagos, que é prevalente em todas as regiões do Brasil (BRASIL, 2015; Carnieli et al, 2006; Favoretto et al, 2002).

Modelos experimentais com cangambás *Mephitis mephitis*, mimetizando o que ocorre na infecção natural, mostram que após inoculação intramuscular na extremidade dos membros posteriores, ocorre uma replicação extra neural do RABV no músculo localizado na porta de entrada (Charlton et al, 1997).

Foi observado em experimentos com modelos experimentais (gambás-*Mephitis mephitis*), que o RABV pode se replicar em células musculares próximo ao local de inoculação, antes de invadir o SNC, representando um passo primordial à invasão do sistema nervoso (Tsiang, 1993). Contudo, ocasionalmente pode ocorrer a entrada direta do vírus no SNC, sem replicação prévia em células musculares (Shankar et al, 1991). Uma vez infectando células neuronais, o RABV é conduzido aos nervos periféricos e através de transporte axoplásmico retrógrado, ao SNC, posteriormente, disseminando-se por todo o organismo (Tsiang, 1993). Antígenos virais já foram detectados em células da

epiderme, folículos pilosos, retina, córnea, glândulas lacrimais, glândulas salivares, pulmões, músculo cardíaco, mucosa gástrica e intestinal, pâncreas, parênquima renal, glândulas adrenais, tecidos neuroepiteliais dos ureteres, bexiga e uretra (Charlton, 1994). O principal meio de disseminação do RABV na natureza é através da secreção das glândulas salivares (Iwasaki, 1991).

Vacina anti-rábica

A raiva humana pode ser prevenida por meio de vacinação disponibilizada gratuitamente por órgãos de saúde (WHO, 2016). A primeira vacina foi produzida a partir de passagens sucessivas em cérebro de coelhos (Pasteur, 1885; Pasteur et al, 1881; Pasteur et al, 1882). Essa vacina causava acidentes neurológicos em virtude da presença de mielina no cérebro de animais adultos (Horack, 1939; Sellers, 1947). Fuenzalida & Palácios (1955) desenvolveram uma vacina produzida em cérebro de camundongos recém-nascidos, quando o cérebro ainda não apresenta níveis consideráveis de mielina, reduzindo os efeitos colaterais, e assim chamadas de vacinas de primeira geração. Posteriormente Koprowski & Cox (1948) testaram vacinas produzidas em ovos embrionados, chamadas de segunda geração. Entretanto, estas vacinas apresentavam baixa antigênicidade e reações alérgicas decorrentes da presença de proteínas do ovo. Além do mais, essas vacinas não são livres de risco, pois apresentam partículas de vírus não inativados (Rupprecht et al, 2002).

Com a possibilidade de produção de vacinas de vírus atenuado ou inativados e expressão de antígenos virais pelos sistemas de expressão de proteínas heterólogas, novas vacinas contra raiva têm sido desenvolvidas (Cenna et al, 2008; Faber et al, 2009; Gupta et al, 2005; Loza-Rubio et al, 2007; Lyons et al, 2008).

Em 2008 o Instituto Butantan iniciou a produção da vacina Vero-IB, onde o vírus rábico fixo da cepa PV proveniente do Instituto Pasteur de Paris foi propagado em células Vero aderidas a microcarregadores e suplementadas com meio de cultura sem proteínas de origem animal. (Frazatti-Gallina et al, 2004). As suspensões virais obtidas são concentradas por ultra-filtração, purificadas por cromatografia de troca iônica e inativadas com β -propiolactona. Testes de

controle de qualidade foram realizados e comprovados a eficiência e segurança dessa vacina.

Vacinas e sistema imune

A resposta imune está intimamente relacionada com a eficiência de uma vacina, dosada pela sua imunogenicidade, quesito imprescindível para sua aprovação e liberação. A maioria das vacinas licenciadas, se baseia na indução de anticorpos, como por exemplo os anticorpos neutralizantes, para comprovar sua eficácia (Plotkin, 2001). Para o desenvolvimento e produção de vacinas contra o RABV, a WHO recomenda que seja realizado teste para a verificação dos títulos de anticorpos neutralizantes, determinados por soroneutralização em camundongos ou em células. Considera-se protetor, níveis de anticorpos neutralizantes maiores ou igual a 0,5 UI/ml (WHO, 2002).

Diante de todas estas considerações abordadas acima, a expressão de proteínas do RABV no sistema baculovírus x células de insetos poderiam ser um excelente alternativa para produção de insumos visando a estimulação do sistema imune e soroneutralização do RABV.

Bocca et al. (2013) estudando os baculovírus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) e o *Anticarsia gemmatilis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV), demonstraram proteínas derivadas desses vírus são capazes de estimular a fagocitose de leveduras por macrófagos e a produção de interferon-gama (IFN- γ) por esplenócitos *in vitro*, aumentar a migração de linfócitos TDC8+ no pulmão de camundongos saudáveis, bem como a expressão de CXCR3 e a produção de óxido nítrico. Além disto, proteínas do AgMNPV são capazes de aumentar a produção de interleucina-12 (IL-12) e a proliferação celular de esplenócitos *in vitro*. Considerando tais propriedades imunogênicas dos baculovírus e sua capacidade limitada de infectar células de mamíferos, a sua utilização como vetor para expressar proteínas do vírus da raiva poderia contribuir para a ativação dos linfócitos B e T, não sendo necessário a utilização de adjuvantes à vacina. Várias vacinas utilizando este sistema de expressão, baculovírus e células de inseto, tem sido eficaz e eficiente, como por exemplo a Flublok® (Influenza), Cervarix® (Papilomavirus

humano), Provenge ® (cancer prostata), e Ingelvac ® Circoflex™ (circovirus suino) (Mena & Kamen, 2011)

Justificativa

A raiva é uma zoonose quase sempre fatal, resultando anualmente em milhares de mortes humanas ao redor do mundo, principalmente nos países subdesenvolvidos. Atualmente, é uma doença prevenida pela profilaxia pre e pós exposição (PEP) por meio da administração combinada de uma vacina do vírus da raiva inativado e imunoglobulina do vírus da raiva (RIG), seja ela homóloga ou heteróloga.

Estudos prévios demonstraram que a glicoproteína G, presente no envelope viral, tem uma grande capacidade em induzir a produção de anticorpos neutralizantes e ativar as células do sistema imune, resultando em uma possível proteção contra a doença. Além disso, já se tem conhecimento sobre a região mínima dessa proteína que é responsável pelo maior reconhecimento do sistema imune.

Dessa forma, o presente trabalho propõe a expressão de um peptídeo imunogênico da glicoproteína G (pept/G) utilizando o sistema em baculovírus através da fusão à proteína poliedrina, com a concomitante purificação em larga escala. A produção desse peptídeo pode ser utilizada na estimulação do sistema imune, e futuramente como uma possível alternativa na prevenção da infecção pelo vírus da raiva.

Objetivo

Expressar o peptídeo imunogênico do vírus da raiva fusionado a poliedrina de AcMNPV e avaliar o seu potencial antigênico em camundongos por inoculação subcutânea.

Materiais e Métodos

Vírus, células e insetos

Os vírus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) e o baculovírus recombinante vAcPH-RGPV (Barros, 2011), derivados do bacmídeo bMON14272 (Bac-to-Bac “Baculovirus Expression System”, Invitrogen) foram utilizados nesse trabalho. Os vírus foram propagados em cultura de células *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4 ou Tn5B) (Granados et al, 1994) e/ou larvas de *Spodoptera frugiperda*, no terceiro instar. Essas células foram mantidas em meio TC-100 (Gibco-BRL) com 10 % de soro fetal bovino a 28 °C e as larvas a 25°C, com dieta artificial (Greene et al, 1976).

Células de *Escherichia coli* DH10 β (Invitrogen) foram utilizadas como hospedeiras para maioria dos plasmídeos utilizados no presente trabalho. No entanto, experimentos envolvendo Bac-to-Bac “Baculovirus Expression System” (Invitrogen), foram utilizadas células *Escherichia coli* DH10Bac (Invitrogen).

Obtenção e clonagem do pept/G

Foram inseridos, por meio de iniciadores específicos (pept/G F e pept/G R) (Tabela 3), sítios para a enzima de restrição *Nco* I em ambas as extremidades do gene de interesse, de modo a permitir a fusão do pept/G na região 5' do gene *polh*, esses iniciadores paream na posição 690-702 do gene. As reações de PCR foram realizadas em termociclador marca Switft Max (ESCO®), analisadas por eletroforese em gel da agarose (Joseph & David, 2001) e fotografadas em um fotodocumentador (Alfa Innotec). O fragmento de 126pb observado foi cortado do gel com auxílio de uma lâmina e purificado utilizando-se ‘GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit’ (GE Healthcare). O fragmento purificado foi clonado no vetor pGem®-T easy (Promega) de acordo com instruções do fabricante. Posteriormente, o plasmídeo obtido foi sequenciado (Macrogen Inc., Coreia do Sul) usando iniciadores T7 e SP6 que se paream em regiões presentes no plasmídeo comercial usado.

Tabela 2. Iniciadores utilizados no trabalho

Iniciadores	Sequência de nucleotídeos (5' → 3')
pept/G F	CCATGGGGGGATCCAGAGGCCTATATAAGTCTTTAAA AGGAGCTTGCAAACCTCCAGTTATGTGGAGTTCTCGGA CTTA
pept/G R	CCATGGGGGCATGCTGATGTTTGCATCGAGACCCATGT TCCATCCATAAGTCTAAGTCCGAGAACTCCACATAACT GG
M13-F	GCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
M13-R	CACAGGAAACAGCTATGACCATGATT

Clonagem do pept/G na região 5' do gene da *polh* do AcMNPV

Um plasmídeo doador, previamente construído, foi utilizado para clonagem do pept/G. Esse plasmídeo é derivado do vetor comercial pFastBac1® (Invitrogen), que permitem fusão de genes de interesse à região 5' do gene *polh* do AcMNPV (pFastBac1-6xHis-AcPH) (Araujo, 2011). Este vetor apresenta o gene *polh* com um sítio de restrição para *Nco* I e uma cauda de hexa-histidina em fase, ambos na região 5' do gene (Figura 18-B). O plasmídeo pGem-pept/G contendo o gene de interesse foi digerido com *Nco* I, submetido a separação por eletroforese em gel de agarose e a banda correspondente ao gene de interesse foi purificada, como descrito anteriormente e utilizada para clonagem no plasmídeo doador pFastBac1-6xHis-AcPH previamente digeridos com a mesma enzima e defosforilado (Green & Sambrook, 2012). O plasmídeo resultante foi confirmado por PCR com iniciadores específicos, por digestão e sequenciamento (Macrogen, Coreia do Sul).

Obtenção de baculovírus recombinante para expressão do pept/G fusionada à poliedrina

O plasmídeo de fusão gerado contendo o gene quimérico (genes de interesse fusionados na região 5' do gene *polh*) foi utilizado para construção de baculovírus recombinante via sistema Bac-to-Bac (Invitrogen), conforme instruções do fabricante.

Produção *in vitro* da proteína quimérica pept/G fusionada à poliedrina

Uma μg do DNA plasmidial dos bacmídeos recombinantes gerados, foram utilizados para transfectar 10^6 células de inseto Tn5B. Foi adicionado um volume de 10 μL de DNA plasmidial dos bacmídeos (1 μg) em 90 μL de meio de cultura TC-100 sem soro em placas de 35mm e misturado, posteriormente foi adicionado 6 μL de lipossomos catiônico da marca FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega). A mistura contendo os lipossomos/DNA de cada bacmídeo foram misturados e incubados por 15 min à temperatura ambiente.

Placas com 10^6 células em dois mL de meio TC-100 (HiMedia) foram incubadas com a mistura lipossomos/DNA de cada bacmídeo por 4 horas a 28°C. Após 4 h, a placa foi recomposta com mais dois mL de meio de cultura TC-100 contendo 10% de soro fetal bovino e incubada a 28°C por sete dias. As células de inseto que foram transfectadas com o DNA do baculovírus recombinante foram capazes de produzir vírus, pois como é sabido que o DNA nu do baculovírus é infectivo (Burand et al, 1980). Em uma nova placa de 100 mm, contendo 5×10^6 células de inseto Tn5B foram adicionados 500 μL do sobrenadante da transfecção e a placa incubada a 28°C por sete dias para amplificação dos vírus recombinantes. O DNA viral foi purificado pelo método de mini preparação como descrito por (O'Reilly et al, 1994). O DNA extraído foi utilizado para confirmação por meio de uma reação de PCR para o gene heterólogo.

Analises da expressão da proteína recombinante em células de inseto e análise ultraestrutural de possíveis cristais recombinantes

Monocamadas de células Tn5B (aproximadamente 10^5 células) foram incubadas com moi de 10 vírus/célula com os vírus recombinantes. As células infectadas foram observadas e fotografadas a 72 h p.i. em um microscópio de luz invertida Axiovert 100 (Zeiss). Para microscopia eletrônica de varredura (MEV), aproximadamente 10 μl do sobrenadante de células Tn5B (96 h p.i.)

infectadas com o vírus recombinantes (10^6 virus em forma de fenótipo BV) foram injetados em larvas de *Spodoptera frugiperda* quarto instar, no segundo par de falsas patas por meio de de uma agulha e seringa de 1mL. As larvas foram separadas individualmente para que não houvesse canibalismo e alimentadas com dieta artificial preparada segundo (Hoffmann-Campo et al, 2003). Após 5 dias, as larvas já apresentavam estágio avançado de infecção, tais como perda do apetite, clareamento da epiderme devido ao acúmulo de vírus nos núcleos das células epidermais e adiposas, parada no desenvolvimento larval e letargia (Federici, 1997). No sexto dia pós-infecção, as larvas estavam mortas ou em processo de morte. Após a morte, os cadáveres foram homogeneizados com o mesmo volume de PBS (p/v), filtrado com gaze e centrifugado a $7.000 \times g$ por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento (“pellet”) ressuspendido em um volume de 5% Triton X-100 e centrifugado a $7,000 \times g$ por 10 min (duas vezes). O último “pellet” foi ressuspendido em 0,5 M NaCl, centrifugado como descrito acima, e resuspendido com PBS. Todas as soluções continham inibidor de protease que inibe serina, cisteína e metaloproteases (Protease Inhibitor Cocktail -Sigma). As soluções ressuspendidas foram colocadas em um gradiente descontínuo de sacarose (40-80% de sacarose em Phosphate Buffered Saline [PBS], 137,0 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,0 mM Na_2HPO_4 , 2,0 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) e centrifugada a $130.000 \times g$ por 75 min. As bandas que continham os possíveis cristais foram removidas do gradiente, diluídas em ddH₂O, e centrifugadas a $7.000 \times g$ por 10 min, o “pellet” foi ressuspendido em um mL de PBS. Posteriormente, as amostras foram desidratadas com acetona para serem secas ao ponto crítico (Balzer CPD30) e cobertas com ouro no aparelho “sputter coater” (Balzer SCD 050). As amostras foram, então, analisadas no microscópio de varredura JEOL JSM 840 a 10 kV.

Análise da expressão das proteínas recombinantes em larvas de *Spodoptera frugiperda* e em cultura de células de insetos

Uma alíquota de 10 µL dos possíveis cristais purificados descritos acima foram analisados por eletroforese em dois géis desnaturantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% (Green & Sambrook, 2012). Um dos géis foi corado e fixado em solução de 40 % de metanol e 10 % de ácido acético e azul de Coomassie 0,1 %, por cerca de 16 h e descorado em solução de 40 % de metanol e 10% de ácido acético por 4 h, sob leve agitação. O outro foi utilizado para transferência das proteínas para uma membrana de Nitrocelulose (GE Healthcare), para o experimento de imuno-deteção de proteínas (“Western-blot”) abaixo descrito. As proteínas foram transferidas para membrana de Nitrocelulose, usando-se o aparato de transferência da Bio-Rad (Trans-Blot® SD – Semi Dry Transfer Cell, para transferência semi-seca), de acordo com o protocolo do fabricante e com tampão de transferência Bjerrum and Schafer-Nielsen (48 mM de Tris; 39 mM de glicina; 20 % metanol, pH 9,2). Após a transferência a membrana foi bloqueada com solução de PBS 1X e 3 % de leite em pó desnatado por 16 h a 4°C, sendo em seguida processada para a imuno-marcação. O primeiro passo foi lavar a membrana por 3 vezes com PBS Tween (0,05 %) para retirar toda a solução de bloqueio e em seguida colocar a membrana em uma solução de PBS/albumina bovina (BSA) 0,5 % adicionada do anticorpo primário anti-6xHIS (GE Healthcare) de coelho por 1 h. Essa solução foi então descartada e a membrana lavada novamente por 3 vezes em PBS Tween (0,05 %) sob agitação suave. A seguir, a membrana foi colocada em uma solução de PBS/BSA 0,5 % contendo o anti-IgG de coelho conjugado à enzima fosfatase alcalina (Sigma) por mais uma 1 h sob agitação suave. Esta solução então foi retirada e a membrana é lavada novamente com PBS Tween (0,05%) por 3 vezes e com o tampão da enzima fosfatase alcalina por 5 min com agitação suave. O revelador, uma solução de NBT/BCIP (Promega), foi adicionado logo a seguir. A combinação de NBT (cloreto de tetrazólio nitro-azul) e BCIP (sal de 5-bromo-4-cloro-3'-p-toluidina indolil fosfato) produz um precipitado insolúvel de cor negro-púrpura intensa quando reage com fosfatase alcalina, que é uma popular enzima conjugada para

sondas de anticorpo. A reação precisa ser interrompida com sucessivas lavagens com água destilada para que não ocorra marcação inespecífica.

Imunização, produção de anticorpos e citocinas in vivo

Corpos de oclusão do baculovírus AcMNPV (OBs) e os possíveis cristais da proteína recombinante fusionada com a POLH de AcMNPV foram incubados a 37 °C em uma solução alcalina de 0.1 M de Na₂CO₃ a dissolução de todos os cristais, neutralizados com 0.1 M de Tris-HCl (pH 7.6), e submetidos a quantificação de proteína total utilizando Quant-iT™ assay kit (Thermo Scientific) seguindo as instruções do fabricante. Os OBs e os cristais recombinantes, foram utilizados para imunização em camundongos Balb/c, de 6-8 semanas de idade, por via subcutânea. Esses animais foram imunizados 3 vezes, com intervalos de 15 dias entre cada imunização. A proteína foi ministrada na concentração de 100µg em um volume final de 200µL. A primeira inoculação foi ministrada com adjuvante incompleto de Freund (Sigma Aldrich) na proporção de 1:1, a segunda e a terceira imunização foi ministrada somente com os cristais. Os camundongos foram divididos em três grupos (6 animais por grupo): I – camundongo tratado com tampão fosfato, com grupo controle (grupo PBS); II– camundongo tratado com três doses dos possíveis cristais de proteína recombinante, com intervalos de duas semanas (grupo *pept/G-polh*); III – tratado com três doses de OBs de AcMNPV com intervalo de duas semanas (grupo POLH-Ac). Após 15 dias da última imunização, os camundongos foram sacrificados e o sangue periférico foi obtido por via retroorbital para obtenção do soro afim de dosar citocinas e anticorpos. A cavidade peritoneal destes animais foi ainda lavada para análise da migração celular no local, por meio de da contagem diferencial das células. O soro foi armazenado a -80⁰C até serem testados por Elisa, como descrito anteriormente. Paralelamente camundongos Balb/c, de 6-8 semanas de idade foram imunizados com o vírus da raiva atenuado (vacina comercializada) para produção de anticorpo.

Ensaio de cultivo e proliferação de esplenócitos

Os linfócitos foram separados por meio de maceração e lavagem do baço dos camundongos, marcados com CFSE, colocados em cultura por 48-60 h, a 37°C e 5% de CO₂ e depois o sobrenadante recolhido e suas células analisadas por citometria de fluxo. Os dados foram avaliados por meio do programa FlowJo versão 8.7 (TreeStar Software). As células em cultura foram estimuladas com Concanavalina A, para uma estimulação não específica (5 µg/mL), e com a proteína recombinante purificada (100µg/mL) para as estimulações específicas. Esplenócitos totais obtidos do baço de camundongos BALB/c foram marcados com o marcador citoplasmático fluorescente 5,6-carboxifluoresceína diacetate succinimidil éster (CFSE, Invitrogen) a 5µM e transferidos para placas de poliestireno a 10⁶ células/ml em meio RPMI 1640 (Sigma) enriquecido a 10% de soro fetal bovino (v/v) (Gibco), 1 mM de aminoácidos não essenciais, 1 mM de piruvato de sódio, 2mM de L-glutamina, 50 uM de 2β-mercaptoetanol e 50 µg/ml de gentamicina. Posteriormente, foram adicionados aos poços da referida placa a proteína POLH-AcMNPV (100µg/mL), RGPV/PEP (100µg/mL), concanavalina A (ConA) (Sigma) a 4ug/mL (mitógeno inespecífico de linfócitos T, utilizado como controle positivo) e meio enriquecido (controle negativo).

Após 5 dias de cultivo a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, o sobrenadante de cultivo foi coletado, congelado a -20°C e reservado para a quantificação de citocinas. As células foram lavadas 2 vezes com tampão de lavagem/leitura PBS contendo 2% de soro fetal bovino (v/v), ressuspendidas nesta mesma solução, adquiridas em citômetro de fluxo (BD FACS Verse) e lidas utilizando o programa BD CELLQUEST Pro. Os dados obtidos foram analisados pelo programa FlowJo versão 8.7 para a determinação da porcentagem de células que sofreram divisão e para a representação gráfica dos resultados. Essa porcentagem é calculada por meio da mensuração da quantidade relativa de células que apresentaram decaimento da fluorescência do CFSE (em comparação ao grupo controle negativo), que ocorre quando da ativação e expansão clonal dos linfócitos, visto que, como agente que se liga a proteínas intracelulares, o marcador tem seu sinal igualmente dividido durante a mitose celular.

Dosagem de citocinas

O sobrenadante obtido dos ensaios de cultura celular 24, 48 e 60 h foram submetidos à técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; Ensaio de Ligação Imunoenzimático) a fim de se avaliar os níveis de citocinas presentes nas amostras, demonstrados em valores absolutos (pg/ml). Foram utilizados kits comerciais (kit Ready-Set-Go!; eBioscience), seguindo-se as recomendações dos fabricantes, para a dosagem de TNF- α , INF- γ e IL10.

Resultados

Obtenção e clonagem do pept/G

A fim de expressar uma proteína quimérica contendo o pept/G fusionada à POLH do AcMNPV, um vetor doador, pFB1-6xHis-*polh* com modificações no gene *polh* foi construído (Figura 19). Esta ORF modificada tem um único sítio de restrição (*Nco* I) para fusão em fase de genes na região 5' e seis histidinas para identificação da proteína recombinante por immunoblotting (Figura 18A-I e B). O pept/G foi amplificado (Figura 18A-II e C) e inserido no gene *polh* modificado gerando o plasmídeo pFB1-6xHis-pept/G-*polh* (Figura 18A-III). O vetor modificado fusionado com pept/G foi denominado 6xHis-pept/G-*polh* (Figura 18D). Tanto o vetor sem a fusão e o vetor fusionado com o pept/G foram usados para construir os vírus recombinantes pelo Sistema Bac-to-Bac (Invitrogen). O vírus recombinante (denominado de vAc-pept/G-*polh*) foi amplificado em células de inseto. O DNA viral foi purificado e utilizado para confirmação por meio de de uma reação de PCR para o gene heterólogo utilizando iniciadores que paream no pept/G e amplificam um fragmento de aproximadamente 126 pb (Figura 19).

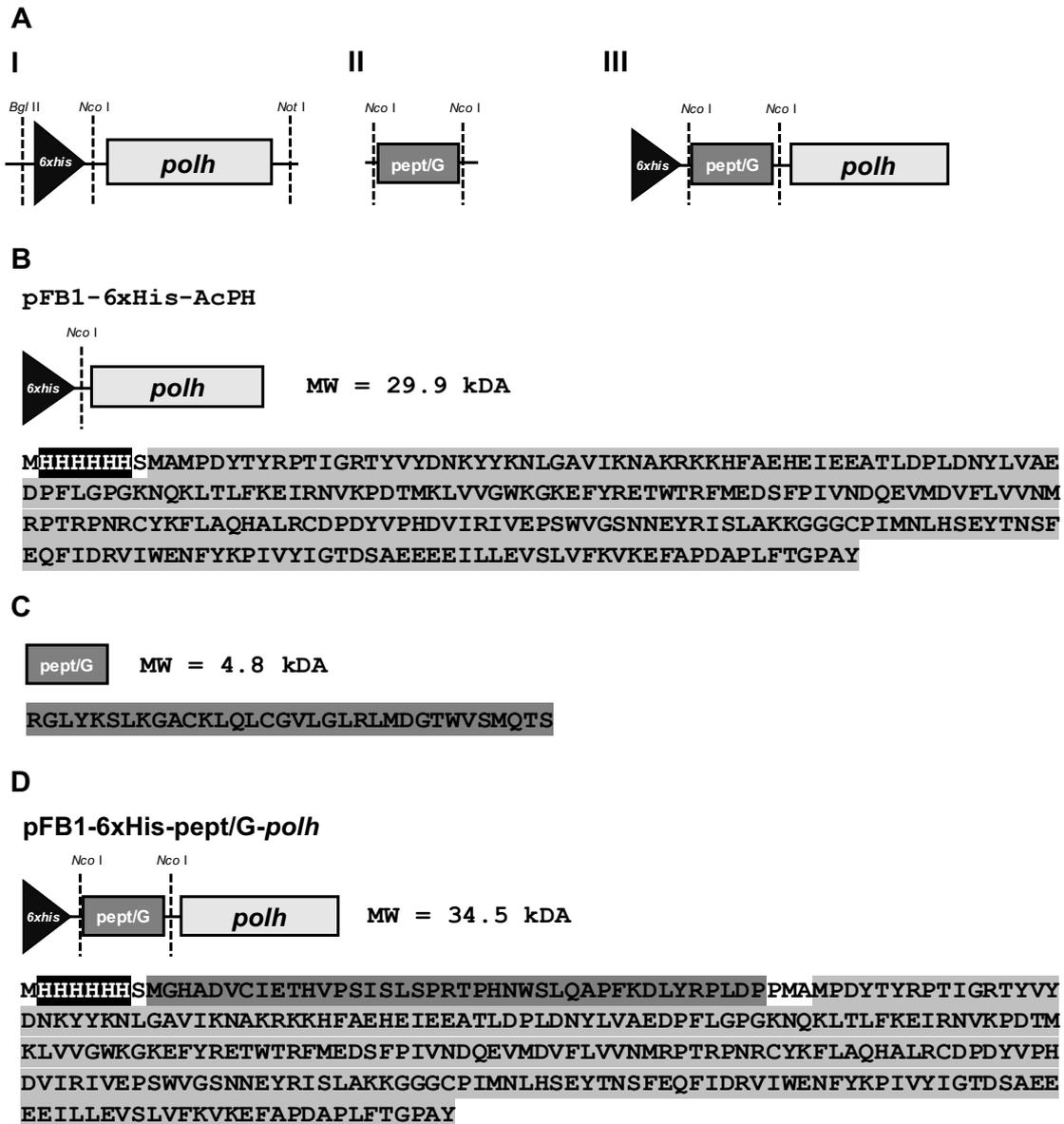


Figura 17. Esquemas dos genes usados para fusão da *polh* com o *pept/G* e seqüências de aminoácidos deduzidas a partir da seqüência do DNA. (A) Esquema mostrando a fusão do gene referente ao *pept/G* e o gene *polh* de AcMNPV. (I) Região do vetor pFB1-6xHis-*polh* usado para clonagem do gene de interesse no sítio para a enzima *Nco* I, resultando na fusão dos genes (II e III). Esse vetor recombinante foi usado para construir o vírus recombinante vAc-6xHis-*pept/G-polh* por transposição sítio específica em *E. coli* (Bac-to-bac® system, Invitrogen). (B) Seqüência de aminoácidos deduzidos do pFB1-6xhis-*polh* e 6xHis-*Polh* (29.9 kDa), (C) *pept/G* (4.8 kDa), e (D) pFB1-6xHis-*pept/G-polh* (34.5 kDa).

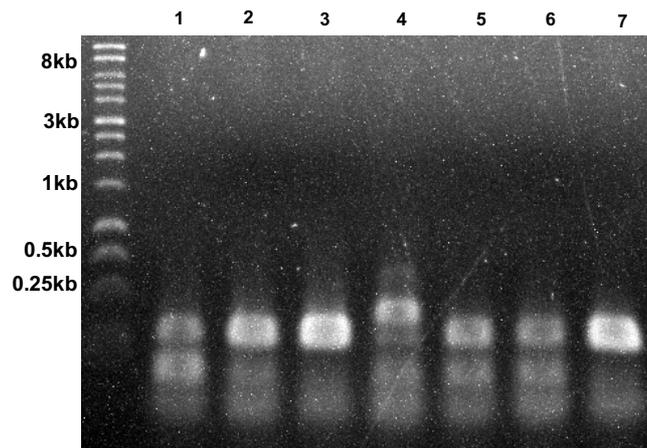


Figura 18. Confirmação da construção do vírus vAc-pept/G-polh. Gel de agarose a 0,8% mostrando resultado de reações de PCR a partir de DNA de possíveis vírus recombinantes contendo o gene pept/G em seu genoma. O resultado da PCR utilizando oligonucleotídeos (pept/G F e pept/G R) que amplificam um fragmento de tamanho de 126 pb.

Análise da expressão da proteína recombinante

Células Tn5B foram infectadas com diferentes vírus recombinantes e a 72 h p.i, foram analisadas por microscopia de luz (Figura 20), coletadas e o extrato protéico analisado por SDS-PAGE a 12% e imuno-marcação após a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose. As proteínas recombinantes contendo uma cauda de seis histidinas foram detectadas usando anticorpo anti-hexa-histidina (anti-6xHis) e nenhuma banda foi detectada em células não infectadas (Figura 21).

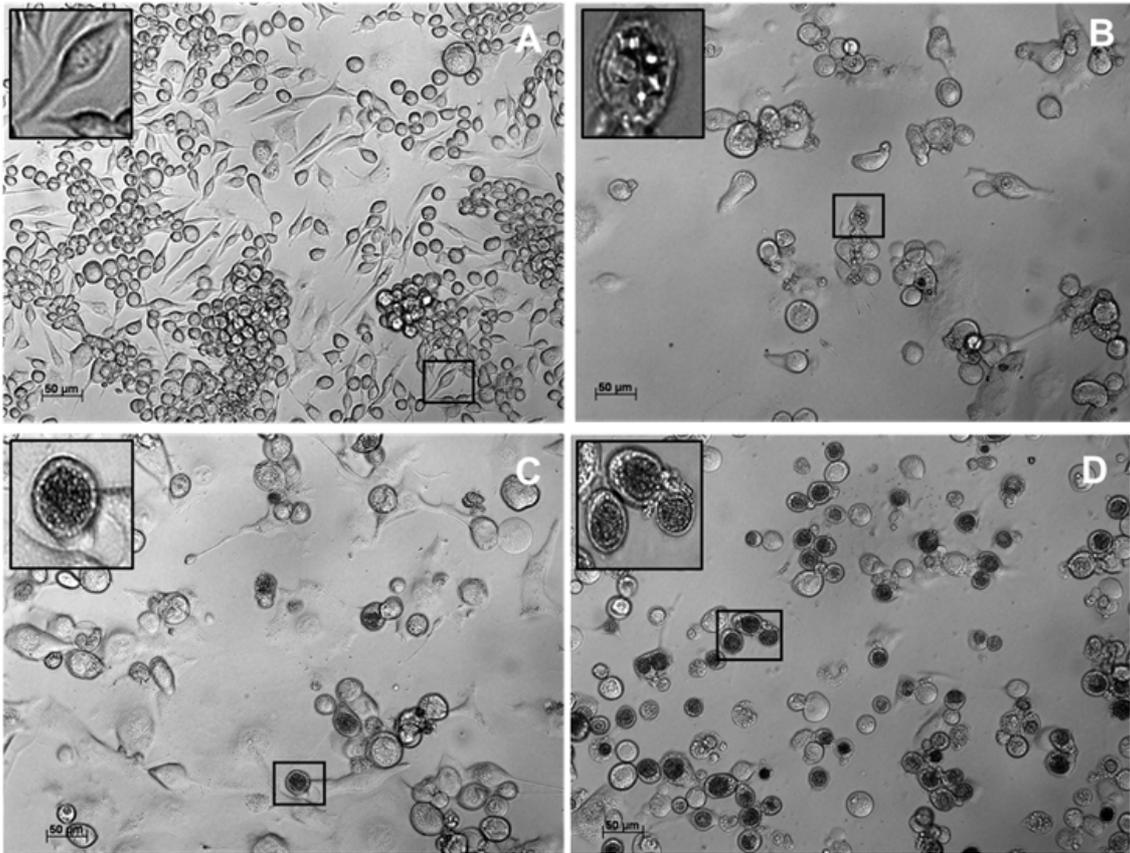


Figura 19. Análise do efeito citopático da infecção de células Tn5B com diferentes baculovírus a 72h.p.i. Células de inseto Tn5B não infectadas (A) ou infectadas (B, C e D) com diferentes recombinantes ou vírus selvagem. Células infectadas com o vírus AcMNPV (B); com vAc-6xhis-polh (C) e vAc-pept/G-polh (D). OBs ou poliedros são mostrados no núcleo das células B e corpos de oclusão de morfologia disforme e em agregados C, D e E. vAc-6xhis-polh vírus contendo o gene *polh* contendo seis histidinas na 5'.

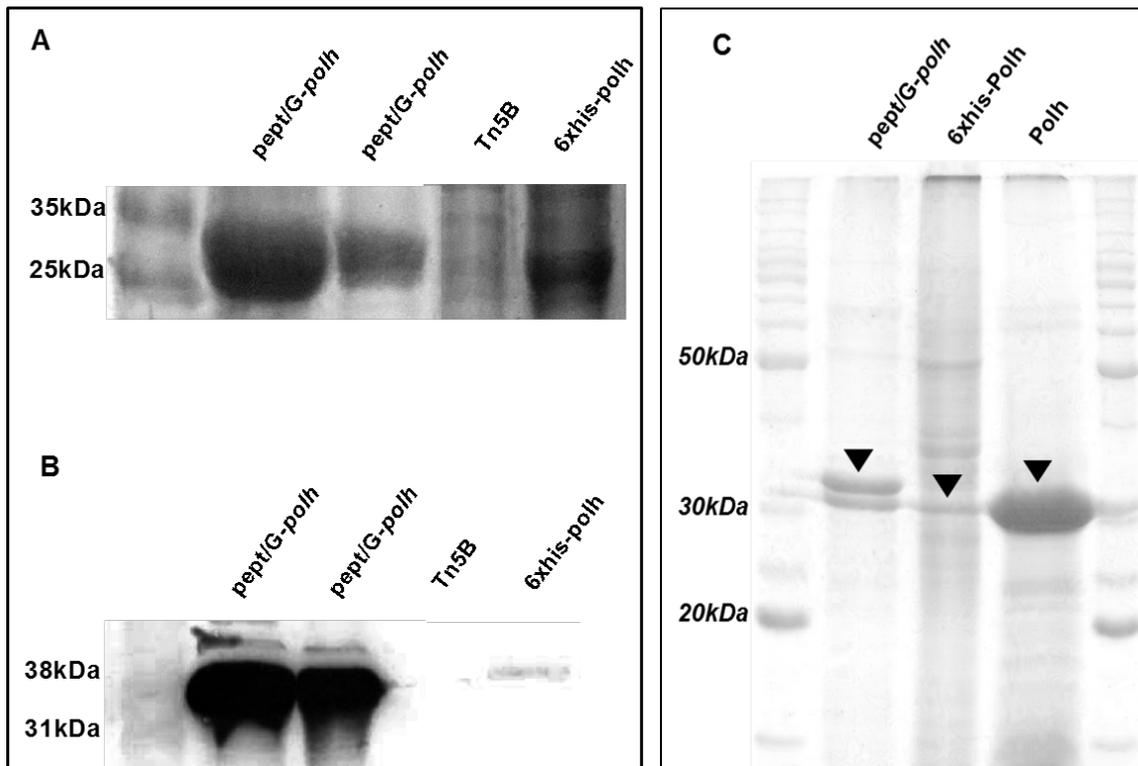


Figura 20. Análise da expressão de proteínas recombinantes em células de inseto infectadas com diferentes baculovírus recombinantes. (A e C) SDSPAGE 12 % de extratos de células de inseto infectadas por baculovírus recombinantes. (B) Análise de Western blot dos extratos proteicos. A membrana foi imunomarcada com anti-6xHIS (Promega) como anticorpo primário. A mesma banda de 34,5 kDa do SDS-PAGE gel é observada na membrana, que foi reconhecida pelo anticorpo anti-HIS.

Análise da purificação dos cristais recombinantes

Larvas de *S. frugiperda* foram infectadas com os vírus vAc-6xHis-polh e vAcPEP/polh e os cristais das proteínas recombinantes foram purificados e analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), SDS-PAGE e imunoblotting. Os cristais apresentaram duas bandas após a centrifugação em gradiente de sacarose (Figure 22A). Na análise por MEV, os cristais se mostraram como uma massa proteica sem forma definida e (Figura 19B-I e 19B-II). Os cristais foram analisados por SDS-PAGE e imuno-marcação confirmando a natureza proteica dos cristais e a presença da cauda de histina na imuno-marcação com o anti-6xHis (Figura 23A), pept/G utilizando anticorpo anti-virus da raiva atenuado (vacina comercializada) (Figura 23B), PEP/Polh na imuno-marcação com anti-PEP/Polh e anti-Polh (Figura 23C e D, respectivamente).

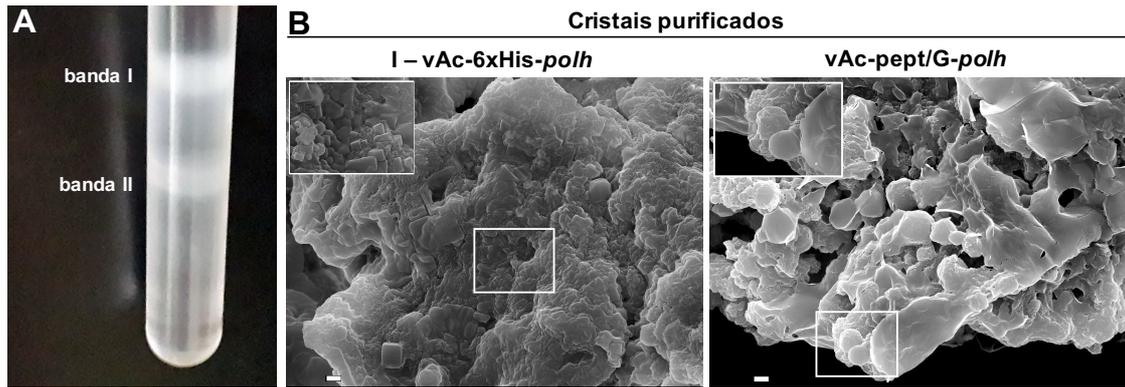


Figura 21. Purificação e análise ultraestrutural dos corpos de oclusão derivados de insetos infectados pelos baculovírus recombinantes *vAc-6xHis-polh* e *vAcPEP/polh*. Possíveis cristais da proteína POLH contendo seis histidinas na sua amino-terminal (derivados da infecção pelo vírus *vAc-6xHis-polh*) e da proteína POLH fusionada com o *pept/G* na amino-terminal (derivados da infecção pelo vírus *vAc-pept/G-polh*) purificados por centrifugação em gradiente de sacarose a partir de cadáveres *S. frugiperda*. (A) Um tubo de ultra centrifuga depois da centrifugação do extrato de insetos infectados com *vAc-pept/G-polh*, mostrando duas bandas. (B) Os cristais foram coletados do gradiente de sacarose e preparados para microscopia eletrônica de varredura: (I) Corpos de oclusão de cadáveres de inseto infectados com *6xHis-Polh*; (II) Corpos de cadáveres de inseto infectados com *vAc-pept/G-polh* (barra = 5 μ m).

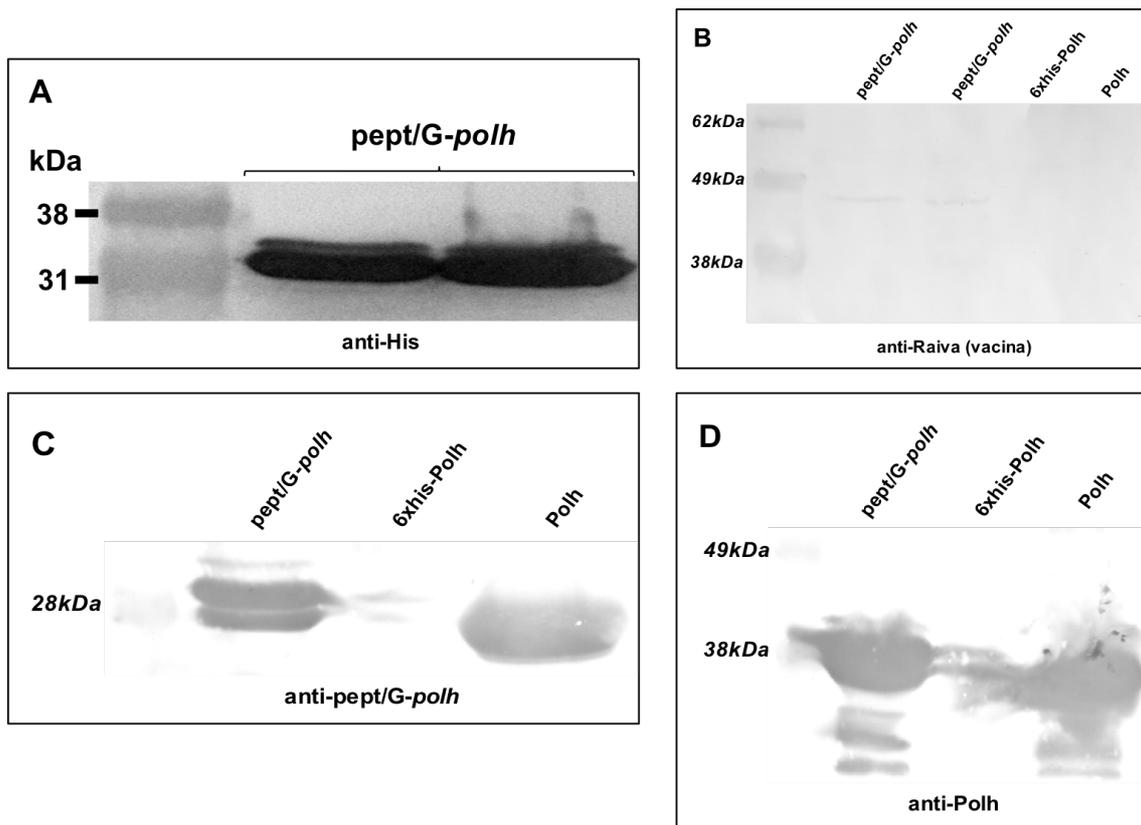


Figura 22. Análise da expressão de proteínas recombinantes. Cristais purificados e solubilizados derivados de insetos infectados com vírus recombinantes e separados por SDS-PAGE 12% (dados não mostrados) foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi então tratada com anticorpos anti-6xHis (A) anti-vírus da raiva atenuado (vacina comercializada) (B), anti-*pept/G-polh* (C) e anti-*Polh* (D).

Ensaio de proliferação celular e análises de citocinas

Para analisar se as proteínas recombinantes produzidas em células de inseto infectadas por baculovírus recombinantes podem estimular linfócitos, células do baço de camundongos saudáveis foram estimuladas *in vitro*. Sobrenadantes de células do baço em cultura dos grupos experimentais foram utilizados para a detecção da produção de citocinas. As citocinas interleucina-10 (IL-10), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interferon-gama IFN- γ foram medidos por ELISA. A estimulação com *pept/G-polh* não induziu a produção de IL-10, IFN- γ e TNF- α em comparação aos níveis de células não estimuladas (dados não amostrados). Por outro lado, estimulou a proliferação de células do baço (Figura 24). Portanto, *pept/G-polh* estimulou eficientemente a proliferação de células do baço.

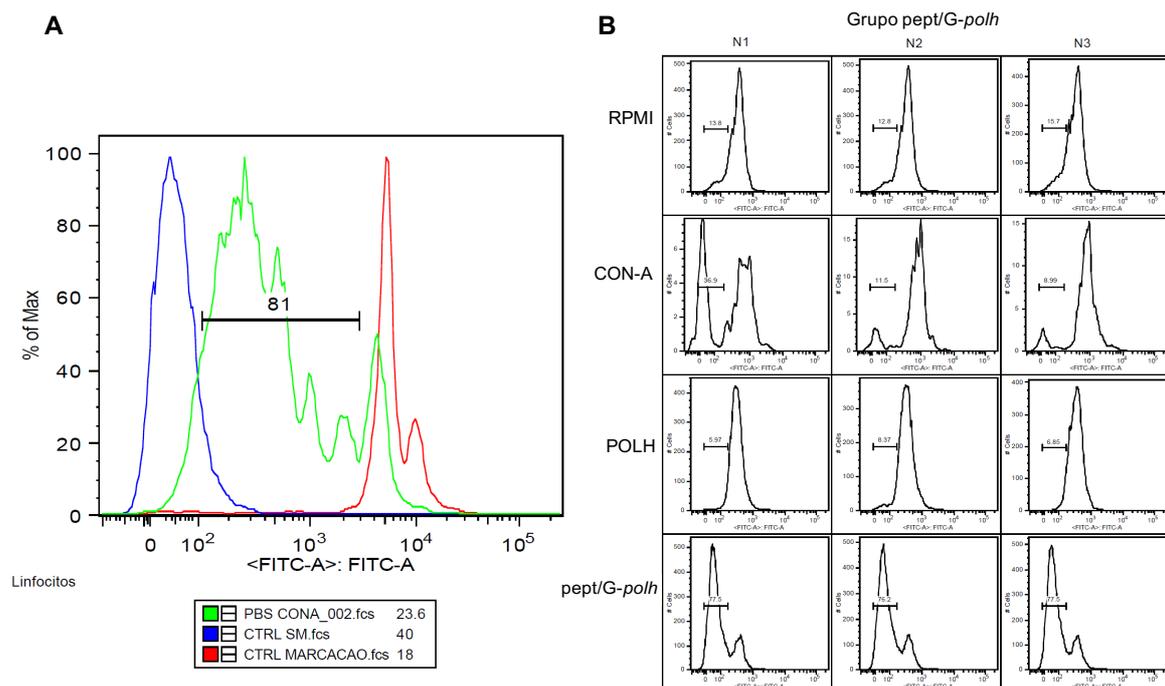


Figura 23. Ensaio de proliferação celular pelo método CFSE. A medida que a curva se desloca para a esquerda significa que está ocorrendo proliferação (A) Controle da técnica de CFSE. (B) experimento com o grupo de animais imunizados com *pept/G-polh*. Tampão fosfato com Concanavalina (PBS CONA_002fcs), controle sem marcação (CTRL_SM_fcs) e Controle marcado (CTRL_MARCAÇÃO). RPMI, Concanavalina A (CON-A), Poliedrina AcMNPV (POLH) e *pept/G-polh*.

Discussão

Há mais de 20 anos, a expressão do gene da glicoproteína G tem sido estudada tanto em células eucarióticas (Burger et al, 1991; Kieny et al, 1984; McGarvey et al, 1995), quanto em procarióticas (Lathe et al, 1983). A proteína expressa em bactérias não teve efeito protetor em camundongos após desafio com o vírus da raiva, provavelmente porque a proteína produzida nesse sistema não foi glicosilada, o que é fundamental para que gere atividade. Diante disso, sistemas de expressão em células de mamíferos também foram testados. Morimoto et al. (1992) construíram um vetor derivado de retrovírus contendo o gene da GPV, expressando-a em células de neuroblastoma e BHK-21. Mochizuki et al. (1998) utilizaram HIV-1 (vírus da imunodeficiência humana) defectivo e também observaram produção da glicoproteína G em células humanas HEK293-T (células embrionárias de rim humano). Em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, Klepfer et al. (1993), expressaram a glicoproteína G utilizando um vetor de expressão sob controle de um promotor indutível (metalotioneína) e um promotor constitutivo (triose desidrogenase). A glicoproteína G foi glicosilada e associada à membrana das leveduras, porém extratos de levedura contendo a proteína protegeram animais em desafio intramuscular, mas não no desafio intracerebral de camundongos.

Barros (2011) construiu um baculovírus recombinante contendo o gene da glicoproteína G fusionado à região 3' do gene da poliedrina, com o objetivo de facilitar a purificação das proteínas recombinantes. O baculovírus recombinante foi capaz de expressar a proteína recombinante em insetos infectados e os corpos de oclusão construídos foram purificados parcialmente por centrifugação em gradiente de sacarose. Entretanto, os corpos de oclusão não possuíam forma definida e não foi possível uma purificação livre de contaminantes.

Uma experimento com vacinação oral contra raiva em guaxinins, com glicoproteína G expressa por células Sf9 infectadas por baculovírus recombinante sob o comando do promotor polh, demonstrou que a glicoproteína G expressa por células de inseto mostrou ser similar a glicoproteína G nativa em relação a antigenicidade e imunogenicidade, quando vacinados com duas doses de vacina contendo 100 µg de glicoproteína G na primeira dose e 200 µg na segunda, depois de 7 semanas (Fu et al, 1993).

A glicoproteína G nativa tem uma grande capacidade em induzir a produção de anticorpos neutralizantes e ativação de células do sistema imune, tendo como resultado a proteção contra a doença, mesmo em um desafio intracerebral (Jallet et al, 1999; Lodmell et al, 2004; Perrin et al, 1985; Wiktor et al, 1984). Marissen et al. (2004) realizou experimentos com a tentativa de mapear a região mínima da glicoproteína G que é reconhecida por anticorpos monoclonais, uma vez que algumas estirpes do vírus da raiva conseguem escapar da neutralização de dois anticorpos (Bakker et al, 2006). O gene da glicoproteína G destas variantes anticorpo-resistentes foi sequenciado e resíduos críticos de aminoácidos envolvidos na ligação de cada um desses anticorpos foram identificados e testados por meio de análises de ligação, por meio do método “Pepscan” que se baseia em sintetizar vários peptídeos randômicos de alguma glicoproteína G de interesse e que podem ser usados diretamente em Elisa, dado que estes peptídeos podem ser reconhecidos por anticorpos neutralizantes (Geysen et al, 1984; Miles et al, 1989; Sloodstra et al, 1996).

Neste trabalho, a expressão de pept/G fusionados à proteína poliedrina dos baculovírus AcMNPV foi realizada. Possíveis corpos de inclusão foram purificados de larvas de *S. frugiperda* infectadas com os vírus recombinantes e analisados por microscopia eletrônica, SDS-PAGE e immunoblotting. Os corpos de inclusão apresentaram duas bandas no gradiente de sacarose, e um formato mais próximo do selvagem o que se espera de um peptídeo fusionado com a poliedrina de baculovírus, este resultado foi diferente do observado por Barros (2011), em que foi produzido apenas uma massa proteica.

Os possíveis OBs foram dissolvidos em solução alcalina e submetidos ao Western blot e uma banda imunorreativa de 34.5 kDa foi detectada usando anti-6xHis comprovando a expressão da proteína fusionada e usando o anticorpo anti-virus da raiva atenuado (vacina comercializada), anti-pept/G-*Polh* e anti-*Polh*, comprovando a correta imunogenicidade.

A glicoproteína G possui epítomos que envolvem a ativação de linfócitos T citotóxicos durante a infecção viral (Desmézières et al, 1999). Quando camundongos vacinados com glicoproteína G trimérica e solúvel, produzida por células HEK-293T, com e sem o adjuvante Matrix-M (adjuvante baseado em saponina que modula tanto resposta humoral quanto celular), apresentaram

título de anticorpos neutralizantes de 1,99 e 12,56 UI/mL, respectivamente, e sobrevivência de 100% em ambos os casos, demonstrou capacidade imunoprotetiva quando desafiados com o vírus da raiva intracerebralmente. Os animais vacinados com glicoproteína G monomérica, produzida por células Sf9 infectadas com baculovírus recombinante, também com 1 µg de glicoproteína G /dose, com e sem o adjuvante, apresentaram título de anticorpos neutralizantes de 0,18 e 11,67 UI/mL, e sobrevivência 10% e 80%, respectivamente, quando desafiados com o vírus da raiva intracerebralmente. Vacinas inativadas e proteínas geralmente geram uma resposta imune, celular ou humoral, insuficientes, requerendo uma associação à adjuvantes que sejam capazes de induzir um resposta imunológica protetora (Vander Veen et al, 2012).

Trabalhos realizados com OBs de AgMNPV, mostraram que podem aumentar uma resposta de células Th1 e podem ser considerados mais eficazes como vetores de vacinação ou adjuvantes imunológicos do que AcMNPV (Bocca et al, 2013). AgMNPV na forma selvagem ou recombinante, pode ser também utilizado para alterar o tipo de resposta adaptativa desenvolvida (Barros, 2011; Bocca et al, 2013).

A produção de anticorpos e a resposta imune mediada por células são reconhecidamente importantes para a proteção contra a infecção pelo vírus da raiva (Chopy et al, 2011; Hooper et al, 1998; Saxena et al, 2009; Wen et al, 2011). A análise das citocinas permite avaliar a tendência da resposta imunológica estimulada por um determinado antígeno. Basicamente, por meio da proliferação de clones de células CD4+ Th1 e Th2 e do estudo da liberação de citocinas após estímulo com antígeno, é possível definir quais mecanismos imunológicos foram ativados contra o antígeno em estudo. Nesse contexto, quando utilizamos cristais recombinantes fusionado com o peptídeo mais imunogênico do vírus da raiva. Houve um aumento da proliferação celular, evidenciando uma resposta imune celular. A produção de IL-10, IFN-γ e TNF-α está relacionada à resposta imune humoral, inibindo a ativação de Th1 (Ng & Oldstone, 2014). As citocinas produzidas por linfócitos Th1, como o IFN-γ, resultam na produção de anticorpos IgG2a, promovendo uma tendência a resposta imune do tipo celular, característica de uma infecção causada por vírus (Nimmerjahn & Ravetch, 2005). Diante disto, analisamos a produção de algumas citocinas (IL-10, IFN-γ e TNF-α) por esplenócitos *ex vivo*, para melhor caracterizar a resposta imunológica dos

animais imunizados com a proteína recombinante. Porém, não foi observada uma diferença significativa quando analisadas estatisticamente quanto a produção de IL-10, IFN- γ e TNF- α em relação aos controles, quando utilizamos cristais pept/G-polh.

Os resultados deste trabalho corroboram outros trabalhos anteriores que mostraram que baculovírus recombinantes e as proteínas recombinantes expressas são capazes de modular a resposta imune de mamíferos *in vivo* e *in vitro*. Observamos que o pept/G-polh é capaz de estimular células do baço e desencadear uma resposta celular. Porém, será preciso padronizar melhor a análise de IL-10, IFN- γ e TNF- α , uma vez que não foi possível observar níveis diferentes do controle, como observado pelos trabalhos citados acima que utilizaram a glicoproteína G fusionada e não fusionada com a poliedrina.

Outros trabalhos serão necessários para elucidar se baculovírus selvagem ou formas recombinantes podem alterar os tipos de respostas imunológicas características de outras doenças.

Perspectivas

Hepatite

- ❖ Realizar um teste de ELISA onde a proteína produzida será utilizada como antígeno para reconhecer anticorpos presentes no soro de pacientes infectados com HBV, HAV, HCV e CMV.
- ❖ Redigir um artigo/patente com os resultados obtidos.

Raiva

- ❖ Repetir o experimento de ativação de linfócitos B após a estimulação *in vitro* com o baculovírus recombinante após a inoculação em camundongos saudáveis, para avaliação da expressão de moléculas co-estimulatórias na superfície dos linfócitos B, por citometria de fluxo, produção de anticorpos e produção de citocinas, por ELISA.

- ❖ Repetir o experimento de ativação de linfócitos T *in vitro* com o baculovírus recombinante pela análise da expressão de citocinas pelo método de Elisa, proliferação celular, citometria de fluxo e cooperação na ativação de linfócitos B.
- ❖ Avaliação da dinâmica da resposta imune por anticorpos após a inoculação em camundongos saudáveis do baculovírus recombinante por meio da soroneutralização;
- ❖ Análise de sobrevivência de camundongos vacinados com a proteína recombinante após o desafio com amostra padrão do vírus da raiva.
- ❖ Redigir um artigo com os resultados obtidos.

Referências Bibliográficas

Araujo ACOd (2011) Nova abordagem para expressão da partícula sSHbsAg do antígeno HBsAg do vírus da hepatite B em células de inseto. Mestrado Thesis, Patologia Molecular da Universidade de Brasília, Universidade de Brasília.,

Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO (2002) Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *Journal of general virology* **83**: 2059-2073

Ardisson-Araújo DMP, Morgado FDS, Schwartz EF, Corzo G, Ribeiro BM (2013a) A New theraphosid Spider Toxin Causes Early Insect Cell Death by Necrosis When Expressed In Vitro during Recombinant Baculovirus Infection. *PLoS one* **8**: 12

Ardisson-Araújo DMP, Rocha JR, da Costa MHO, Bocca AL, Dusi AN, de Oliveira Resende R, Ribeiro BM (2013b) A baculovirus-mediated strategy for full-length plant virus coat protein expression and purification. *Virology journal* **10**: 262-262

Badrane H, Bahloul C, Perrin P, Tordo N (2001) Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. *Journal of virology* **75**: 3268-3276

Bakker AB, Marissen W, Goudsmit J. (2006) Antigenic peptides of rabies virus and uses thereof. Google Patents.

Banyard AC, Hayman D, Freuling CM, Müller T, Fooks AR, Johnson N (2013) Bat rabies. In *Rabies: scientific basis of the disease and its management*, pp 215-267. Elsevier Academic Press, Oxford, UK

Barros MCdES (2011) Atividade de baculovírus selvagens em camundongos in vivo e in vitro e Expressão da proteína do envelope do vírus da Febre Amarela (YFE) e da glicoproteína do vírus da Raiva (RVGP) em células de inseto. Universidade de Brasília,

- Barry GF (1988) A broad-host-range shuttle system for gene insertion into the chromosomes of Gram-negative bacteria. *Gene* **71**: 75-84
- Beck J, Nassal M (2007) Hepatitis B virus replication. *World journal of gastroenterology* **13**: 48
- Blissard GW (1996) Baculovirus--insect cell interactions. *Cytotechnology* **20**: 73-93
- Bocca AL, Barros MCdES, Martins GKM, de Araújo ACO, Souza MJ, Ribeiro AM, Figueiredo F, Ribeiro BM (2013) Immunological effects of *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) by stimulation of mice in vivo and in vitro. *Virus research* **176**: 119-127
- BRASIL. (2008a) Hepatites virais: o Brasil está atento. In Saúde Md (ed.), Brasília, DF, Brasil.
- BRASIL. (2008b) Manual de diagnóstico laboratorial de raiva. In Saúde Md (ed.), Brasília, DF, Brasil.
- BRASIL. (2015) Casos de raiva humana, grandes regiões e unidades federadas 1990 a 2015., Secretaria de Vigilância em Saúde, Vol. 2015.
- Bruss V (2004) Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus research* **106**: 199-209
- Burand JP, Summers MD, Smith GE (1980) Transfection with baculovirus DNA. *Virology* **101**: 286-290
- Burger S, Remaley A, Danley J, Moore J, Muschel R, Wunner W, Spitalnik S (1991) Stable expression of rabies virus glycoprotein in Chinese hamster ovary cells. *Journal of general virology* **72**: 359-367
- Carnieli P, Brandão PE, Carrieri ML, Castilho JG, Macedo CI, Machado LM, Rangel N, de Carvalho RC, de Carvalho VA, Montebello L (2006) Molecular epidemiology of rabies virus strains isolated from wild canids in Northeastern Brazil. *Virus research* **120**: 113-120
- Carvalho AMCd, Araújo TMEd (2008) Análise da produção científica sobre Hepatite B na pós-graduação de enfermagem:[revisão]. *Revista Brasileira de Enfermagem* **61**: 518-522
- Cenna J, Tan GS, Papaneri AB, Dietzschold B, Schnell MJ, McGettigan JP (2008) Immune modulating effect by a phosphoprotein-deleted rabies virus vaccine vector expressing two copies of the rabies virus glycoprotein gene. *Vaccine* **26**: 6405-6414
- Charlton K (1994) The pathogenesis of rabies and other lyssaviral infections: recent studies. *Current topics in microbiology and immunology* **187**: 95
- Charlton K, Nadin-Davis S, Casey G, Wandeler A (1997) The long incubation period in rabies: delayed progression of infection in muscle at the site of exposure. *Acta neuropathologica* **94**: 73-77
- Chopy D, Detje CN, Lafage M, Kalinke U, Lafon M (2011) The type I interferon response bridges rabies virus infection and reduces pathogenicity. *Journal of neurovirology* **17**: 353-367
- Clem RJ, Passarelli AL (2013) Baculoviruses: Sophisticated Pathogens of Insects. *PLoS Pathogens* **9**: e1003729-e1003729

- Condreay JP, Kost TA (2007) Baculovirus expression vectors for insect and mammalian cells. *Current Drug Targets* **8**: 1126-1131
- Custer B, Sullivan SD, Hazlet TK, Iloeje U, Veenstra DL, Kowdley KV (2004) Global epidemiology of hepatitis B virus. *Journal of clinical gastroenterology* **38**: S158-S168
- da Silva AL, Vitorino RR, Esperidião-Antonio V, Santos ET, Santana LA, Henriques BD, Gomes AP (2012) Hepatites virais: B, C e D: atualização. *Rev Bras Clin Med São Paulo* **10**: 206-218
- Darani M, Gerber M (1974) Hepatitis-B antigen in vaginal secretions. *The Lancet* **304**: 1008
- Davison F, Alexander GJ, Trowbridge R, Fagan EA, Williams R (1987) Detection of hepatitis B virus DNA in spermatozoa, urine, saliva and leucocytes, of chronic HBsAg carriers: a lack of relationship with serum markers of replication. *Journal of hepatology* **4**: 37-44
- Desmézières E, Jacob Y, Saron M-F, Delpeyroux F, Tordo N, Perrin P (1999) Lyssavirus glycoproteins expressing immunologically potent foreign B cell and cytotoxic T lymphocyte epitopes as prototypes for multivalent vaccines. *Journal of general virology* **80**: 2343-2351
- Diaz AM, Papo S, Rodriguez A, Smith JS (1994) Antigenic Analysis of Rabies-virus Isolates from Latin America and the Caribbean. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* **41**: 153-160
- Dietzgen R, Calisher C, Kurath G, Kuzman I, Rodriguez L, Stone D, Tesh R, Tordo N, Walker P, Wetzel T (2012) Rhabdoviridae, p 654–681. *Virus taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses Elsevier, San Diego, CA*
- El Khouri M, Santos VAd (2004) Hepatitis B: epidemiological, immunological, and serological considerations emphasizing mutation. *Revista do Hospital das Clínicas* **59**: 216-224
- Entwistle P.F. EHF (1985) In: Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Physiology. In *Viral control*, eds. Gilbert LI KG (ed), pp 347–412. Pergamon Press, Oxford, UK
- Faber M, Li J, Kean RB, Hooper DC, Alugupalli KR, Dietzschold B (2009) Effective preexposure and postexposure prophylaxis of rabies with a highly attenuated recombinant rabies virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 11300-11305
- Favoretto SR, Carrieri ML, Cunha EMS, Aguiar EA, Silva LHQ, SodrÉ MM, Souza MCA, Kotait I (2002) Antigenic typing of Brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-2000. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* **44**: 91-95
- Favoretto SR, De Mattos CC, De Moraes NB, Carrieri ML, Rolim BN, Silva LM, Rupprecht CE, Durigon EL, De Mattos CA (2006) Rabies virus maintained by dogs in humans and terrestrial wildlife, Ceara State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* **12**: 1978-1981
- Favoretto SR, de Mattos CC, Moraes NB, Araújo FA, de Mattos CA (2001) Rabies in marmosets (*Callithrix jacchus*), Ceará, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* **7**: 1062
- Federici BA (1997) Baculovirus pathogenesis. In *The baculoviruses*, pp 33-59. Springer
- Ferreira CT, Silveira Td (2004) Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. *Revista brasileira de epidemiologia = Brazilian journal of epidemiology* **7**: 473-487

Fonseca JCFd (2007) História natural da hepatite crônica B:[revisão]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*: 672-677

Frazatti-Gallina NM, Mourão-Fuches RM, Paoli RL, Silva ML, Miyaki C, Valentini EJ, Raw I, Higashi HG (2004) Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. *Vaccine* **23**: 511-517

Friesen PD (1997) Regulation of baculovirus early gene expression. In *The baculoviruses*, pp 141-170. Springer

Fu ZF, Rupprecht CE, Dietzschold B, Saikumar P, Niu HS, Babka I, Wunner WH, Koprowski H (1993) Oral vaccination of racoons (*Procyon lotor*) with baculovirus-expressed rabies virus glycoprotein. *Vaccine* **11**: 925-928

Funk CJ, Braunagel SC, Rohrmann GF (1997) Baculovirus structure. In *The baculoviruses*, pp 7-32. Springer

Ganem D, Prince AM (2004) Hepatitis B virus infection—natural history and clinical consequences. *New England Journal of Medicine* **350**: 1118-1129

Ganem D, Schneider RJ (2001) Hepadnaviridae: the viruses and their replication. *Fields virology* **2**: 2923-2969

Geysen HM, Meloen RH, Barteling SJ (1984) Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **81**: 3998-4002

Gonçales Júnior FL (2002) Hepatite B: história natural da infecção; apresentação clínica; complicações. In *Tratado de hepatites virais*, pp 141-150. Atheneu

Gonçales N, Cavalheiro N (2006) Marcadores sorológicos da hepatite B e sua interpretação. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* **10**: 19-22

Granados RR, Guoxun L, Derksen ACG, McKenna KA (1994) A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology* **64**: 260-266

Granados RR, Lawler KA (1981) In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology* **108**: 297-308

Green M, Sambrook J (2012) Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press. *New York*

Greene GL, Leppla NC, Dickerson WA (1976) Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology* **69**: 487-488

Grob P (1998) Hepatitis B: virus, pathogenesis and treatment. *Vaccine* **16**: S11-S16

Gupta PK, Sharma S, Walunj SS, Chaturvedi V, Raut AA, Patial S, Rai A, Pandey K, Saini M (2005) Immunogenic and antigenic properties of recombinant soluble glycoprotein of rabies virus. *Veterinary microbiology* **108**: 207-214

- Haase S, Sciocco-Cap A, Romanowski V (2015) Baculovirus Insecticides in Latin America: Historical Overview, Current Status and Future Perspectives. *Viruses* **7**: 2230-2267
- Hadziyannis SJ, Vassilopoulos D (2001) Hepatitis B e antigen–negative chronic hepatitis B. *Hepatology* **34**: 617-624
- Hatzakis A, Magiorkinis E, Haida C (2006) HBV virological assessment. *Journal of hepatology* **44**: S71-S76
- Hawtin RE, Zarkowska T, Arnold K, Thomas CJ, Gooday GW, King LA, Kuzio JA, Possee RD (1997) Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Virology* **238**: 243-253
- Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, Toprak U (2009) New Insights into Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function. In *Annual Review of Entomology* Vol. 54, pp 285-302. Palo Alto: Annual Reviews
- Herniou EA, Olszewski JA, O'Reilly DR, Cory JS (2004) Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. *Journal of virology* **78**: 3244-3251
- Hoffmann-Campo C, Oliveira L, Moscardi F, Gazzoni D, Corrêa-Ferreira B, Lorini I, Borges M, Panizzi A, Sosa-Gomez D, Corso I (2003) Integrated pest management in Brazil. *Integrated pest management in the global arena CABI Publishing, Wallingford and Cambridge*: 285-299
- Hollinger FB (2008) Hepatitis B virus infection and transfusion medicine: science and the occult. *Transfusion* **48**: 1001-1026
- Hollinger FB, Liang TJ (2001) Hepatitis B virus. *Fields virology* **4**: 2971-3036
- Hoofnagle H (1983) Serodiagnosis of acute viral hepatitis. *Hepatology* **3**: 267-268
- Hooper DC, Morimoto K, Bette M, Weihe E, Koprowski H, Dietzschold B (1998) Collaboration of antibody and inflammation in clearance of rabies virus from the central nervous system. *Journal of virology* **72**: 3711-3719
- Horack HM (1939) Allergy as a factor in the development of reactions to anti-rabic treatment. *The American Journal of the Medical Sciences* **197**: 672-682
- Hourani MR, Mayor GH, Greenbaum DS, Hugget DO, Patterson MJ (1978) Hepatitis B surface antigen in urine of hemodialysis patients. *Kidney international* **13**: 324-328
- ICTV. (2015) INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES., Vol. 2016.
- Irwin GR, Allen AM, Bancroft WH, Karwacki JJ, Brown H, Pinkerton R, Willhight M, Top F (1975) Hepatitis B antigen in saliva, urine, and stool. *Infection and immunity* **11**: 142-145
- Iwasaki Y (1991) Spread of virus within the central nervous system. *The natural history of rabies*: 121-132
- Jallet C, Jacob Y, Bahloul C, Drings A, Desmezieres E, Tordo N, Perrin P (1999) Chimeric lyssavirus glycoproteins with increased immunological potential. *Journal of virology* **73**: 225-233

- Jarvis DL (1997) Baculovirus expression vectors. In *The baculoviruses*, pp 389-431. Springer
- Jarvis DL (2009) Baculovirus–insect cell expression systems. *Methods in enzymology* **463**: 191-222
- Jehle JA, Blissard GW, Bonning BC, Cory JS, Herniou EA, Rohrmann GF, Theilmann DA, Thiem SM, Vlak JM (2006) On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Archives of Virology* **151**: 1257-1266
- Jenison SA, Lemon SM, Baker LN, Newbold JE (1987) Quantitative analysis of hepatitis B virus DNA in saliva and semen of chronically infected homosexual men. *Journal of Infectious Diseases* **156**: 299-307
- Ji X, Sutton G, Evans G, Axford D, Owen R, Stuart DI (2010) How baculovirus polyhedra fit square pegs into round holes to robustly package viruses. *The EMBO journal* **29**: 505-514
- Joseph S, David WR (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. *Gold Spring Harbor, New York*
- Kawano H, Mifune K, Ohuchi M, Mannen K, Cho S, Hiramatsu K, Shichijo A (1990) Protection against rabies in mice by a cytotoxic T cell clone recognizing the glycoprotein of rabies virus. *Journal of general virology* **71**: 281-287
- Kieny M, Lathe R, Drillien R, Spehner D, Skory S, Schmitt D, Wiktor T, Koprowski H, Lecocq J (1984) Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature* **312**: 163-166
- King AMQ, Adams MJ, Lefkowitz EJ, Carstens EB (2012) *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Vol. 9: Elsevier.
- Klepfer SR, Debouck C, Uffelman J, Jacobs P, Bollen A, Jones EV (1993) Characterization of rabies glycoprotein expressed in yeast. *Archives of virology* **128**: 269-286
- Komatsu H, Inui A, Sogo T, Hiejima E, Tateno A, Klenerman P, Fujisawa T (2010) Cellular immunity in children with successful immunoprophylactic treatment for mother-to-child transmission of hepatitis B virus. *BMC infectious diseases* **10**: 1
- Koprowski H, Cox H (1948) Studies on Chick Embryo adapted Rabies Virus. I. Culture Characteristics and Pathogenicity. *Journal of immunology* **60**: 533-554
- Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL (2005) Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature biotechnology* **23**: 567-575
- Kotait I, Carrieri ML, Carnieli Júnior P, Castilho JG, Oliveira RdN, Macedo CI, Ferreira KCS, Achkar SM (2007) Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. *BEPA Boletim Epidemiológico Paulista (Online)* **4**: 02-08
- Krieg A, Franz JM, Groner A (1980) Safety of Entomopathogenic Viruses for Control of Insect Pests. *Environ Conserv* **7**: 158-160
- Lai CL, Ratzu V, Yuen M-F, Poynard T (2003) Viral hepatitis B. *The Lancet* **362**: 2089-2094

Lanford RE, Luckow V, Kennedy R, Dreesman G, Notvall L, Summers M (1989) Expression and characterization of hepatitis B virus surface antigen polypeptides in insect cells with a baculovirus expression system. *Journal of virology* **63**: 1549-1557

Lathe R, Kieny M, Schmitt D, Curtis P, Lecocq J (1983) M13 bacteriophage vectors for the expression of foreign proteins in *Escherichia coli*: the rabies glycoprotein. *Journal of molecular and applied genetics* **2**: 331-342

Lee WM (1997) Hepatitis B virus infection. *New England journal of medicine* **337**: 1733-1745

Liang T (2000) The molecular virology of hepatitis B virus. *American Association for the Study of Liver Diseases-Update on viral hepatitis-Postgraduate Course*: 78-82

Locarnini S (2003) Hepatitis B viral resistance: mechanisms and diagnosis. *Journal of hepatology* **39**: 124-132

Lodmell DL, Esposito JJ, Ewalt LC (2004) Live vaccinia-rabies virus recombinants, but not an inactivated rabies virus cell culture vaccine, protect B-lymphocyte-deficient A/WySnJ mice against rabies: considerations of recombinant defective poxviruses for rabies immunization of immunocompromised individuals. *Vaccine* **22**: 3329-3333

Loza-Rubio E, Rojas E, Gómez L, Olivera M, Gomez-Lim M (2007) Development of an edible rabies vaccine in maize using the Vnukovo strain. *Developments in biologicals* **131**: 477-482

Lu A, Miller LK (1997) Regulation of baculovirus late and very late gene expression. In *The baculoviruses*, pp 193-216. Springer

Lu Y, Cao W, Hong M, Zhu J, Liu Z, Yang D (2008) [A study on the relationship between point mutation in pre-core region G1896A of hepatitis B virus and safety of breast feeding]. *Zhonghua yu fang yi xue za zhi [Chinese journal of preventive medicine]* **42**: 739-741

Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO (1993) 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* **67**: 4566-4579

Lyons A, Longfield J, Kuschner R, Straight T, Binn L, Seriwatana J, Reitstetter R, Froh IB, Craft D, McNabb K (2008) A double-blind, placebo-controlled study of the safety and immunogenicity of live, oral type 4 and type 7 adenovirus vaccines in adults. *Vaccine* **26**: 2890-2898

Maeda S, Volrath SL, Hanzlik TN, Harper SA, Kei MM, Maddox DW, Hammock BD, Fowler E (1991) Insecticidal Effects of an Insect-Specific Neurotoxin Expressed by a Recombinant Baculovirus. *Virology* **184**: 777-780

Margolis HS, Alter MJ, Hadler SC (1991) Hepatitis B: evolving epidemiology and implications for control. In *Seminars in liver disease*, Vol. 11, pp 84-92.

McGarvey PB, Hammond J, Dienelt MM, Hooper DC, Fu ZF, Dietzschold B, Koprowski H, Michaels FH (1995) Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology* **13**: 1484-1487

- Mebatsion T (2001) Extensive attenuation of rabies virus by simultaneously modifying the dynein light chain binding site in the P protein and replacing Arg333 in the G protein. *Journal of virology* **75**: 11496-11502
- Mena JA, Kamen AA (2011) Insect cell technology is a versatile and robust vaccine manufacturing platform. *Expert review of vaccines* **10**: 1063-1081
- Miles M, Wallace G, Clarke J (1989) Multiple peptide synthesis (Pepscan method) for the systematic analysis of B- and T-cell epitopes: application to parasite proteins. *Parasitology Today* **5**: 397-400
- Miller LK (1997) *The baculoviruses*: Springer Science & Business Media. New York.
- Mochizuki H, Schwartz JP, Tanaka K, Brady RO, Reiser J (1998) High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells. *Journal of virology* **72**: 8873-8883
- Moreira RC, Deguti MM, Lemos MF, Saraceni CP, Oba IT, Spina AMM, Nascimento-Lima AS, Fares J, Azevedo RS, Gomes-Gouvêa MS (2010) HBV markers in haemodialysis Brazilian patients: a prospective 12-month follow-up. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **105**: 107-108
- Morimoto K, Hooper DC, Spitsin S, Koprowski H, Dietzschold B (1999) Pathogenicity of different rabies virus variants inversely correlates with apoptosis and rabies virus glycoprotein expression in infected primary neuron cultures. *Journal of virology* **73**: 510-518
- Morimoto K, Kawai A, Mifune K (1992) Comparison of rabies virus G proteins produced by cDNA-transfected animal cells that display either inducible or constitutive expression of the gene. *Journal of general virology* **73**: 335-345
- Moscardi F (1999) Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual review of entomology* **44**: 257-289
- Moulton JK, Pepper DA, Jansson RK, Dennehy TJ (2002) Pro-active management of beet armyworm (Lepidoptera : Noctuidae) resistance to tebufenozide and methoxyfenozide: Baseline monitoring, risk assessment, and isolation of resistance. *Journal of Economic Entomology* **95**: 414-424
- Nascimento PP, Pinto SGS, Pereira I (2012) Perfil epidemiológico dos marcadores sorológicos para vírus da hepatite B dos pacientes atendidos em um laboratório público. *Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica* **10**: 495-498
- Neurath A, Kent S, Strick N, Parker K (1986) Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell* **46**: 429-436
- Ng CT, Oldstone MB (2014) IL-10: achieving balance during persistent viral infection. In *Interleukin-10 in Health and Disease*, pp 129-144. Springer
- Nimmerjahn F, Ravetch JV (2005) Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* **310**: 1510-1512
- O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA (1992) *Baculovirus Expression Vector: A Laboratory Manual* WH Freeman and Company. New York

O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA (1994) *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual*: Oxford University Press on Demand.

OIE. (2016) WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. Rabies., Vol. 2016.

Okanoue T, Minami M (2006) Update of research and management of hepatitis B. *Journal of gastroenterology* **41**: 107-118

Oreilly DR, Miller LK (1991) Improvement of a Baculovirus Pesticide by Deletion of the Egt Gene. *Bio-Technol* **9**: 1086-1089

Paraná R, Kay A, Molinet F, Viana S, Silva LK, Salcedo JM, Tavares-Neto J, Lobato C, Rios-Leite M, Matteoni L (2006) HDV genotypes in the Western Brazilian Amazon region: a preliminary report. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **75**: 475-479

Pasteur L (1885) *Methodes pour prevenir la rage apres morsure*, Vol. 101, Comptes Rendus de l'Académie des Sciences.

Pasteur L, Chamberland C, Roux (1881) *Sur la rage*, Vol. 92, Comptes Rendus de l'Académie des Sciences: Imp. Larousse.

Pasteur L, Chamberland M, Roux M, Thuillier M (1882) Nouveaux faits pour servir a la connaissance de la rage. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* **95**: 1187

Pawlotsky JM, Dusheiko G, Hatzakis A, Lau D, Lau G, Liang TJ, Locarnini S, Martin P, Richman DD, Zoulim F (2008) Virologic monitoring of hepatitis B virus therapy in clinical trials and practice: recommendations for a standardized approach. *Gastroenterology* **134**: 405-415

Perrin P, Thibodeau L, Sureau P (1985) Rabies immunosome (subunit vaccine) structure and immunogenicity. Pre-and post-exposure protection studies. *Vaccine* **3**: 325-332

Peter G (1997) Summary of major changes in the 1997 red book: Report of the committee on infectious diseases. *Pediatrics* **100**: 109-111

Plotkin SA (2001) Immunologic correlates of protection induced by vaccination. *The Pediatric infectious disease journal* **20**: 63-75

Price PM, Reichelderfer CF, Johansson BE, Kilbourne ED, Acs G (1989) Complementation of recombinant baculoviruses by coinfection with wild-type virus facilitates production in insect larvae of antigenic proteins of hepatitis B virus and influenza virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**: 1453-1456

Rapparini C, Vitória MAdÁ, Lara LTdR (2000) Recomendações para atendimento e acompanhamento de exposição ocupacional a material biológico: HIV e Hepatite B e C. In *Recomendações para atendimento e acompanhamento de exposição ocupacional a material biológico: HIV e Hepatite B e C*.

Ribeiro BMM, F. S. ; ARDISSON-ARAÚJO, D. M. P. ; SILVA, L. A. ; CHAVES, L. C. S. ; QUIRINO, M. S. ; ANDRADE, M. S. ; CORREA, R. F. T. (2015) Baculovírus para expressão de proteínas recombinantes em células de insetos. In *Biotecnologia Aplicada à Saúde* Vol. 2, pp 255-306. In: Rodrigo Ribeiro Resende; Carlos Ricardo Soccol. (Org.) 1ed.São Paulo: Blucher

- Ribeiro BMP, F. J. R. (2001) Baculovirus recombinante para controle de praga. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* **22**: 50-58
- Rizzetto M, Ciancio A (2008) Chronic HBV-related liver disease. *Molecular aspects of medicine* **29**: 72-84
- Roberto F (2007) Tratado de Hepatites Virais. São Paulo: Editora Atheneu: 221-229
- Rohrmann G (1986) Polyhedrin structure. *Journal of General Virology* **67**: 1499-1513
- Rohrmann GF (2013a), 3rdEd edn. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US)
George Rohrmann.
- Rohrmann GF (2013b) *Baculovirus molecular biology*, 3rdEd edn. National Center for Biotechnology Information (Bethesda MD).
- Rupprecht CE, Hanlon CA, Hemachudha T (2002) Rabies re-examined. *The Lancet infectious diseases* **2**: 327-343
- Saxena S, Sonwane AA, Dahiya SS, Patel CL, Saini M, Rai A, Gupta PK (2009) Induction of immune responses and protection in mice against rabies using a self-replicating RNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein. *Veterinary microbiology* **136**: 36-44
- Seeger C, Mason WS (2000) Hepatitis B virus biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**: 51-68
- Sellers T (1947) Complications of antirabic treatment. *Journal of the Medical Association of Georgia* **36**: 30
- Shankar V, Dietzschold B, Koprowski H (1991) Direct entry of rabies virus into the central nervous system without prior local replication. *Journal of virology* **65**: 2736-2738
- Shapiro CN (1993) Epidemiology of hepatitis B. *The Pediatric infectious disease journal* **12**: 433-437
- Slootstra JW, Puijk WC, Ligtoet GJ, Langeveld JP, Melen RH (1996) Structural aspects of antibody-antigen interaction revealed through small random peptide libraries. *Molecular diversity* **1**: 87-96
- Smith GE, Summers MD, Fraser MJ (1983) Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular and cellular biology* **3**: 2156-2165
- Smith J, Yager P, Baer G (1996) A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. *Laboratory techniques in rabies* **4**: 200-208
- Takehara K, Ireland D, Bishop DH (1988) Co-expression of the hepatitis B surface and core antigens using baculovirus multiple expression vectors. *Journal of general virology* **69**: 2763-2777

Theze J, Bezier A, Periquet G, Drezen JM, Herniou EA (2011) Paleozoic origin of insect large dsDNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 15931-15935

Thomas ED, Reichelderfer CF, Heimpel AM (1972) Accumulation and persistence of a nuclear polyhedrosis virus of the cabbage looper in the field. *Journal of Invertebrate Pathology* **20**: 157-164

Tian Y, Xu Y, Zhang Z, Meng Z, Qin L, Lu M, Yang D (2007) The amino acid residues at positions 120 to 123 are crucial for the antigenicity of hepatitis B surface antigen. *Journal of clinical microbiology* **45**: 2971-2978

Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith G, Rougeon F (1986) Walking along the rabies genome: is the large GL intergenic region a remnant gene? *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83**: 3914-3918

Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith G, Rougeon F (1988) Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA viruses. *Virology* **165**: 565-576

Tripatzis I (1972) Australia antigen in urine and feces. *American Journal of Diseases of Children* **123**: 401-404

Tsiang H (1993) Pathophysiology of rabies virus infection of the nervous system. *Advances in virus research* **42**: 375-412

Van Der Eijk AA, De Man R, Niesters HG, Schalm SW, Zaaijer HL (2006) Hepatitis B virus (HBV) DNA levels and the management of HBV-infected health care workers. *Journal of viral hepatitis* **13**: 2-4

van Oers MM (2011) Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. *Journal of invertebrate pathology* **107 Suppl**: S3-15

van Oers MM, Pijlman GP, Vlak JM (2015) Thirty years of baculovirus--insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. *Journal of General Virology* **96**: 6-23

Vander Veen RL, Harris DH, Kamrud KI (2012) Alphavirus replicon vaccines. *Animal Health Research Reviews* **13**: 1-9

Vigilato MAN, Clavijo A, Knobl T, Silva HMT, Cosivi O, Schneider MC, Leanes LF, Belotto AJ, Espinal MA (2013) Progress towards eliminating canine rabies: policies and perspectives from Latin America and the Caribbean. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **368**: 20120143

Villarejos VM, Visoná KA, Alvaro GD, Antonio RA (1974) Role of saliva, urine and feces in the transmission of type B hepatitis. *New England Journal of Medicine* **291**: 1375-1378

Wang S-L, Bentley WE, Liu C-C, Wang M-Y (1999) The use of glucose to regulate pH values of culture media and increase the production of baculovirus (BmNPV) and foreign protein (HBsAg). *Process biochemistry* **34**: 295-301

Washburn JO, Chan EY, Volkman LE, Aumiller JJ, Jarvis DL (2003a) Early Synthesis of Budded Virus Envelope Fusion Protein GP64 Enhances Autographa californica Multicapsid

Nucleopolyhedrovirus Virulence in Orally Infected *Heliothis virescens*. *Journal of virology* **77**: 280-290

Washburn JO, Trudeau D, Wong JF, Volkman LE (2003b) Early pathogenesis of Autographa californicamultiple nucleopolyhedrovirus and Helicoverpa zea single nucleopolyhedrovirus in *Heliothis virescens*: a comparison of the 'M' and 'S' strategies for establishing fatal infection. *Journal of General Virology* **84**: 343-351

Wen Y, Wang H, Wu H, Yang F, Tripp RA, Hogan RJ, Fu ZF (2011) Rabies virus expressing dendritic cell-activating molecules enhances the innate and adaptive immune response to vaccination. *Journal of virology* **85**: 1634-1644

WHO (2002) Monoclonal antibody cocktail for rabies post exposure treatment: report of a WHO consultation, 23–24 May 2002. *World Health Organization document R2-370-15 World Health Organization, Geneva, Switzerland*

WHO. (2016) WORLD HEALTH ORGANIZATION. Rabies., Vol. 2016.

Wiktor TJ, Macfarlan RI, Reagan KJ, Dietzschold B, Curtis PJ, Wunner WH, Kieny M-P, Lathe R, Lecocq J-P, Mackett M (1984) Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **81**: 7194-7198

Wunner WH (2007) Rabies Virus. pp 23-68. Elsevier Ltd

Wunner WH, Larson JK, Dietzschold B, Smith CL (1988) The molecular biology of rabies viruses. *Review of Infectious Diseases* **10**: S771-S784

Yao LG, Liu ZC, Zhang XM, Kan YC, Zhou J-J (2007) A highly efficient method for the generation of a recombinant Bombyx mori nuclear-polyhedrosis-virus Bacmid and large-scale expression of foreign proteins in silkworm (*B. mori*) larvae. *Biotechnology and applied biochemistry* **48**: 45-53

Yue Y, Jiang H, Shi L, Li L, Xi B, Yu Y, Chen G (2004) [Study on the mechanism of intrauterine infection of hepatitis B virus]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* **39**: 224-226

Zanotto PMD, Kessing BD, Maruniak JE (1993) Phylogenetic Interrelationships among Baculoviruses - Evolutionary Rates and Host Associations. *Journal of Invertebrate Pathology* **62**: 147-164

Zhang L, Fang Z, Zhen Z, Liu X, Gong X, Wu Y (1994) The study of transmission route of HBV from father to infant. *Zhonghua Chuanranbing Zazhi* **12**: 199-201

Zhang Q, Cao G (2011) Genotypes, mutations, and viral load of hepatitis B virus and the risk of hepatocellular carcinoma. *Hepatitis Monthly* **11**: 86-91

Zheng Y, Lu Y, Ye Q, Xia Y, Zhou Y, Yao Q, Wei S (2011) Should chronic hepatitis B mothers breastfeed? a meta analysis. *BMC public health* **11**: 1