



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA (IB)
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR**

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.

Maria Creuza do Espírito Santo Barros

Orientador: Dr. Bergmann Moraes Ribeiro

Tese apresentada ao Departamento de Pós-Graduação em Biologia Molecular, do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

Brasília, 27 de julho de 2011

ÍNDICE

Figuras	viii
Citações	x
Agradecimentos	xi
Lista de abreviaturas	xiii
Resumo	xv
Abstract.....	xvi
Breve introdução geral	xix

CAPÍTULO I

Efeitos imunológicos de dois baculovírus (*AcMNPV* e *AgMNPV*) nas duas formas fenotípicas (vírus extracelular – BV e corpos de inclusão poliédrica – PIBs) em modelo murino *in vivo* e *in vitro*.

1. Introdução.....	20
1. Baculovírus e células de mamífero.....	21
2. Classificação dos baculovírus.....	21
3. Estrutura dos baculovírus	22
4. Modo de infecção	23
5. Baculovírus <i>AcMNPV</i> e <i>AgMNPV</i>	27
6. Aplicações de baculovírus e segurança de aplicação	27
7. Baculovírus e o sistema imunológico.....	28
2. Objetivo	30
3. Materiais e métodos.....	31
1. Animais.....	31
2. Inoculação intranasal e retirada e armazenamento de órgãos.....	31

3.	Preparação de tecido para hitopatológico e imunohistoquímica	32
4.	Imunohistoquímica	33
5.	Contagem de células e análise estatística	33
6.	Citocinas no pulmão ou no sobrenadante de cultura	34
7.	Medição da concentração de citocinas	34
8.	Dosagem de óxido nítrico.....	35
9.	Índice Fagocitário	36
10.	Ensaio de proliferação celular e concentração de citocinas	37
11.	Modelo de infecção de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	38
12.	Concentração fúngica	39
4.	Resultados.....	40
1.	A influência do baculovírus na resposta imunitária pulmonar em camundongos.....	40
4.1.1.	A inoculação de PIBs ou BVs induziu diminuição na migração de células	40
4.1.2.	A inoculação de PIBs ou BVs não alterou o padrão de citocinas de pulmão	42
4.1.3.	A inoculação de BV aumenta a produção de óxido nítrico (NO)	42
2.	A influência dos baculovírus na ativação de células imunológicas <i>in vitro</i>	45
4.2.1.	Índice fagocitário e produção de IL-12 por macrófagos <i>in vitro</i>	45
4.2.2.	O fenótipo AgMNPV estimula a proliferação de células do baço e produção de IFN- γ <i>in vitro</i>	45

3. A influência do baculovírus em um modelo de doença pulmonar	49
5. Discussão	52
6. Perspectiva.....	58
7. Referências bibliográficas	59

CAPÍTULO II

A proteína do envelope (E) do vírus da febre Amarela expressa em células de inseto é capaz de promover a formação de sincício em células de lepidópteros e pode ser utilizada em imunodeteccões do vírus da Febre amarela em soros de pacientes humanos

1. Introdução.....	67
1.1. Transmissão	67
1.2. Vacinação	68
1.3. Complicações da vacina	69
1.4. Vírus da Febre Amarela.....	70
1.5. Proteína do Envelope (E).....	72
1.6. Diagnóstico e tratamento	72
2. Objetivo	76
3. Materiais e métodos	77
3.1. Obtenção do gene do Envelope	77
3.2. Clonagem do gene <i>env</i> no plasmídeo pGEM-T Easy (Promega) e sequenciamento	77
3.3. Construção do vetor pSynYFE.....	78
3.4. Construção dos baculovírus recombinantes vSynYFE	79
3.5. Análise da expressão das proteínas E através de SDS-PAGE e imuno-marcação	80

3.6.	Análise por microscopia confocal e microscopia de fluorescência..	81
3.7.	Análise estrutural e ultraestrutural de células de inseto infectadas com vSynYFE	82
3.8.	Imunoensaio de Mac-ELISA	82
4.	Resultados	85
4.1.	Construção do baculovírus recombinante vSynYFE.....	85
4.2.	Detecção da expressão da proteína recombinante	89
4.3.	Imunodeteccção da proteína recombinante	89
4.4.	Análise estrutural e ultra-estrutural de células de inseto infectadas com vSynYFE	95
4.5.	Imunoensaio de MAC-ELISA	95
5.	Discussão	99
6.	Perspectiva	104
7.	Referências bibliográficas	105

CAPÍTULO III

Uma nova estratégia para a expressão da glicoproteína do vírus da Raiva em células de inseto

1.	Introdução	112
1.1.	Um breve histórico	112
1.2.	Epidemiologia da Raiva.....	113
1.3.	Transmissão do vírus da Raiva.....	114
1.4.	<i>Rabies virus</i>	114
1.5.	Patologia	116
1.6.	Glicoproteína G	118

1.7.	Glicoproteína G e sistemas de expressão	119
1.8.	Poliedros de baculovírus.....	122
2.	Objetivo	124
3.	Material e métodos	125
3.1.	Vírus e células utilizados	125
3.2.	Construção do vetor pFastPH.....	125
3.3.	Amplificação e clonagem do gene RVGP	127
3.4.	Construção do vetor de transferência pFastPHRVGP	129
3.5.	Construção do bacmídeo recombinante e obtenção do baculovírus recombinante vAcPHRVGP	130
3.6.	Obtenção do baculovírus recombinante.....	133
3.7.	Confirmação da presença do gene RVGP no DNA do vírus vAcPHRVGP.....	134
3.8.	Análise da expressão da proteína PHRVGP em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e imuno-deteção.....	134
3.9.	Purificação e análise ultraestrutural de corpos de oclusão de larvas de Spodoptera frugiperda infectadas com vAcPHRVGP.....	136
3.10.	Análise por microscopia confocal.....	137
4.	Resultados.....	139
4.1.	Construção do baculovírus recombinante vAcPHGPV	139
4.2.	Análise da expressão de proteínas recombinantes em células de inseto infectadas.....	145
4.3.	Purificação e análise ultra-estrutural dos corpos de oclusão isolados do tecido adiposo de larvas de S. frugiperda infectadas com vAcPHRVGPV	145

4.4.	Análise por microscopia confocal.....	148
5.	Discussão	151
6.	Perspectiva.....	157
7.	Referências bibliográficas	158
	Anexo	169

Artigo publicado na revista *Virology Journal*

Barros MCES, Galasso TGCM, Chaib AJM, Degallier N, Nagata T, Ribeiro B. **Yellow fever virus envelope protein expressed in insect cells is capable of syncytium formation in lepidopteran cells and could be used for immunodetection of YFV in human sera.** *Virology Journal* 2011, **8**: 261-271.

FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1: Estrutura dos baculovírus do gênero <i>nucleopolyhedrovirus</i>	23
Figura 2: Desenho esquemático mostrando o ciclo de infecção <i>in vivo</i> de uma larva de lepidóptera infectada por um baculovírus	24
Figura 3: Esboço do experimento	30
Tabela 1	39
Figura 3: Níveis de citocinas em sobrenadantes de preparados de pulmão.....	41
Figura 4: Produção de NO ₃ no soro e NO ₂ em sobrenadantes de preparado de pulmão	42
Figura 5: Índice fagocitário	44
Figura 6: Medição da produção de NO ₂	45
Figura 7: Proliferação celular e perfil de concentração de citocinas	46
Figura 8: Análise histopatológica de pulmão	48
Figura 9: Determinação da concentração fúngica.	49

CAPÍTULO II

Figura 1: Esquema de replicação do vírus da Febre Amarela	69
Figura 2: Amplificação do gene do envelope do vírus da febre amarela por RT-PCR	84
Figura 3: Clonagem gene <i>env</i> no vetor pGEM-T Easy	85
Figura 4: Clonagem do gene <i>env</i> no vetor de transferência pSynXIV VI ⁺ X3	86
Figura 5: Confirmação da presença do gene <i>env</i> no vírus recombinante vSynYFE ..	88
Figura 6: Construção de vírus recombinante e produção da proteína E.....	89

Figura 7: Detecção da proteína E em células de inseto infectadas pelo vírus vSynYFE	91
Figura 8: Análise estrutural e ultraestrutural de células de inseto infectadas com vSynYFE mostrando formações sinciciais multinucleadas	94
Figura 9: Imunoensaio de MAC-ELISA	95

CAPÍTULO III

Figura 1: Diagrama da amplificação e clonagem do gene da poliedrina (PH) modificado em pFastBac TM 1.	124
Figura 2: Plasmídeo pGPV/PV	125
Figura 3: Plasmídeo pGEM-T Easy (Promega). Sítio de multiclonagem mostrado à direita.....	126
Figura 4 Sistema Bac-to-Bac de expressão	129
Figura 5 Amplificação do gene RVGP por PCR.....	138
Figura 6 Construção do plasmídeo pGEMRVGP e digestão com NcoI.....	139
Figura 7 Confirmação da clonagem do gene RVGP no plasmídeo pFastPH dando origem ao pFastPHRVGP.....	140
Figura 8 Confirmação da construção do bacmídeo BacPHRVGP	141
Figura 9 Presença de RVGP no DNA viral de BV de vAcPHRVGP	142
Figura 10 Análise da expressão da proteína recombinante	144
Figura 11 Purificação e análise ultra-estrutural dos corpos de oclusão vAcPHRVGP nas larvas infectadas de <i>S. frugiperda</i>	145
Figura 12 Imunodeteção da proteína RVGP e análise estrutural de células infectadas pelo inseto vAcPHRVGP	147

“Quem tem um Pai que está no céu, e uma Mãe que está no mar, pode enfrentar o mundo sem ter medo de tombar”

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Deus e a todos os santos e anjos protetores.

Obrigada, de todo meu coração e com toda minha fé.

Agradeço aos meus pais Kátia e Odemar por serem meus amores, meus queridos, meus parceiros, meu tudo, porto seguro, hoje e sempre. Obrigada por estarem ao meu lado, obrigada por tudo!

Agradeço à minha família linda, vovó, vovô, tias, tios, primas e primos, por serem minha base, por todo o carinho, o amparo, as risadas, o abraço, a presença nos momentos bons e ruins. Agradeço ao tio querido que se foi mas deixou toda sua boa energia conosco e ao novo pequenino integrante que veio para nos trazer ainda mais alegrias e união.

Agradeço ao meu namorado Danilo pelo incentivo, apoio, amor, carinho, compreensão por ser um companheiro de verdade e por estar do meu lado sempre.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr Bergmann por ter me dado a oportunidade de fazer o mestrado e doutorado em seu grupo de pesquisa, e por ter sido um orientador de verdade e ter tido paciência mesmo quando parecia que nada ia sair do papel. Vencemos professor!

Agradeço às minhas amigas Tati, Ju, Sara, Carol, Karina, Susane por todo o aprendizado e amor!

Agradeço aos meus queridos baculofriends de hoje e das antigas Greitchas, Line line, Bele bele, Eriqitchas, Bri, Beto, Daniel, Bruna, Gláucia, Aninha, Susi, Naná, Breno, Dani, e todos com que pude conviver e que por detalhe não estão nessa lista. Sem vocês não teria sido tão divertido! Beijo para as baculoviretes!

Agradeço ao professor Chaib por ter iniciado e feito parte do todo esse processo, professor Tatsuya por toda a colaboração e boas idéias!

Agradeço aos professores Renato Resende e Sônia Bão por toda a ajuda sempre que necessário.

Agradeço ao pesquisador Péricles Matsunaga da Zoonoses por toda a colaboração e anticorpos cedidos e toda a equipe do Butantan (SP).

Agradeço á Ana da secretaria por sempre saber de tudo!

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro

Agradeço à Universidade de Brasília pela oportunidade de realização do trabalho

E repito tanto a palavra “agradeço” porque sem tanto amor, compreensão, colaboração, não teria terminado esse trabalho!

Lista de abreviaturas

AcMNPV	<i>Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus</i>
AgMNPV	<i>Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus</i>
BV	Budded virus
cDNA	DNA complementar
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
DENV	Dengue virus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
E	Proteína do Envelope do vírus da Febre Amarela
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FA	Febre Amarela
GT	Genótipo
GV	Granulovirus
h	horas
h.p.i.	Horas pós infecção
HPV	Papiloma vírus humano
HRP	Horseradish peroxidase
IFN	Interferon
IL	Interleucina
Kb	Quilobases
kDa	Quilodaltons
L	Litro
LACEN	Laboratório Central
M	Molar
MAbs	Anticorpos monoclonais
mg	Miligrama
µg	Micrograma
mL	Microlitro
NO	Óxido Nítrico
NPV	Nucleopoliedrovirus
OB	Occluded body

ODV	Occluded derived virus
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino
PCM	Paracoccidioidomicose
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pfu	Unidades formadoras de placas
PH	Poliedrina do AcMNPV
PIB	Corpo de inclusão poliédrica
RNA	Ácido ribonucléico
RVGP	Rabies vírus glycoprotein
S2	<i>Drosophila melanogaster Schneider 2</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i>
TN	<i>Trichoplusia ni</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
vAcPHRVGP	AcMNPV recombinante contendo o gene da poliedrina de Ac fusionado a RVGP
vSynYFE	AcMNPV recombinante contendo o gene do envelope do vírus da Febre Amarela
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosídeo
YFV	Virus da Febre amarela

RESUMO

Baculovírus são vírus de DNA originalmente 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 e hoje baculovírus podem ser aplicados para expressar antígenos de uso vacinal ou diagnóstico e até mesmo podem ser utilizados como 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 estudos comprovam que são capazes de entrar nessas células e produzir algumas proteínas virais. Apresentam ainda capacidades imunoestimulatórias e o estudo da interação baculovírus-saúde humana se torna cada vez mais importante com o aumento das várias aplicações biomédicas do uso desse vírus. Esta tese teve como objetivos, avaliar os efeitos imunológicos e a segurança dos baculovírus para vertebrados e o seu uso como vetores de expressão para produção de insumos biotecnológicos pela expressão das proteínas dos envelopes dos vírus da Febre Amarela e Vírus da Raiva. Para avaliar os efeitos imunológicos em vertebrados, foi realizada a inoculação intranasal de camundongos BALB/c com os dois fenótipos (ODVs contidos nos corpos de inclusão poliédrica, OB ou PIB e vírus extracelular, BV) dos baculovírus AcMNPV e AgMNPV. Foi demonstrado que os baculovirus são capazes de modular a resposta imune de mamíferos *in vivo* e *in vitro*. BVs ou PIBs de AgMNPV podem aumentar uma resposta de células Th1 e podem ser considerados mais úteis como vetores de vacinação ou adjuvantes imunológicos do que AcMNPV. AgMNPV na forma selvagem ou recombinante, pode ser também utilizado para alterar o tipo de resposta adaptativa desenvolvida. Com relação à expressão de proteínas heterólogas em células de inseto, os genes da proteína do envelope (E) do vírus da Febre Amarela (YFV) e da glicoproteína

G (RVGP) do vírus da Raiva foram introduzidos no genoma de um baculovírus e expressas em células de inseto. Tanto a proteína recombinante E (derivadas de YFV) como a proteína RVGP (derivada do vírus da Raiva) fusionada à proteína poliedrina de baculovírus foram antígenicamente similares às proteínas dos vírus selvagens, mostrando potencial para uso diagnóstico ou vacinal.

ABSTRACT

Baculoviruses are DNA viruses originally used only as a biological control because they are able to eliminate insect pests associated with agriculture. In the 70's and 80's, its potential as a tool for expression of heterologous proteins began to be explored and today it can be applied to express vaccine or diagnosis antigens and can even be used as vectors for gene therapy and DNA vaccines. Its biosafety is guaranteed by the fact of not being able to replicate in mammalian cells but studies show that they are able to enter these cells and produce some viral proteins. They also present immunostimulating capabilities and the study of human health-baculovirus interaction becomes increasingly important with the increasing number of biomedical applications of using this virus.. This thesis had as objectives, to evaluate the immunological effects and safety of baculoviruses for vertebrates and to use baculoviruses as expression vectors for the production of biotechnological products by the expression of envelope proteins from yellow fever virus and Rabies Virus., In order to evaluate the effects of baculovirus in the immune system of vertebrates, intranasal inoculation of BALB / c mice with both phenotypes (ODVs in polyhedral inclusion bodies, OB and extracellular virus, BV) of AgMNPV and AcMNPV baculovirus was performed. It was shown that baculovirus was able to modulate the immune response in mammals *in vivo* and *in vitro*. BVs or PIBs of AgMNPV can increase a Th1 response and may be more useful as vectors for vaccination or immune adjuvants than AcMNPV. Wild or recombinant AgMNPV can also be used to change the type of adaptive response developed. Regarding the heterologous expression of proteins in insect cells, the the envelope protein gene of Yellow Fever virus and the glycoprotein G gene of Rabies virus were introduced into the genome of a baculovirus e expressed in insect cells. Both the recombinant proteins (E derived from YFV and RVGP derived from Rabies virus and fused with

polyhedrin of baculovirus) were shown to be antigenically similar to the wild type proteins , showing potential to be used for vaccine development or diagnosis.

Breve Introdução Geral

Este trabalho encontra-se dividido em três capítulos e cada capítulo refere-se aos resultados obtidos de linhas de trabalho diferentes desenvolvidas no período deste doutorado: O primeiro capítulo refere-se aos baculovírus, vírus de inseto utilizados como agentes de controle biológico e bastante usados como vetores de expressão de proteínas heterólogas em células de inseto, transdução de DNA em células de mamíferos e como possível vetor para terapia gênica. No primeiro capítulo será descrito o trabalho sobre a resposta imunológica de camundongos inoculados com diferentes baculovirus visando avaliar a segurança desse vírus em modelo animal. O mesmo vírus foi utilizado em estratégias diferentes de expressão de proteínas heterólogas em células de inseto no segundo e terceiro capítulos. Baculovírus foram utilizados na expressão da proteína do envelope do vírus da Febre Amarela em células de inseto no capítulo 2 e em uma nova estratégia para expressão e obtenção da glicoproteína G do vírus da Raiva no capítulo 3.

CAPÍTULO I

Efeitos imunológicos de dois baculovírus (AcMNPV e AgMNPV) nas duas formas fenotípicas (vírus extracelular – BV e vírus derivado de oclusão, ODV, envolvidos por corpos de inclusão poliédrica – PIBs) em modelo murino *in vivo* e *in vitro*.

1. Introdução

Baculovírus são vírus de DNA dupla fita (80-180Kpb) altamente específicos e capazes de replicação apenas em hospedeiros artrópodes (Airenne *et al.*, 2000). Por serem vírus de inseto, foram primeiramente estudados como possíveis agentes de controle biológico de insetos-praga associados à agricultura (Castro *et al.*,1999). Sua utilização como ferramenta para expressão de proteínas heterólogas surgiu a partir do desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante nas décadas de 70 e 80 (Smith *et al.*,1983). Desde então, milhares de proteínas de interesse agrônômico, médico e para pesquisa básica foram expressas em células de inseto (Grabherr *et al.*,2010). Sua ampla utilização como vetores de expressão de proteínas oriundas de diferentes organismos (O'Reilly *et al.*,1992) possibilitou a ampliação de sua gama de aplicações em biotecnologia não apenas como um agente de controle biológico, mas também como vetores de expressão e de agentes de entrega de gene *in vivo* e aplicações *ex vivo* (como na medicina regenerativa e transdução de células-tronco). A recente aprovação do uso

de baculovírus pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) para a produção de vacinas prepara o caminho para o uso de baculovírus também em terapia gênica (Airenne *et al.*, 2000).

1.1. Baculovírus e células de mamífero

Baculovírus são capazes de transdução em mais de 40 tipos de células de mamíferos, cuja origem varia de suínos, roedores e mamíferos em geral ao ser humano. Muitas linhagens de células normalmente utilizadas, bem como culturas primárias são eficientemente transduzidas (Kost *et al.*, 2002). Portanto, baculovírus recombinantes representam uma ferramenta biotecnológica poderosa para entrega de genes de interesse em células de mamíferos, e também possuem várias vantagens para a entrega gênica em células de mamíferos especialmente quando a transdução viral é comparada com a forma mais comumente utilizada de entrega gênica, transfecção por lipossomos (Hofmann *et al.*, 1995).

1.2. Classificação de baculovírus

Taxonomicamente, os baculovírus são nomeados de acordo com a espécie do hospedeiro do qual foram inicialmente isolados e são agrupados na família *Baculoviridae*. Originalmente eram divididos em dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV) (Castro *et al.*, 1999).

A principal diferença morfológica entre esses dois grupos está na morfologia do corpo de oclusão viral. Nos baculovirus, os vírions encontram-se oclusos em uma oclusão cristalina de natureza protéica, denominada corpo de oclusão OB ("occlusion body"). Os NPV (*Nucleopolyhedrovirus*) têm um corpo de oclusão que contém vários

vírions, sendo chamado de poliedro, composto principalmente, pela proteína poliedrina. Os GVs (*Granulovirus*) apresentam, na maioria das vezes apenas um vírion dentro de um corpo de oclusão pequeno, chamado grânulo, raramente podendo apresentar dois a três vírions por grânulo (O'Reilly *et al.*,1992; Crook ,1991). O grânulo mede cerca de 0,3 x 0,5 µm sendo menor do que os poliedros que podem chegar de 0,15 a 15 µm em diâmetro (Bilimoria, 1991). Representando aproximadamente 95% do conteúdo do corpo de oclusão nos NPVs, a poliedrina é uma proteína de cerca de 29.000 daltons e possui massa molecular similar ao da granulina, componente principal do corpo de oclusão dos GVs.

A taxonomia do baculovírus foi atualizada e, na nova classificação, a família *Baculoviridae* é dividida em 4 gêneros distintos: Alphabaculovirus (NPVs de lepidópteros), Betabaculovirus (GVs de lepidópteros), Gammabaculovirus (NPVs de himenópteros) e Deltabaculovirus (NPVs de dípteros) (Rohrmann, 2008).

1.3. Estrutura do baculovírus

A estrutura morfológica do vírion é de onde se origina o termo *baculo* da família *Baculoviridae*. A origem da palavra vem do latim *baculum* que significa bastão, caracterizando a forma do nucleocapsídeo das partículas virais desta família (Fields *et al.*,2001). O nucleocapsídeo possui de 40-50nm de diâmetro e 200-400 nm de comprimento, podendo ser estendido para acomodar genomas maiores no caso de insertos de DNA em vírus recombinantes (O'Reilly *et al.*, 1992). O genoma viral é composto por DNA fita dupla, circular, superenovelados, variando em tamanho de 80 e 200 kilobases (Kb) (Arif, 1986). Em apenas um único ciclo de infecção, os baculovirus apresentam dois fenótipos distintos, o que o faz se destacar dentre os vírus conhecidos. Os dois fenótipos variam de acordo com o modo de disseminação do vírus: o vírus

extracelular BV ("budded vírus") é responsável pela transmissão do vírus de célula a célula, dentro do mesmo inseto; já o vírus derivado da oclusão ou ODV é envolto pela proteína poliedrina e outras proteínas formando o corpo de oclusão OB ("occlusion bodies") é responsável pela transmissão horizontal do vírus, ou seja, na transmissão do vírus de inseto a inseto (Smith *et al.*,1983) (Figura 1).

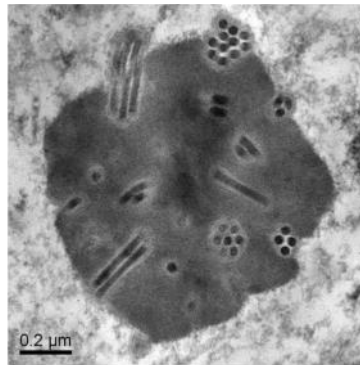
1.4. Modo de infecção

A infecção pelos baculovírus começa quando o inseto ingere alimento contaminado com o vírus na forma ocluída, o OB (poliedro no caso de NPV e grânulo no caso de GV) constituindo a rota natural de infecção. O OB pode ter um ou mais vírions que se encontram protegidos do meio ambiente e da degradação ambiental pela matriz protéica cristalina que os envolve (Benz, 1986). Uma vez ingeridos por uma larva susceptível, seguem pelo trato intestinal até chegar ao intestino médio onde o ambiente é altamente alcalino (pH 9,5 a 11,5) o que leva à dissolução do OB e liberação das partículas virais. Essas partículas virais dão início à infecção das células colunares epiteliais do intestino médio pela fusão dos nucleocapsídeos virais com a membrana das microvilosidades (Horton, 1993). Essa infecção é denominada primária e, a partir da replicação dos vírus no intestino e produção de novas partículas virais do tipo BV, é estabelecida a infecção secundária, ou seja, a disseminação do vírus para os outros tecidos do inseto que serão infectados subsequente (Volkman, 1986). Outra rota para infecção das diferentes células do inseto é a passagem direta do vírus pelo citoplasma das células intestinais e a infecção das células da traquéia ou da hemolinfa após passagem pela lâmina basal (Engelhard *et al.*,1994).

A infecção então se espalha rapidamente e ocorre a manifestação dos sintomas mais típicos de infecção por baculovirus: clareamento da epiderme pelo acúmulo de

vírus nos núcleos das células adiposas da epiderme, parada no desenvolvimento larval e diminuição de movimentos. A perda de apetite acontece no final da infecção e é seguida da morte do inseto (Federici, 1997). Quando a larva do inseto infectado morre, ocorre desintegração do seu tegumento e conseqüente liberação dos OBs no ambiente, que podem então ser ingeridos por outras larvas de inseto (Figura 2).

A



B

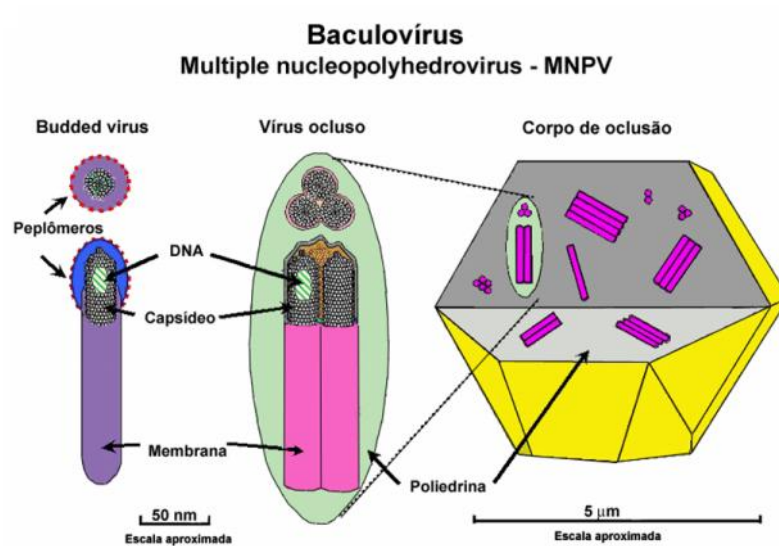


Figura 1: Estrutura dos baculovírus do gênero *nucleopolyhedrovirus*. A) Micrografia eletrônica de transmissão mostrando múltiplas partículas virais envelopadas (ODV) no interior de um poliedro do vírus AcMNPV (Bergmann M. Ribeiro, dados não publicados). B) Esquema da organização interna do poliedro, mostrando os diferentes fenótipos característico dos baculovírus, o budded vírus, o vírus ocluso e o corpo de oclusão. Adaptado de <http://en.wikipedia.org/wiki/Baculovirus>

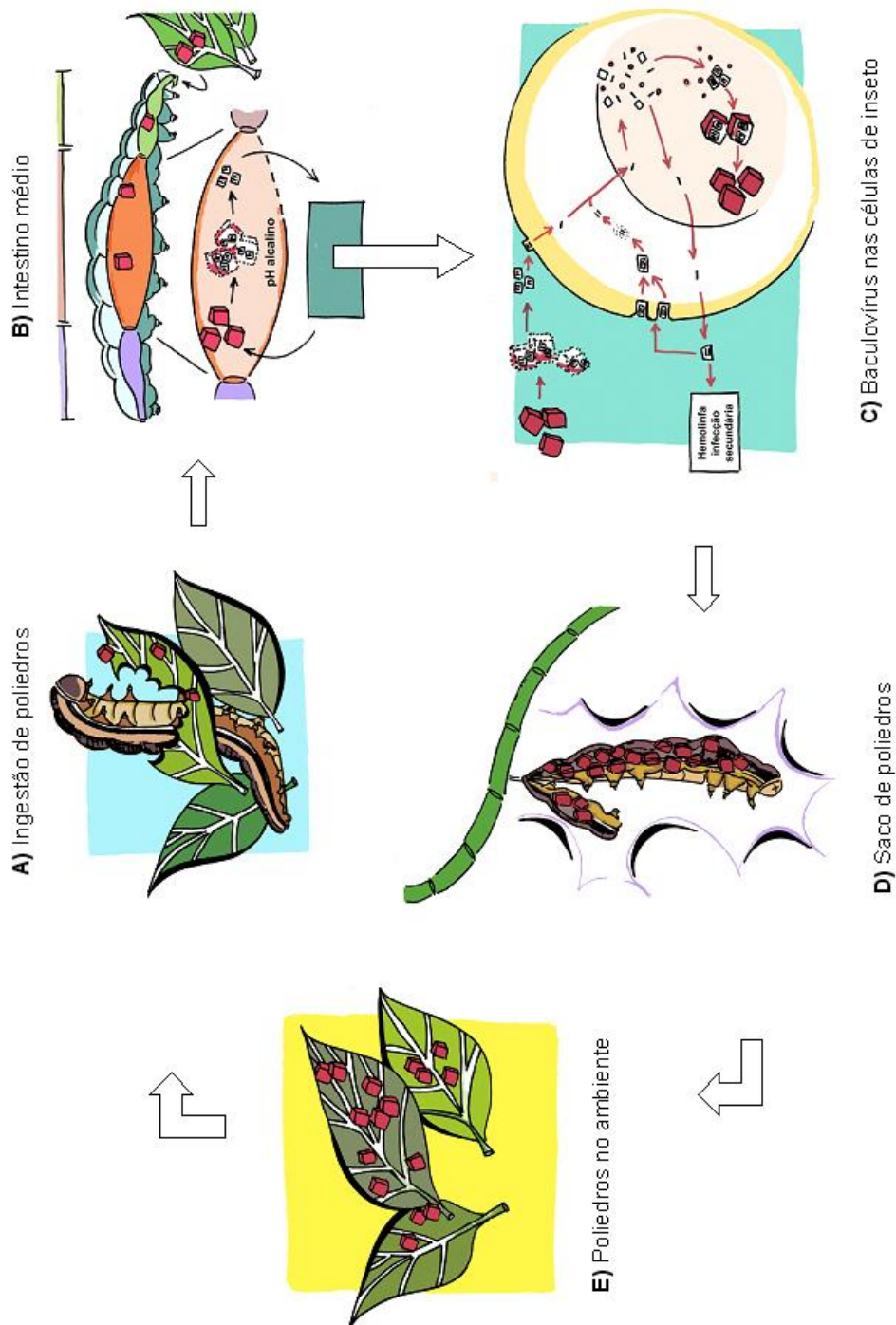


Figura 2: Desenho esquemático mostrando o ciclo de infecção *in vivo* de uma larva de lepidóptera infectada por um baculovírus. Em (1) ocorre a ingestão de poliedros pela larva do inseto e, depois de ingeridos, estes seguem pelo trato digestivo (2) até chegarem ao intestino médio e sofrem dissolução pelo baixo pH e liberam as partículas virais. Com a passagem pela membrana peritrófica, o vírus pode infectar células colunares (caracterizando a infecção primária) e, em seguida, partir para infectar outros tipos celulares permitindo a disseminação do vírus pela hemolinfa (caracterizando a infecção secundária) (3). A infecção se espalha, causando a morte da larva (4) e ela se torna um “saco” de poliedros que, quando se rompe, libera os poliedros no ambiente tornando-se fonte de infecção para outras lagartas (5). Arquivo pessoal, autoria Maria Creuza Barros.

1.5. Baculovirus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) e *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV)

De acordo com o International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) cada gênero viral contém uma espécie-tipo e o *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) é a espécie-tipo dos NPVs (Fauquet *et al.*, 2005). O AcMNPV é o baculovirus mais estudado em nível molecular (Rohrmann, 2008) e este vírus foi primeiramente isolado da lagarta *Autographa californica*, e é capaz de infectar diferentes insetos da ordem lepidóptera. O principal modelo de estudo hoje associado ao AcMNPV é na infecção de cultura de células de inseto derivadas de *Spodoptera frugiperda* e *Trichoplusia ni* (Williams & Faulkner, 1997). Por ser a espécie-tipo, o modelo de replicação de AcMNPV é caracterizado e aceito como modelo para os outros baculovirus. Entretanto, outro baculovirus, *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) é o baculovirus utilizado no maior programa de utilização viral para controle biológico de uma praga e está estabelecido no Brasil para o controle da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*) a principal desfolhadora desse tipo de cultivo (Moscardi, 1999).

1.6. Aplicações do Baculovirus e segurança de manipulação

Diferentes genes foram introduzidos no genoma dos baculovirus visando a melhoria de sua patogenicidade a seus hospedeiros. As modificações incluem a introdução de genes de toxinas heterólogas que melhoram a atividade inseticida e que diminuem o tempo de induzir a morte do inseto, quando comparado ao vírus selvagem. Os genes heterólogos utilizados até o momento são derivados de diferentes organismos

como fungos, escorpiões, aranhas, anêmonas do mar e de bactérias (Gramkow *et al.*,2010). Como o objetivo é utilizá-los em larga escala no campo, é necessário estabelecer se são seguros em sua aplicação e, para isso, é necessário estabelecer a segurança dos vírus selvagens, ainda não modificados com proteínas heterólogas.

Baculovírus são considerados seguros para a manipulação humana, especialmente em se tratando de testes *in vitro*. Ao contrário dos vírus humanos, os baculovírus são incapazes de se replicar em células de mamíferos devido à ausência ou da limitada transcrição de seus principais genes reguladores (Tani *et al.*,2003). Na maioria dos casos, os genes do AcMNPV ou não são expressos ou são expressos em um nível extremamente baixo (Liu *et al.*,2007). Após a entrada em células de mamíferos, baculovírus produzem pouca ou nenhuma citotoxicidade microscopicamente observável, mesmo utilizando uma alta multiplicidade de infecção (MOI) (Kost *et al.*,2005).

Assim sendo, um modelo de estudo utilizando camundongos que forneça indícios de que a segurança do uso dos baculovírus (já atestada *in vitro*) se estende para as aplicações *in vivo* serve de base para que a utilização destes seja ampliada não só no uso como controle biológico mas na área de saúde.

1.7. Baculovírus e o sistema imunológico

Baculovírus (em especial da espécie AcMNPV) demonstraram capacidades imunoestimulatórias para induzir a expressão ou promover a liberação de diversas citocinas inflamatórias em modelos murinos e em células de mamífero. Esta propriedade é mediada pela resposta imune inata, como macrófagos e ativação do sistema complemento através da via clássica de ativação (Hofmann,1998). As principais citocinas produzidas pela presença dos baculovírus são: fator de necrose tumoral alfa

(TNF- α) (Beck *et al.*,2000) e interferons do tipo I (IFN- α/β) (Gronowski *et al.*,1999), ambos contribuindo para a resposta inflamatória local e defesa antiviral respectivamente. Estas citocinas pró-inflamatórias e IFN Tipo-I são produzidas através de vias de ativação dependentes e independentes do receptor toll-like (TLR) 9 (Abe *et al.*, 2005, Abe *et al.*,2009). Depois de ser injetado no organismo, o AcMNPV pode provocar significativa resposta imune inata, modulando o sistema imunológico de camundongos *in vivo* e *in vitro*.

Esta propriedade tem sido explorada para proteger cobaias de um desafio letal com o vírus da encefalomiocardite (Gronowski *et al.*,1999), e vírus da gripe (Abe *et al.*,2003). O AcMNPV pode ainda induzir imunidade adaptativa, caracterizada como uma resposta imune específica contra os produtos dos genes virais, tanto o gene heterólogo expresso nas células ou genes virais do próprio baculovírus como anteriormente mostrado com gene *p39* (Abe *et al.*, 2005 , Pieroni *et al.*,2001).

Muito pouco se sabe sobre os efeitos dos poliedros de baculovírus quando em contato com células de mamíferos *in vivo*, a maioria dos estudos têm sido realizados com a forma do vírus extracelular (BVs) do AcMNPV. Tomando como base que poliedros de AgMNPV são largamente aplicados como controle biológico no Brasil (por exemplo, em 2003, mais de 2 milhões de hectares de plantações de soja foram tratadas com este vírus -Moscardi, comunicação pessoal), os efeitos da exposição humana a uma quantidade tão grande de poliedros é um assunto relevante e de interesse científico.

Apesar de baculovírus serem incapazes de se replicar, eles têm a capacidade de entrar nas células de mamíferos. Portanto, existem algumas preocupações sobre seus efeitos sobre a saúde humana, especialmente entre aqueles indivíduos que estão em contato contínuo com baculovírus na agricultura ou no laboratório.

2. Objetivo

Avaliar os efeitos de baculovírus no sistema imunológico de camundongos, através da inoculação intranasal de camundongos BALB/c com os dois fenótipos (ODVs contidos nos corpos de inclusão poliédrica, OB ou PIB e vírus extracelular, BV) dos baculovírus AcMNPV e AgMNPV.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados 5 camundongos BALB/c com aproximadamente 6-8 semanas de idade para cada grupo de experimentação. Os animais foram fornecidos pelo biotério da faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - USP (Campus de Ribeirão Preto) e mantidos no alojamento de animais da Faculdade de Medicina / Faculdade de Saúde (FM/FS) da Universidade de Brasília (UnB), com alimentação e água *ad libitum* e ciclo de claro e escuro (+-12 horas). Para eutanásia, os animais foram inicialmente anestesiados com éter e em seguida sacrificados por deslocamento cervical.

Os procedimentos realizados estão de acordo com os procedimentos aceitos pelo Comitê Brasileiro de Ética Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animal da Universidade de Brasília (CEUA/UnB).

3.2. Inoculação intranasal e retirada e armazenamento de órgãos

Os camundongos BALB / c foram inoculados por via intranasal com PBS ou com os dois fenótipos (OBs e BVs) dos baculovírus AcMNPV e AgMNPV, com duas doses em intervalos de 2 semanas. Os animais foram inicialmente anestesiados com éter e em seguida sacrificados por deslocamento cervical após 15 dias a partir da última dose de inoculação. Imediatamente após o deslocamento cervical, foram realizados os seguintes procedimentos: a) coleta sanguínea em tubos plásticos de 1,5mL (Eppendorf). As amostras sanguíneas foram deixadas em repouso por 2h. Em seguida foram centrifugadas a 4000g durante 10 minutos. Os soros gerados foram separados em tubos

plásticos de 1,5mL e, em seguida, armazenados a -20°C para futuros ensaios; b) uma ampla incisão longitudinal na parede abdominal foi realizada em ambiente estéril (fluxo laminar) e em seguida foi realizada a retirada de órgãos (pulmão e baço) para futuros ensaios. Macrófagos peritoneais foram coletados para análise sequencial.

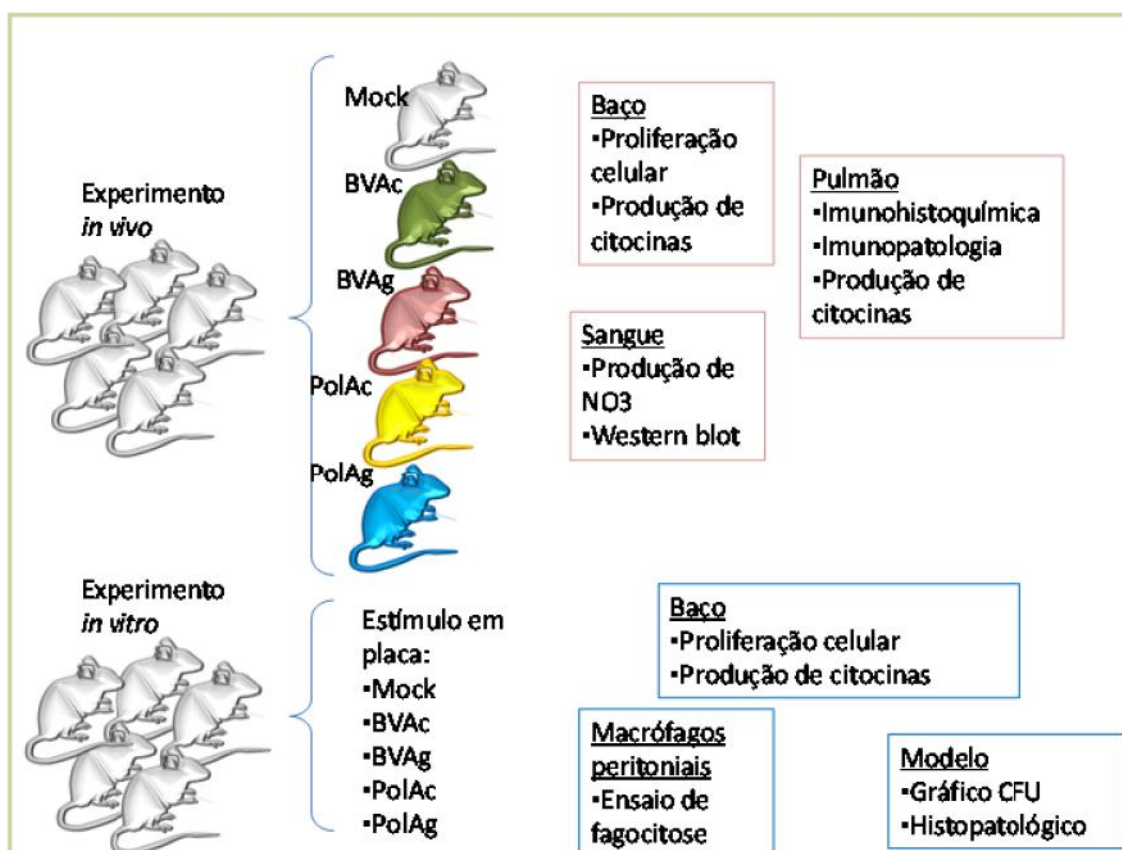


Figura 3 – Esboço dos experimentos com camundongos *in vivo* e *in vitro*.

3.3. Preparação do tecido para Histopatologia e Imunohistoquímica

Amostras de pulmão foram fixadas em formol tamponado a 10%, incluídas em parafina e os cortes consecutivos de 5mm foram obtidos para análises histopatológicas (coloração por hematoxilina e eosina – HE) e imunohistoquímicas (coloração utilizando marcação por anticorpos).

3.4. Imunohistoquímica

Amostras de pulmão previamente incluídas em parafina foram seccionadas com 5mm de espessura e recolhidas em lâminas de vidro revestidas de gelatina. As amostras foram imersas em 3mM tampão citrato (pH 6,0) por 10 minutos a 120°C para a recuperação antigênica. Posteriormente, os cortes foram incubados em 3% de soro e depois com um dos seguintes anticorpos (monoclonais e policlonais): mouse anti-human CD4 (M0716, Dako), CD8 (M1703, Dako) e CD25 (M0742, Dako), anticorpos monoclonais produzidos em camundongos e fornecidos pela empresa Dako (Glostrup, Dinamarca); goat anti-human CXCR3 (C-20; sc6226, Santa Cruz), CCR1 (C-20, sc6125, Santa Cruz), CTLA-4 (C-20, sc6226, Santa Cruz) anticorpos policlonais produzidos em cabras fornecidos pela empresa Santa Cruz Biotechnology. Todos os anticorpos foram diluídos em PBS-BSA a 1:100. Após a incubação com os anticorpos primários, as lâminas com os tecidos seccionados foram incubadas com anticorpos biotinizados por 20 minutos e depois com complexo avidina-biotina de acordo com as instruções do kit LSAB-HRP (Dako, Glostrup, Dinamarca). Controles negativos foram obtidos pela omissão dos anticorpos primários e, após a lavagem com reagente do kit, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer.

3.5. Contagem de células e análise estatística

Para a contagem das células positivamente marcadas foi utilizado um microscópio binocular (AxiolabZeiss) associado a ocular com retículo de integração quadrado em forma de rede (CARL ZEISS-474068000000 Netzmikrometer-12.5x). Todas as células foram contadas em cinco campos consecutivos sob a objetiva de 40X. Com este aumento (40X da objetiva e 10X da ocular), cada campo tem uma área igual a 0.015625

mm²; assim uma área total igual a 0,078125 mm² foi analisada em cada espécime. Os resultados foram expressos como a média de células positivas ± desvio padrão (SD) de n observações por mm². Todos os experimentos foram repetidos três vezes de forma independente. Todos os cálculos e plotagem foram feitos utilizando o programa GraphPad PRISM versão 4.0 (Graph Pad Software for Science, San Diego, CA, EUA). Valores P foram consideradas significativos quando P <0,05. Todos os valores são médias ± S.E.M.

3.6. Citocinas no pulmão ou no sobrenadante de cultura de células

As citocinas produzidas pelas células do pulmão, ou presentes no sobrenadante da cultura de macrófagos ou de células do baço foram testadas por ELISA. Os pulmões dos animais inoculados e não inoculados foram pesados, homogeneizados em 1,0 ml de PBS frio e os sobrenadantes coletados. Os macrófagos ou células do baço foram cultivados por 24h ou 48h, respectivamente, e os sobrenadantes foram coletados. As citocinas interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-12 (IL-12) foram analisadas segundo as recomendações do fabricante (BD Biosciences Pharmigen, EUA). As concentrações de citocinas foram determinadas conforme protocolo abaixo descrito, através de curvas padrão com diluições seriadas de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-12 e expressa em pg /mL.

3.7. Medição das concentrações de citocinas

Os orifícios da placa de ELISA foram sensibilizados com 100 μ L de anticorpo de captura (anti-TNF- α ou anti-IFN- γ ou anti-IL-10 ou anti-IL12 de camundongo), diluído 1:250 em tampão de ligação (carbonato de sódio 0,1M pH 9,5) e incubada por 12 horas

à 4°C. A seguir os orifícios foram aspirados e lavados 3 vezes com 300 µL de tampão de lavagem (tampão fosfato com 0,05% tween 20). Depois da última lavagem, a placa foi seca em papel absorvente. A seguir os orifícios foram bloqueados com 200 µL/orifício de diluente de ensaio (tampão fosfato com 10% de soro bovino fetal inativado – BSF, pH 7,0) e incubada a temperatura ambiente por 1 hora. Depois da incubação os orifícios foram novamente lavados como descrito anteriormente e 100 µL de cada concentração da curva padrão e das amostras foram distribuídas nos orifícios apropriados, e a placa foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Um novo ciclo de 5 lavagens foi realizado utilizando tampão de lavagem e 100 µL do anticorpo de detecção (específico para cada tipo de anticorpo de captura) de camundongo biotilado (diluído 1:25) foi adicionado em cada orifício, e a placa foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente. Um ciclo de 5 lavagens foi realizados e 100µL do reagente enzimático diluído 1:250 (conjugado de peroxidase e estreptavidina de coelho) foi adicionado em cada orifício. A placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, e em seguida lavada por 7 vezes com o tampão de lavagem. Para a revelação da reação foi adicionado 100 µL da solução de substrato (tetrametilbenzidina) e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e no escuro. A reação foi interrompida com H₂SO₄ 2N e a leitura realizada em filtro de 450nm. Os resultados foram expressos em pg/mL de citocinas comparando-se a densidade ótica (O.D.) com uma curva padrão feita com a dosagem (BD Biosciences Pharmigen, USA).

3.8. Dosagem de óxido nítrico

O Óxido Nítrico (NO) decompõe-se espontaneamente em nitritos (NO₂⁻) e nitratos (NO₃⁻) no meio de cultura e a produção de NO₂⁻ pelos macrófagos pode ser dosada por ensaio colorimétrico baseado na reação de Griess (Green et al, 1981). Para esta dosagem

foi adicionado aos sobrenadantes da cultura dos macrófagos o mesmo volume do reagente de Griess, que continha NEED 0,1% (N-(1-Naphthyl)ethyl-enedinamine – Sigma Chemical, lote 23H0262, USA) e sulfanilamida 1% (Vetec, lote 020698, Brasil) diluída em ácido fosfórico (H_3PO_4) a 5% (Vetec, lote 072353, Brasil). As amostras foram lidas em leitor de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay - Enzimaimunoensaio) com filtro de 540nm usando um leitor de microplacas. Os resultados foram expressos em μM de NO_2^- por 3×10^6 células após 24h de incubação, comparando-se a O.D. do experimento com a O.D. da curva padrão de NO_2^- feita junto com o experimento e que variou de 3,125 a 200,0 μM (Green et al, 1981). Todas as determinações foram realizadas em duplicata.

A dosagem de NO no soro dos animais foi realizada através de redução enzimática do NO_3^- em NO_2^- pela enzima nitrato redutase. Os soros foram diluídos (1:5 em água destilada) e alíquotas de 50 μL foram incubadas com o mesmo volume do tampão nitrato redutase (fosfato de potássio 0,1M pH 7,5 contendo 1mM NADPH, 10mM FAD e 4U nitrato redutase/mL), por 12 horas, a 37°C. A curva de nitrato foi também incubada com tampão redutase. A concentração do nitrito foi determinada pela reação colorimétrica de Griess. Os resultados foram expressos em μM de NO_3^- +-S.E.M.

3.9. Índice fagocitário

Macrófagos peritoneais de camundongos não inoculados, na concentração de 1×10^5 , foram cultivados por 24h em microplacas de 24 orifícios contendo lamínulas. As análises de cada condição analisada foram realizadas em triplicadas, sendo que em uma os macrófagos foram estimulados apenas com tampão fosfato, e as demais incubadas com BVs de AcMNPV (10^5), BVs de AgMNPV (10^5), poliedros de AcMNPV (10^3) ou com poliedros de AgMNPV (10^3) por 24h. Em seguida todos os orifícios foram

incubados com leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* na concentração 3×10^6 células por poço, sensibilizadas com 10% de soro fresco de camundongo e incubadas em câmara úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% CO₂. Após 30 minutos, os sobrenadantes foram coletados, as leveduras retiradas (por centrifugação) e congelados a -20°C para posterior dosagem de citocinas e as células foram lavadas com meio RPMI1640 para remover leveduras não fagocitadas. As células foram fixadas com metanol absoluto e coradas com solução de Giemsa a 20% tamponada. Foram analisadas 200 células de cada preparação com objetiva de imersão (100x). O experimento foi realizado em triplicata. A capacidade fagocitária foi expressa pelo percentual de fagócitos envolvidos na fagocitose, pelo número médio de leveduras fagocitadas por fagócito e pelo índice fagocitário, produto destas duas determinações (IF = % Fagócitos envolvidos na fagocitose x média de leveduras fagocitadas.) (Shaw & Griffin, 1981).

3.10. Ensaio de proliferação celular e medição da concentração de citocinas

Após a eutanásia e retirada do baço, células do baço de animais não inoculados foram utilizadas em cultura para avaliar a proliferação celular. As células foram separadas em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), suplementado com 2mM L-glutamina, 1mM piruvato sodico, 5% aminoácidos não-essenciais (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), estreptomina 2M (100 mg / mL) e 5% soro fetal bovino (FBS). As células foram lavadas duas vezes em RPMI sem soro, contadas, adicionadas à placas de 96 poços de fundo chato, em volume de 100µL, em triplicata, na concentração de 3×10^5 células / poço. Às células foram adicionados 100 µL de meio de cultura RPMI 1640

(SIGMA) contendo o mitógeno inespecífico Con-A (Concanavalina A) (4 mg / mL, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). As células foram estimuladas apenas com tampão fosfato ou então com BVs de AcMNPV (10^5), BVs de AgMNPV (10^5), poliedros de AcMNPV (10^3) ou com poliedros de AgMNPV (10^3). Os experimentos foram realizados em triplicata em um volume final de 200 μ L / poço. As células foram incubadas por 60 horas a 37 °C com 5% de CO₂, e, 12 horas antes do término da incubação, 1mCi de timidina tritiada [3H] TdR (1m Ci/mL) (Amersham, Arlington Heights, IL) foi adicionado às culturas. Após este período, as células foram coletadas e a incorporação da timidina tritiada foi determinada pela radiação liberada medida em contador de cintilação líquida (Beckman Instruments). Os resultados foram expressos como média das contagens de pulsos por minuto (CPM).

Sobrenadantes de células do baço de cultura dos grupos experimentais foram utilizados para a detecção da produção de citocinas. As citocinas interleucina-10 (IL-10), -12 (IL-12), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interferon-gama (IFN- γ) foram medidos como descrito acima.

3.11. Modelo de infecção de *Paracoccidioides brasiliensis*

A forma de levedura do isolado virulento de *P. brasiliensis* 18 obtida da coleção do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB) foi utilizada para os ensaios de infecção. O fungo foi cultivado em meio líquido YPD (2% peptona, 1% de extrato de levedura, 2% de glicose) a 36°C em um agitador rotativo (220 rpm) durante cinco dias. Após este período, uma suspensão de células de *P. brasiliensis* foi separada dos grumos por agitação mecânica, lavadas com tampão fosfato salino estéril 0,1M (PBS pH7,2) e ressuspensas para se obter uma concentração de 10^6 células

viáveis / mL. A viabilidade das células foi determinada usando o corante Janus Green B vital dye (Merck, Darmstadt, Alemanha) segundo protocolo de Berliner & Reza, 1966. 100 µL desta solução foram inoculados via intratraqueal em cada animal. Após 30 dias de infecção, o tratamento com baculovírus na forma poliédrica e com o controle negativo de PBS foi iniciado por via intranasal. Camundongos foram divididos em quatro grupos (5 animais por grupo): grupo I-camundongos não-infectados e não-tratados (grupo não-infectado), grupo II - camundongos infectados com *Pb* e tratados com solução salina 0,9% (grupo infectado), grupo III - camundongos infectados com *Pb* e tratados com 2 doses de 10^6 poliedros PIBAc com 2 semanas de intervalo; grupo IV - camundongos infectados com *Pb* e tratados com 2 doses de 10^6 poliedros PIBAg com 2 semanas de intervalo Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical após 15 dias a partir da última dose de tratamento. Pulmões foram coletados para análise sequencial.

3.12. Concentração fúngica

A concentração fúngica nos pulmões foi medida pelo número de UFC (unidades formadoras de colônia) de *P. brasiliensis* por grama de tecido pulmonar. Fragmentos de pulmão dos grupos acima descritos foram homogeneizados em 1,0 mL de PBS gelado (pH 7,2). Um total de 100µL dos homogeneizados foram semeados em meio BHI ágar (Infusão cérebro/coração, suplementado com 4% (v/v) de soro de cavalo, 5% (v/v) de filtrado de cultura de *P. brasiliensis* 192 (Pb192) (Singer-Vermes, 1992) , 40 mg / L de gentamicina (Gentamycin Sulfate, Schering- Plough). As placas foram incubadas a 36 ° C, e o número de colônias foram contadas após incubação de 7-21 dias em sacos plásticos para evitar desidratação. Resultados foram expressos em número de UFC ± desvio padrão da média (SEM) por grama de tecido pulmonar.

4. Resultados

4.1. A influência do baculovírus na resposta imunitária pulmonar em camundongos

4.1.1. A inoculação de PIBs ou BVs induziu diminuição na migração de células

Com o objetivo de analisar o papel dos corpos de inclusão poliédrica (PIBs) e vírus extracelulares (BVs) dos baculovírus AcMNPV e AgMNPV na resposta imunitária do pulmão em camundongos, os vírus foram inoculados por via intranasal. Quando comparados aos camundongos não-inoculados, os pulmões de camundongos inoculados mostraram uma resposta inflamatória pequena, com estrutura tissular normal (dados não mostrados). A imunohistoquímica do tecido pulmonar mostrou um menor número de células T reguladoras em camundongos inoculados com ambos os PIBs (CD25 + CTLA4 +) quando comparado com camundongos inoculados com PBS e BVs, além de um aumento do nível de receptores CXCR3 em camundongos inoculados com ambos os BVs quando comparado com camundongos inoculados com PBS e PIBs. O número de células CD4 + estava aumentado em camundongos inoculados com PIBAg mas diminuído em camundongos inoculados com PIBAc. Alterações celulares significativas não foram observadas em outros marcadores. (Tabela 1).

	PIBAc	BVAc	PIBAg	BVAg	PBS
CD4	19.2 ± 11.1	204.8 ± 19.6	357.4 ± 9.6	224.0 ± 12.8	275.2 ± 12.8
CD8	12.8 ± 12.8	1427.2 ± 38.6	10.7 ± 4.4	486.4 ± 33.87	0 ± 0
MAC-1	+	+	+	+	
CTLA-4	12.8 ± 6.4	91.7 ± 26.7	0 ± 0	10.7 ± 7.7	43.9 ± 14.9
CD25	8.5 ± 5.6	6.4 ± 3.7	0 ± 0	81.1 ± 17.5	46.9 ± 15.4
iNOS	+/0	+/0	+	+	
CCR1	21.33 ± 8.5	27.73 ± 5.6	0 ± 0	125.8 ± 40.7	0 ± 0
CXCR3	0 ± 0	68.3 ± 15.4	0 ± 0	232.5 ± 9.3	0 ± 0

Tabela 1 – Identificação de marcadores de células no pulmão de camundongos tratados com as diferentes formas de AgMNPV e AcMNPV. Os resultados são mostrados como número de células imunitárias positivas/mm².

4.1.2. A inoculação de PIBs ou BVs não alterou o padrão de citocinas de pulmão

A produção de citocinas no pulmão de camundongos tratados ou não tratados com PIBs ou BVs foi avaliada e nenhuma diferença estatisticamente significativa em níveis de citocinas foi observada quando comparada com animais não-inoculados (Figura 3A e Figura 3B).

4.1.3. A inoculação de BV aumenta a produção de óxido nítrico (NO)

Considerando o aumento da expressão de iNOS em células pulmonares de animais tratados (análise imunohistoquímica -Tabela 1) a produção de NO foi avaliada através da análise de concentrações de NO₃ em amostras de soro (Figura 4A) e NO₂ por grama nos sobrenadantes dos macerados de pulmão (Figura 4B). Os animais inoculados com BVAg demonstraram quantidade aumentada de NO₃ e NO₂ de modo expressivo quando comparados a camundongos não-inoculados (aqueles que receberam apenas PBS). Os outros grupos, inoculados com BVAc, PIBAc ou PIBAg não apresentaram alterações nos valores de NO₃ em comparação ao grupo não-inoculado. A produção de NO₂ nos sobrenadantes dos preparados de pulmão aumentou apenas em animais inoculados com formas BV (Figura 4B) quando comparado com camundongos não-inoculados.

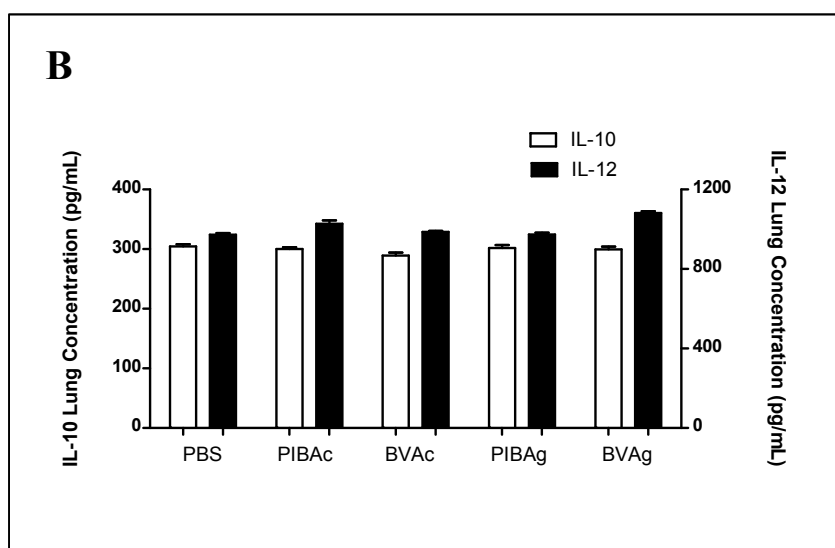
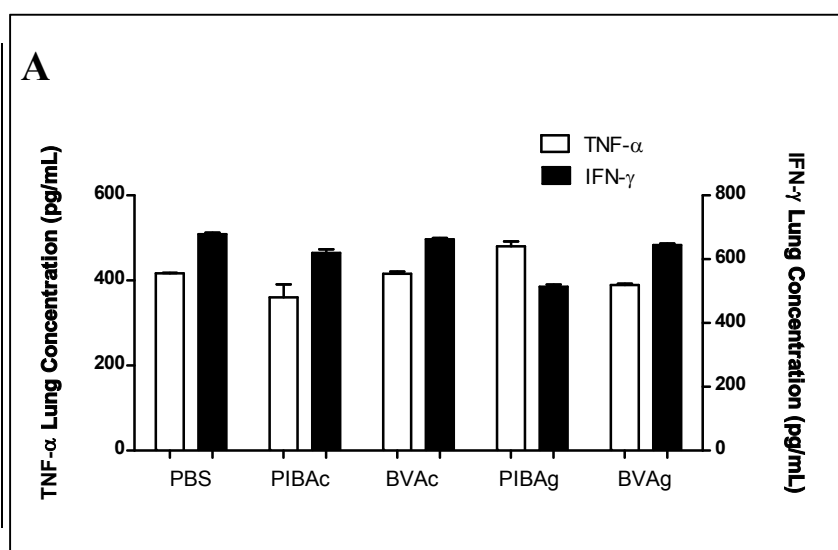


Figura 3: Níveis de citocinas em sobrenadantes de macerados de pulmão. Os níveis de TNF- α , IFN- γ (Figura 3A) e IL-10 e IL-12 (Figura 3B) de camundongos tratados com PIBs ou BVs de AcMNPV e AgMNPV foram medidos por ELISA como descrito anteriormente. Os valores são as médias \pm SEM de cada medição da concentração de citocinas para grupos de 5 animais cada.

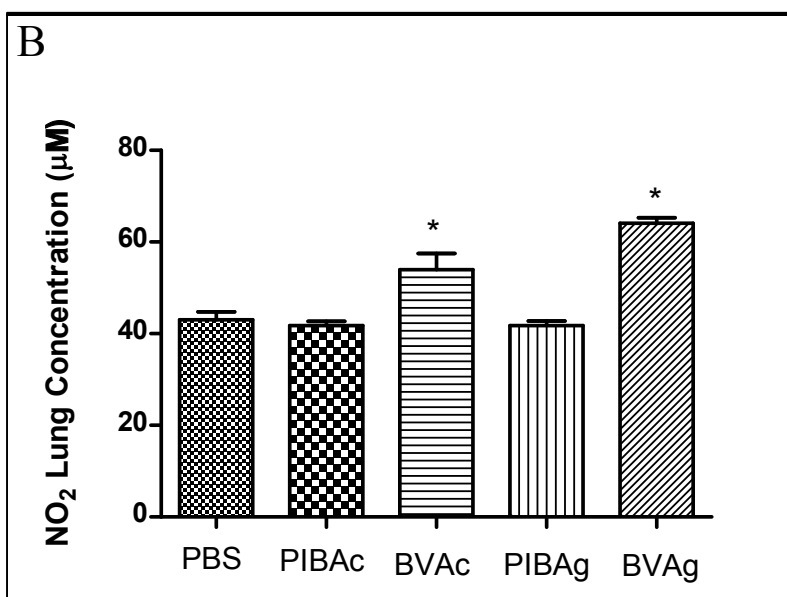
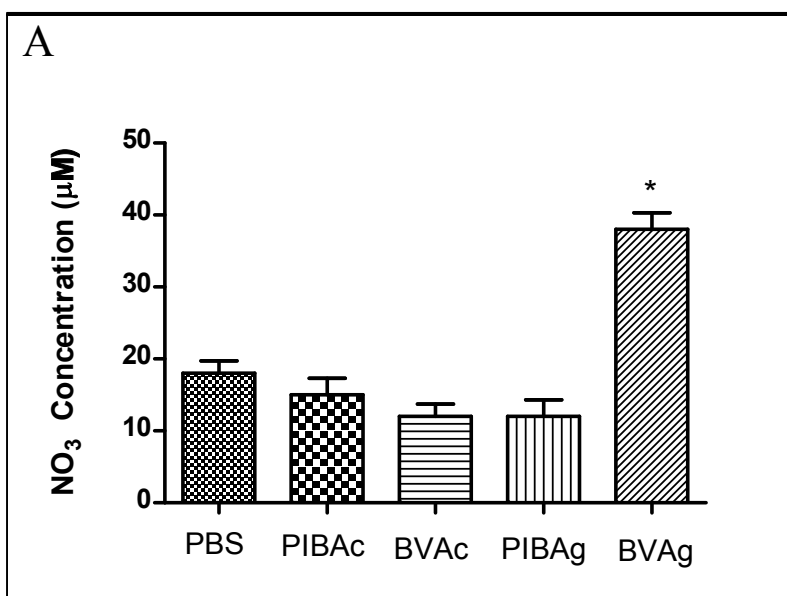


Figura 4 – Produção de NO₃ no soro (Figura 4A) e produção de NO₂ em sobrenadantes de pulmão (Figura 4B) de camundongos tratados com PIB BV ou de AcMNPV ou de AgMNPV conforme descrito anteriormente. Os valores são as médias ±SEM de produção de NO para grupos de 5 animais cada. *Representa uma diferença significativa em comparação com os animais tratados com PBS (P <0,05)

4.2. A influência dos baculovírus na ativação de células imunológicas *in vitro*

4.2.1. Índice fagocitário e produção de IL-12 por macrófagos *in vitro*

Considerando uma possível ativação de macrófagos *in vivo*, a capacidade de ativação de macrófagos *in vitro* pelos fenótipos de baculovírus PIBs e BVs de AcMNPV e AgMNPV foi analisada de 3 diferentes formas: pelo índice fagocitário dessas células na presença viral (Figura 5A), quantificação dos níveis de TNF- α e da citocina IL-12 (Figura 5B) e produção de óxido nítrico (Figura 6). Todos os estímulos aumentaram o índice de fagocitose quando comparados com células não-estimuladas (Figura 5A). A estimulação de macrófagos com os tipos BV ou PIB de baculovírus não induziu um aumento da produção de TNF- α , mas a produção de IL-12 aumentou com a utilização dos estímulos PIBAg e BVAg (Figura 5B). A estimulação por PIBAg foi capaz de aumentar também a produção de NO₂ por macrófagos (Figura 6).

4.2.2. O fenótipo AgMNPV estimula a proliferação de células do baço e produção de IFN- γ *in vitro*

As células do baço de camundongos saudáveis após a estimulação com todas as formas de baculovírus demonstraram a mesma produção IL-10 que as células não-estimuladas (PBS). As células estimuladas com BVAg, PIBAg ou BVAc foram capazes de induzir a produção de IFN- γ (Figura 7A). A proliferação de células esplênicas aumentou com o tratamento com os estímulos BVAg e PIBAg. (Figura 7B).

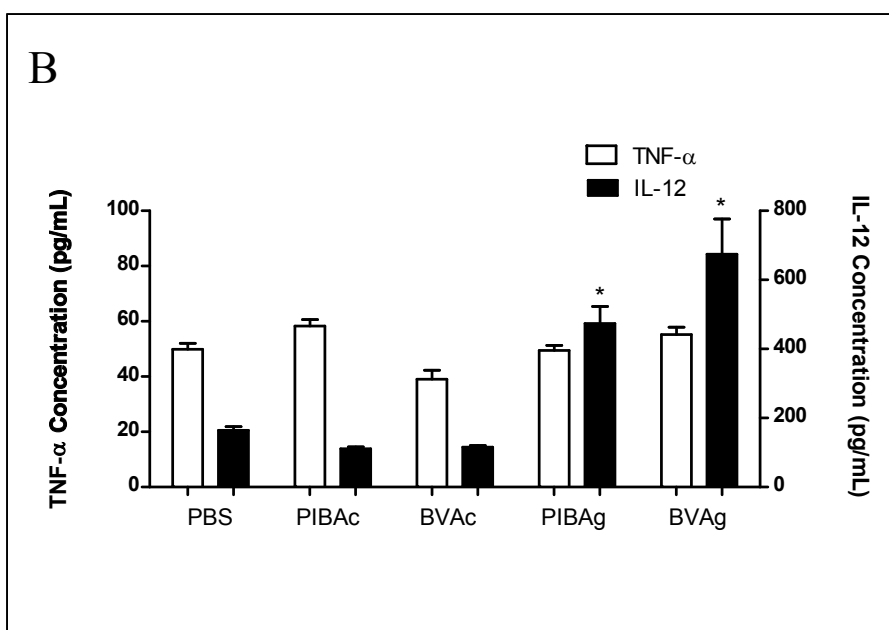
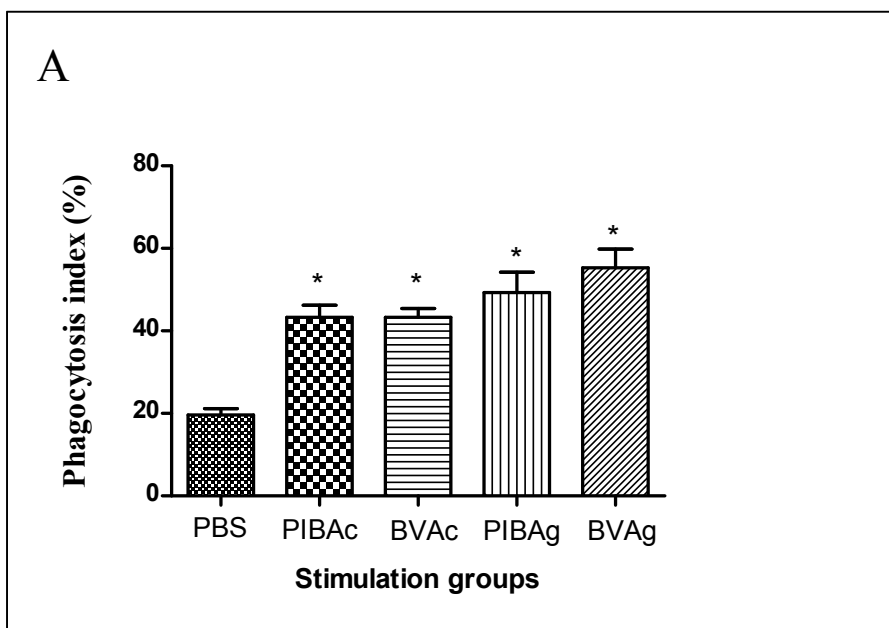


Figura 5 – Medição do índice fagocitário (Figura 5A) e produção de citocinas (Figura 5B) por macrófagos de camundongos não tratados. Os macrófagos peritoneais foram estimulados com PIBs ou BVs de AcMNPV e AgMNPV *in vitro* durante 24 horas. Células de *Saccharomyces cerevisiae* foram adicionadas para a medição do índice fagocitário. Os valores são as médias \pm SEM do índice fagocitário ou concentração de citocinas. *Representa uma diferença significativa em comparação com macrófagos não-estimulados ($P < 0,05$)

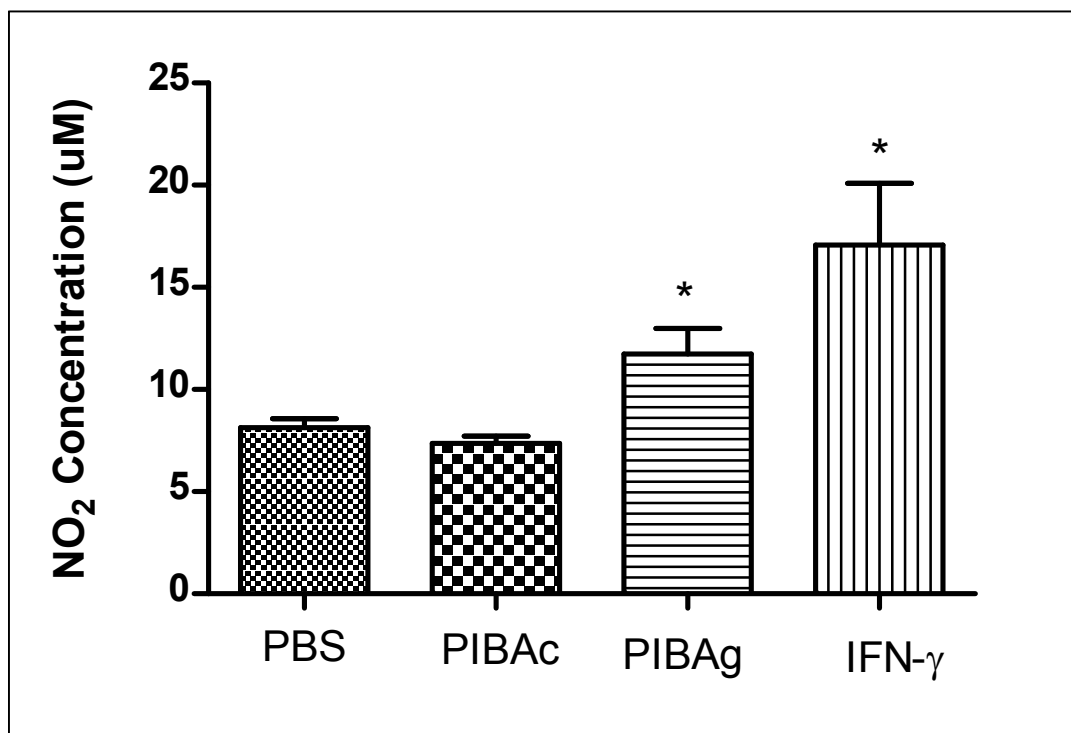


Figura 6 – Medição da produção de NO₂ em macrófagos de camundongos não tratados. Os macrófagos peritoneais foram estimulados com PIB de AcMNPV ou IFN-γ recombinante *in vitro* durante 24 horas. Os valores são as médias ±SEM da concentração de NO₂. *Representa uma diferença significativa em comparação com macrófagos não-estimulados (P <0,05)

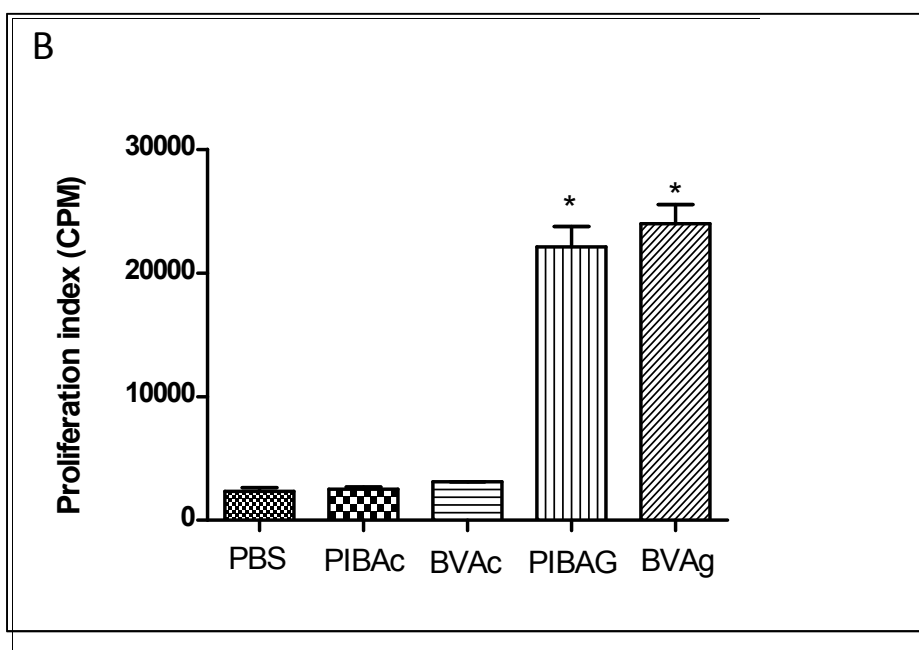
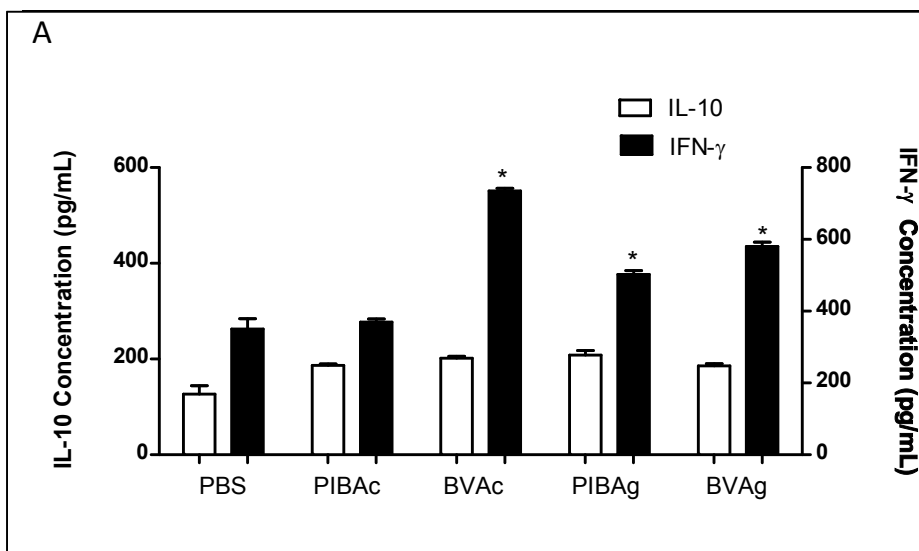


Figura 7 – Proliferação celular e perfil de concentração de citocinas. As células do baço foram isoladas de animais não inoculados e incubadas durante 24h com PIBs ou BVs de AcMNPV e AgMNPV. Os níveis de IFN- γ e IL-10 foram medidos no sobrenadante da cultura pelo método ELISA como descrito anteriormente. A linfoproliferação foi medida pela incorporação de timidina tritiada. As barras representam a média \pm SEM de contagens por minuto de incorporação de timidina tritiada às células do baço de grupos experimentais. *Representa uma diferença significativa em comparação com culturas de células não estimuladas (PBS) ($P < 0,05$).

4.3. A influência dos baculovírus em um modelo de doença pulmonar

Com o objetivo de avaliar a influência do baculovirus na forma poliédrica (PIBs) em um modelo de doença pulmonar, o destino de uma paracoccidíomicose, depois de dois tratamentos com o PIBAc ou PIBAg foi analisado. A análise histológica pulmonar de animais do grupo infectado pelo fungo e tratado ou não tratado com PIBAc revelou uma evidente resposta inflamatória com a presença de lesões granulomatosas confluentes e um predomínio de células epitelióides perto da maioria das células infectadas pelo fungo (Figura 8A e 8B). O exame histológico dos pulmões dos grupos tratados com PIBAg mostrou a infecção progressiva nos pulmões, caracterizada por uma resposta inflamatória bem circunscrita, redução do número de granulomas, bem como um pequeno número de leveduras *P. brasiliensis* (Figura 8C). A inoculação de poliedros não alterou a concentração fúngica nos pulmões dos animais tratados (Figura 9).

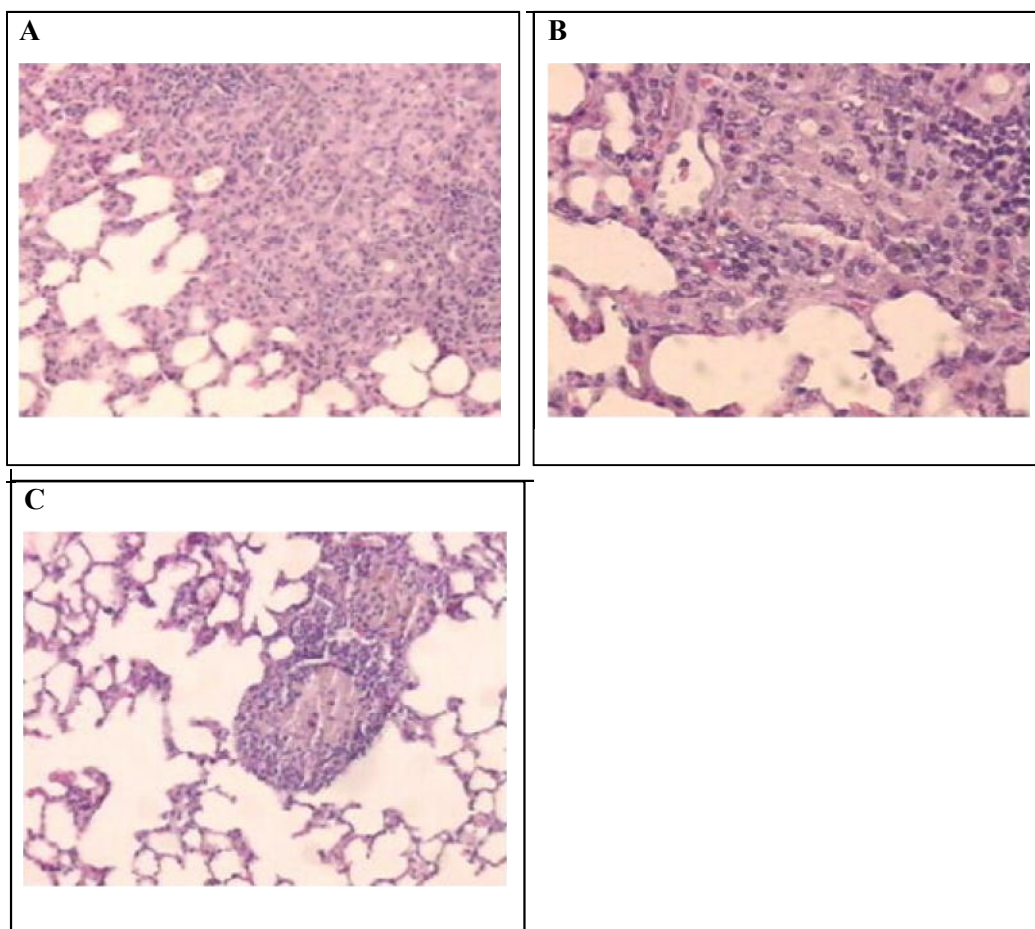


Figura 8 – Análises histopatológicas de pulmão de animais com 30 dias de infecção com 10^6 *P. brasiliensis* e tratados com PIB de AcMNPV ou AgMNPV. A – pulmão de animais infectados com *Pb* e não-tratados, coradas com HE (200x); B – pulmão de animais infectados com *Pb* e tratados com PIBAc, coradas com HE (200x); C – pulmão de animais infectados com *Pb* e tratados com PIBAg, corados com HE (200x). Os animais foram tratados com PIB de AcMNPV ou AgMNPV por duas vezes e sacrificados 15 dias após o último tratamento.

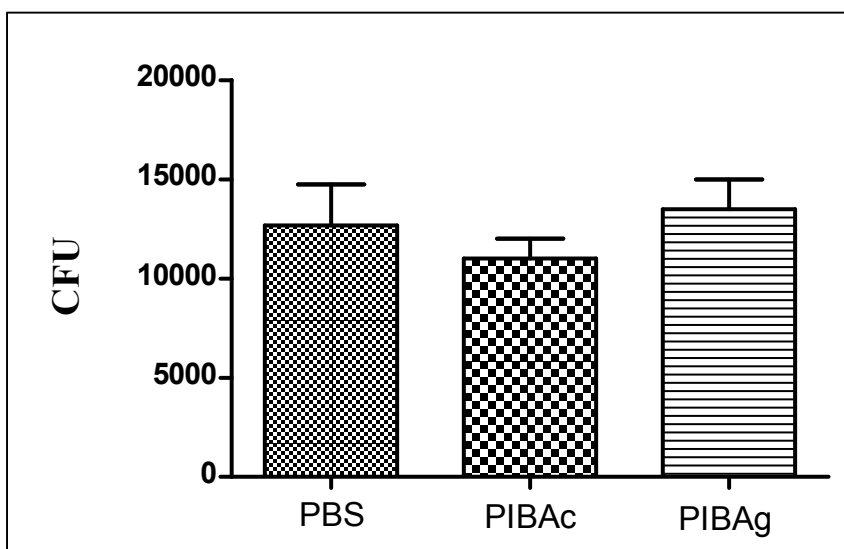


Figura 9 – Determinação da concentração fúngica nos pulmões dos animais infectados pro *Pb* e tratados com PIBAcMNPV ou PIBAgMNPV ou não tratados (PBS). Animais com 30 dias de infecção com 10^6 *P. brasiliensis*. A concentração fúngica nos pulmões foi medida pelo número de UFC (unidades formadoras de colônia) de *P. brasiliensis* \pm desvio padrão da média (SEM) pro grama de tecido pulmonar.

5. Discussão

Baculovírus vêm sendo utilizados como biopesticidas de forma segura e como vetores virais para a expressão de proteínas recombinantes em células de insetos e de mamíferos de forma eficiente e prática. São vírus incapazes de se replicar em células de mamíferos, mas capazes de infectar eficientemente muitos tipos celulares de células de mamíferos e expressar genes funcionais de sua fase precoce. (Carbonell *et al.*, 1985;. Murgues *et al.*, 1997). Apesar de ser amplamente estudada, a interação entre células de mamíferos e o baculovírus AcMNPV permanece não totalmente elucidada. Abe *et al.* (2003) descreveram que a imunização intramuscular e intraperitoneal de camundongos com tipo selvagem e recombinante de baculovírus contendo genes do vírus influenza induziu níveis mais altos de uma resposta de anticorpos específicos, mas a proteção contra o desafio letal utilizando o vírus da gripe foi alcançada somente através da imunização intranasal. No presente trabalho, a imunização intranasal foi escolhida para ser utilizada em camundongos com o objetivo de simular o modo de utilização de baculovírus como agente de controle biológico aplicado no campo e analisar a interação baculovírus com células do sistema imunológico que migraram para o pulmão. A lagarta, *Anticarsia gemmatalis*, é uma das principais pragas da soja no Brasil e, embora o controle químico tenha sido predominante contra esse inseto, um nucleopoliedrovírus do inseto (AgMNPV) tem sido extensivamente aplicado nos campos de soja nas duas últimas décadas no Brasil, proporcionando controle efetivo de larvas de *A. gemmatalis* (Moscardi *et al.*, 1999). A interação entre células hospedeiras de mamíferos e AgMNPV ainda é pouquíssimo estudada e pouco esclarecida.

A inoculação nasal de ambos os baculovírus (AcMNPV e AgMNPV), em ambos os fenótipos, mostrou uma reação inflamatória leve nos pulmões dos camundongos, sem alterações na arquitetura do tecido, com um pequeno aumento da migração celular e sem produção de citocinas nos pulmões dos camundongos. Este resultado confirma a segurança de baculovírus como biopesticida previamente já descrita (McWilliams 2003). O estudo imunohistoquímico do tecido pulmonar mostrou um ligeiro aumento de células T e do número de macrófagos. Os linfócitos não apresentaram aumento dos marcadores CTLA5/CD25 e expressaram alguns receptores importantes para a resposta imune. A expressão dos receptores CXCR3 e CCR1 em camundongos inoculados com a forma BV de ambos os vírus se mostraram aumentados em relação aos inoculados com as formas PIBs e o controle inoculado com PBS. CXCR3, um receptor acoplado à proteína G de IP-10 (CXCL10), é expresso em células T ativadas, em células NK, e em uma fração significativa de células T CD4 circulantes e células T CD8 (Dufour *et al.*, 2002). Lee *et al.* (2005) descreveram que os camundongos CXCR3^{-/-} apresentaram menor recrutamento de células T do que os camundongos do tipo selvagem. Nos resultados encontrados neste trabalho, tanto BVAg quanto BVAc estimularam CXCR3 e células T CD8. BVAg também foi responsável pela indução de um aumento da expressão de CCR1 quando comparado com os outros grupos. CCR1 é o receptor de MIP-1 α e CCL5 (Proudfoot *et al.*, 2002) e, tal qual CXCR3, está associada a uma migração de linfócitos T, preferencialmente células T do tipo 1 (Th1). As outras células que migraram para os pulmões foram macrófagos com um aumento da expressão da iNOS após a inoculação com ambos fenótipos de AgMNPV. Para confirmar este aumento de atividade da iNOS os níveis de NO₃ e NO₂ foram medidos no soro e no sobrenadante de preparados de pulmão de camundongos, respectivamente. Os níveis de nitrato encontravam-se aumentados apenas em animais tratados com BVAg e os níveis

de nitrito encontravam-se aumentados em animais tratados com BVAg e BVAc. Dados presentes nesse trabalho confirmam outros resultados que mostraram a ativação de macrófagos após interação com baculovírus (Beck *et al.*, 2000, Abe *et al.*, , 2003, Han *et al.*, 2009).

Para explorar a ativação de macrófagos por baculovírus e a ativação da resposta imune inata, macrófagos peritoneais foram estimuladas *in vitro* com BVs e PIBs. Todos os estímulos levaram ao aumento da fagocitose de leveduras, e esta é a mesma via responsável pela entrada do vírus nas células (Abe *et al.*, 2010). Ambos os fenótipos de AgMNPV induziram aumento na produção de IL-12 e PIBAg aumentou os níveis de nitrito. O fenótipo BV do vírus *Antheraea pernyi nuclear polyhedrosisvirus* (ApMNPV) é capaz de estimular resposta imune inata em células correspondentes a macrófagos em aves através da produção de IL-12, IFN- γ e NO, mediadas pelas vias MAPK p38, JNK e NF-kB e a produção de NO foi mediada através da via MAPK p38 / NF-kB . Beck *et al.* (2000), Abe *et al.*,(2003) e Han *et al.*(2009) descreveram que os macrófagos estimulados por AcMNPV (fenótipo BV) induziram a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Por outro lado, não foi observada produção de TNF- α neste trabalho. Outra célula importante do sistema imune inato é a célula dendrítica que foi descrita capaz de ser infectada e ativada por AcMNPV (fenótipo BV), embora o mecanismo exato não esteja ainda elucidado (Suzuki *et al.*, 2010). Células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs – bone marrow-derived dendritic cells) após a infecção por AcMNPV demonstraram uma expressão estimulada (up-regulada) do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I e II, moléculas de co-estimulação, e produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL12p70, e TNF- α) e IFN- α . Com base nestes resultados os autores do trabalho sugeriram que as células dendríticas infectadas pelo baculovirus

induzem a resposta imune não- específica e que o baculovírus pode ser usado como um agente de imunoterapia ou com alguma abordagem com relação à vacinas, como adjuvantes (Suzuki *et al.*, 2010) .

Molinari *et al.* (2010) mostraram que o tratamento de camundongos com uma única injeção de AcMNPV antes do desafio letal utilizando o vírus da doença da febre aftosa (FMDV) resultou na anulação completa da mortalidade e remissão da viremia. Os autores concluíram que AcMNPV poderia ser uma valiosa ferramenta para melhorar o design de uma nova vacina e agir como adjuvante. Vários sistemas de vacinas baseados no baculovírus AcMNPV estão sendo testados (Yoshida *et al.*, 2009; Andrew *et al.*, 2010; Martelli *et al.*, 2010). Os resultados destes sistemas mostram que AcMNPV é um candidato seguro e eficaz, com potencial para ser um sistema de entrega de vacinas. O baculovírus também pode ser usado como adjuvante de imunização, promoção da potencialização da resposta adaptativa humoral e de células T CD8 contra proteínas co-administradas além de aumentar a maturação das células dendríticas e os níveis de citocinas inflamatórias (Hervas-Stubbs *et al.*, 2007).

A proteção imunológica baseada em imunização depende da ativação de células T e Suzuki *et al.* (2010) demonstraram que a estimulação das células T com o tipo selvagem de AcMNPV foi responsável pelo aumento da produção de IFN- γ , regulação positiva de CD69 e aumento da proliferação celular. Com o objetivo de analisar a ativação de células T por AcMNPV ou AgMNPV em ambos os fenótipos, nesse trabalho foi demonstrado que BVs são capazes de induzir a produção de IFN- γ , mas apenas AgMNPV em ambos os fenótipos (BV ou PIB) é que demonstrou capacidade de aumentar a proliferação de células do baço. Os dados de imunohistoquímica e ativação de células *in vitro* sugerem que AgMNPV é capaz de estimular uma resposta imune celular, com o envolvimento de macrófagos e células Th1.

A resposta imune celular do hospedeiro é muito importante para o desenvolvimento de imunidade contra vários patógenos intracelulares, como alguns fungos e bactérias. Para analisar a capacidade do baculovírus modular uma resposta imune celular, foi utilizado um modelo de infecção com o fungo causador da paracoccidiodomicose (PCM).

PCM é uma doença endêmica rural e suburbana comumente manifestando-se como uma pneumopatia de curso crônico (Brummer *et al.*, 1993). A doença causada pelo *Paracoccidioides brasiliensis* é considerada a mais prevalente infecção fúngica sistêmica no Brasil e está presente em muitos países latino-americanos. Na forma crônica, os pulmões são principalmente afetados com uma resposta inflamatória granulomatosa, onde a resposta celular ao invés da resposta humoral é o mecanismo de defesa mais eficaz do hospedeiro para controlar os fungos (Brummer *et al.*, 1993; De Camargo & Franco, 2000). Pacientes com PCM sistêmica mostram-se imunodeprimidos com relação à resposta imune celular (Motta *et al.*, 1988) e em um modelo murino, os camundongos resistentes são capazes de desenvolver uma resposta imune com produção de IFN γ e ativação eficiente de macrófagos direcionando para uma resposta preferencialmente Th1, capaz de conter a disseminação dos fungos e a progressão da doença (Kashino *et al.*, 2000). Neste trabalho, não observamos uma melhora na reação inflamatória pulmonar em modelo murino com PCM ou diminuição da carga fúngica quando camundongos foram tratados com AcMNPV. O tratamento com AgMNPV reduziu o dano pulmonar com granulomas bem definidos e circunscritos que cercavam a maioria dos fungos, indicando que o tipo selvagem AgMNPV pode modular a resposta imune adaptativa, mesmo após ela estar já estabelecida.

Os resultados deste trabalho corroboram com outros trabalhos anteriores que mostraram baculovirus sendo capazes de modular a resposta imune de mamíferos *in*

vivo e in vitro. BVs ou PIBs de AgMNPV podem aumentar uma resposta de células Th1 e pode ser considerado mais útil como vetores de vacinação ou adjuvantes imunológicos do que AcMNPV. AgMNPV na forma selvagem ou recombinante, pode ser também utilizado para alterar o tipo de resposta adaptativa desenvolvida. Outros trabalhos serão necessários para elucidar se baculovírus selvagem ou formas recombinantes podem alterar os tipos de respostas imunológicas características de outras doenças.

6. Perspectivas

- 6.1. Realização do ensaio de RT-PCR para avaliação da transcrição de genes que codificam as citocinas estudadas neste trabalho e PCR tempo real para quantificar essa expressão.
- 6.2. Repetição do ensaio de doença pulmonar com prévio tratamento com baculovírus e análise da relação entre o tratamento e a evolução da PCM.

7. Referências bibliográficas

Abe T, Takahashi H, Hamazaki H, Kurosaki NM, Matsuura Y, Takaku H. **Baculovirus Induces an Innate Immune Response and Confers Protection from Lethal Influenza Virus Infection in Mice.** *Journal of Immunology* 2003; **171**: 1133-1139.

Abe, T., Hemmi, H., Miyamoto, H., Moriishi, K., Tamura, S., Takaku, H., Akira, S., Matsuura, Y. **Involvement of the Toll-Like Receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus.** *Journal of Virology* 2005.2847-2858.

Abe, T., Kaname, Y., Wen, X., Tani, H., Moriishi, K., Uematsu, S., Takeuchi, O., Ishii, K. J., Kawai, T., Akira, S., Matsuura, Y., **Baculovirus induces type I interferon production through Toll-Like receptor-dependent and –independent pathways in a cell-type-specific manner.** *Journal of Virology* 2009.7629-7640.

Airenne, K. J., Makkonen, K. E., Mahonen, A. J., Yla-Herttuala, S., 2010. **In vivo application and tracking of baculovirus.** *Current Gene Therapy* **10**.

Andrew ME, Morrissy CJ, Lenghaus C, Oke PG, Sproat KW, Hodgson ALMN, Johnson MA, Coupar BEH. **Protection of pigs against classical swine fever with DNA-delivered gp55 Vaccine** 2010 **18(18)**:1931-1938

Arif BM. **The structure of the viral genome.** *Current Topics Microbiology and Immunology* 1986,**131**: 21-29.

Beck, N. B., Sidhu, J. S., Omiecinski, C. J., 2000. **Baculovirus vectors repress Phenobarbital-mediated gene induction and stimulate cytokine expression in primary cultures of rat hepatocytes.** *Gene Therapy* **7**, 1274-1283.

Benz GA. **Introduction: historical perspective.** In: GRANADOS, R.R., FREDERICI, B.A. (Eds). **The Biology of Baculovirus.** Boca Raton: CRC Press 1986:1-35.

Berliner MD & Reca ME. **Vital staining of *Histoplasma capsulatum* with Janus green B.** *Sabourandia* 1966, **5**:26-29.

Bilimoria SL. **The biology of nuclear polyhedrosis viruses.** In: Kurstak E. **Viruses of invertebrates.** New York: Marcel Dekker 1991:1-72.

Brummer E, Castaneda E, Restrepo A **Paracoccidioidomycosis: an update.** Clin Microbiol Rev 1993, **6(2)**: 89-117.

Carbonell LF, Klowden MJ, Miller LK. **Baculovirus-mediated expression of bacterial genes in dipteran and mammalian cells.** *Journal of Virology*, 1985. **56(1)**:153-160.

Castro MEB, Souza ML, Sihler W, Rodrigues JCM, Ribeiro BM. **Biologia Molecular de Baculovirus e seu uso no Controle Biológico de Pragas no Brasil.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 1999, **34(10)**:1733-1761.

Crook NE. **Baculoviridae: sub-group B: comparative aspects of granulosis viruses.** In: Kurstak E. **Viruses of invertebrates.** New York: Marcel Dekker 1991:73-110.

De Camargo ZP, De Franco MF. **Pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis.** Rev Iberoam Micol 2000; **17**: 41-48

Dufour, J. H., Dziejman, M., Liu, M. T., Leung, J. H., Lane, T. E., Luster, A. D., 2002. **IFN gama inducible protein 10 9IP-10; CXCL100 deficient mice reveal a role for**

IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *Journal of Immunology* 168, 3195-3204.

Engelhard EK, Kam-morgan LNW, Washburn JO, Volkman LE. **The insect tracheal system: A conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M Nuclear polyhedrosis virus.** *Proceedings in the National Academy of Sciences* 1994, 91:3324-3327.

Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. **Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.** *Academic Press*. 2005.

Federici BA. **Baculovirus pathogenesis.** p. 33-59. In: MILLER, L.K. (Eds). **The baculoviruses.** *New York; Plenum Press* 1997: 447.

Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Monath TP, Melnick JL, Roizman B, Sraus SE. **Field-Virology.** *Lippincott Williams & Wilkins* 2001:2950.

Grabherr R, Ernst W. **Baculovirus for Eukaryotic Protein Display** *Current gene Therapy* 2010, **10(3)**: 195-200

Gramkow AW, Perecmanis S, Sousa RLB, Noronha EF, Felix CR, Nagata T, Ribeiro BM. **Insecticidal activity of two proteases against *Spodoptera frugiperda* larvae infected with recombinant baculoviruses.** *Virology Journal* 2010, 7: 143-153

Green LC, Tannenbaum SR, Goldman P. **Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat.** *Science* 1981, 212.4490:56-58.

Gronowski, A. M., Hilbert, D. M., Sheehan, K. C. F., Garotta, G., Schreiber, R. D., **Baculovirus stimulates antiviral effects in mammalian cells.** *Journal of Virology* 1999.9944-9951

Han Y, Niu M, An L, Li L. **Upregulation of proinflammatory cytokines and NO production in BV-activated avian macrophage-like cell line (HD11) requires MAPK and NF- κ B pathways.** *International Immunopharmacology* 2009, 9(7-8): 817-823.

Hervas-Stubbs S, Rueda P, Lopez L, Leclerc C. Insect Baculoviruses Strongly Potentiate Adaptive Immune Responses by Inducing Type I IFN. *J Immunol* 2007, 178:2361-2369.

Hofmann, C., Sandig, V., Jennings, G., Rudolph, M., Schlag, P., Strauss, M., **Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors.** *Cell Biology* 1995 **92**: 10099-10103.

Hofmann, C., Strauss, M., 1998. **Baculovirus- mediated gene transfer in the presence of human serum or blood facilitated by inhibition of the complement system.** *Gene Therapy* **5**, 531-536.

Horton HM, Burand JP. **Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion.** *Journal of Virology* 1993, **67**: 1860-1868.

Kashino SS, Fazioli RA, Cafalli-Favati C, Meloni-Bruneri LH, Vaz CAC, Burger E, Singer LM, Calich VLG. **Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* Infection Is Linked to a Preferential Th1 Immune Response, Whereas Susceptibility Is Associated with Absence of IFN-gamma Production.** *Journal of Interferon & Cytokine Research.* 2000, **20(1)**: 89-97

Kost TA, Condreay JP, Jarvis DI. **Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells.** *Nature Biotechnology* 2005, **23**:1-8.

Kost TA, Condreay JP. **Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors.** *Trends in Biotechnology* 2002.

Lee, B. J., Giannoni, F., Lyon, A., **Role of CXCR3 in the Immune Response to Murine Gammaherpesvirus 68.** *Journal of Virology* 2005. **79**: 9351-9355.

Liu CYY, Wang CH, Wang JC, Chao YC. **Stimulation of baculovirus transcriptome expression in mammalian cells by baculoviral transcriptional activators.** *Journal of General Virology* 2007, **88**: 2176–2184

Martelli P, Ferrari L, Morganti M, De Angelis E, Bonilauri P, Guazzetti S, Caleffi A, Borghetti P. **One dose of a porcine circovirus 2 subunit vaccine induces humoral and cell-mediated immunity and protects against porcine circovirus-associated disease under field conditions.** *Vet Microbiol.* 2010 Dec 14. [Epub ahead of print].
In:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=One%20dose%20of%20a%20porcine%20circovirus%20%20subunit%20vaccine%20induces%20humoral%20and%20cell-mediated%20immunity%20and%20protects%20against%20porcine%20circovirus-associated%20disease%20under%20field%20conditions>

McWilliam A. **Environmental Impact of Baculoviruses.** In:
http://scholar.google.com.br/scholar?cluster=17237326428178052290&hl=pt-BR&as_sdt=0,5

Molinari P, García-Nuñez S, Gravisacoa MJ, Carrillo E, Berinstein A, Tabogaa O. **Baculovirus treatment fully protects mice against a lethal challenge of FMDV** *Antiviral Research* 2010, **87(2)**: 276-279.

Moscardi F. **Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera.** *Annual Review of Entomology* 1999, **44**:257-289.

Mota NGS, Rezkallah-Iwasso MT, Peraçoli MTS, Audi RC, Mendes RP, Marcondes J, Marques SA, Dillon NL, Franco MF. **Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1988, **79 (6)**:765-772.

Murges D, Kremer A, Knebel-Morsdorf D. **Baculovirus transactivator IE1 is functional in mammalian cells.** *Journal of General Virology* 1997, **78**: 1507-1510

O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA: **Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual.** *New York: W.H. Freeman and Company*, 1992.

Pieroni P, Maione D, Monica NL. **In Vivo Gene Transfer in Mouse Skeletal Muscle Mediated by Baculovirus Vectors**, 2001: **12(8)**: 871-881

Proudfoot, A. E. I., Fritchley, S., Borlat, F., Shaw, J. P., Vilbois, F., Zwahlen, T., Trkola, A., Marchant, D., Clapham, P.R., Wells, T.N.C., 2002. **The BBXB Motif of RANTES Is the Principal Site for Heparin Binding and Controls Receptor Selectivity.** *The Journal of Biological Chemistry* 14, 10620-10626.

Rohrmann GF. **Baculovirus Molecular Biology.** Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2008 November. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=bacvir>

Shaw DR & Griffin Jr FM. **Phagocytosis requires repeated triggering of macrophage phagocytic receptors during particle ingestion.** *Nature* 1981, **289**:409-411.

Singer-Vermes LM, Caldeira CB, Burger E, Claich LG. **Experimental murine paracoccioidomycosis: relationship among th dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses.** *Clin Exp Immunol.* 1993, **94(1)**: 75-79.

Smith GE, Summers MD, Fraser MJ. **Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector.** *Molecular and Cellular Biology* 1983, **3(12)**:2156-2165.

Smith GE, Vlak JM, Summers MD. **Physical analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus transcripts for polyhedrin and 10,000 molecular weight protein.** *Journal of Virology* 1983, **45**:215-225.

Suzuki T, Chang MO, Kitajima M, Takaku H. **Baculovirus activates murine dendritic cells and induces non-specific NK cell and T cell immune responses,** *Cellular Immunology* 2010, **262(1)**:35-43.

Tani H, Limn CK, Yap CC, Onishi M, Nozaki M, Nishimune Y, Okahashi N, Kitagawa Y, Watanabe R, Mochizuki R, Moriishi K, Matsuura Y. **In Vitro and In Vivo Gene Delivery by Recombinant Baculoviruses.** *Journal of Virology* 2003, **77(18)**:9799–9808.

Volkman LE. **The 64K envelope protein of budded *Autografa californica* nuclear polyhedrosis virus.** *Current Topics in Microbiological Immunology* 1986, **131**:103-118

Williams GV, Faulkner P. **Cytological changes and viral morphogenesis during Baculovirus infection.** In: MILLER, L.K. (Eds). *The baculoviruses.* *Plenum New York* 1997: 61-107.

Yoshida S, Kawasaki M, Hariguchin, Hirota K, Matsumoto M. **A Baculovirus Dual Expression System-Based Malaria Vaccine Induces Strong Protection against Plasmodium berghei Sporozoite Challenge in Mice.** *Infection and Immunity* 2009, 77(5): 1782-1789

CAPÍTULO II

A proteína do envelope (E) do vírus da febre Amarela expressa em células de inseto é capaz de promover a formação de sincício em células de lepidópteros e pode ser utilizada em imunodeteccções do vírus da Febre amarela em soros de pacientes humanos

1. Introdução

1.1. Transmissão

Muito da distribuição mundial dos casos de Febre Amarela se deve à densidade e distribuição geográfica de mosquitos vetores pertencentes ao gênero *Aedes* e, por ser uma doença transmitida por vetor artrópode, a Febre Amarela (FA) é classificada como uma arbovirose (“arbo” de “arthropod borne”). A doença é transmitida por fêmeas de mosquitos pertencentes a esse gênero, sendo a espécie *Aedes aegypti* a mais prevalente nas Américas (Fonseca, 2002). Outras arboviroses estão relacionadas com a distribuição desde vetor, dentre as mais importantes está a Dengue (Vasconcelos,2003). A primeira suposta erradicação do mosquito ocorreu em 1956 pelo uso do inseticida DDT na campanha da organização pan-americana de saúde (PAHO) nas Américas com o objetivo de assegurar a erradicação da febre amarela urbana, ocorrida em 1942, através da vacinação. Desde então, o mosquito reemergiu em várias ocasiões e sua erradicação ainda hoje é motivo para campanhas junto à população (Marzochi,1994). A Febre

Amarela mantém-se presente em seu ciclo silvestre representando um risco constante de reurbanização devido à globalização aliada ao crescimento urbano não ordenado e ocupação de áreas silvestres (Tuboi *et al.*, 2007).

1.2. Vacinação

A Febre Amarela é uma doença viral infecciosa, não contagiosa e que se manifesta, em sua forma clássica, como uma febre hemorrágica de alta letalidade (Chang *et al.*, 1995). A vacinação contra a Febre Amarela representou grande avanço no combate da doença, é produzida com vírus vivo atenuado, linhagem 17D, cultivado em ovos embrionados de galinha, sendo que duas subcepas são utilizadas em sua produção: 17DD no Brasil e 17D-204 nas demais partes do mundo (Monath, 2005).

O primeiro vírus da febre amarela foi isolado do sangue de um paciente humano africano chamado Asibi. Essa cepa Asibi deu origem a cepa YF17D que foi obtida através da atenuação viral por passagens sucessivas da cepa Asibi em ovos embrionados de galinha. A partir da passagem 114 foi confirmada a atenuação do vírus onde este se torna incapaz de produzir lesões viscerais e encefalite fatal em macacos, mantendo a capacidade de imunização (Post *et al.*, 1999). Os dois subtipos de 17D, 17D-204 e 17DD, são obtidos por diferentes número de passagens em série de 17D. As vacinas que utilizam 17D-204 são obtidas com passagens virais entre 233 e 240 enquanto que as vacinas 17DD são obtidas com passagens virais entre 286 e 288 (Sil *et al.*, 1992).

A equivalência na imunogenicidade das vacinas contra a Febre Amarela das subcepas 17D e 17DD foi demonstrada em um estudo que amplia as bases para utilização da vacina brasileira em outros países e de trazer alternativas de subcepas para o produtor da vacina no Brasil (Gubler, 2004). A vacina é considerada segura apesar de conter o vírus atenuado, pois, apresenta replicação viral limitada no hospedeiro, porém,

com significativa expansão e disseminação viral e sua resposta imunológica é considerada robusta, elicitando uma boa resposta de anticorpos neutralizantes, com taxas de soroconversão que encontram-se acima de 90%. A vacina tem baixo custo e é aplicada como uma única dose (que deve ser reaplicada a cada dez anos), possui metodologia de produção bem estabelecida e procedimentos de controle de qualidade, incluindo o teste de neurovirulência em macacos (Bonaldo *et al.*, 2005).

1.3. Complicações da vacina

Alguns problemas relacionados à vacina já foram registrados e correspondem a complicações clínicas graves, levando ao desenvolvimento da patologia. As complicações apresentam-se de duas principais maneiras: Febre Amarela associada à doença neurotrópica, que leva a infecção e lesão das células do sistema nervoso e Febre Amarela associada à doença viscerotrópica, que consiste em um tropismo do vírus pelo fígado, rins e coração levando a infecção e lesão desses tecidos (Monath, 2005). No Brasil, até o final de 2007, foram registrados 8 casos de eventos adversos graves considerados como doença viscerotrópica aguda, dos quais 7 foram publicados e 1 caso suspeito, não publicado (Ministério da Saúde, 2000; Vasconcelos *et al.*, 2001; Struchiner *et al.*, 2004; Engel *et al.*, 2006). Mutações significativas no vírus vacinal não foram encontradas e uma investigação da Fundação Nacional da Saúde (FUNASA) concluiu que são eventos muito raros, determinados por fatores estritamente individuais (Galler *et al.*, 2001). Quanto aos casos de doença neurotrópica, estes ocorreram principalmente em crianças muito pequenas o que foi utilizado como base para estabelecer uma idade mínima para receber a vacina, que atualmente é de 6 meses de idade (Monath, 2005).

1.4. Vírus da Febre Amarela

O agente etiológico da Febre Amarela é o *Yellow fever virus* pertencente ao gênero *Flavivirus*, e espécie-tipo da família *Flaviviridae* (Lee *et al.*, 2000). Outros vírus de importância médica fazem parte do grupo dos flavivirus, o vírus da Encefalite Japonesa, o vírus do Oeste do Nilo, (também conhecido como *West Nile virus* - WNV) e o vírus que causa a encefalite transmitida por carrapato (*Tick-borne encephalitis virus*) (Corver *et al.*, 2003). Outro vírus que faz parte deste grupo são os quatro sorotipos do vírus da Dengue, que compartilham com a Febre Amarela a característica de ser uma arbovirose. A família *Flaviviridae* possui três gêneros principais: *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus* (gênero ao qual pertence o vírus responsável pela Hepatite C) (Fauquet *et al.*, 2005).

O vírus da Febre Amarela, ao contrário do que acontece com o vírus da Dengue, apresenta um único sorotipo (Monath, 2001). Entretanto, foram identificados sete genótipos distintos: cinco genótipos africanos e dois genótipos sul-americanos. No Brasil, o genótipo I sul-americano é o mais prevalente, apresentando apenas alguns casos isolados do genótipo II sul-americano (Von Lindern *et al.*, 2006).

A apresentação do vírus é a de uma partícula esférica com 50nm de diâmetro que apresenta um capsídeo icosaédrico contendo uma molécula de RNA fita simples não segmentado, polaridade positiva, com genoma de 10.862 nucleotídeos, que codifica o precursor de uma única poliproteína (Galler *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 2003; Chambers *et al.*, 2005). Essa poliproteína é clivada por proteases em várias proteínas virais em um processo que ocorre no lúmen do retículo endoplasmático rugoso (Wu *et al.*, 2005). (Figura 1) Originalmente com 3.411 aminoácidos, ao ser processada, dá origem a três proteínas virais estruturais (Capsídeo - C, Membrana - Pré-M/M, Envelope - E) e a sete

proteínas virais não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Vasconcelos, 2003; Wu *et al.*,2005).

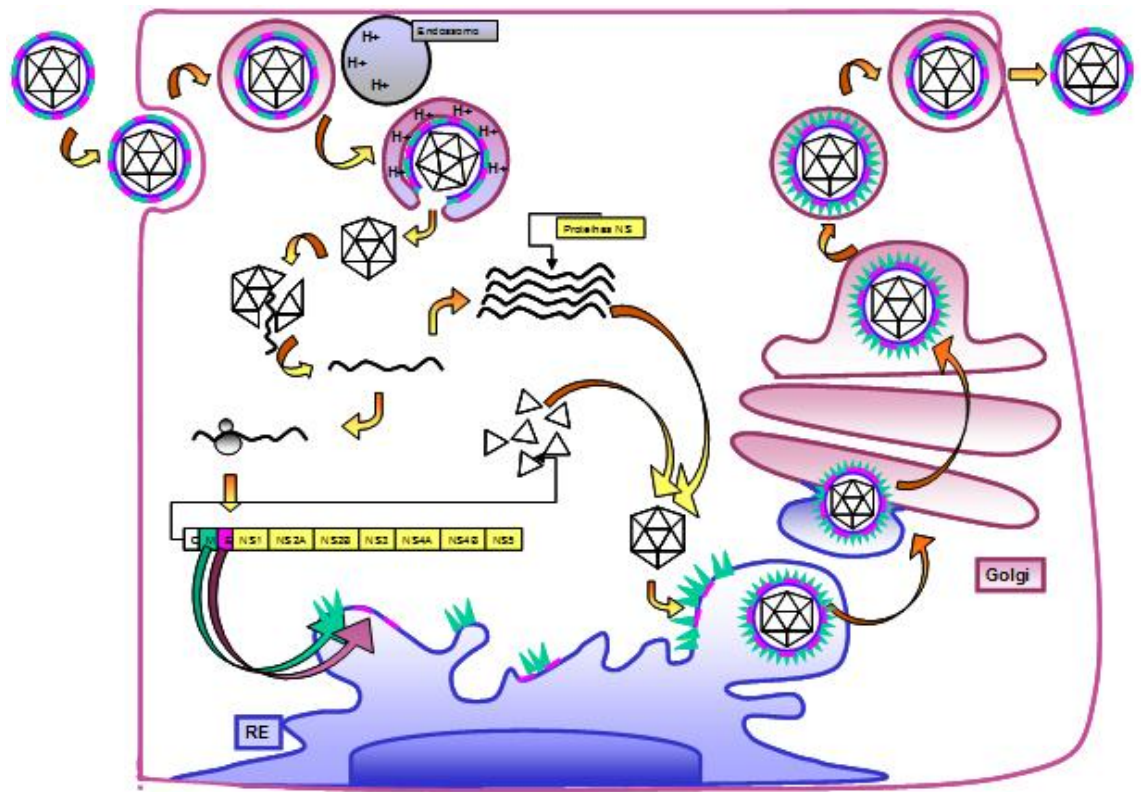


Figura 1: Esquema de replicação do vírus da Febre Amarela. 1) Entrada do vírus por endocitose mediada por receptor. 2) Fusão do endossomo à vesícula contendo o vírus e diminuição do pH, induzindo a fusão da membrana viral à membrana do endossomo. 3) Liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular. 4) Descapsidação e conseqüente liberação do genoma viral. 5) Tradução do genoma de RNA sentido positivo em uma poliproteína. 6) Proteína pré-M (prM) e envelope (E) seguem para o retículo endoplasmático rugoso (RER) sendo expressadas em sua membrana. 7) Proteína do capsídeo é direcionada para formação das subunidades que irão compor o capsídeo. 8) Proteínas não estruturais atuam na replicação do RNA viral. 9) Montagem do nucleocapsídeo. 10) Aquisição da membrana do RER contendo a proteína prM e E. 11) Vesícula contendo a partícula viral imatura segue do RER para o Complexo de Golgi. 12) Modificações pós-traducionais ocorrem no Complexo de Golgi. 13) Vesícula contendo a partícula viral imatura brota do complexo de Golgi em direção à membrana celular. 14) Maturação da partícula viral. 15) Vesícula contendo o vírus se funde à membrana celular, liberando o vírus para o exterior da célula. Arquivo pessoal, autoria Maria Creuza Barros.

Os genótipos diferem na seqüência das regiões pré-M/M, E e região não codante 3' do genoma. O genoma é organizado em uma única fase aberta de leitura

(*Open Reading Frame* - ORF), que contém 10.233 nucleotídeos. Essa ORF é flanqueada por duas regiões não codantes: a região 5', que possui cap e a região 3', que não possui cauda poli-A (Bredenbeek *et al.*, 2003; Mutebi *et al.*, 2004).

1.5. Proteína do envelope (E)

A proteína escolhida para este trabalho, a proteína do Envelope, apresenta um papel muito importante na entrada do vírus na célula hospedeira, que é feita por endocitose mediada por receptor. Na partícula viral madura, a proteína do envelope governa a ligação dos flavivirus a receptores específicos celulares, que são responsáveis pela endocitose e direcionamento do vírus a um compartimento endossomal. Com a diminuição do pH no interior do endossomo ocorrem mudanças conformacionais que permitem a fusão do envelope viral com a membrana endossomal e a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular. A descapsidação permite a liberação do RNA viral que uma vez livre serve de base para replicação e tradução em proteínas (Vlaycheva *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2003). As proteínas não estruturais se associam para formar o complexo de replicação viral, no qual diversas funções enzimáticas têm sido identificadas, entre elas a função de protease, RNA polimerase RNA dependente, metiltransferase e helicase (Jones *et al.*, 2003). Uma vez formada, a partícula viral brota do retículo endoplasmático e o vírus é levado à superfície celular através da via de exocitose (Pugachey *et al.*, 2004).

1.6. Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico em meio a uma epidemia é basicamente clínico, mas, na ocorrência de casos esporádicos em moradores ou viajantes, o diagnóstico se torna mais difícil devido à manifestação clínica da Febre Amarela ser facilmente confundida com

outras doenças como hepatite viral fulminante (por exemplo, a causada pelo vírus da hepatite E severa), leptospirose, malária grave, febre tifóide, febre do dengue hemorrágico, febre do Vale de Rift, febre hemorrágica da Criméia e Congo e vírus Ebola. Nesses casos é necessário fazer um diagnóstico diferencial (Vasconcelos, 2002).

Diferentes exames laboratoriais podem ser utilizados na confirmação da infecção pelo vírus da Febre Amarela, dentre eles, os que isolam o vírus, os que identificam anticorpos neutralizantes e os que detectam o RNA viral (Vasconcelos, 2003). O método de escolha para isolamento viral é a cultura em células de mosquito C6/36, em especial pela alta sensibilidade e pelo baixo custo quando comparadas com células de mamífero. A replicação viral é evidenciada por volta do quinto ou sétimo dia após inoculação da amostra suspeita, onde pode ser observado efeito citopático na cultura celular, com destaque para a formação de sincício (células gigantes multinucleadas originadas a partir da fusão de membrana de células infectadas), efeito citopático típico de infecções por flavivirus. O diagnóstico laboratorial de rotina do vírus da Dengue segue os mesmos princípios dos testes para detecção do vírus da Febre Amarela. O isolamento viral também pode ser feito através da inoculação da amostra do paciente em cérebro de camundongos recém-nascidos, inoculação intratorácica de mosquitos e, inoculação de cultura de células animais (Vero, BHK-21, SW13, AP61) (Vera, 2004). Após isolamento, a amostra viral é identificada através de testes de imunofluorescência indireta, usando anticorpos monoclonais ou, como alternativa, testes de fixação de complemento (Vasconcelos 2002).

Apesar de ser um teste que uma vez positivo é bastante confiável e definitivo não se pode falar o mesmo do resultado negativo, que pode ser falso. A presença do vírus na circulação corresponde ao período virêmico que é seguido da fase dos anticorpos neutralizantes, produzidos por volta do quinto dia da doença, que promovem

a eliminação do agente viral da circulação. Nesta fase, os exames confirmatórios consistem da detecção de anticorpos circulantes que sejam específicos para o vírus em questão. Os métodos sorológicos detectam os anticorpos através de testes laboratoriais que incluem ELISA (“Enzyme linked immunosorbent assay”), imunofluorescência, inibição da hemaglutinação e neutralização (Monath, 2005).

O MAC-ELISA anti-IgM é o método sorológico de escolha na rotina laboratorial de diagnóstico de Febre amarela. É bastante utilizado por coincidir com o aparecimento dos primeiros sintomas e a procura do paciente por ajuda médica além de ser um teste que permite um diagnóstico rápido na amostra obtida a partir do 5º dia da doença. Por se tratar de um método colorimétrico, é necessário assegurar que os títulos de anticorpos para febre amarela sejam bastante superiores aos títulos de anticorpos para outros flavivirus, uma vez que existem reações cruzadas no reconhecimento de anticorpos entre vírus pertencentes a esse gênero (Professor Antônio Chaib, LACEN-DF, comunicação pessoal). Os anticorpos IgM detectados são os mesmos para uma infecção recente e para a soroconversão específica induzida por vacinação, portanto é importante que haja uma diferenciação no resultado entre um paciente vacinado e um que está realmente infectado pelo vírus. Isso é obtido por informações dos antecedentes vacinais e observação do quadro clínico do indivíduo (Vasconcelos,2003).

A detecção do RNA viral é uma técnica que apresenta custo elevado e por isso seu uso na rotina laboratorial não está estabelecido nem padronizado. Além disso, são poucos os laboratórios que possuem estrutura e profissionais capacitados para desenvolvê-la. Esta técnica é realizada através da transcrição do RNA em um DNA complementar (cDNA), pela ação de uma enzima transcriptase reversa, e a amplificação deste material por PCR (“Polimerase Chain Reaction”), técnica essa denominada RT-PCR (“Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction” (Drosten *et al.*,2003).

Quanto ao tratamento, este é de suporte, proporcionando ao paciente boas condições para que seu próprio organismo debele a infecção viral. Não há tratamento específico para a Febre Amarela. Deve-se ministrar medicamentos para minimizar os sintomas da doença, evitando uso de ácido acetil-salicílico e derivados, pois estes podem agravar os fenômenos hemorrágicos (Monath, 2001)

O isolamento de partes virais é importante na formulação de antígenos que substituam o uso do vírus em vacinas e métodos diagnósticos, tornando-os mais seguros para os profissionais de saúde e menos dispendiosos em sua utilização. Dentre as proteínas virais a proteína do envelope é uma das mais estudadas devido ao seu alto potencial antigênico. Neste trabalho a proteína do envelope será expressa em células de inseto através do sistema baculovírus de expressão.

2. Objetivo

Neste capítulo, a proteína do envelope do vírus da Febre Amarela expressa em células de inseto pelo sistema baculovírus de expressão será testada com relação à sua antigenicidade e possível atuação em substituição do vírus selvagem em um teste diagnóstico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A construção do vírus recombinante vSynYFE (3.1- 3.4) foi realizada em um trabalho anterior (Machado, 2007).

3.1. Obtenção do gene do Envelope

RNA total de células de cérebro de camundongo infectadas com o vírus da Febre Amarela de um paciente infectado (cedidas pelo Instituto Evandro Chagas e obtidas gentilmente por Antônio Chaib do Instituto de Saúde do Distrito Federal) foi extraído conforme descrito em Machado, 2007. Uma vez obtido o RNA, procedeu-se à realização de um RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para a região do gene do envelope e o resultado da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% segundo protocolo descrito em Sambrook *et al*, (1989). A banda com o tamanho correspondente ao gene do envelope (1.590 pb) foi extraída do gel, eluída e purificada utilizando-se o Kit Sephaglas (SephaglasTM Bandprep Kit, Amersham), de acordo com as indicações do fabricante.

3.2. Clonagem do gene *env* no plasmídeo pGEM-T Easy (Promega) e sequenciamento

O fragmento purificado de *env* foi clonado no plasmídeo pGEM-T Easy (Kit pGEM[®]-T Easy Vector Systems, Promega) de acordo com as instruções do fabricante, conforme descrito em Machado, 2007. O gene *env* no plasmídeo recombinante, denominado pGEMYFE, foi confirmado pela digestão utilizando a enzima de restrição *Eco* RI (Promega) presente no plasmídeo flanqueando o inserto, com a liberação de

uma banda de aproximadamente 1.590 pb referente ao gene do envelope que foi extraída do gel, eluída e purificada utilizando-se o Kit Sephaglas (SephaglasTM Bandprep Kit Amersham), de acordo com as indicações do fabricante, e por sequenciamento, conforme descrito em Machado,2007.

3.3. Construção do vetor pSynYFE

Para a construção do vetor pSynYFE, o inserto purificado extraído do plasmídeo pGEMYFE foi ligado ao plasmídeo pSynXIV VI⁺X3 sob o comando do promotor pXIV, que é uma seqüência modificada do promotor da poliedrina. Este plasmídeo havia sido previamente digerido com *Eco* RI (Promega, seguiu-se protocolo do fabricante) e desfosforilado por reação utilizando a enzima CIAP - Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. Para confirmar a presença do gene do envelope do vírus da febre amarela no plasmídeo, foi realizada uma digestão com a enzima de restrição *Eco* RI (Promega), pois este sítio está presente no plasmídeo flanqueando o inserto. A restrição foi avaliada em eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Para confirmar a direção foram feitas duas reações de PCR. Em uma das reações foram utilizados os oligonucleotídeos polR (CAACGCACAGAATCTAG e YFE2460R (CAGATCTCCTTAATCCGCCCAACTCC) e na outra reação foram utilizados os oligonucleotídeos YFE878F (GTGACAGATCTGACCATTGCC) e o orf603 (ACAGCCATTGTAATGAGACG). O protocolo da reação e o programa utilizado estão descritos em Machado, 2007. O resultado das PCRs foram avaliados em gel de agarose 0,8%.

3.4. Construção do baculovírus recombinante vSynYFE

O vírus vSynVI-gal foi linearizado com a enzima de restrição *Bsu* 36I (New England BioLabs) segundo indicações do fabricante. Essa digestão é necessária, pois, o vírus vSynVI-gal linearizado não é infectivo para as células de inseto, o que ocorre somente quando o mesmo se encontra na forma circular (Kitts *et al.*, 1990). Células de BTI-Tn5B1-4 (Granados *et al.*, 1994) derivadas da linhagem *Trichoplusia ni* ($0,5 \times 10^6$ células) foram transferidas para uma placa de 35 mm de diâmetro por pelo menos 1 h, para a formação de monocamadas de células. Foi realizada a co-transfecção com o DNA do plasmídeo pSynYFE e o DNA do vírus vSynVI-gal linearizado da seguinte forma: em uma placa de 35 mm foi adicionado 0,5 mL de meio TC-100 (Gibco BRL) sem soro e 10 µg de lipossomo (Cellfectin da Invitrogen); em outra placa foi misturado o DNA do pSynYFE (1 µg), o DNA do vírus vSynVI-gal (0,5 µg) e 0,5 mL do meio TC-100 sem soro. Após 10 min, a mistura do plasmídeo com o vírus foi adicionada ao meio TC-100 sem soro contendo lipossomo. O material foi incubado 10 min à temperatura ambiente. Durante esse período, o sobrenadante das células BTI-Tn5B1-4 foi removido e após os 10 min a mistura DNA/lipossomo foi adicionada às células e incubada à temperatura ambiente por 3 h. Ao final desse período foram adicionados 2 mL de meio TC-100 contendo 10% de soro fetal bovino e as células foram incubadas a 27°C por 7 dias.

Conforme descrito por Machado, 2007, a co-transfecção permite que, no interior das células de inseto, ocorra recombinação homóloga entre regiões flaqueadoras do gene de interesse, no vetor de transferência, e as regiões homólogas no genoma do vírus vSynVI-gal, que flaqueiam o gene da β-galactosidase e o genoma circular. Desta forma, após a recombinação homóloga, somente o vírus recombinante estará na forma circular e infectiva, facilitando a purificação do recombinante. O vírus

vSynVI-gal não possui o gene da poliedrina (*polh*), o que não permite a formação de poliedros durante a infecção. Quando ocorre a recombinação homóloga entre o DNA plasmidial e o DNA viral o vírus passa a apresentar o gene *polh*, permitindo então que o vírus recombinante produza poliedros. Para isolar o vírus recombinante vSynYFE, foi feita purificação viral pelo método de diluição em placa de 96 poços (protocolo descrito em O'Reilly *et al.*, 1992), utilizando o sobrenadante das células transfectadas (após sete dias da co-transfecção). Após esse período, pode ser visualizada, através de microscopia óptica, a formação de poliedros e sincícios, características essenciais que confirmam a presença desse vírus recombinante.

3.5. Análise da expressão da proteína E através de SDS-PAGE e Imuno-marcação

Células TN5B (1×10^6 por poço) foram adicionadas à uma placa com 6 poços (TPP) e foram infectadas com 10 unidades formadoras de placa (pfu) /célula do baculovírus recombinante vSynYFE. Como controle, foram utilizadas células Tn5B não infectadas, infectadas com o tipo selvagem AcMNPV, infectadas com o vírus vSynVI-gal, com o tipo selvagem AgMNPV e com o vírus recombinante vSynScathL, construído em um outro trabalho (Gramkow, 2010). As células foram coletadas com 96 h.p.i. e centrifugadas a 750g por 7 minutos. O sobrenadante foi armazenado como estoque e o sedimento de células foi ressuspenso em 100 μ L de tampão PBS. O pellet foi lavado com PBS e alíquotas das amostras foram analisadas por SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

Em seguida, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% , conforme Laemmli (1970). O gel foi corado e

fixado em solução de 40 % de metanol e 10 % de ácido acético e Coomassie blue 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.

3.6. Análise por microscopia confocal e microscopia de fluorescência

Células Tn5B (1×10^6 células) foram adicionadas à placas de 6 poços de 60mm que continham lamínulas posicionadas no fundo de cada poço. Desta forma, a monocamada das células foi formada em cima das lamínulas e isso permitiu que depois elas pudessem ser retiradas da placa, imunomarcadas e analisadas, em cima de uma lâmina, por microscopia confocal. As células foram infectadas com vSynYFE (10 pfu / célula) ou não infectadas (controle negativo - mock). Após 72 hpi as lamínulas contendo as monocamadas de células foram utilizadas para a imunomarcção. As células foram fixadas com acetona gelada por uma hora (-20°C) e então incubadas por 30 min com uma solução de PBS / BSA 10% em temperatura ambiente. As lamínulas contendo células foram então incubadas por 1h com: a) anticorpo monoclonal que reage com a proteína do envelope do vírus da febre amarela de forma específica e sem reação cruzada com outros flavivirus - anti-E ou b) um anticorpo policlonal anti-flavivirus já conjugado com isotiocianato de fluoresceína, utilizado atualmente no laboratório de diagnóstico público de referência LACEN-DF (anti-FLAV fluorescein isothiocyanate-conjugated antibody). As lamínulas incubadas com a) foram lavadas 3 vezes com PBS (pH 7,4) e coradas com DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole). As células foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com o anticorpo anti-camundongo conjugado com o fluoróforo Alexa488 (Invitrogen). Por fim, as células foram cobertas com uma gota de A31632 B Component Image iT TM Fx Signal Enhancer (Invitrogen) e 1 gota de N-

Propilgalato (0,2 g em 4 ml de PBS com glicerol-1 ml) e observadas com um microscópio confocal (The Broadband Confocal Leica TCS SP5, Leica DMI Series EL6000) com configurações apropriadas de excitação e emissão para o corante utilizado. As lamínulas incubadas com b não foram coradas com DAPI, apenas lavadas e cobertas como descrito acima e observadas com o auxílio do microscópio de fluorescência (Axiophot, Zeiss).

3.7 Análise estrutural e ultraestrutural de células de inseto infectadas com vSynYFE

Células Tn5B (1×10^6) foram adicionadas à placas de sessenta milímetros (TPP) e infectadas com vSynYFE (10 pfu / célula). Células não infectadas e células infectadas com vSynYFE foram observadas com 72h.p.i e fotografadas em um microscópio Axiophot (Zeiss) e processados para microscopia eletrônica. As amostras foram fixadas por 30 minutos em tampão fixador (2,0% de glutaraldeído, 2,0% de paraformaldeído, 0,1 mol/L de tampão cacodilato e 5,0% de sacarose) e depois infiltradas e emblocadas, segundo protocolo descrito por Bozzola & Russel (1992). Depois de emblocadas, as amostras foram seccionadas (80 nm) em ultramicrotomo automático Leica ultracut UCT e montados em tela de níquel de 200 mesh. As amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011 a 80 kV.e as imagens obtidas pelo programa GATAN Bio Scan câmera, modelo 792.

3.8. Imunoensaio de Mac-ELISA

As propriedades antigênicas do baculovírus recombinante vSynYFE foram testadas em um ensaio modificado MAC-ELISA (Vázquez *et al.*, 2003). Células Tn5B na concentração de 1×10^6 células por poço foram adicionadas a uma placa de 6 poços e células infectadas por vSynYFE ou pelo baculovírus selvagem AcMNPV por 96 hpi e células não infectadas foram coletadas e centrifugadas a $750 \times g$ por 7 min. O pellet foi lavado em tampão PBS e este procedimento foi repetido três vezes. As células foram ressuspendidas em uma solução de PBS e soro humano e reservadas para um momento posterior. Duzentos μL de soro de dois pacientes positivamente diagnosticados para febre amarela foram diluídos 1:40 em PBS contendo 0,5% BSA (albumina bovina). Um volume de 50 μL dessa amostra foi adicionado aos poços e a placa foi incubada por 1 hora em câmara úmida a 37°C . A placa foi lavada cinco vezes com PBS. Um volume de 50 μL de antígeno foi adicionado à placa. Três diferentes antígenos foram utilizados neste ensaio conforme foi descritos acima e consistem nos 3 extratos de células de inseto :não-infectados (mock), infectados com AcMNPV e infectados com vSynYFE. A placa foi incubada overnight em câmara úmida a 4°C e depois lavada por 5 vezes com PBS. O anticorpo anti-FLAV conjugado à peroxidase (anticorpo monoclonal 6B6C-1 Mab, HRP Conjugated) , usado atualmente para o diagnóstico de infecção por flavivirus no LACEN, Brasília, Brasil foi adicionado aos poços diluído 1 / 3000 em PBS mais 20% soro humano. A placa foi incubada por 1 h em câmara úmida a 37°C e depois lavada por 5 vezes com PBS. O substrato da enzima peroxidase (100ml de H_2O_2 e 2,2 azino-bis-3-ethylbenzithiazoline-6-sulphonic acid) foi adicionado e após 30 minutos a 37°C a leitura foi realizada.

O mesmo experimento foi repetido com um “pool” de soros de três pacientes diagnosticados positivamente para a dengue (sorotipos 1, 2 e 3) e o controle positivo foi

baseado na reação entre o mesmo “pool” de soros com um “pool” de vírus da dengue,
DENV (D1D2D3).

4. RESULTADOS

Os resultados referentes à construção do vírus recombinante vSynYFE (4.1) foram obtidos em um trabalho anterior (Machado, 2007)

4.1. Construção do baculovírus recombinante vSynYFE

Com o objetivo de construir o baculovírus recombinante vSynYFE, a seqüência de DNA que codifica o gene do envelope da Febre Amarela foi isolada por RT-PCR de uma amostra de tecido cerebral liofilizado de camundongos neonatos inoculados intracerebralmente com YFV como uma banda 1590pb (Figura 2) e clonada no vetor pGEM-T ® Easy-vector (Promega), formando o vetor pGEMYFE (Figura 3). Depois da transformação e amplificação em *E. coli* (DH5- α , Invitrogen), o DNA plasmidial foi digerido com *EcoRI* (Figura 4). e a banda de 1590 pb foi isolada e clonada no vetor de transferência pSynXIV VI + X3 gerando o plasmídeo recombinante pSynYFE. A inserção correta do gene *env* no plasmídeo recombinante foi confirmada através de digestão com *EcoRI* e a confirmação da direção do inserto através de amplificação por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos conforme descrito por Machado, 2007 (Figura 5). O vetor pSynYFE, que contém o gene do envelope foi co-transfectado com o DNA do vírus vSynVI-gal em células BTI-Tn5B1-4, permitindo que ocorresse, no interior das células, a recombinação homóloga entre regiões do plasmídeo vetor e o genoma do vírus. Após a recombinação o gene *env* foi colocado sob o comando do promotor pXIV (promotor da poliedrina modificado, Wang *et al.*, 1991) o que permite que o vírus recombinante vSynYFE seja expresso paralelamente com a expressão da poliedrina.

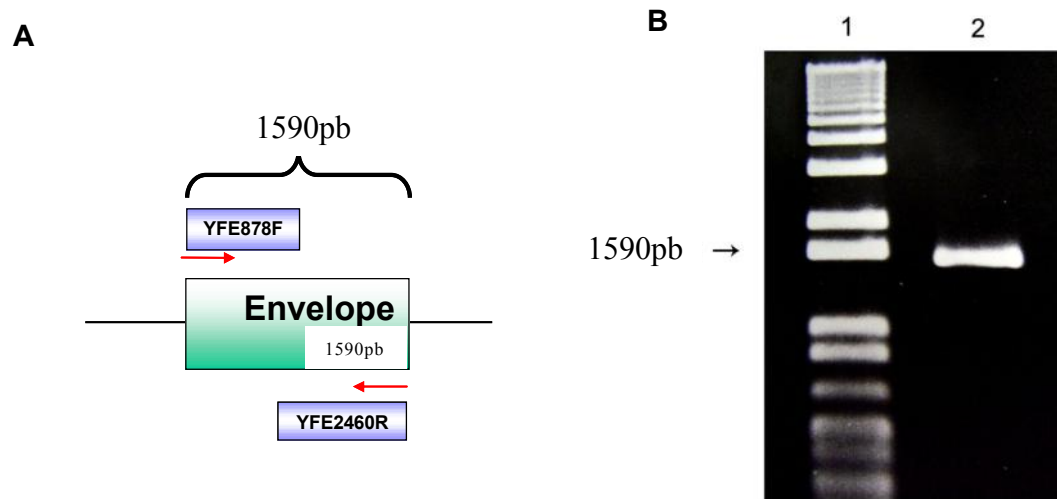


Figura 2: Amplificação do gene do envelope do vírus da febre amarela por RT-PCR. A) Esquema mostrando posição dos oligonucleotídeos YFE2460R e YFE878F no gene env. B) Eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando produto de amplificação do RT-PCR (poço 2) utilizando os oligonucleotídeos YFE2460R e YFE878F e Marcador DNA ladder 1Kb plus (poço 1). A seta indica fragmento de 1.590 pb referente ao tamanho do gene env.

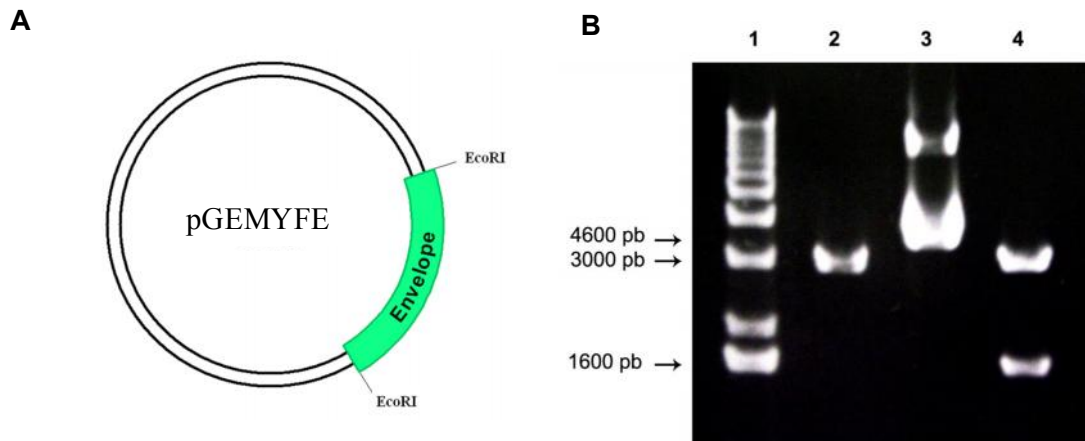


Figura 3: Clonagem gene *env* no vetor pGEM-T Easy. A) Esquema mostrando mapa do plasmídeos pGEMMYFE. B) Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Poço 1: Marcador DNA ladder 1Kb plus. Poço 2: plasmídeo pGEM-T Easy sem o inserto, apresentando tamanho de 3.015 pb referente ao tamanho do plasmídeo. Poço 3: plasmídeo pGEMMYFE não digerido, e. Poço 4: plasmídeo pGEMMYFE digerido com *Eco* RI, apresentando duas bandas, uma de 3.015 pb referente ao plasmídeo pGEM-T Easy e outra de 1.590 pb referente ao gene *env*.

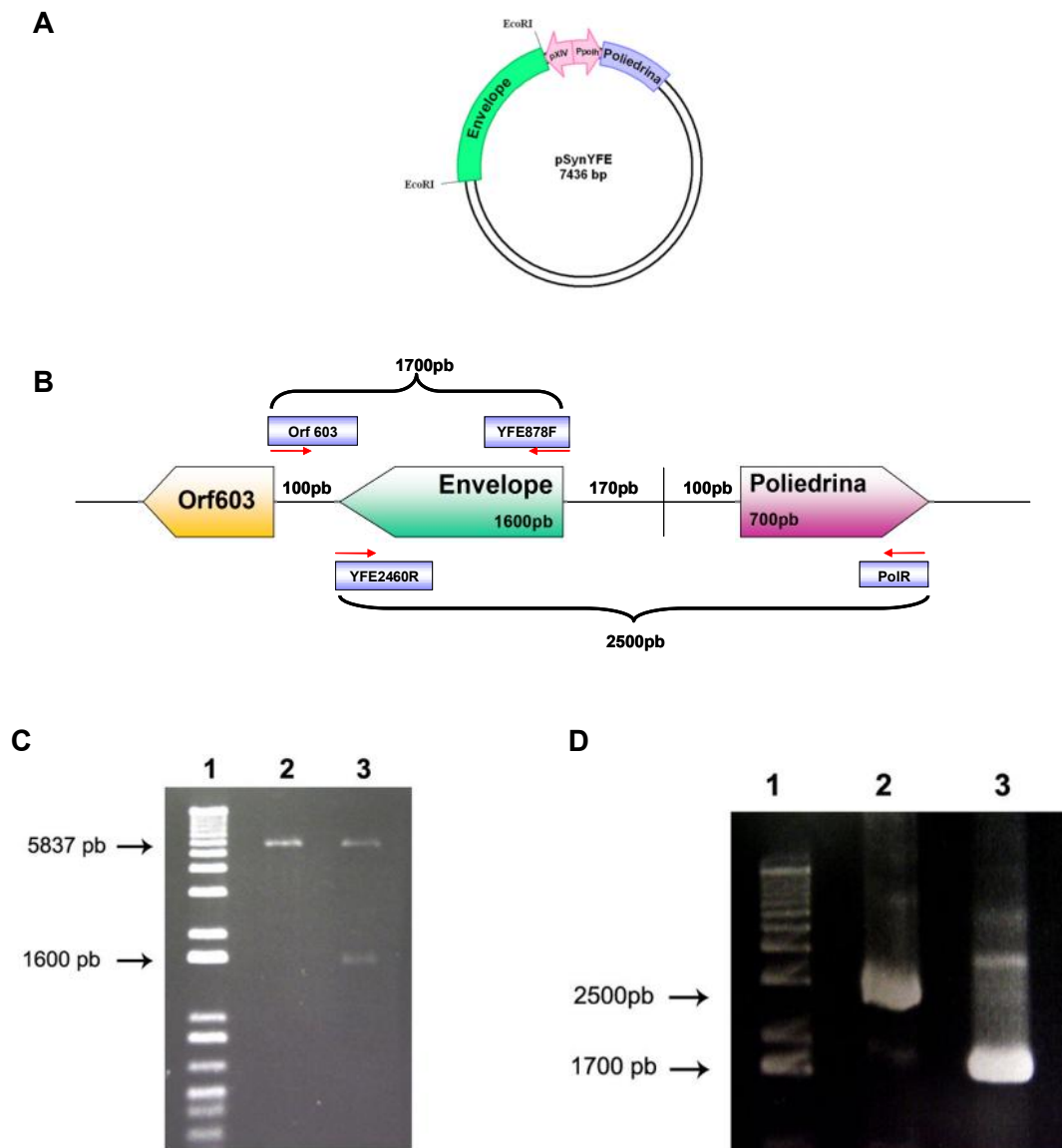


Figura 4: Clonagem do gene *env* no vetor de transferência pSynXIV VI⁺X3. A) Esquema mostrando mapa do plasmídeo pSynYFE, o gene *env*, o gene da poliedrina e os promotores pXIV e Ppolh. B) Esquema mostrando a posição de anelamento dos oligonucleotídeos orf 603, YFE878F, YFE2460R e polR no plasmídeo pSynYFE. C) Eletroforese em gel de agarose 0,8%, mostrando no poço 1: Marcador DNA ladder 1Kb plus. Poço 2: plasmídeo pSynXIV VI⁺X3 linearizado, sem o inserto, apresentando tamanho de 5.837 pb referente ao tamanho do plasmídeo. Poço 3: plasmídeo pSynYFE digerido com *Eco*RI, apresentando duas bandas, uma de 5.837 pb referente ao plasmídeo e outra de 1.590 pb referente ao gene *env*. D) Eletroforese em gel de agarose 0,8% para confirmar direção do gene *env* no vetor de transferência. Poço 1: Marcador DNA ladder 1Kb plus. Poço 2: PCR utilizando oligonucleotídeos polR e YFER, evidenciando uma banda esperada de 2.500 pb. Poço 3: PCR utilizando oligonucleotídeos orf 603 e YFEF, evidenciando uma banda esperada de 1.700 pb.

Posteriormente, o vírus foi isolado através da observação por microscopia óptica de corpos de oclusão, nas células infectadas com o sobrenadante da co-tranfecção e das diluições em placa de 96 poços (O'Reilly *et al.*, 1992). Para confirmar a presença do gene env no vírus recombinante vSynYFE, uma reação de PCR foi realizada com DNA viral, utilizando os oligonucleotídeos YFE2460R e YFE878F onde houve a amplificação da banda esperada de 1590 pb (Figura 5).

4.2. Detecção da expressão da proteína recombinante

Extratos de células de inseto infectadas com vSynYFE foram usados em um gel SDS-PAGE para detectar proteínas do envelope e, quando comparados com células infectadas com outros baculovírus eles apresentaram uma proteína de cerca de 54 kDa (Figura 6). Esta banda não estava presente nas células não infectadas de Tn5B nem em células infectadas com AcMNPV, AgMNPV e um AcMNPV recombinante contendo o gene da ScathL de *Sarcophaga peregrina* (vSynScathL) (Gramkow *et al.*, 2010). A proteína recombinante de 54 kDa produzida tem o tamanho esperado para a proteína recombinante.

4.3. Imunodetecção da proteína recombinante

Com o objetivo de confirmar a imunogenicidade da proteína recombinante E expressa em células de inseto foi realizada microscopia de fluorescência e microscopia de fluorescência confocal. Anticorpos policlonais e monoclonais contra a proteína E foram capazes de detectar a presença da proteína recombinante E no citoplasma de células Tn5B infectadas com vSynYFE indicando que a proteína recombinante é antigenicamente semelhante à proteína E selvagem (Figura 7A e B).

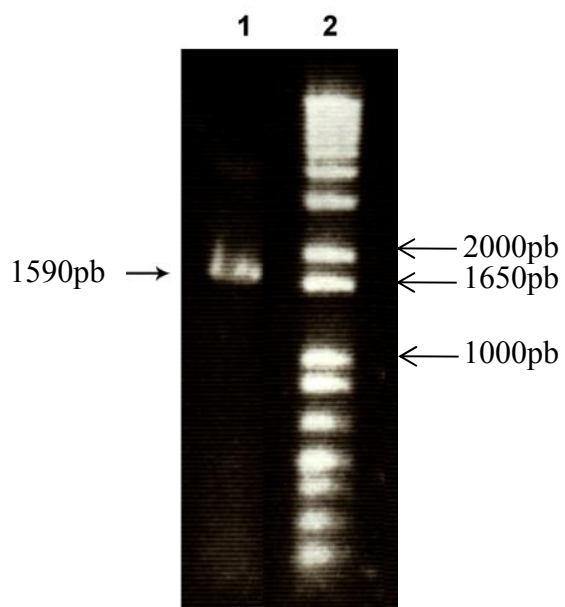
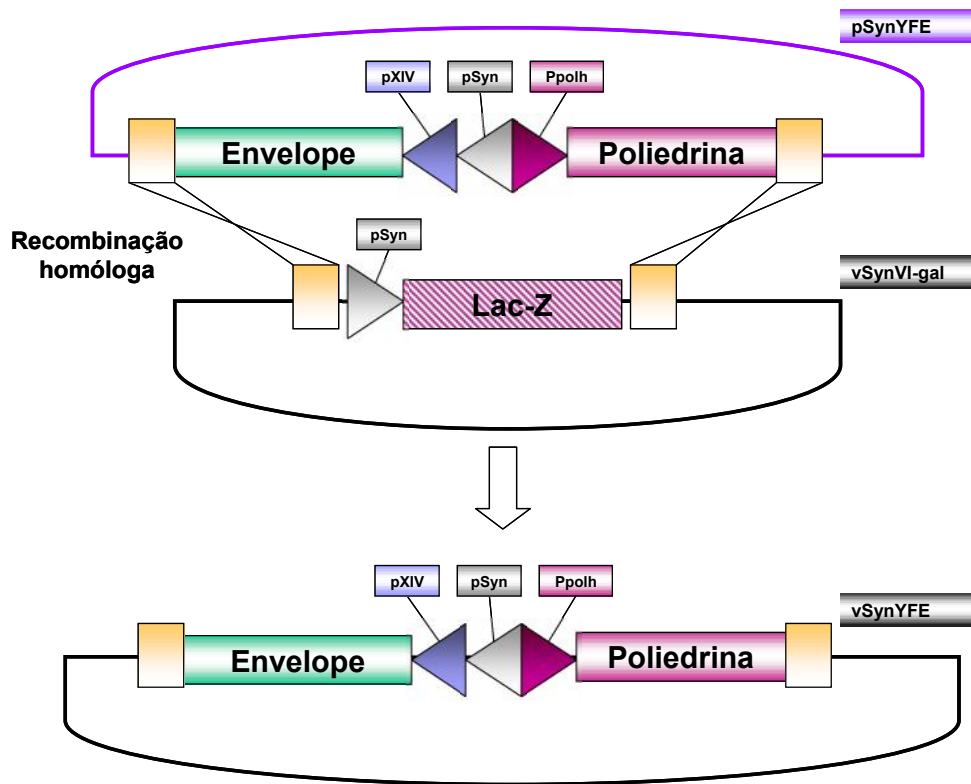


Figura 5: Confirmação da presença do gene *env* no vírus recombinante vSynYFE Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Poço 1: PCR com o DNA do BV de vSynYFE utilizando os oligonucleotídeos YFE2460R e YFE878F. A seta indica a banda de 1.590 pb referente ao gene *env*. Poço 2: Marcador DNA ladder 1Kb plus. .

A



B

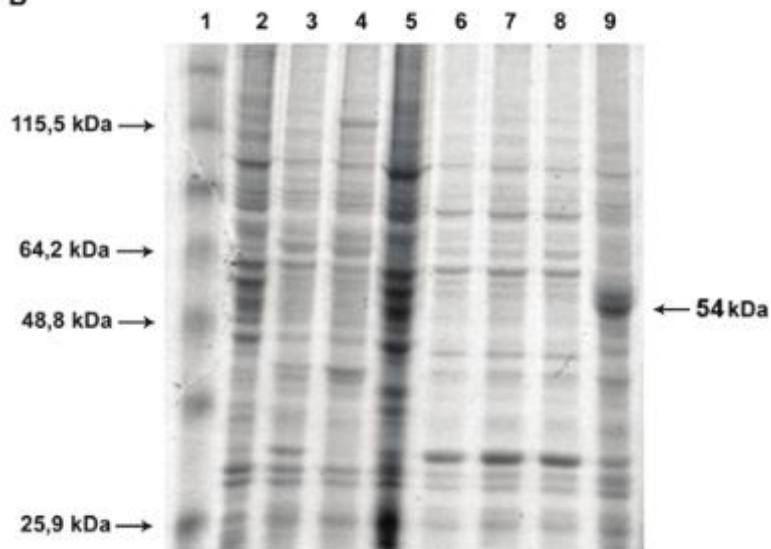


Figura 6 Construção de vírus recombinante e produção da proteína E.

(A) Representação esquemática da construção do vírus recombinante vSynYFE, O esquema mostra o locus do gene da poliedrina no plasmídeo pSynYFE e a mesma região (contendo o gene lac-Z) no vírus vSynVI-gal. O plasmídeo pSynYFE, que contém o gene do envelope da febre amarela, foi co-transfectado juntamente com o DNA do vírus vSynVI-gal, para a construção do vírus recombinante vSynYFE. Os genes da poliedrina, envelope e lac-Z estão indicados na figura, assim como os promotores pXIV, Ppolh e pSyn que controlam a expressão desses genes.

(B) Análise da expressão da proteína recombinante E do vírus da febre amarela em células de inseto. Gel desnaturante de poliacrilamida a 12% mostrando no poço 1: Marcador BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder da Invitrogen. Poço 2: Extrato de células BTI-Tn5B1-4 não infectadas (mock). Poço 3: Extrato de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com o vírus AcMNPV. Poço 4: Extrato de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com o vírus vSynVI-gal. Poço 5: Extrato de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com o vírus AgMNPV. Poços 6, 7 e 8: Extrato de células BTI-Tn5B1-4 6, 7 e 8 células Tn5B infectado com um AcMNPV recombinante contendo o gene da ScathL de *Sarcophaga peregrina* (vSynScathL). Poço 9: Extrato de células BTI-Tn5B1-4 infectadas com o vírus vSynYFE. A seta indica a presença de uma banda de aproximadamente 54 kDa, em células infectadas com vSynYFE.

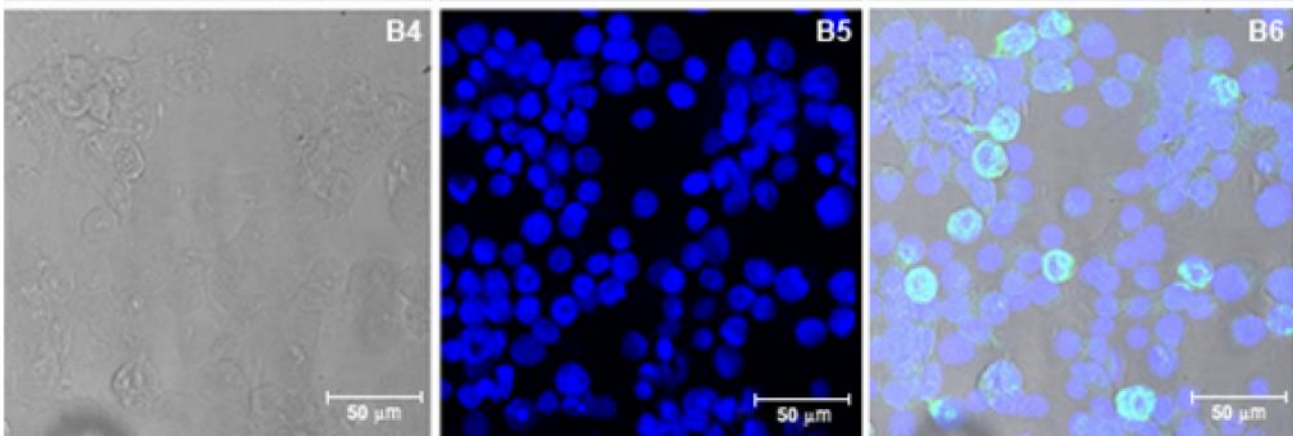
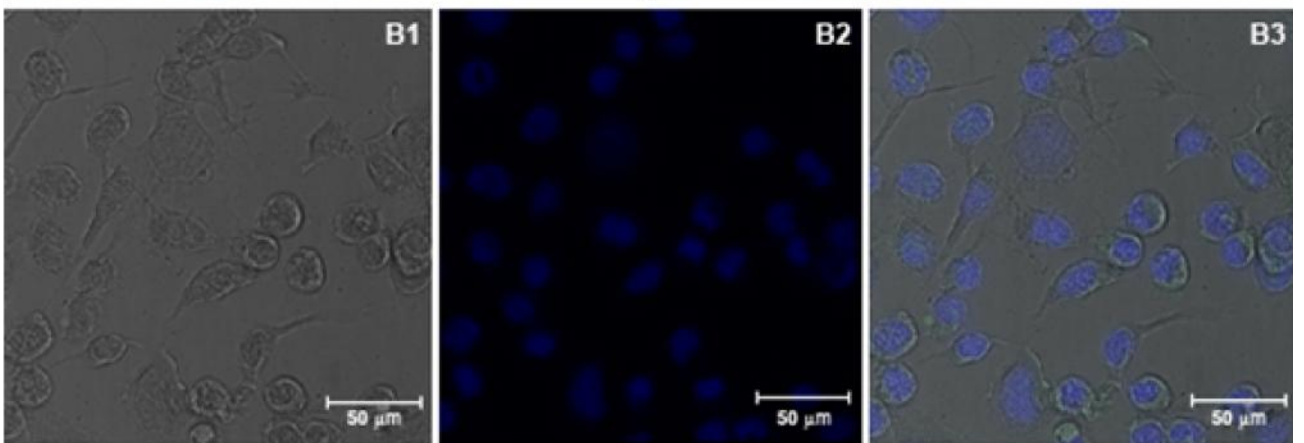
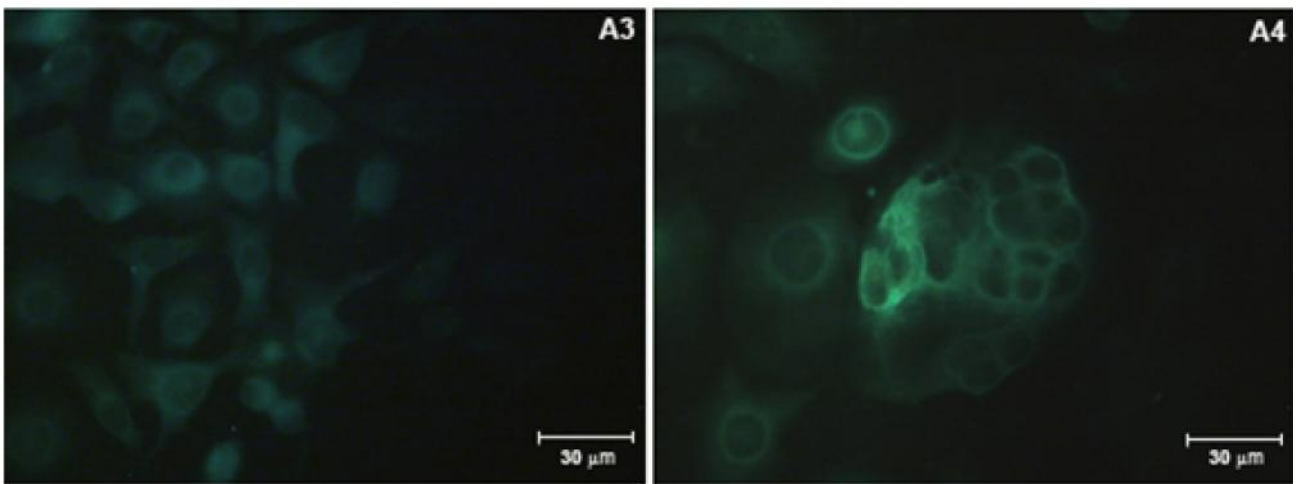
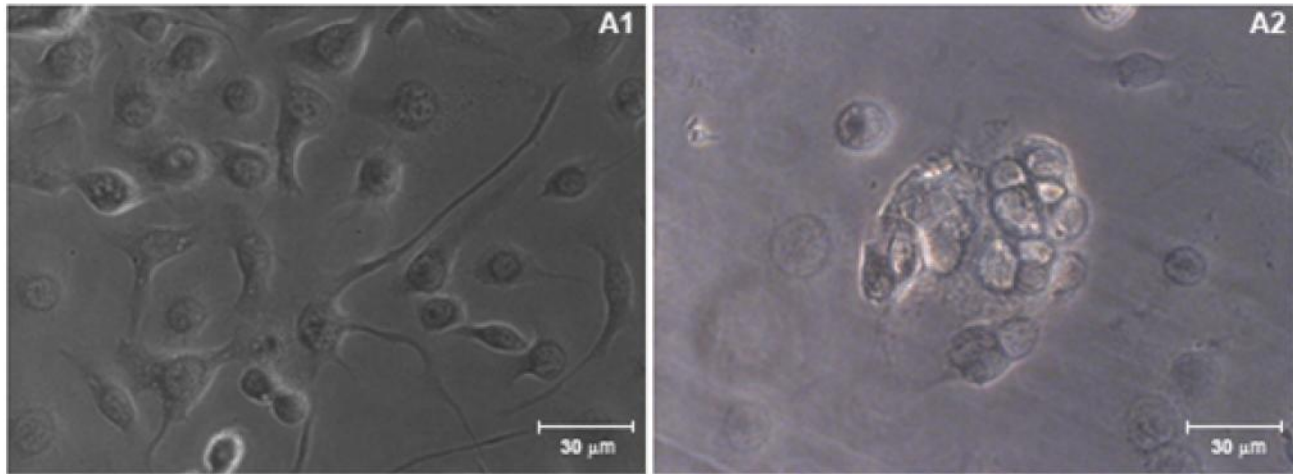


Figura 7 – Detecção da proteína E em células de inseto infectadas pelo vírus vSynYFE

Células Tn5B foram infectadas com o vírus vSynYFE (10pfu/cell) e 72 hpi, as células foram fixadas com acetona gelada e incubadas com um anticorpo policlonal anti-FLAV (conjugado com isotiocianato de fluoresceína) ou um anticorpo monoclonal específico anti-E. Anticorpos monoclonais anti-E foram detectados por anticorpo anti-mouse conjugado ao fluoróforo Alexa488 por microscopia confocal (verde). Núcleos celulares foram visualizados por coloração DAPI (azul). (A) Imunomarcação com o anticorpo Anti-FLAV policlonal visualizado em um microscópio de fluorescência. A1, Células Tn5B não infectadas (campo claro). A2, Células Tn5B infectadas com vSynYFE mostrando células sinciciais multinucleadas (campo claro). A3, Células Tn5B não infectadas (fluorescência). A4, Células Tn5B infectadas com vSynYFE mostrando células sinciciais multinucleadas (fluorescência). Em A1, A2, A3 e A4: barra indicada na imagem: 30 μ m (B) Imunomarcação com anticorpo monoclonal específico anti-E visualizada em um microscópio confocal. B1, Células Tn5B não infectadas (campo claro). B2, Células Tn5B não infectadas (coloração DAPI). B3, Células Tn5B não infectadas (sobreposição). B4, Células Tn5B infectadas com vSynYFE (campo claro). B5, Células Tn5B infectadas com vSynYFE (DAPI). B6, Células Tn5B infectadas com vSynYFE (sobreposição). Em B1, B2, B3, B4, B5 e B6: barra indicada na imagem: 50 μ m. A coloração em azul de DAPI indica a posição do núcleo.

4.4. Análise estrutural e ultra-estrutural de células de inseto infectadas com vSynYFE

Células de inseto infectadas com vSynYFE apresentaram células multinucleadas sinciciais o que é um efeito citopático típico da infecção por Flavivirus, o que não foi observado em células Tn5B não infectadas por microscopia de luz e microscopia eletrônica (Figura 8).

4.5. Imunoensaio de MAC-ELISA

Neste ensaio, foram utilizados dois diferentes soros de pacientes infectados por Febre amarela para a reação com extratos de células de inseto não-infectados, infectados por AcMNPV ou por vSynYFE servindo como antígenos. Os valores da OD demonstrados nos gráficos da Figura 8 são médias das três repetições de medidas de experimentais e barras de erro determinadas utilizando Software Graph Pad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Extratos de células não infectadas e extratos de células infectadas por AcMNPV apresentaram valores baixos de OD (0,113 e 0,121, respectivamente) quando comparados com extratos de células infectadas pelo vírus vSynYFE (0,214) (Figura 9A). Extratos de células infectadas com AcMNPV também apresentaram baixos valores OD utilizando um segundo soro de paciente infectado por febre amarela (0,081) quando comparados com extratos de células infectadas pelo vírus vSynYFE (0,294) (Figura 9B). Também foi realizado um segundo ensaio com um pool de soros de pacientes infectados com o vírus da dengue e os mesmo extratos celulares acima descritos como antígenos. (Figura 9C). Não foi detectada reatividade cruzada com o extrato de células de inseto infectadas pelo vírus vSynYFE indicando que este

material pode ser usado em substituição do vírus da febre amarela integral como antígeno neste ensaio.

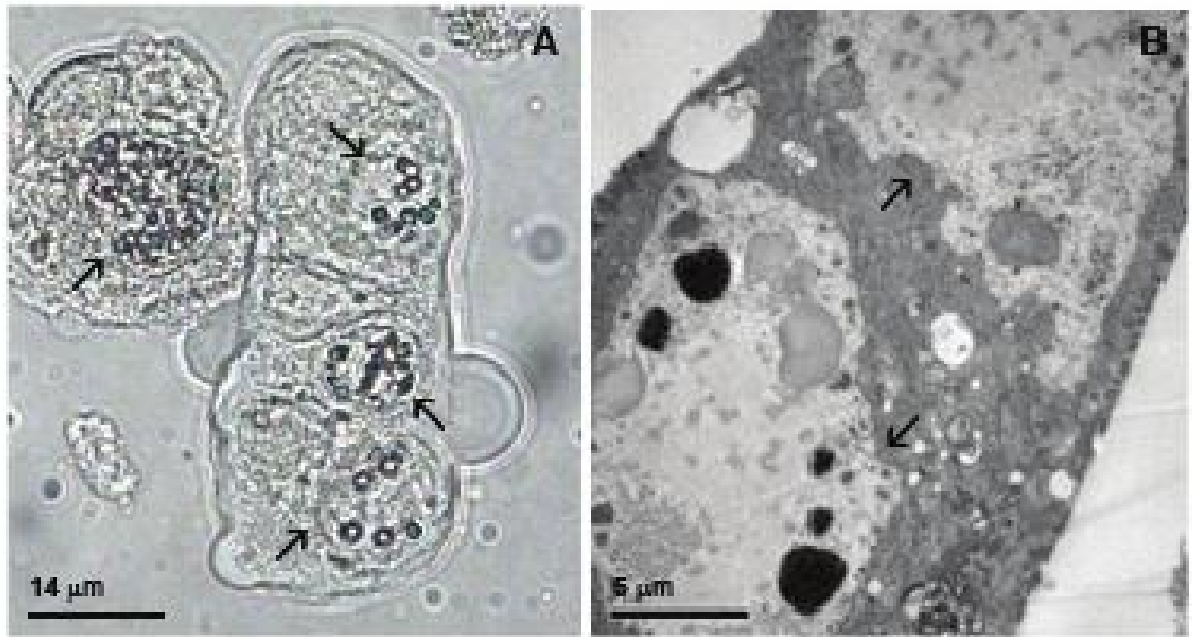


Figura 8 – Análise estrutural e ultraestrutural de células de inseto infectadas com vSynYFE mostrando formações sinciciais multinucleadas.

C1: Microscopia de luz. Barra indicada na figura: 14mm; C2: Eletromicrografia de transmissão. Barra indicada na figura 5mm. Setas indicam o núcleo das células

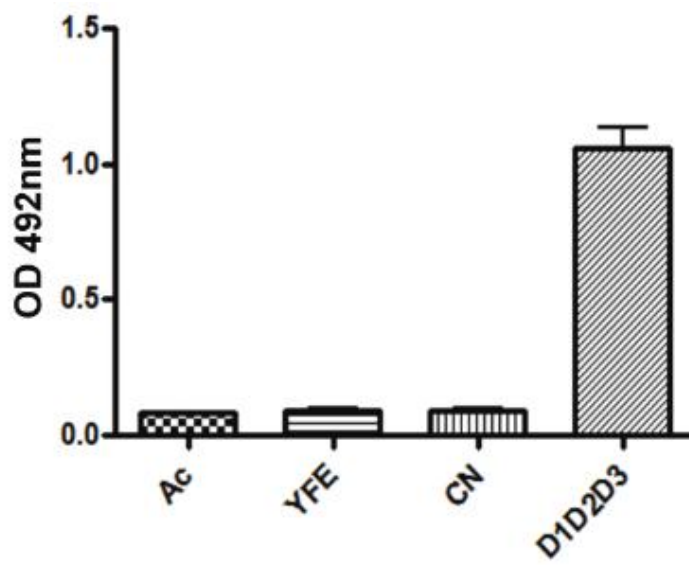
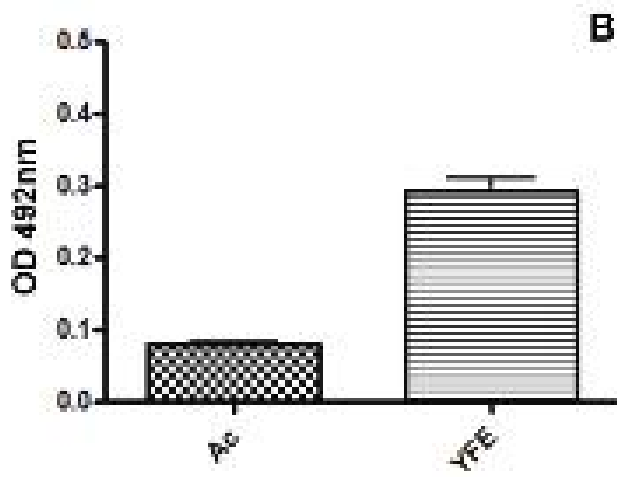
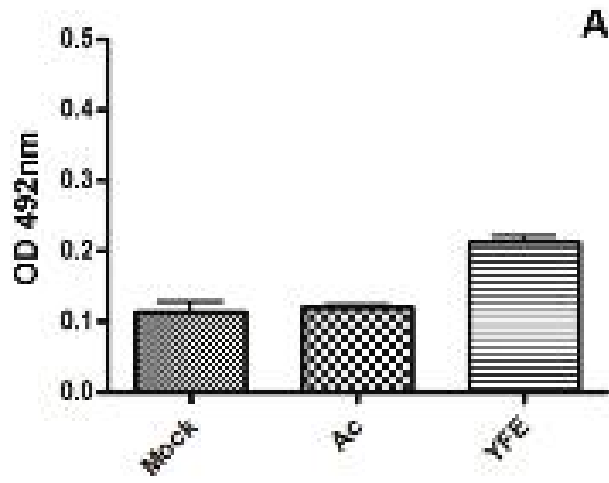


Figura 9 – Imunoensaio de MAC-ELISA

Neste ensaio modificado de ELISA de captura de IgM (MAC-ELISA) os antígenos testados foram células Tn5B não infectadas (mock), infectadas com AcMNPV e infectadas com vSynYFE. (A) e (B): Dois diferentes soros de pacientes infectados com o vírus da febre amarela foram utilizados para testar a detecção dos antígenos (sabe-se que esses soros são capazes de reagir positivamente ao vírus selvagem de FA). O experimento foi repetido por 3 vezes. (C) Um pool de soros de pacientes infectados com o vírus da dengue – contendo anticorpos contra os 3 sorotipos de dengue 1, 2 e 3 - foi utilizado para testar a detecção dos antígenos (sabe-se que esse pool de soros é capaz de reagir positivamente ao vírus selvagem da Dengue sorotipos 1,2 e 3, representado no gráfico como o controle positivo - D1D2D3). CN é o controle negativo, com um soro de paciente saudável. Nenhuma reatividade foi detectada com células Tn5B infectadas por vSynYFE usadas como antígeno. O experimento foi repetido por 3 vezes.

5. Discussão

Com o objetivo de verificar a atividade antigênica de uma proteína recombinante E do vírus da Febre Amarela, esta proteína foi expressa em células de inseto com o auxílio de um baculovírus recombinante (vSynYFE) construído em um trabalho anterior (Machado, 2007). Células de mamíferos são muito eficientes para expressar a proteína E do vírus da febre amarela (Desprès *et al.*, 1988; Nogueira *et al.*, 2011) e de outros flavivirus, como o do vírus da Dengue (Jaiswal & Swaminathan, 2003). No entanto, seu uso é muito mais caro e trabalhoso quando comparado ao uso de células de inseto as quais também apresentam a vantagem de não serem infectadas por vírus patogênicos para humanos (Morton & Potter, 2000). Células Tn5B infectadas com vSynYFE expressaram a a proteína recombinante E com o tamanho previsto de 54 kDa. As células infectadas pelo vírus recombinante também demonstraram a formação de células multinucleadas sinciciais o que constitui um efeito citopático típico encontrado em células de mosquitos infectados com Flavivirus (Vasconcelos 2002). A presença do efeito citopático é inclusive utilizada como uma das técnicas de diagnóstico disponíveis para a Febre amarela.

As células infectadas por vSynYFE foram também positivamente imunomarcadas por anticorpos monoclonais e policlonais específicos para a proteína E do vírus da Febre amarela original e específicos para flavivirus, respectivamente. Este último anticorpo é atualmente utilizado em um centro de diagnóstico (LACEN), na cidade de Brasília, Brasil. Além disso, em um ensaio de MAC-ELISA, dois diferentes soros de pacientes infectados por febre amarela reagiram positivamente com extratos de células de inseto infectadas pelo vSynYFE usados como antígenos. Esta experiência seria mais representativa se mais soros de pacientes fossem testados. Infelizmente, a

disponibilidade desse soro positivo é pequena, o soro positivo contra a febre amarela é raro e grande parte dele é distribuída entre os centros de referência de diagnóstico e não estavam disponíveis para testes acadêmicos. Por outro lado, extratos de células de inseto infectadas pelo vírus recombinante não reagiram de forma cruzada com um pool de soros de pacientes infectados pelo vírus da dengue (Fig. 8), o que indica que a proteína recombinante do envelope pode responder de forma antígenicamente muito semelhante ao que acontece com o vírus intacto o que é muito relevante quando se considera que isso pode ser utilizado em testes de diagnóstico mais específicos e que apresentem menos erros ou dúvidas com relação aos resultados.

A reatividade cruzada com Flavivirus diferentes é bastante comum durante os testes sorológicos (Monath, 2005). O uso de proteínas recombinantes do vírus ou partes dele ainda menores podem diminuir esse tipo de problema. Esta estratégia também poderia reduzir os custos uma vez que atualmente o próprio vírus da febre amarela é utilizado como antígeno para o diagnóstico o que requer uma estrutura de biossegurança, com uso de animais e cuidado dos mesmos.

O diagnóstico mais rápido significaria o controle também mais rápido da doença. Casos subnotificados levam ao atraso na decisão por medidas de emergência e o risco de reurbanização da doença uma vez que o vetor urbano se adaptou para viver entre os humanos em ambientes domésticos. A utilização de proteínas recombinantes do envelope poderá ser estendida para o desenvolvimento de uma vacina mais segura, que não inclua o vírus da Febre Amarela. Especialmente porque eventos adversos graves estão sendo associados à vacina contra a febre amarela utilizando o vírus atenuado, como reações de hipersensibilidade, doença neurotrópica e doença viscerotrópica associadas (Barnett, 2007).

Despres *et al.* (1991) utilizou o sistema baculovírus de expressão para expressar e caracterizar a proteínas E e NS1 da febre amarela (NS1: proteína não estrutural do vírus da febre amarela identificada como o antígeno responsável pela fixação de complemento) e mostraram que células de inseto infectadas com o baculovírus recombinante eram capazes de sintetizar as proteínas E e NS1 de forma similar ao tamanho e antigenicidade daquelas expressas em células Vero infectadas com o vírus da Febre Amarela. Este trabalho se assemelha aos métodos utilizados no trabalho descrito nesta tese, mas difere com relação ao tipo de célula hospedeira utilizada (Despres *et al* utilizou células de inseto *S. frugiperda*), vetor utilizado para a construção do vírus recombinantes e tamanho do gene da proteína E usado. Em seu trabalho, não foi relatada formação sincicial em células de *S. frugiperda* infectadas pelo vírus recombinante. Isto pode ser explicado pela expressão de uma versão truncada da proteína E sem a região hidrofóbica C-terminal (aminoácidos 740-778) responsável pela localização transmembrana da proteína dentro das membranas intracelulares, o que pode ser importante para a oligomerização e correto dobramento de E em uma proteína ativa biologicamente (Ruiz *et al.*,1989).

O mesmo grupo de pesquisa injetou extratos de células de inseto infectadas por vírus recombinante em camundongos e conduziu um desafio letal com o vírus da Febre Amarela (Després *et al.*,1991). O resultado foi uma proteção sólida contra a encefalite letal causada pela infecção viral o que reforça a antigenicidade de proteínas recombinantes quando comparadas ao vírus intacto. Shiu *et al.* (1991), também expressou a proteína E recombinante em células de insetos utilizando o sistema baculovírus de expressão. O genoma do vírus recombinante continha um cDNA codificando os aminoácidos 109-820 da poliproteína do vírus da Febre Amarela. Esta região tem um trecho N-terminal truncado de pré-M, Proteínas M e E completas e os

primeiros 42 aminoácidos da proteína NS1. Esta proteína recombinante expressa em células de inseto mostrou-se antígenicamente indistinguível da proteína E do vírus da febre amarela vacinal.

A cepa da vacina contra a febre amarela utilizada atualmente é considerada muito segura, na verdade, é considerada uma das vacinas mais seguras já desenvolvidas (Struchiner *et al.*,2004). Sua produção tem sido administrado ao homem desde o final dos anos 1930 (Nogueira *et al.*,2011) e uma dose única de vacina 17D contra a febre amarela confere imunidade a longo prazo, com alguns dados que confirmam casos de proteção superior ao esperado de 10 anos (Bodilis *et al.*,2010). No entanto, como ainda faz uso de vírus atenuado, alguns eventos adversos podem resultar da sua utilização (Eventos adversos pós vacinação com a vacina contra Febre Amarela – Portal da Saúde) causando eventos adversos viscerotrópicos e neurotrópicos e anafilaxia (Monath *et al.*,2011). A doença viscerotrópica associada a vacina contra febre amarela (YEL-AVD) assemelha-se aos sintomas da febre amarela selvagem, com uma taxa de mortalidade semelhante, enquanto a doença neurológica associada a vacina da febre amarela (YEL-AND) pode ser manifestada através de encefalite, meningite, neuropatia, síndrome de Guillain-Barré, encefalomielite aguda disseminada ou mielite espinhal (Hayes, 2010). Sua ocorrência varia de 0,4 a 7,9 casos por 100.000 doses de vacinas e algumas alternativas estão sendo estudadas, a fim de minimizar os riscos da administração da vacina, especialmente para aqueles com um sistema imunológico comprometido, como idosos, imunodeprimidos ou pacientes timectomizados, crianças com menos de 9 meses de idade e mulheres grávidas ou amamentando.

Uma alternativa seria a administração de vírus inativado que já está sendo testado em ensaios clínicos (Monath *et al.*,2011). Outra seria usar partículas que simulam partículas virais como imunógenos. Viral-like-particles (VLP) produzidas em

células de insetos têm sido utilizadas em ensaios de vacinas de subunidade para a infecção por influenza e estudos preliminares demonstraram que estas VLPs são capazes de induzir imunidade contra algumas cepas do vírus influenza (Quan *et al.*,2007). Gut-Winiarska *et al.* (2000) desenvolveu um método de ELISA direto como teste de diagnóstico utilizando uma glicoproteína B recombinante (GB), expressa em baculovírus para detectar o vírus da pseudoraiwa (PRV). Ele mostrou alta sensibilidade e especificidade quando comparado com outros dois testes comerciais que utilizavam o vírus inteiro. Recentemente, uma vacina que utiliza VLPs produzidas por baculovírus recombinante em células de inseto conferindo proteção contra papilomavírus humano (HPV), agente causador da neoplasia cervical, foi aprovada para uso no Brasil e o Ministério da Saúde está considerando a possibilidade de adotá-la em seu programa de vacinação anual (European medicines agency).

Em conclusão, nossos dados mostram que a proteína recombinante E derivadas de YFV expressa em células de inseto é reconhecida por anticorpos monoclonais e policlonais utilizados para detectar a infecção por YFV em soros humanos e, portanto, pode ser útil para diferentes aplicações médicas desde melhorar o diagnóstico da doença como para o desenvolvimento de uma vacina de subunidade, o que pode ser útil no futuro para promover a imunização dos indivíduos contraindicados a receber a atual vacina de vírus atenuado.

6.Perspectiva

6.1 Expressar a proteína E fusionada à proteína poliedrina de baculovírus e verificar se a antigenicidade é mantida e a purificação facilitada. Assim este antígeno, agora produzido em maior quantidade, poderia ser testado em testes diagnósticos.

7.Referências

Barnett ED. **Yellow fever: epidemiology and prevention.** *Clin Infect Dis* 2007 **44(6)**:850-856.

Bodilis HC, Benabdelmoumen G, Gergely A, Goujon C, Pelicot M, Poujol P, Consigny PH: **Persistence à long terme des anticorps neutralisants de la fièvre jaune chez les personnes âgées de 60 ans et plus: Long term persistence of yellow fever neutralising antibodies in elderly persons.** *Bull Soc Pathol Exot* 2010, **1**: 1-6.

Bonaldo MC, Garrat RC, Marchevsky RS, Coutinho ESF, JABOR AV, Almeida LFC, Yanamura AMY, Duarte AS, Oliveira PJ, Lizeu JOP, Camacho LAB, Freire GR. **Attenuation of recombinant Yellow Fever 17D viruses expressing foreign protein epitopes at the surface.** *Journal of Virology* 2005, **79(13)**: 8602-8613.

Bozzola, JJ., Russel, LD. **Electron microscopy: principles and techniques for biologists.** *Jones & Batlet* 1992. Boston. 542 p.

Bredenbeek PJ, Kooi EA, Lindenbach B, Huijkman N, Rice CM, Spaan WJM. **A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication.** *Journal of General Virology* 2003, **84**:1261-1268.

Chambers TJ, Droll DA, Tang Y, Liang Y, Ganesh VK, Murthy KHM, Nickells, M. **Yellow fever virus NS2B-NS3 protease: characterization of charged-to-alanine mutant and revertant viruses and analysis of polyprotein-cleavage activities.** *Journal of General Virology* 2005, **86**:1403:1413.

Chang GJJ, Cropp BC, Kinney RM, Trent DW, Gubler, DJ. **Nucleotide sequence variation of the envelope protein gene identifies two distinct genotypes of yellow fever virus.** *Journal of Virology* 1995, **69(9)**: 5773-5780.

Corver J, Lenches E, Smith K, Robinson RA, Sando T, Strauss EG, Strauss JH. **Fine mapping of a cis-acting sequence element in Yellow Fever virus RNA that is required for RNA replication and cyclization.** *Journal of Virology* 2003, **77(3)**: 2265-2270.

Desprès P, Cahour A, Wychowski C, Girard M, Bouloy M: **Expression of the yellow fever virus envelope protein using hybrid SV40/yellow fever viruses.** *Ann Inst Pasteur Virol* 1988, **139(1)**:59-67.

Desprès P, Dietrich J, Girard M, Bouloy M: **Recombinant baculoviruses expressing yellow fever virus E and NS1 proteins elicit protective immunity in mice.** *J Gen Virol* 1991, **72**:2811-2816.

Drosten C, Kümmerer BM, Schmitz H, Günther S. **Molecular diagnostics of viral hemorrhagic fevers.** *Antiviral Research* 2003, **57**:61-87.

Engel AR, Vasconcelos PFC, McArthur MA, Barret ADT. **Characterization of a viscerotropic yellow fever vaccine variant from a patient in Brazil.** *Vaccine* 2006, **24**:2803-2809.

European Medicines Agency: **Cervarix suspension for injection - Human Papillomavirus vaccine [Types 16, 18] (Recombinant, adjuvanted, adsorbed).** *European public assessment Reports* [http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000721/WC500024632.pdf]

Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. **Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.** *Academic Press*. 2005.

Fonseca BM, Fonseca SNS. **Dengue virus infections.** *Current Opinion in Pediatrics* 2002, **14**: 67–71.

Galler R, Pugachev KV, Santos CLS. **Phenotypic and molecular analyses of Yellow fever 17DD vaccine viruses associated with serious adverse events in Brazil.** *Virology* 2001, **290**: 309-19.

Galler R, Freire MS, Jabor AV, Mann GF. **The yellow fever 17D vaccine virus: molecular basis of viral attenuation and its use as an expression vector.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1997, **30**: 157-168.

Gramkow AW, Perecmanis S, Sousa RLB, Noronha EF, Felix CR, Nagata T, Ribeiro BM. Insecticidal activity of two proteases against *Spodoptera frugiperda* larvae infected with recombinant baculoviruses. *Virology Journal* 2010, **7**: 143-153

Granados RR, Guoxun L, Derskse ACG, Mckenna KAA: **A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single nuclear polyhedrosis virus.** *J Invertebr Pathol* 1994, **64**:260-266.

Gubler DJ. **The changing epidemiology of yellow fever and dengue.** *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 2004, **27**:319-330.

Gut-Winiarska M, Jacobs L, Kerstens H, Bienkowska-Szewczyk K: **A highly specific and sensitive sandwich blocking ELISA based on baculovirus expressed pseudorabies virus glycoprotein B.** *J Virol Methods* 2000, **88**:63-71.

Hayes EB: **Is it time for a new yellow fever vaccine?** *Vaccine* 2010, **28**:8073-8076

Jaiswal S, Khanna N, Swaminathan S: **Replication-defective adenoviral vaccine vector for the induction of immune responses to Dengue virus type 2.** *J Virol* 2003, **77(23)**: 12907–12913.

Jones CT, Ma L, Burgner JW, Groesch TD, Post CB, Kuhn RJ. **Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein.** *Journal of Virology* 2003, **77(12)**: 7143-7149.

Kitts PA, Ayres MD, Possee RD. **Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors.** *Nucleic Acids Research* 1990, **18**: 5667-5672.

Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**:680-685.

Lee E, Stocks CE, Amberg SM, Rice CM, Lobigs M. **Mutagenesis of the signal sequence of Yellow Fever virus prM protein: enhancement of signalase cleavage in vitro is lethal for virus production.** *Journal of Virology* 2000, **74(1)**: 24-32

Machado TGC. **Expressão da proteína do envelope do vírus da Febre Amarela em células de inseto.** Dissertação de Mestrado em Patologia Molecular – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

Marzochi KBF. **Dengue in Brazil- situation, transmission and control- A proposal for ecological control.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1994, **89(2)**:235-245.

Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Eventos Adversos sérios Associados com a vacina 17D Contra Febre Amarela.** Brasília: *Fundação Nacional de Saúde*, 2000.

Monath TP. **Yellow fever: an update.** *Lancet Infectious Diseases* 2001, **1**:11-20.

Monath TP: **Yellow fever.** *Medicine* 2005, **33(7)**:21-23.

Monath TP, Fowler E, Johnson CT, Baiser J, Morin MJ, Sisti M, Trent DW: **An Inactivated Cell-Culture vaccine against Yellow Fever.** *N Engl J Med* 2011, **364(14)**: 1326-1333.

Morton CL, Potter PM: **Comparison of Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris, Spodoptera frugiperda, and COS7 Cells for Recombinant Gene Expression: Application to a Rabbit Liver Carboxylesterase.** *Mol Biotech* 2000, **16(3)**: 193-202.

Mutebi JP, Rijnbrand RCA, Wang H, Ryman W, Fulop ELD, Titball R, Barrett ADT. **Genetic relationships and evolution of genotypes of Yellow Fever virus and other members of the Yellow Fever virus group within the *Flavivirus* genus based on the 3' noncoding region.** *Journal of Virology* 2004, **78(18)**: 9652-9665.

Nogueira RT, Nogueira AR, Pereira MCS, Rodrigues MM, Galler R, Bonaldo MC: **Biological and immunological characterization of recombinant Yellow Fever 17D Viruses expressing a Trypanosoma cruzi Amastigote Surface Protein-2 CD8+ T cell epitope at two regions of the genome.** *Virology* 2011, **8**:127-140.

O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA: *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual.* New York: W.H. Freeman and Company; 1992

Post PR, Santos CND, Carvalho R, Lopes OS, Galler R. **Molecular Analysis of yellow fever virus 17DD vaccine strain.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1999, **86 (2)**: 239-246.

Pugachev KV, Guirakhoo F, Ocran SW, Mitchell F, Parsons M, Penal C, Girakhoo S, Pougatcheva SO, Arroyo J, Trent DW, Monath TP. **High fidelity of Yellow Fever virus RNA polymerase.** *Journal of Virology* 2004, **78(2)**: 1032-1038.

Quan FS, Huang C, Compans RW, Kang SM: **Virus-like particle vaccine induces protective immunity against homologous and heterologous strains of influenza virus.** *J Virol* 2007, **81(7)**:3514-3524.

Ruiz-Linares A, Cahour A, Després P, Girard M, Bouloy M. **Processing of yellow fever virus polyprotein: role of cellular proteases in maturation of the structural proteins.** *J Virol* 1989, **63(10)**:4199-4209.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning: a laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Shiu SYW, Morikawa S, Buckley A, Higgs S, Karunakarannair V, Blachere C, Gould EA: **17D yellow fever vaccine virus envelope protein expressed by recombinant baculovirus is antigenically indistinguishable from authentic viral protein.** *J Gen Virol* 1991, **72**:1451-1454.

Sil BK, Dunster LM, Ledger TN, Wills MR, Minor PD, Barret ADT. **Identification of Envelope Protein Epitopes that are important in the attenuation process of wild-type yellow fever virus.** *Journal of Virology* 1992, **66(7)**: 4265-4271.

Struchiner CJ, Luz PM, Dourado I. **Risk of fatal adverse events associated with 17DD yellow fever vaccine.** *Epidemiology and Infection* 2004,**132(5)**: 939-946.

Tuboi SH, Costa ZGA, Vasconcelos PFC, Hatch, D. **Clinical and epidemiological characteristics of yellow fever in Brazil: analysis of reported cases 1998-2002.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2007, **101**:169-175.

Vasconcelos PFC. **Febre amarela: reflexões sobre a doença, as perspectivas para o século XXI e o risco da reurbanização.** *Revista Brasileira de Epidemiologia* 2002, **5(3)**: 244-258.

Vasconcelos PFC **Febre Amarela.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2003, **36(2)**:275-293.

Vasconcelos PFC, Luna E, Galler R. **Serious adverse events associated with 17DD yellow fever vaccine in Brazil: a report of two cases.** *Lancet* 2001, **358**: 91-97.

Vázquez S, Valdés O, Pupo M, Delgado I, Álvarez M, Pelegrino JL, Guzmán MG: **MAC-ELISA and ELISA inhibition methods for detection of antibodies after yellow fever vaccination.** *J Virol Methods* 2003, **110(2)**:179-184.

Vera AV. **Fiebre amarilla: a propósito de la alerta.** *MedUNAB* 2004, **7**: 15-20.

Vlaycheva L, Nickells M, Droll DA, Chambers TJ. **Yellow fever 17D virus: pseudo-revertant suppression of defective virus penetration and spread by mutations in domains II and III of the E protein.** *Virology* 2004, **327**: 41- 49.

Von Lindern JJ, Aroner S, Barret, ND, Wicker JA, Davis CT, Barrett ADT. **Genome analysis and phylogenetic relationships between east, central and west African isolates of Yellow fever virus.** *Journal Of General Virology* 2006, **87**:895-907.

Wang X, Ooi BG, Miller LK: **Baculovirus vectors for multiple gene expression and for occluded virus production.** *Gene* 1991, **100**: 131-137.

Wu J, Bera AK, Kuhn RJ, Smith JL. **Structure of the Flavivirus helicase: implications for catalytic activity, protein interactions and proteolytic processing.** *Journal of Virology* 2005, **79(16)**: 10268-10277.

CAPÍTULO III

Uma nova estratégia para a expressão da glicoproteína do vírus da Raiva em células de inseto

1. Introdução

1.1. Um breve histórico

Não se sabe ao certo quando a raiva apareceu na sociedade humana. Presume-se que o homem iniciou seu convívio com cães cerca de 30.000 anos atrás, então existe a possibilidade de que a raiva humana tem ocorrido desde então. O documento mais antigo mencionando a raiva como uma zoonose é a lei promulgada em torno de 2.300 a.C., na Mesopotâmia. A lei, parte do Código Eshunna, imputava uma penalidade ao proprietário do cão cuja mordedura de uma vítima culminasse em morte. Subentende-se desta lei que, já neste período, o modo de transmissão da raiva era parcialmente compreendido e um tipo de controle de disseminação estava sendo posto em prática. Seres humanos e cães foram aumentando em número, e as pessoas começaram a migrar para novas regiões com seus cães. Esse movimento parece ser a razão pela qual a raiva se espalhou para várias regiões do mundo (Takayama, 2008).

Hoje, a raiva pode ser encontrada em vários animais de pequeno e grande porte e existe uma preocupação com a vacinação de animais domésticos menos comuns como furões e coelhos que, apesar de apresentar raiva de modo mais raro, devem também ser fonte de preocupação por já terem sido encontrados com o vírus (Lakay *et al.*, 2008).

1.2. Epidemiologia da Raiva

A raiva é uma encefalomielite aguda viral que é praticamente 100% fatal, Após o início dos sintomas apenas 2 casos de cura foram registrados até hoje (Willoughby *et al.*,2005; Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde 2009). A doença é mais prevalente nos países em desenvolvimento, onde é pouco reportada. Grandes nações que apresentam casos de raiva canina endêmica (entre eles a Índia e o Paquistão) não incluem a raiva entre doenças de notificação ou comunicação e a incidência real não é conhecida. Estima-se que mais de 55.000 seres humanos morrem da doença rábica no mundo cada ano (Desmézières *et al.*,2003).

Todas as espécies de mamíferos são suscetíveis à infecção pelo vírus rábico, mas apenas algumas espécies são importantes como reservatório para a doença. Nos Estados Unidos, linhagens distintas do vírus da raiva foram identificadas nos guaxinins, gambás, raposas e coiotes. Várias espécies de morcegos insetívoros também são reservatórios para as estirpes do vírus (Jacob *et al.*,2000). No Brasil, acreditava-se que a transmissão mais comum era feita por animais domésticos, pela arranhadura de gatos e especialmente mordedura de cães mas essa condição foi modificada e hoje a transmissão mais preocupante se dá por morcegos, em áreas não urbanas (Cleaveland *et al.*, 2006). Os casos mais preocupantes também não são mais os de raiva em humanos pois as campanhas de vacinação gratuitas mantidas pelo governo vêm diminuindo os casos de transmissão deste tipo de raiva de maneira bastante eficiente e os casos caíram de 73 em 1990 para apenas 3 em 2008 (Raiva CID 10, Ministério da Saúde). Os casos mais preocupantes e de impacto econômico são os que acontecem entre animais de grande porte como gado, promovendo não só perda econômica (estima-se uma incidência de 5 mortes/100.000 animais gerando um prejuízo anual de aproximadamente 12 milhões de dólares por ano na África e Ásia) (Knobel *et al.*,2005)

como aumento no risco de exposição ao vírus por contaminação da carne de consumo onde níveis detectáveis de vírus foram relatados em corações, pulmões, rins, fígados, testículos, glândulas salivares, músculos, de diferentes animais (Ito, 2005)

1.3. Transmissão do vírus da Raiva

O modo mais comum de transmissão do vírus da raiva é através da mordedura de animal infectado e geralmente começa quando a saliva infectada de um hospedeiro entra em contato com o tecido susceptível à infecção de um animal não infectado. Embora mais raro, a transmissão tem sido documentada por outras vias como a contaminação das mucosas (olhos, nariz, boca), transmissão aerossol, e transplantes de córnea e órgãos (transmissão inter-humana) (CDC, 2008).

A entrada do vírus da raiva no organismo ocorre através de ferimentos ou contato direto com superfícies mucosas uma vez que, na pele intacta, o vírus não consegue penetrar (WHO, 2004). As partículas do vírus da raiva, transmitidas por mordedura animal, migram do local de inoculação para o cérebro e causam uma doença aguda e fatal associada a intensa replicação viral no sistema nervoso central (Seif *et al.*,1985).

O ciclo viral é citoplasmático e todo o processo da transcrição e replicação ocorre dentro de uma “fábrica viral especializada”, o corpúsculo de Negri. Esses corpúsculos de inclusão são típicos na infecção cerebral, sendo utilizados como prova histológica de tal infecção no diagnóstico definitivo (Albertini *et al.*,2008).

1.4. Vírus da raiva (*Rabies virus*)

O agente etiológico da raiva é o *Rabies virus*, o qual pertence à família *Rhabdoviridae* e ao gênero *Lyssavirus*. Tem formato de um projétil e possui como

material genético um RNA fita simples sentido negativo que codifica cinco proteínas: uma nucleoproteína (N), uma fosfoproteína (P), uma RNA polimerase (L), uma proteína de matriz (M), e uma glicoproteína transmembrana (G). A proteína M, junto com a glicoproteína G, fazem parte do envelope que reveste o nucleocapsídeo viral (Jacob *et al.*, 2000).

Após se ligar ao receptor na célula hospedeira, a via de entrada do vírus é por endocitose, seguida da fusão induzida por baixo pH, entre a membrana viral e endossomal. (Albertini *et al.*, 2008). Essa fusão é catalisada pela glicoproteína G, o principal determinante da neuropatogenicidade do vírus da raiva (Hemachudha *et al.*, 2006; Gaudin, 2000). O genoma viral de RNA sentido negativo encontra-se encapsidado pela proteína N e requer o complexo de polimerases virais L (de “large protein”) e P (de “phosphoprotein”) para a transcrição e replicação. L é a RNA polimerase RNA dependente enzimaticamente ativa e P é o seu co-fator. A fusão entre membranas permite a liberação intracelular do nucleocapsídeo (N-RNA). Na célula, o N-RNA serve como molde para transcrição e replicação. O primeiro passo para o ciclo de replicação é a transcrição do genoma viral. Existe um único sítio para iniciar a transcrição na terminação 3’ no RNA genômico. Após a iniciação da transcrição, o complexo L e P transcreve uma cópia do RNA líder para o sentido positivo formando o RNA mensageiro (mRNA) (Albertini *et al.*, 2008).

Posteriormente na infecção, a atividade de L muda para replicação, no intuito de produzir cópias completas de fita positiva de RNA, sem a presença de cap ou cauda poli-A. Esses RNA complementares (cRNA) também são encapsidados pela N e ligam-se ao complexo L-P. Os cRNA são usados como molde para produzir novas fitas negativas de RNA genômico para encapsidação pela N e assim formar novos nucleocapsídeos. Não se conhece ainda o gatilho molecular que induz a mudança do

processo de transcrição para a replicação, mas essa mudança só ocorre se houver quantidade suficiente de nucleoproteína recém-produzida disponível para encapsidação do genoma replicado (Albertini, 2008).

Portanto, o processo de replicação produz nucleocapsídeos contendo o RNA genômico antisenso completo, o qual serve como molde para a síntese de RNA genômico senso. A proteína N favorece o processo de replicação pela sua habilidade de se ligar à fita líder de RNA recém produzida e também às junções intergênicas, resultando na síntese completa do RNA genômico senso. O novo genoma sintetizado, serve tanto como molde para transcrição secundária ou é compactado por proteínas M permitindo o brotamento do vírus da membrana celular (Chelbi *et al.*,2006).

1.5. Patologia

O vírus da raiva multiplica-se no local de inoculação, em tecido não-nervoso, ou entra diretamente nos nervos periféricos e viaja pelo fluxo axonal retrógrado para o sistema nervoso central (SNC). Tanto fibras motoras como sensoriais podem estar envolvidas. O vírus então migra do SNC via fluxo axonal anterógrado, dentro dos nervos periféricos, levando à infecção de alguns tecidos não-nervoso adjacentes como tecidos secretores e glândulas salivares, onde também se replica e é eliminado pela saliva tanto de humanos quanto dos animais enfermos.

A velocidade da ocorrência do óbito associado à raiva, após mordeduras não tratadas, varia dependendo da severidade e local do ferimento, bem como da concentração do vírus na saliva (Hemachudha *et al.*,2006). Mordidas na cabeça, face, pescoço e mãos, especialmente com sangramento, têm riscos mais altos e geralmente estão associadas a um curto período de incubação (Hemachudha *et al.*, 2006). Porém, o

risco está presente mesmo em um ferimento superficial, devido a habilidade única destes agentes de se replicarem na epiderme e derme (Takayama, 2008).

O período de incubação varia de quinze dias a seis anos dependendo da quantidade de vírus no inóculo e do local de inoculação. Em cerca de 60% dos pacientes com a doença, o período de incubação é de 1 a 3 meses, mas de 6% a 7% dos pacientes mostram um período de incubação maior que 1 ano. O maior tempo de incubação já relatado foi de 7 anos (Takayama, 2008). A velocidade estimada de migração do vírus no interior do axoplasma dos neurônios é de 15 a 100 mm por dia mas dados mais recentes descrevem um intervalo menor, mais freqüente, de 8–20 mm por dia (Germano, 1994).

Ao início dos sintomas clínicos, o vírus já está amplamente disseminado por todo organismo. O curso clínico da raiva humana consiste no período de incubação, na fase prodomal, na fase neurológica aguda e no coma. O primeiro sintoma da raiva é geralmente dor neuropática no local do ferimento e surge após a entrada do vírus no SNC, caracterizando a fase prodomal. Essa dor neuropática é causada pela replicação viral inicial. Na fase prodomal, que dura de 2 a 10 dias, os pacientes relatam sintomas não-específicos como mal-estar, febre e anorexia, bem como podem apresentar coceira, dor e parestesia ao redor da ferida da mordedura [WHO 2004).

A fase neurológica aguda continua por 2 a 7 dias e caracteriza-se por ansiedade intensa, agitação emocional e confusão, intermitentemente. Em alguns momentos, os pacientes podem estar calmos, lúcidos e cooperativos. Os principais sinais clínicos estão relacionados à encefalomieloradiculite induzida pelo vírus. As duas principais características clínicas observadas são a raiva (fúria) e as paralisias que podem não estar relacionadas a nenhuma localização anatômica específica do vírus no SNC. No entanto, a disfunção dos nervos periféricos é responsável pela fraqueza na raiva paralítica, pois

afeta os neurônios motores. Já na fúria ou raiva, estudos eletrofisiológicos indicam disfunção de neurônio do corno anterior, mesmo na ausência de fraqueza clínica (Wu *et al.*, 2005; Hemachudha *et al.*, 2006).

A hidrofobia ocorre em cerca de 60% dos pacientes. Eles desenvolverão espasmos faríngeos e laríngeos severos quando tentarem beber, ou mesmo quando verem água. Sintomas similares podem ser desencadeados com uma brisa no rosto ou peitoral, caracterizando a aerofobia. Como consequência, os pacientes evitam beber água, lavar as mãos ou sentir o vento. As condições do paciente deterioram-se gradualmente, evoluindo com febre alta, confusão, desorientação, paralisia e convulsões também podem ocorrer. O paciente geralmente entra em coma. Na fase do coma, a instabilidade autonômica torna-se extremamente predominante, podendo desenvolver hipotensão, arritmia e hipoventilação. A maioria dos pacientes morrem pouco depois de entrar em coma, cerca de 1 a 5 dias, se não for dado suporte intensivo. Não há nenhuma terapia efetiva para a raiva o que a torna inevitavelmente fatal, com aproximadamente 100% de óbitos (Takayama *et al.*, 2008).

1.6. Glicoproteína G

O vírus da raiva não é uma única entidade, mas consiste de um número vasto de variantes associados com os diferentes tipos de hospedeiros. Corresponde a apenas um dos 7 genótipos pertencentes ao gênero *Lyssavirus*, sendo considerado o genótipo 1 (GT1) seguido de Lagos Bat virus (GT2), Mokola virus (GT3), Duvenhage vírus (GT4), European Bat lyssaviruses 1 e 2 (GT5 e GT6 respectivamente) e Australian Bat lyssavirus. (GT7) (Jacob *et al.*, 2000). Estes vírus diferem em seu caráter antigênico devido a características da glicoproteína G, o determinante primário de sua patogenicidade e o maior indutor de proteção imune (Morimoto *et al.*, 2001). Antes eram

vírus divididos em dois grupos de acordo com a reatividade cruzada de anticorpos de neutralização e proteção cruzada (Desmezières *et al.*,2003). No Brasil foi realizada uma pesquisa utilizando um painel de 11 anticorpos monoclonais específicos para a proteína N com o objetivo de identificar diferenças genômicas e antigênicas em vírus da raiva isolados de diferentes regiões e de diferentes hospedeiros. A pesquisa foi capaz de identificar dois grupos principais de variantes, o primeiro formado por isolados de gado e morcegos e o segundo por isolados de cães e gatos. (Schaefer *et al.*,2005).

A glicoproteína G é responsável pela ligação dos vírions à superfície celular e, após a endocitose, entrega dos nucleocapsídeos dentro do citoplasma da célula pela fusão do envelope viral com a membrana da vesícula endossomal (Desmezières *et al.*,2003). Esta proteína consiste de 438 aminoácidos formando um ectodomínio que tem três potenciais sítios para glicosilação do tipo N-ligada, um domínio transmembrana de 22 aminoácidos e um domínio citoplasmático com 44 aminoácidos (Benmansour *et al.*,1991). Trabalhos também já demonstraram que a glicoproteína G nativa possui uma estrutura trimérica e, em pH ácido, ela medeia a fusão das membranas no endossomo (Gaudin, 2000).

A proteína G é muito importante para a infecção viral pois o vírion depende dela para a entrada na célula por ligação a receptores e fusão de membrana (Luo *et al.*,2007). A vacinação para prevenir o desenvolvimento da patologia da raiva se baseia principalmente na capacidade da glicoproteína G em induzir a produção de anticorpos neutralizantes e ativação de células do sistema imune, como células T helper e células T citotóxicas, tendo como resultado uma proteção contra a doença, mesmo em um desafio intracerebral (Jallet *et al.*, 1993; Lodmell *et al.*, 2004; Perrin *et al.*, 1985 e Wiktor *et al.*, 1984).

1.7. Glicoproteína G e sistemas de expressão

Por estas razões, a glicoproteína G foi escolhida a proteína do vírus da raiva a ser testada como uma vacina de subunidade ou como potencial ferramenta de diagnóstico através de sua expressão em uma vasta gama de sistemas de expressão de genes heterólogos procarióticos e eucarióticos. Estratégias diferentes foram testadas com o objetivo de produzir o antígeno em grande quantidade:

- 1) Expressão em células de *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (S2). Lemos *et al.* utilizou vetores que contêm os elementos necessários para a amplificação em bactérias e, em seguida promoveu a transfecção em células S2. O sistema de expressão em S2 permite a integração do gene no genoma da célula e sua expressão pela máquina celular. Em seu trabalho, a glicoproteína G expressa alcançou altos níveis de expressão e foi analisada por testes de ELISA e de citometria de fluxo. Ventini *et al.* (2010) também utilizaram células S2 para expressar a glicoproteína G mas em seu trabalho o interesse foi analisar a sua produção em um biorreator de capacidade de 1L, a fim de simular uma bioprodução em larga escala. Ele descreve que o aumento no número de células não foi acompanhado pelo aumento da produção de glicoproteína G e que isso representa um desafio na otimização do crescimento celular para que favoreça a produção da glicoproteína G. Yokomizo *et al.* (2007) testaram a glicoproteína G expressa em S2 em camundongos. Camundongos imunizados com a glicoproteína G demonstraram capacidade de sintetizar anticorpos contra o vírus da raiva e apresentaram proteção contra um desafio letal utilizando o vírus da raiva.
- 2) Expressão em bactérias. Motoi *et al.* (2005), expressou a glicoproteína G em *Escherichia coli* (*E. coli*), a fim de utilizar a proteína recombinante para imunizar galinhas poedeiras. Estas galinhas imunizadas foram capazes de botar

ovos nos quais as gemas eram ricas em imunoglobulina (IgY) e este anticorpo foi testado como uma imunoglobulina anti-rábica. O anticorpo foi capaz de se ligar especificamente aos vírions e às células infectadas com vírus da raiva. Além disso, foi capaz de neutralizar a infectividade do vírus da raiva e de reduzir a mortalidade de camundongos previamente inoculados com o vírus. Bassi *et al.* (2008), também utilizou *E. coli* para expressar a glicoproteína G e mostrou reatividade significativa com anticorpos presentes na terapia de imunoglobulinas de raiva humana (HRIG) em um ensaio de immunoblotting. A proteína também apresenta capacidade de interagir com um ensaio de neutralização competitiva *in vitro*, atuando como um antígeno forte. Li *et al.* (2010) promoveu a construção, expressão e imunocaracterização de uma glicoproteína G recombinante em *E. coli* que, em um ensaio de neutralização, apresentou bastante atividade e capacidade de ser reconhecida pelo anticorpo anti-rábico.

- 3) Expressão em leveduras. Sakamoto *et al.* (1999) mostrou que a glicoproteína G não foi processada normalmente em células de levedura, resultando em estrutura proteica anormal, mas que era capaz de induzir a produção de anticorpos. Infelizmente, estes anticorpos eram incapazes de neutralizar a infecção. Lafay *et al.* (1996) também utilizou leveduras para expressar a glicoproteína G e digeriu aleatoriamente essa proteína recombinante para gerar peptídeos. 40 anticorpos monoclonal (MAbs) anti-glicoproteína G foram usados para identificar regiões antigênicas da proteína e para ver se principais sítios antigênicos poderiam ser mimetizados por peptídeos.
- 4) A glicoproteína G também foi expressa em tomates transgênicos e a proteína recombinante administrada via oral é capaz de induzir imunidade protetora em

guaxinins (McGarvey *et al.*,1995). Também foi relatada a utilização da glicoproteína G em vacinas de DNA que foram capazes de elicitar uma resposta imunológica bastante eficiente em cães e gatos através de vias de inoculação intramusculares e intradermais (Osório *et al.*, 1999).

- 5) Diferentes vírus podem ser utilizados para expressar a glicoproteína G: vaccinia (Rupprecht *et al.*,1986; Pastoret & Brochier, 1993; Brochier *et al.*,1995), adenovírus (Prevec *et al.*,1990 Chaerlton *et al.*,1992), Semliki Forest Virus (Benmaansour *et al.*, 2009) e baculovírus (Gómez-Sebastián *et al.*, 2008; Huang *et al.*,2011; Drings *et al.*,1999; Jarvis, 2003; Rath *et al.*,2005; Sissoeff *et al.*,2005). Huang *et al.* (2011), expressou a glicoproteína G sob o controle do promotor do citomegalovírus (CMV). O baculovírus recombinante gerado promoveu expressão em células de mamíferos e induziu a produção de anticorpos neutralizantes e fortes respostas de células T quando utilizado para vacinar intramuscularmente camundongos. O baculovírus *Autographa californica multicapsid nucleopolyedrovirus* (AcMNPV) é o baculovírus mais estudado a nível molecular e a maioria dos vetores de expressão são baseados neste vírus (Moscardi,1999). Há muitas vantagens de usar o sistema de expressão de Baculovírus tais como altos níveis de expressão e modificações pós-traducionais que permitem que as proteínas heterólogas expressa apresentem dobramento correto e atividade biológica (Kost *et al.*,2005).

1.8. Poliedros de baculovírus

Corpos de oclusão de baculovírus (também chamados de poliedros), são estruturas ricas em proteínas que contêm vírions, que recentemente foram avaliadas quando a possibilidade de incorporação de proteínas heterólogas (Je *et al.*,2003). Como a

poliedrina é o principal constituinte proteico dos corpos de oclusão do baculovírus, corpos de oclusão recombinantes que incorporam uma proteína heteróloga podem ser uma estratégia para a purificação da proteína heteróloga de modo mais prático, através da purificação dos poliedros, os quais são facilmente purificados por centrifugação em gradiente de sacarose (Chang *et al.*,2003).

2. Objetivo

Com o objetivo de expressar a glicoproteína do vírus da raiva em níveis elevados e avaliar o potencial antigênico dessa proteína, um baculovírus recombinante contendo o gene da glicoproteína G fusionado com o gene da poliedrina do baculovírus AcMNPV foi construído. Este vírus recombinante foi utilizado para infectar células de inseto e larvas de insetos suscetíveis e a proteína produzida foi purificada por centrifugação em um gradiente de sacarose e testada para sua antigenicidade

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Vírus e células utilizados

Foram utilizados os seguintes vírus: baculovírus selvagem *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV); baculovírus recombinante vSynVI-Gal (Wang *et al.*, 1991; O'Reilly *et al.*, 1992); baculovírus derivados de bacmídeo bMON14272 (Bac-to-Bac “Baculovirus Expression System”, Invitrogen).

Os vírus foram propagados em cultura de células *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4 ou Tn5B) (Granados *et al.*, 1994). Essas células foram mantidas em meio TC-100 (Gibco-BRL) com 10 % de soro fetal bovino a 27 °C.

Células de *Escherichia coli* DH5 α foram utilizadas como hospedeiras para a maior parte dos plasmídeos utilizados no presente trabalho. No caso de experimentos envolvendo o sistema Bac-to-Bac “Baculovirus Expression System” (Invitrogen), também foram utilizadas células *Escherichia coli* DH10Bac (Invitrogen).

3.2. Construção do vetor pFastPH

O vetor de transferência utilizado neste trabalho para fundir a glicoproteína G do vírus da Raiva (RVGP) à poliedrina do baculovírus AcMNPV (PH) foi construído por Costa *et al.*, (2008). Resumidamente, oligonucleotídeos foram desenhados para amplificação do gene da poliedrina e inserção de um sítio da enzima NcoI para fusão de outros genes (na porção 3') substituindo o “stop codon” e promovendo o sítio de inserção de genes para fusão além de uma cauda de seis histidinas. O gene PH foi

amplificado por PCR , a partir do plasmídeo pSynXIVVIX3+ (Wang *et al.*, 1991) e clonado no plasmídeo pGEM-T Easy (Promega) formando o plasmídeo pGEMPH. O plasmídeo pGEMPH foi digerido com as enzimas de restrição BglII e EcoRI, para que o gene fosse liberado. A seguir, o gene da poliedrina foi clonado no plasmídeo pFastBac1™ (Invitrogen), gerando o plasmídeo pFastPH. (Figura 1)

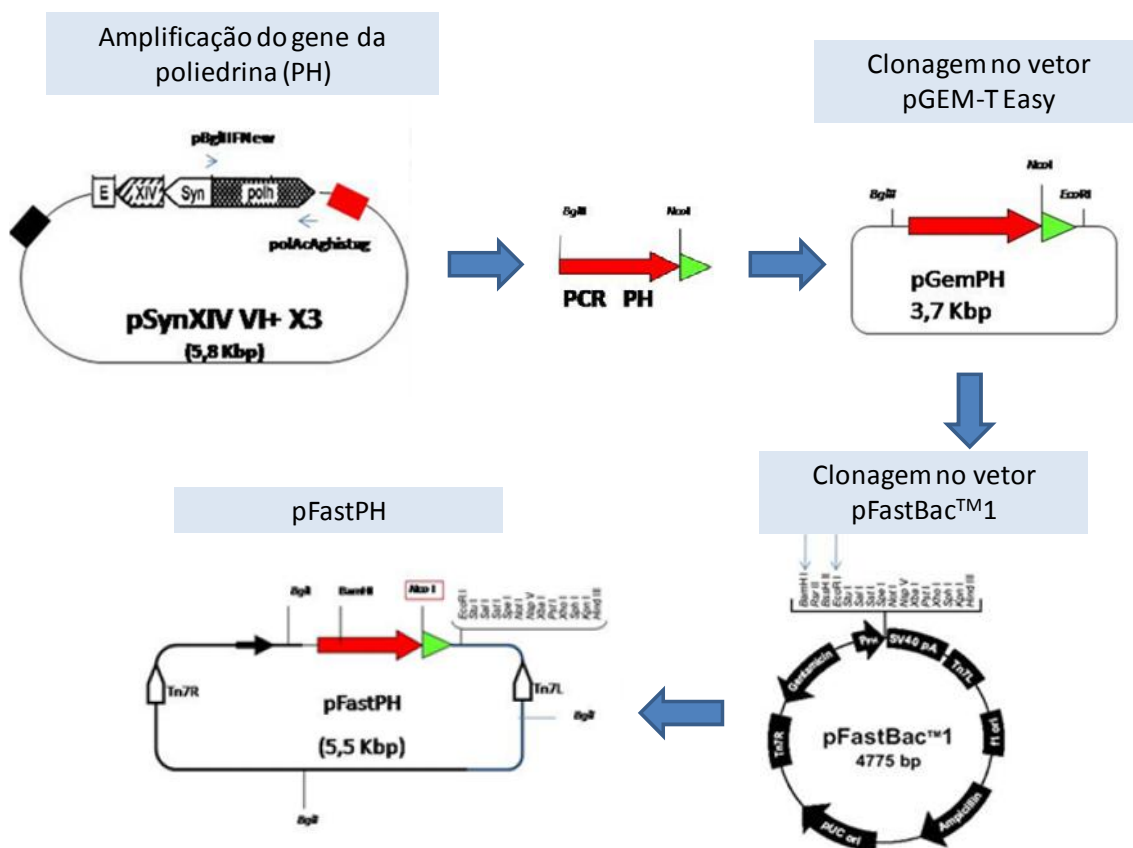


Figura 1 – Diagrama da amplificação e clonagem do gene da poliedrina (PH) modificado em pFastBac™1.

O gene PH foi amplificado por PCR , a partir do plasmídeo pSynXIVVIX3+ (Wang *et al.*, 1991) e clonado no plasmídeo pGEM-T Easy (Promega). O fragmento amplificado possui um sítio de NcoI no lugar do códon de terminação do gene da poliedrina (polh) e seis códon para o aminoácido histidina (em verde). O plasmídeo pGEMPH foi digerido com as enzimas de restrição BglII e EcoRI, para que o gene da polh fosse liberado. A seguir, o gene da poliedrina foi clonado no plasmídeo pFastBac1 (Invitrogen), gerando o plasmídeo pFastPH, que foi utilizado para a clonagem do gene da RVGP.

3.3. Amplificação e clonagem do gene RVGP

O gene RVGP foi amplificado por PCR a partir do plasmídeo pGPV/PV (Figura 2) (gentilmente pelo Dr Yves Jacob do Instituto Pauster, Paris) com os pares de oligonucleotídeos específicos flanqueadores do gene : pRaivaGF (5'-TCGAGAATTCGAGCTCGGTACC-3') e pRaivaGRNcoI (5' CCATGGACAGTCCGGTCTCACCCCGCTC 3'). A localização do sítio para a enzima de restrição NcoI está sublinhado no primer pRaivaGRNcoI. O programa de PCR utilizado foi 94°C/5min; (94°C/1min, 50°C/2min, 72°C/2min) x 35; 72°C/10min. Um fragmento de DNA de 1615pb foi amplificado correspondendo ao tamanho esperado do gene RVGP. O fragmento amplificado foi eluído do gel de agarose utilizando o kit GFX DNA extraction kit, conforme instruções do fabricante (GE Healthcare Life Science).

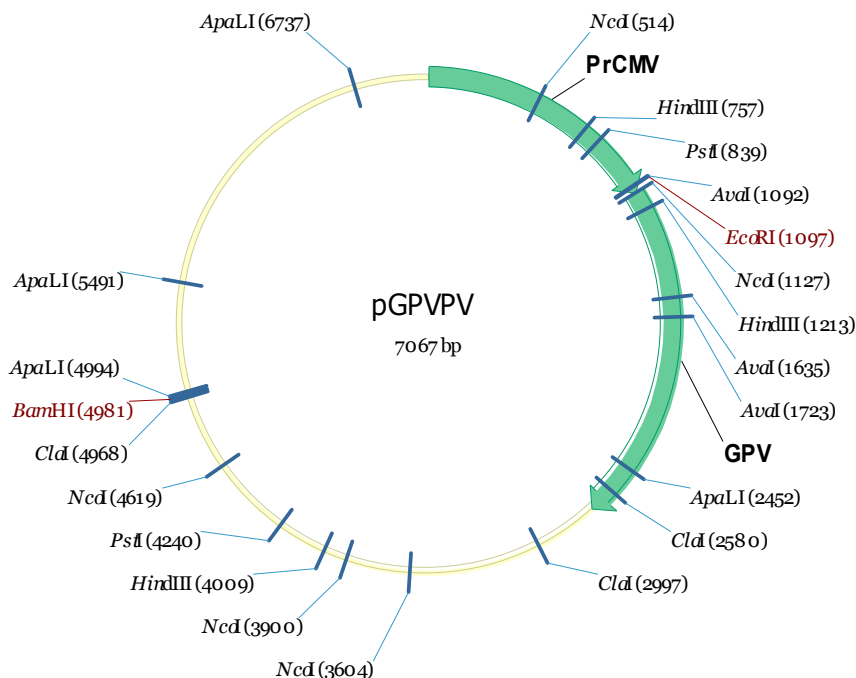


Figura 2 – Esquema mostrando o mapa do plasmídeo pGPV/PV. A posição e direção do gene GPV e do promotor CMV é mostrada em verde. A posição de vários sítios de enzimas de restrição também são mostrados na figura. O mapa foi construído com o programa Vector NTi (Invitrogen).

O fragmento de 1615 pb (RVGP) purificado foi utilizado na reação de ligação com o plasmídeo pGEM-T easy (Promega) (Figura 3) seguindo as recomendações do fabricante. A ligação foi utilizada na transformação, por eletroporação, descrito em Sambrook *et al* (1989), de células competentes de *E. coli* One Shot® Top10 Competent Cells (Invitrogen). O inserto clonado no vetor pGEM-T easy (Promega) foi amplificado em *E. coli*, em meio LB de acordo com protocolo descrito em Sambrook *et al.*, (1989). O plasmídeo recombinante obtido após confirmação foi o pGEMRVGPNcoI. Os clones positivos foram confirmados por dois diferentes métodos: pela resistência à ampicilina (só sobrevivem no meio de cultura com antibiótico as bactérias que receberam com sucesso o plasmídeo de interesse, uma vez que pGEM-T easy possui um gene que confere resistência à ampicilina tornando-a uma marca de seleção) e por reação de digestão utilizando a enzima de restrição *NcoI*.

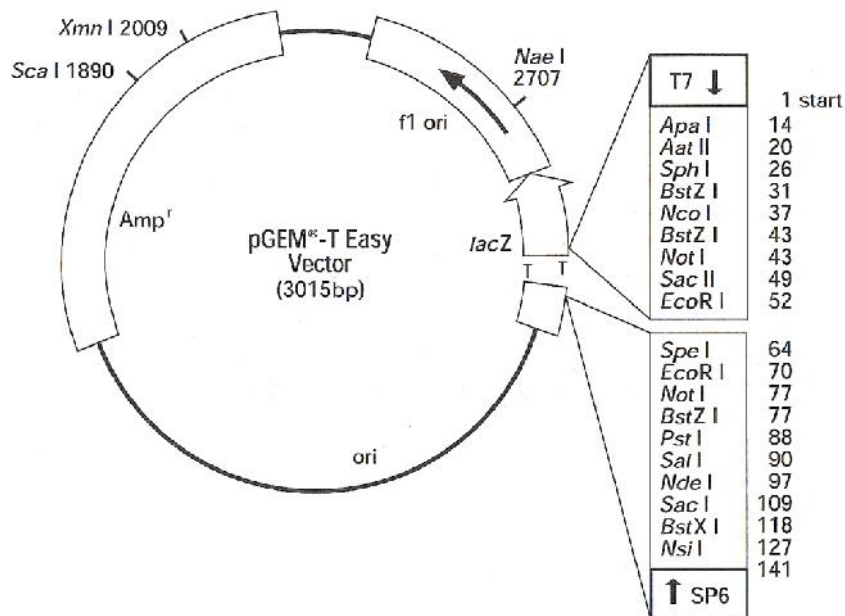


Figura 3: Plasmídeo pGEM-T Easy, manual do fabricante (Promega). Sítio de multiclonagem mostrado à direita.

3.4. Construção do vetor de transferência pFastPHRVGP

O fragmento de 1615 pb (RVGP) foi obtido pela restrição de pGEMRVGPNcoI com a enzima NcoI e posterior análise por eletroforese em gel de agarose e purificação da banda utilizando o kit GFX DNA extraction kit, de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare Life Science). O gene RVGP digerido de pGEMRVGPNcoI possui sítios de NcoI nas extremidades (o ATG do gene faz parte de um sítio de NcoI, presente na seqüência do gene) para a inserção em fase na região 3' do gene da poliedrina modificada (com um sítio de NcoI no lugar do sítio de terminação do gene) do pFastPH.

O fragmento purificado de 1615pb foi adicionado a uma reação de ligação utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) e o plasmídeo pFastPH previamente digerido com a enzima de restrição Nco I e desfosforilado por reação utilizando a enzima CIAP - Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (Promega) seguindo as recomendações do fabricante.

A ligação foi utilizada na transformação de células competentes de *E. coli* DH5 α (Invitrogen) e aquelas que adquiriram resistência à ampicilina foram utilizadas na obtenção do plasmídeo pFastPHRVGP. O plasmídeo pFastBac1 (e conseqüentemente o plasmídeo pFastPH, construído com base no 1 $^{\circ}$) é um vetor que permite que o inserto de interesse seja posteriormente transferido para o genoma de um baculovirus presente na forma plasmidial (bacmídeo) dentro de uma *E. coli* (DH10-Bac, Invitrogen) por um mecanismo de transposição. Os genes de interesse são inseridos em um dos sítios presentes na região de multiclonagem e devem estar posicionados entre os sítios de transposição, logo após o promotor da poliedrina.

A clonagem pôde ser confirmada com a realização de reação de PCR. Para pFastPHRVGP foram utilizados os oligonucleotídeos polAcAg310a348

(AAGACAGCTTCCCCATTGTAAACGACCAAGAAGTGATG) e pRaivaGRNcoI para confirmar a presença do inserto e confirmação da direção. Para a reação de PCR foram utilizados 5 μ L do tampão 5 X da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), e 0,5 μ L da mistura dos quatro dNTPs (de uma solução estoque 10 mM), 0,5 μ L de cada um dos oligonucleotídeos (de uma solução estoque 10 μ M), 3 μ L de preparado de plasmídeo pFastPHRVGP (obtido pela técnica extração de plasmídeos de culturas bacterianas descrita em Sambrook *et al* (1989), uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 2 μ L de MgCl₂ e água “milli-Q” para um volume final de 25 μ L. O programa da PCR utilizado para a amplificação foi: 94°C/5 min, 30 ciclos de 94°C/1 min, 50°C/1 min e 30 s, 72°C/2 min, seguido de uma extensão final de 72°C/7 min. Os produtos das reações de PCR foram analisados em géis de agarose na concentração de 0,8%.

3.5. Construção do bacmídeo recombinante e obtenção do baculovírus recombinante vAcPHRVGP

Na construção do bacmídeo recombinante de interesse foi utilizada uma linhagem de bactéria *E. coli* denominada DH10Bac que possui dentre as suas características especiais o genoma completo de um baculovirus (AcMNPV) na forma de um plasmídeo. O bacmídeo contém um sítio de inserção de um transposon no locus da poliedrina e ainda um plasmídeo auxiliar que codifica transposases responsáveis pelo evento de transposição entre o plasmídeo doador (pFastBac1 com o inserto) e o genoma do baculovirus inserido no bacmídeo (Figura 4).

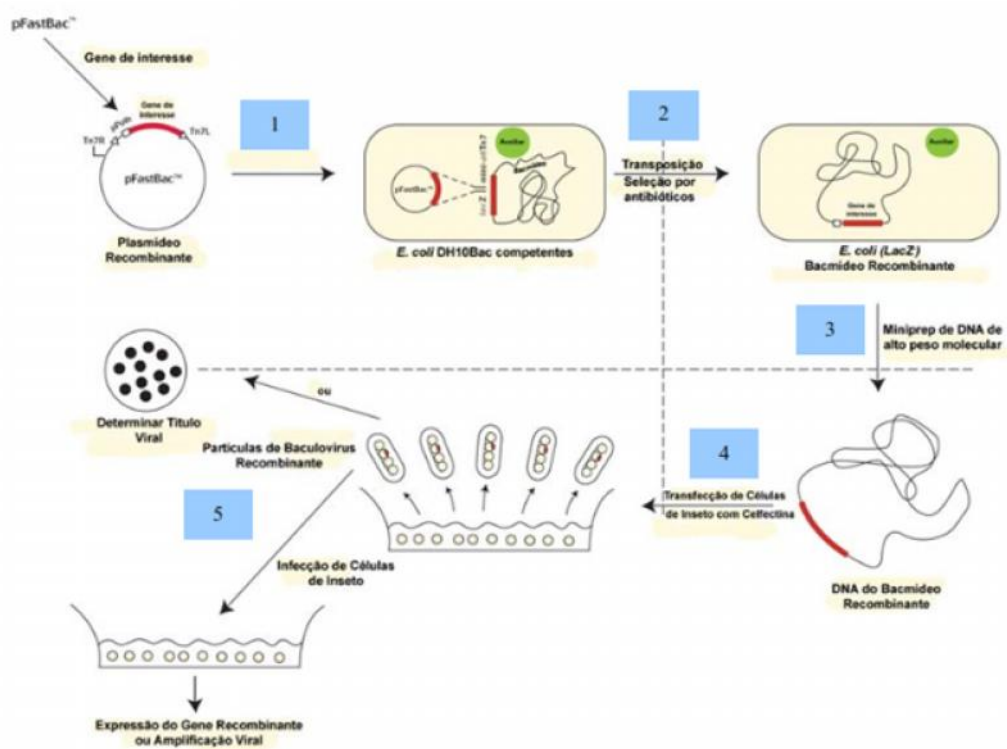


Figura 4: Sistema Bac-to-Bac de expressão. A figura mostra a transformação de bactérias DH10Bac, que contém o genoma do baculovirus AcMNPV na forma de um bacmídeo, com o plasmídeo pFastBac1 com o inserto de interesse em vermelho (1). Logo a seguir é mostrado o evento de transposição (2), que permite a inserção do gene de interesse no bacmídeo e a seleção por antibióticos, seguido pela extração do DNA do bacmídeo (3) e utilização desde na transfecção de células de inseto (4). Os vírus recombinantes obtidos podem ser avaliados quanto ao seu título viral ou ainda utilizados para infectar novas células e promover a produção da proteína recombinante (5). Adaptado de Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System manual (Invitrogen)

O plasmídeo pFastPHGPV foi utilizado na transformação de bactérias DH10Bac seguindo as orientações do fabricante (Invitrogen). As colônias das bactérias *E. coli* DH10Bac nas quais ocorreu transposição foram selecionadas pela observação de demonstração de resistência à tetraciclina, canamicina (genes de resistência presentes

em todas as bactérias DH10Bac) e gentamicina (gene de resistência presente apenas nas bactérias nas quais o evento de transposição obteve sucesso, ele se encontra entre os sítios de transposição de pFastBac1) e, além disso, foram identificadas pela cor branca mesmo na presença do substrato X-gal e indutor IPTG. A ausência de cor (cor branca) ocorre apenas se o gene da enzima β -galactosidase presente no bacmídeo for interrompido pelo evento de transposição. Caso isso não ocorra, o gene estando íntegro permitirá que essa enzima seja produzida e aja sobre o seu substrato (X-gal) provocando a produção da cor azul. Essas colônias foram amplificadas em larga escala e seu material genético foi extraído seguindo orientações do fabricante (Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System, Invitrogen). Por se tratar de um DNA de alta massa molecular e de baixo número de cópias, a confirmação de transposição é feita por PCR e não por restrição.

A transposição pôde ser confirmada com a realização de uma reação de PCR recomendada pelo fabricante. Os oligonucleotídeos utilizados para checar a presença e orientação do inserto são: primer M13 forward (CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC) utilizado junto ao primer reverso do gene de interesse, para BacPHRVGP o primer reverso escolhido foi o pRaivaGRNcoI). Na reação de PCR de BacPHRVGP foram utilizados 5 μ L do tampão 10X da Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 1 μ L da mistura dos quatro dNTPs (de uma solução estoque 10mM), 1,25 μ L de cada um dos oligonucleotídeos (de uma solução estoque 10 mM), 1 μ L do DNA do bacmídeo recombinante (100ng), uma unidade da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1,5 μ L de $MgCl_2$ (de uma solução estoque 50 mM) e água “milli-Q” para um volume final de 50 μ L. O programa da PCR utilizado para a amplificação foi: 93°C/3 min, 35 ciclos de 94°C/45 s, 55°C/45 s, 72°C/5min, seguido de

uma extensão final de 72°C/7 min. Os produtos das reações de PCR foram analisados em géis de agarose na concentração de 0,8%.

3.6. Obtenção do baculovírus recombinante

Cerca de $0,5 \times 10^6$ células de *Trichoplusia ni* (BTI-TN5B1-4 ou TN5B), em cultura (Granados et al., 1994) foram transferidas para uma placa de poliestireno de 35 mm de diâmetro (TPP) por pelo menos 1 h, para a formação de monocamadas de células. Um micrograma de DNA do bacmídeo BacPHRVGP foi diluído em 0,5 mL de meio TC-100 sem soro, em uma placa de 35 mm de diâmetro. Em outra placa, 10 µL de Cellfectin® Reagent (Invitrogen) (lipossomo) foram diluídos em 0,5 mL de meio TC-100 sem soro e misturados à solução contendo o DNA e incubados por pelo menos 10 min à temperatura ambiente. O meio de cultura das células foi substituído pela mistura de DNA/lipossomos sem que isso perturbasse a monocamada formada e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 3 h.

Após esse período, a mistura foi trocada por meio TC-100 novo, contendo 10% de soro fetal bovino e as células foram então incubadas a 27 °C, por sete dias. A grande vantagem da utilização desse sistema é que o mecanismo de transposição não necessita de uma série de purificações que seriam fundamentais para o isolamento do vírus recombinante quando da utilização do mecanismo de recombinação homóloga. Como o DNA do bacmídeo é infectivo e não ocorre a produção de vírus selvagem, uma vez que só o recombinante é selecionado previamente, ocorre a replicação do vírus recombinante em células de inseto em cultura e a produção de suas proteínas, inclusive dos insertos de interesse. O vírus recombinante obtido foi denominado vAcPHRVGP e foi propagado posteriormente em células de inseto Sf21 e/ou TN5B e estoques virais foram mantidos a 4°C.

3.7. Confirmação da presença do gene RVGP no DNA do vírus vAcPHRVGP

O DNA recombinante viral foi extraído do sobrenadante de uma cultura de células infectada com o vírus recombinante vAcPHRVGP 72h.p.i. seguindo o protocolo descrito em O'Reilly *et al.*(1992). A presença do gene recombinante foi confirmada utilizando os seguintes oligonucleotídeos: polAcAg310-348F, localizado na metade da sequência do gene da poliedrina (na posição 310-348 com relação ao códon de início da tradução) e com o primer pRaivaGRNcoI.

3.8. Análise da expressão da proteína PHRVGP em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e imuno-detecção

Células TN5B (1×10^6) por poço foram adicionadas à uma placa com 6 poços (TPP) e foram infectadas com 10 unidades formadoras de placa (pfu) /célula do vírus recombinante (vAcPHRVGP) ou com o vírus selvagem AcMNPV ou permaneceram não infectadas para servirem de controle negativo (Mock). Noventa e seis horas pós-infecção (h.p.i.), as células foram ressuspensas e coletadas e centrifugadas a 4.000 g. por 10 min (centrífuga J2-MI, rotor JA 14, Beckman). Fez-se o descarte do sobrenadante e o sedimento (concentrado de células) foi lavado com tampão PBS por 3 vezes antes de que alíquotas fossem utilizadas como amostra na análise por SDS-PAGE.

Em seguida, as amostras foram analisadas por eletroforese em dois géis desnaturantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%, conforme Laemmli (1970). 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 (Gibco BRL - Life Technologies), para o experimento de imuno-deteção de proteínas (“Western-blot”) abaixo descrito.

As proteínas foram transferidas para membrana de Nitrocelulose, usando-se os aparatos 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). Para checar se a transferência foi realizada com sucesso a membrana foi rapidamente corada por reagente de Ponceau, um corante que destaca as bandas transferidas em uma cor vermelho-viva. Esse corante é facilmente retirado por lavagem com água destilada e não interfere no processo de imuno-marcação. A membrana foi bloqueada com solução de PBS 1X e 3 % de leite em pó desnatado adicionado de azida sódica (para evitar contaminação) por 16 horas, 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 (Promega) de coelho por 1 hora. Essa solução é então descartada e a membrana é lavada novamente por 3 vezes em PBS Tween (0,05 %) sob agitação suave. A seguir, a membrana é 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 hora sob agitação suave. Esta solução então é 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 é adicionado logo a seguir, trata-se de uma solução de NBT/BCIP (Roche) que nada mais é do que o substrato para a ação da fosfatase alcalina. Quando a enzima está presente por estar conjugada ao anticorpo secundário que se ligou ao anticorpo primário e esse à banda de interesse, ocorre a metabolização desse substrato em uma cor azul arroxeadada que se destaca da membrana. A reação precisa ser interrompida com sucessivas lavagens com água destilada para que não ocorra marcação inespecífica ou dano à qualidade do resultado obtido.

3.9. Purificação e análise ultraestrutural de corpos de oclusão de larvas de *Spodoptera frugiperda* infectadas com vAcPHRVGP

Larvas de *Spodoptera frugiperda* no terceiro ou quarto instar, gentilmente cedidas pela Dra Rose Gomes Monnerat e Dra Maria Elita Batista de Castro (EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia), foram inoculadas com \pm 10-15 μ L do estoque de BV (aproximadamente 10^8 pfu/mL) do vírus vAcPHRVGP com ajuda de uma seringa de 1 mL e alimentadas com uma dieta artificial por 72 h.p.i. No 5^o dia, as lagartas foram colocadas no gelo e posteriormente abertas para retirada do tecido adiposo, local de maior replicação do baculovírus e presença de produtos virais. Esse tecido adiposo foi homogenizado em um tampão que inibe a ação de proteases (PMSF 1 mM, EGTA 40 mM e EDTA 100 mM) e filtrado com o auxílio de uma seringa com lã de vidro (O'Reilly *et al.*, 1992).

Esse material processado foi utilizado em um gradiente de sacarose conforme descrito em O'Reilly *et al.*, (1992) e a banda correspondente aos corpos de oclusão foi coletada, lavada com PBS e preparada para microscopia eletrônica de varredura, como

descrito em Matos *et al.*, 1999. Brevemente, 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. Uma alíquota de 10 µL desse material também foi analisada por SDS-PAGE com o auxílio da adição de 10 µL de tampão de amostra de proteína com 5% de β-mercaptoetanol e incubação a 95 °C por 5 min.

3.10. Análise por microscopia confocal

Células Tn5B (1×10^6 células) foram adicionadas à placas de 6 poços de 60mm que continham lamínulas posicionadas no fundo de cada poço. Desta forma, a monocamada das células foi formada em cima das lamínulas e isso permitiu que depois elas pudessem ser retiradas da placa, imunomarcadas e analisadas, em cima de uma lâmina, por microscopia confocal. As células foram infectadas com vAcPHRVGP (10 pfu / célula) ou não infectadas (controle negativo - mock). Após 96 hpi as lamínulas contendo as monocamadas de células foram utilizadas para a imunomarcação. As células foram fixadas com acetona gelada por uma hora (-20 ° C) e então incubadas por 30 min com uma solução de PBS / BSA 10% em temperatura ambiente. As lamínulas contendo células foram então incubadas por 1h com a) anticorpo monoclonal anti-HIS (Promega) ou b) um anticorpo policlonal anti-rábico produzido pela de imunização de coelhos (Instituto Butantan, São Paulo, Brasil) ou c) um anticorpo policlonal para a detecção de raiva produzido pela imunização de camundongos utilizado atualmente em um laboratório de diagnóstico público de referência (Zoonoses laboratório DIVAL, Brasília, Brasil) já conjugado com isotiocianato de fluoresceína. As lamínulas

incubadas com a e b foram lavadas 3 vezes com PBS (pH 7,4) e coradas com DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole). As células foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com o anticorpo anti-coelho conjugado com o fluoróforo Alexa488 (Invitrogen). Por fim, as células foram cobertas com uma gota de A31632 B Component Image iT™ Fx Signal Enhancer (Invitrogen) e 1 gota de N-Propilgalato (0,2 g em 4 ml de PBS com glicerol-1 ml) e observadas em um microscópio confocal (The Broadband Confocal Leica TCS SP5, Leica DMI Series EL6000) com configurações apropriadas de excitação e emissão para o corante utilizado. As lamínulas incubadas com c não foram coradas com DAPI, apenas lavadas e cobertas como descrito acima e observadas com o auxílio do microscópio confocal.

4. Resultados

4.1. Construção do baculovírus recombinante vAcPHGPV

Com o objetivo de construir o baculovírus recombinante vAcPHRVGP, a seqüência de DNA que codifica o gene RVGP foi amplificada por PCR a partir do plasmídeo pGPV / PV como um fragmento 1.615pb (Figura 5) e clonado no vetor pGEM-T ® Easy-vector (Promega), formando o vetor pGEMRVGP. O plasmídeo contendo o DNA recombinante foi digerido com NcoI (Figura 6). e a banda de 1615 pb foi isolada e clonada no vetor pFastPH (Costa, 2008) gerando o plasmídeo recombinante pFastPHRVGP. A inserção correta do gene RVGP no plasmídeo recombinante foi confirmada por PCR (Figura 7). Por fim, o DNA do plasmídeo pFastPHRVGP foi utilizado para transformar células DH10Bac utilizando o sistema Bac-to-Bac de transposição (Invitrogen) e a correta inserção de RVGP no bacmídeo BacAcPHRVGP foi confirmada por PCR (Figura 8). O DNA do bacmídeo recombinante foi purificado e transfectado em células de inseto. Sete dias após a transfecção, o sobrenadante das células transfectadas foi coletado e o DNA do vírus recombinante (denominado vAcPHRVGP) foi extraído e usado em uma reação de PCR para confirmação da correta inserção do gene RVGP no genoma viral (Figura 9).

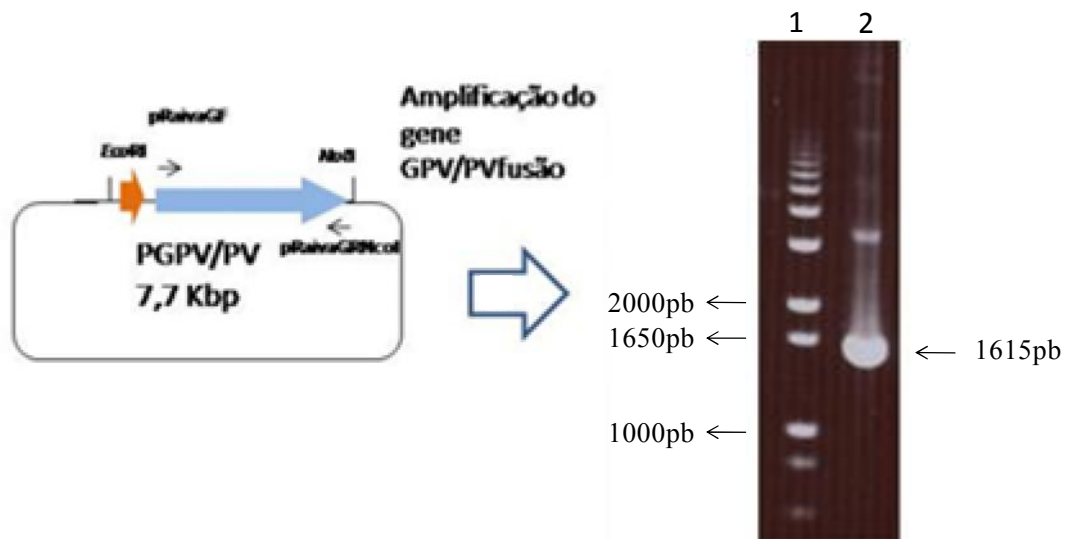


Figura 5 – Amplificação do gene RVGP por PCR

Diagrama da amplificação do gene RVGP a partir do plasmídeo pGPV/PV e eletroforese em gel de agarose (0,8%), mostrando o produto de amplificação por PCR (poço 2) do fragmento de DNA contendo o gene RVGP a partir do DNA do plasmídeo pGPV/PV e os oligonucleotídeos pRaivaF e pRaivaRNcoI. Poço 1 mostra o marcador de massa molecular, 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen). A seta indica o produto da amplificação de 1.615 pb

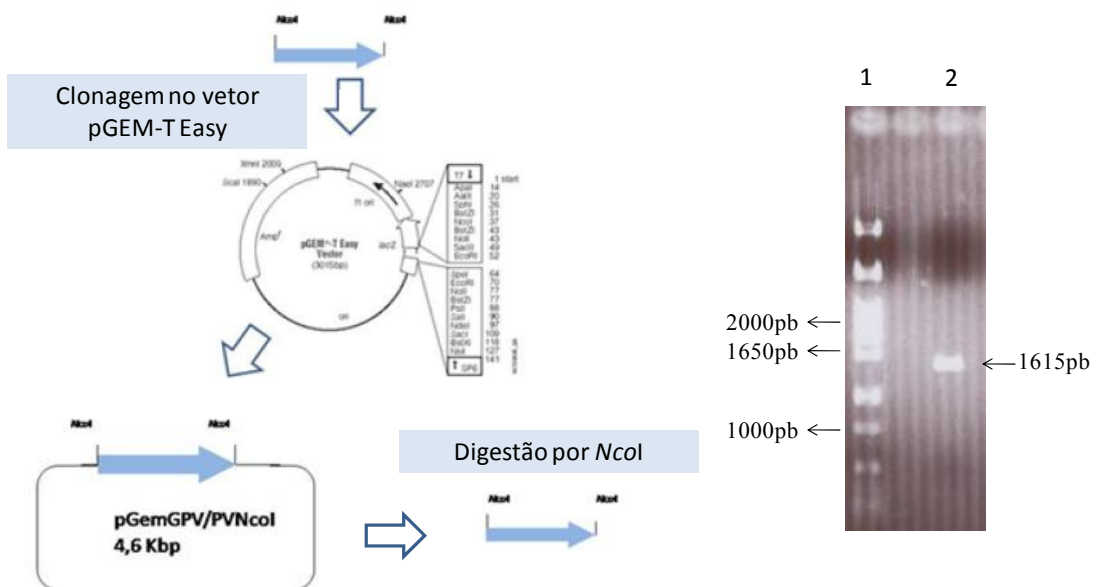


Figura 6 – Construção do plasmídeo pGEMRVGP e digestão com NcoI

Diagrama da clonagem de RVGP em pGEM-T Easy e digestão de pGEMRVGP com NcoI. Poço 1: Marcador – 1 Kb Plus. Poço 2: Eluição do produto da digestão de pGEMGPVNcoI pela enzima NcoI.

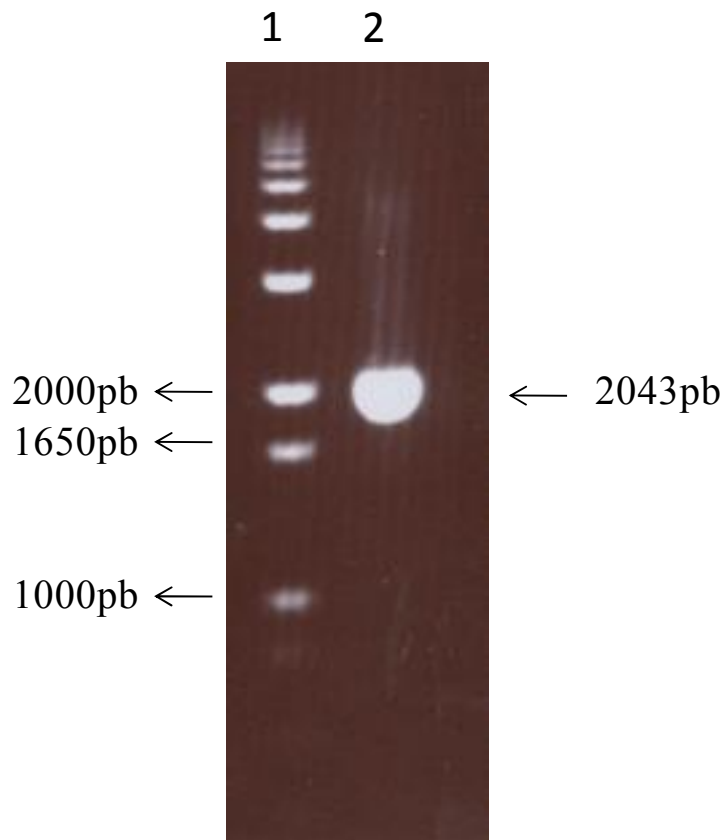
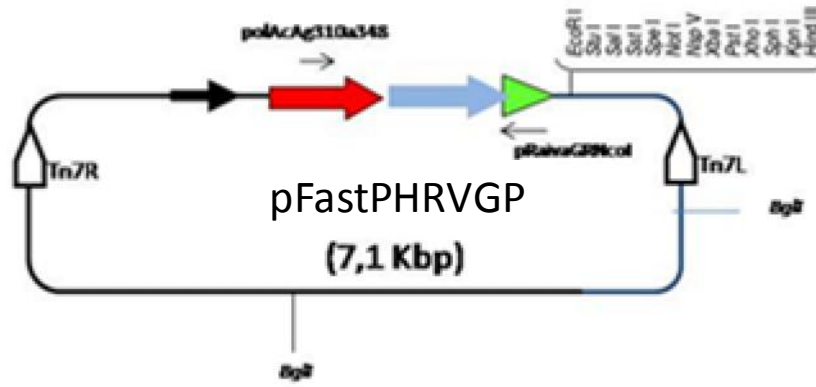


Figura 7 – Confirmação da clonagem do gene RVGP no plasmídeo pFastPH dando origem ao pFastPHRVGP

Diagrama da clonagem de RVGP em pFastPH. Gel de agarose: Poço 1: Marcador – DNA de Fago Lambda digerido com PstI. Poço2: Produto da PCR utilizando como template o plasmídeo pFastPHGPV com os primers polAcAg310a348 e pRaivaGRNcoI. Fragmento de 2043pb.

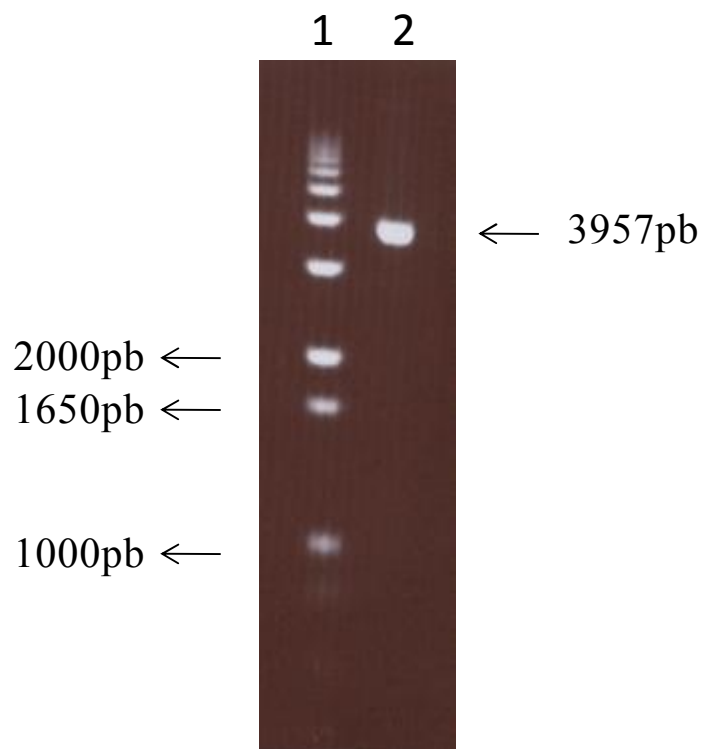
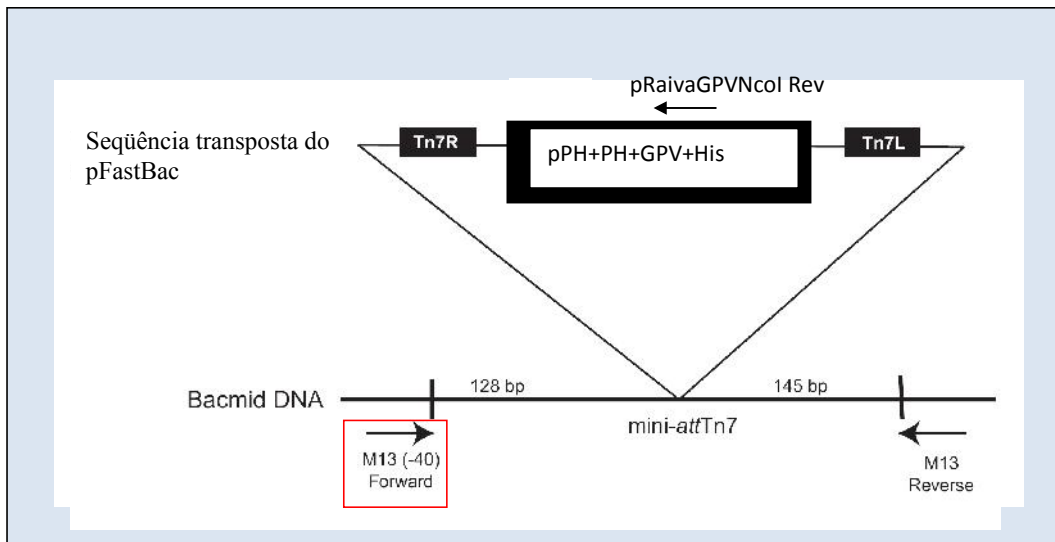


Figura 8 – Confirmação da construção do bacmideo BacPHRVGP

Diagrama da posição dos oligonucleotídeos. Gel de agarose. Poço 1: Marcador – DNA de Fago Lambda digerido com PstI. Poço2: Produto da PCR utilizando como template o bacmideo BacPHRVGP com os primers M13F e pRaivaGRNcoI. Fragmento de 3957pb. BacPHRVGP é o bacmideo obtido após a reação de transposição da região de interesse de pFastPHRVGP para a o genoma da bactéria DH10Bac.

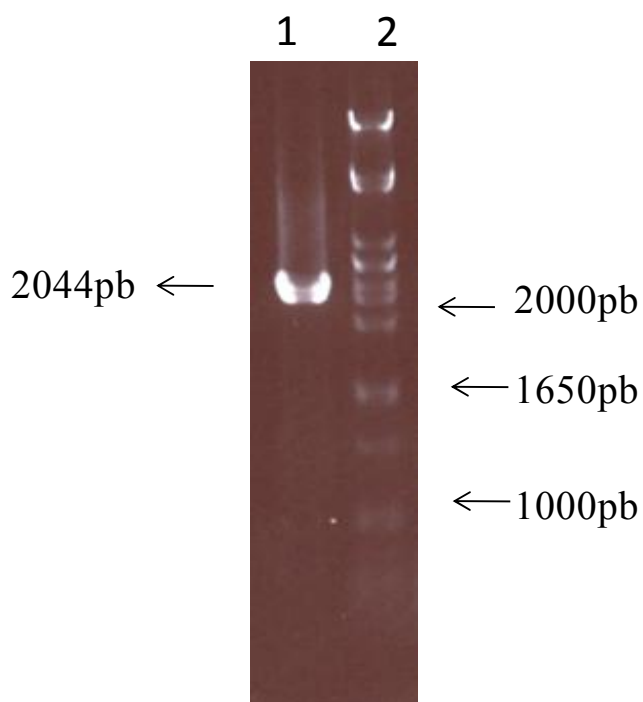
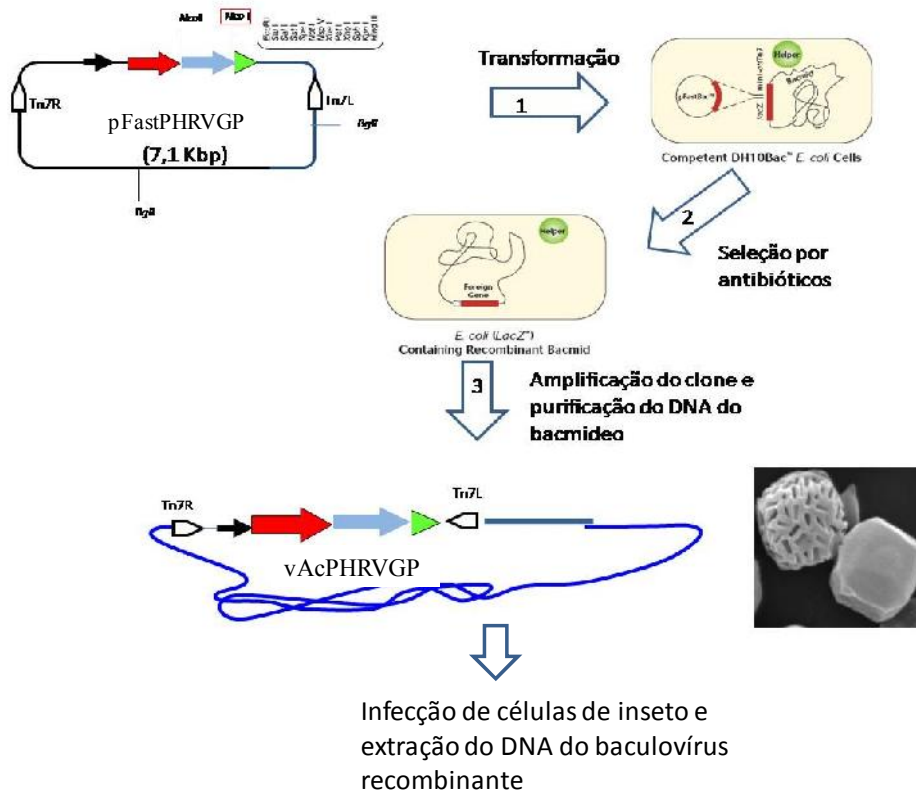


Figura 9 – Presença de RVGP no DNA viral de BV de vAcPHRVGP

Diagrama mostrando a ordem do experimento. Gel de agarose: Poço 1: Produto da PCR utilizando como template DNA viral de BV após 72hpi utilizando o primer reverso pRaivaGRNcoI e o forward polAcAg310a348, Fragmento de 2044pb; Poço 2: Marcador – 1 Kb plus;

4.2. Análise da expressão de proteínas recombinantes em células de inseto infectadas

Uma proteína de cerca de 90 kDa foi detectada em extratos de células de inseto infectadas com vAcPHRVGP por SDS-PAGE e não estava presente em células não infectadas (mock) e células infectadas com o vírus selvagem AcMNPV (Figura 10a).

A proteína de 90 kDa produzida tem o tamanho esperado para a proteína recombinante, correspondendo a 30kDa da proteína polidrina adicionado de 60kDa da forma monomérica de RVGP. A mesma banda foi imunomarcada utilizando a técnica de western blot e com o auxílio de um anticorpo anti-cauda de histidina. Células não infectadas e células infectadas por AcMNPV não apresentaram presença desta proteína nem detecção por esse anticorpo (Figura 10b).

4.3. Purificação e análise ultra-estrutural dos corpos de oclusão isolados do tecido adiposo de larvas de *S. frugiperda* infectadas com vAcPHRVGP

Larvas de *S. frugiperda* infectadas com o vírus vAcPHRVGP tiveram seu tecido adiposo removido e corpos de oclusão foram purificados por centrifugação em um gradiente de sacarose. A banda principal correspondente ao corpo de oclusão recombinante (Figura11a) foi removida do gradiente e analisada em microscópio eletrônico de varredura (Figura11b). A análise por SDS-PAGE deste material mostrou uma proteína de 90 kDa que tem o tamanho esperado para a proteína recombinante (Figura 11c).

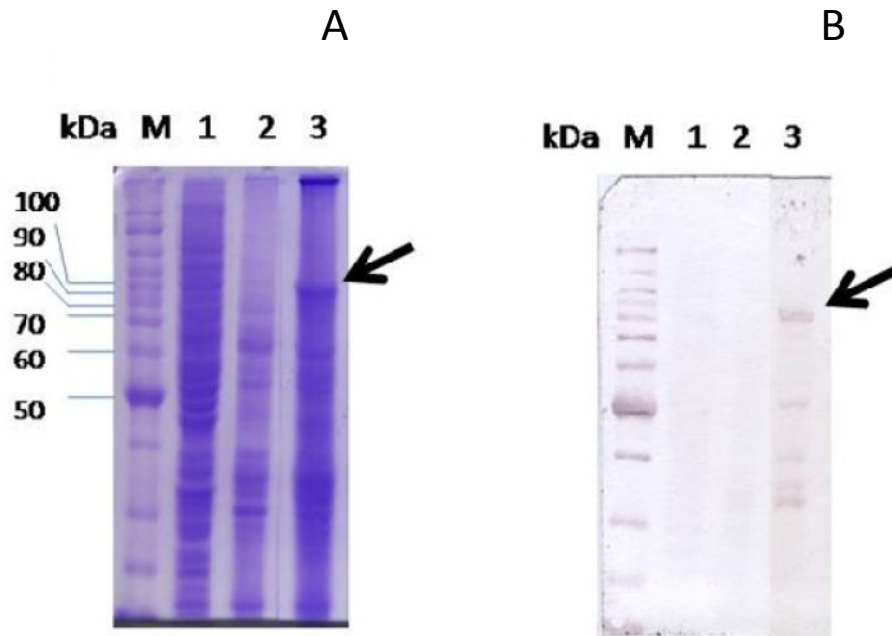


Figura 10 Análise da expressão da proteína recombinante.

A) A análise SDS-PAGE da expressão da proteína RVGP em células de inseto. Poço 1, marcador de massa molecular (Ladder BenchMark™ Protein Prestained - Invitrogen); Poço 2, células não infectadas Tn5B; Poço 3, células Tn5B infectadas com o tipo selvagem AcMNPV; Poço 4, células Tn5B infectadas com vAcPHRVGP. Setas indicam uma banda de cerca de 90 kDa em células Tn5B infectadas com vAcPHRVGP.

B) Análise de Western blot dos extratos proteicos de um gel como mostrado em A. A membrana foi imunomarcada com anti-6xHIS (Promega) como anticorpo primário, incubadas com anti-IgG de coelho conjugado a enzima fosfatase-alcalina (AP)-e a proteína foi detectada utilizando o substrato NBT / BCIP. A mesma banda de 90 kDa do SDS-PAGE gel é indicada com uma seta na membrana, que foi reconhecida pelo anticorpo anti-HIS.

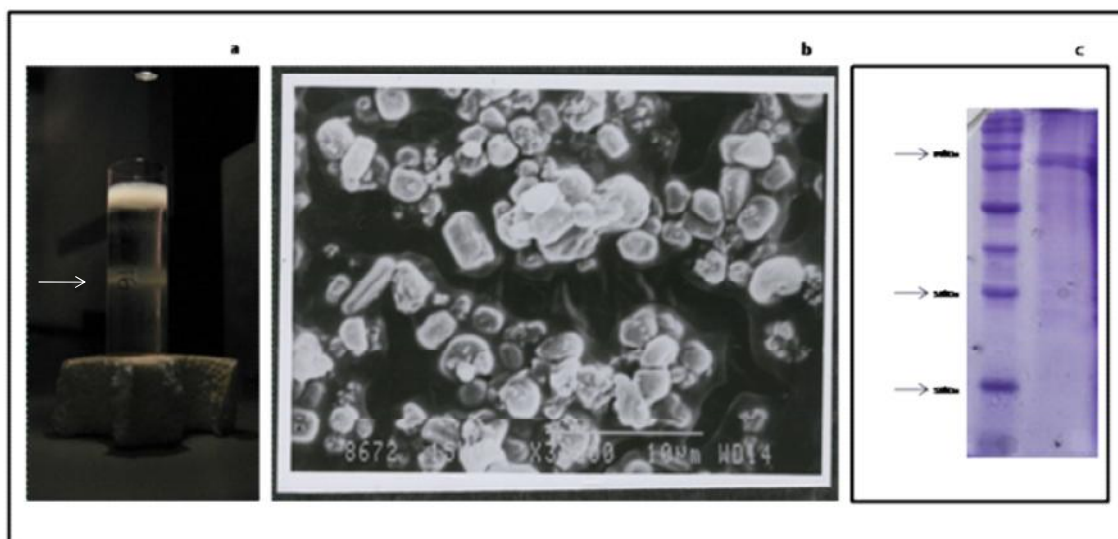


Figura 11 - Purificação e análise ultra-estrutural dos corpos de oclusão vAcPHRVGP nas larvas infectadas de *S. frugiperda*

- a) Tubo de ultracentrifuga após centrifugação de gradiente de sacarose contendo extrato do tecido adiposo de larvas de *S. frugiperda* infectadas pelo vAcPHRVGP. A banda principal correspondente ao corpo de oclusão recombinante foi evidenciada (seta) e removida do gradiente.
- b) Fotomicrografia de corpos de oclusão purificados feita por um microscópio eletrônico de varredura.
- c) SDS-PAGE dos corpos de oclusão purificados, mostrando uma banda protéica principal de aproximadamente 90 kDa.

4.4. Análise por microscopia confocal

A microscopia confocal foi realizada com o objetivo de detectar a proteína recombinante RVGP expressa em células de inseto. Anticorpos policlonais e monoclonais contra proteínas do vírus da raiva e proteínas com cauda de histidina (His-tagged) respectivamente, foram capazes de detectar a presença da proteína recombinante RVGP no citoplasma de células Tn5B infectadas com vAcPHRVGP (Figura 12), indicando que a proteína recombinante é antígenicamente semelhante à proteína selvagem.

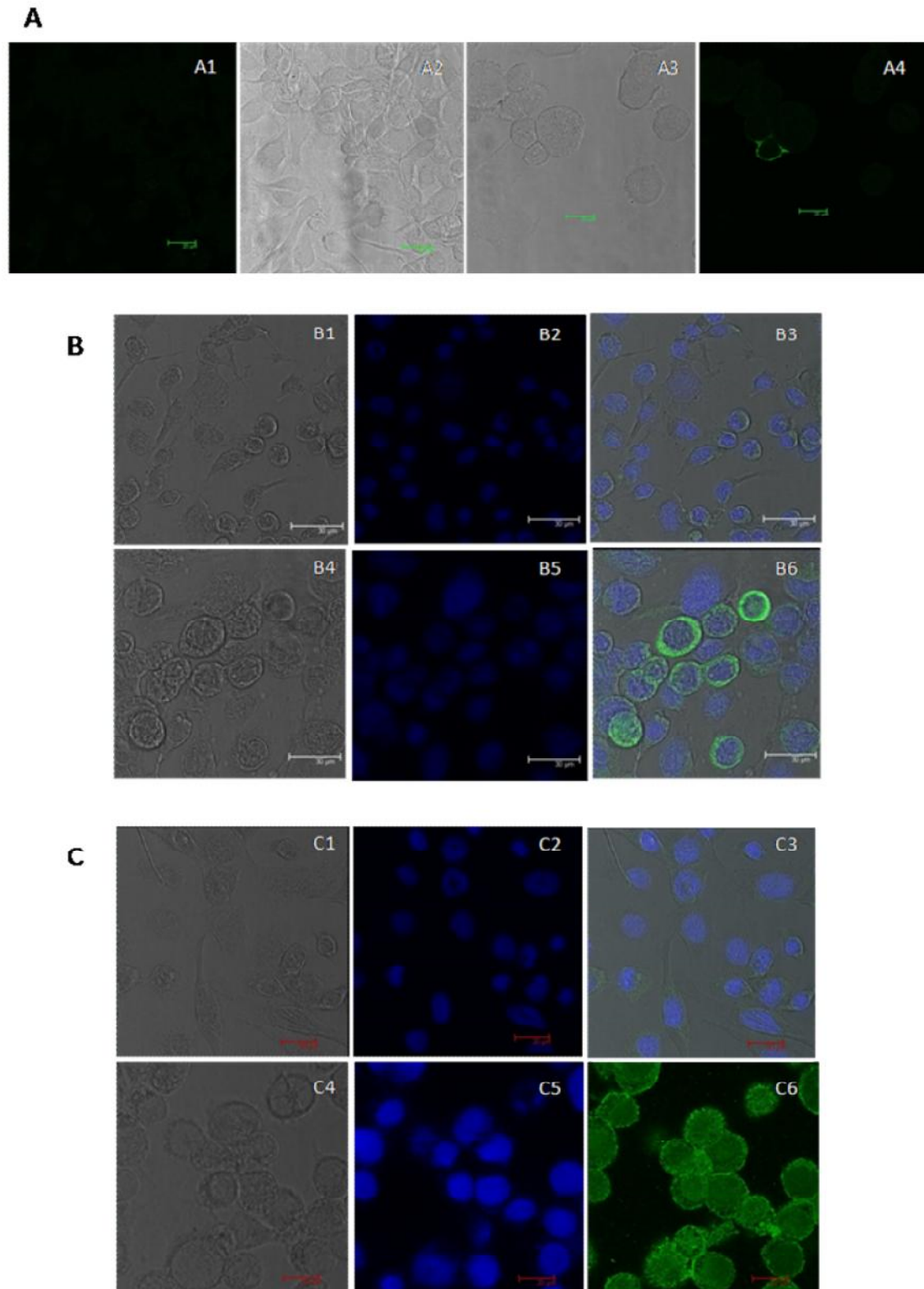


Figura 12 - Imunodeteção da proteína RVGP e análise estrutural de células infectadas pelo inseto vAcPHRVGP

Células Tn5B foram infectadas com vAcPHRVGP (10 pfu/célula) e 72 h p.i., as células foram fixadas com acetona gelada e incubadas com um anticorpo policlonal anti-rábico da Zoonoses (conjugado com isotiocianato de fluoresceína) ou com um anticorpo policlonal anti-rábico do Butantan. Anticorpos anti-

RVGP ligados à célula foram detectados por anticorpo anti-coelho conjugado ao fluoróforo Alexa488 através de microscopia de fluorescência (verde). Núcleos celulares foram visualizados por coloração DAPI (azul).

(A) Análise confocal da imunomarcacão com anticorpo policlonal anti-rábico(Zoonoses). A1: Células Tn5B não infectadas ; A2: Células Tn5B não infectadas (campo claro). A3: Células TN5B infectadas com vAcPHRVGP (campo claro). A4: Células TN5B infectadas com vAcPHRVGP .

(B) Análise confocal da imunomarcacão com anticorpo anti-His. B1: Células Tn5B não infectadas (campo claro). B2: Células Tn5B não infectadas (coloração DAPI). B3: Células Tn5B não infectadas (sobreposição). B4: Células TN5B infectadas com vAcPHRVGP (campo claro). B5: Células TN5B infectadas com vAcPHRVGP (DAPI). B6: Células TN5B infectadas com vAcPHRVGP (sobreposição).

(C) Análise confocal da imunomarcacão usando um segundo anticorpo policlonal anti-rábico (Butantan). C1: Células Tn5B não infectadas (campo claro). C2: Células Tn5B não infectadas (coloração DAPI). C3: Células Tn5B não infectadas (sobreposição). C4: Células TN5B infectadas com vAcPHRVGP (campo claro). C5: Células TN5B infectadas com vAcPHRVGP (DAPI). C6: Células TN5B infectadas com vAcPHRVGP (sobreposição).

5. Discussão

Neste trabalho foi utilizada uma nova estratégia para a expressão de uma forma recombinante da RVGP fusionada com a principal proteína do corpo de oclusão do baculovírus AcMNPV em células de inseto para ser utilizada como uma ferramenta de diagnóstico e / ou uma fonte para antígenos em uma vacina recombinante. O baculovírus recombinante vAcPHRVGP contendo o gene fusionado foi contruído e utilizado para infectar células e larvas de insetos. A proteína recombinante foi expressa como uma proteína de 90 kDa, que também foi reconhecida pelo anti-soro específico contra o vírus da raiva também contra anticorpos específicos para a cauda de histidina. O diagnóstico de infecção pelo vírus da raiva é considerada difícil, pois nenhuma das técnicas atualmente utilizadas têm 100% de sensibilidade e especificidade (Muhamuda *et al.*, 2006). Os testes *ante-mortem* com base na demonstração do antígeno da raiva são invasivos e consistem de esfregaço corneal e secção de biópsia de pele congelada. Estes testes têm sensibilidade de 30% e 50%, respectivamente (Noah *et al.*, 1998). Até mesmo as mais recentes técnicas moleculares que utilizam amostras clínicas não-invasivas, como saliva para detectar o RNA viral por RT-PCR, não são suficientemente sensíveis. Muhamuda *et al.* (2006) descreve que antígenos e anticorpos anti-rábicos são por vezes relatados positivos no líquido cefalorraquidiano (LCR), e que essa informação poderia ser usada para encontrar imunocomplexos específicos da raiva no LCR utilizando um ELISA de captura com base em anticorpos monoclonais contra as proteínas N e G do vírus da raiva. Infelizmente o antígeno do vírus da raiva atualmente utilizado para detecção de anticorpos do paciente é o vírus completo, o que representa grande risco de manipulação pelo profissional de saúde, como a raiva é uma encefalite viral aguda e fatal (Hemachudha *et al.*, 2006).

O uso de proteínas recombinantes do vírus ou partes ainda menores do mesmo, pode tornar o diagnóstico mais seguro para os profissionais de saúde. Isto também poderia reduzir os custos, já que hoje em dia o uso do vírus da raiva como antígeno para o diagnóstico é muito caro, pois requer uma estrutura de biossegurança, com uso de animais e cuidados específicos. Um diagnóstico mais precoce que pode realmente ser realizado antes da morte do indivíduo testado é essencial para o controle rápido da doença, como a disseminação da raiva requer medidas de contenção. Casos subnotificados levam à respostas de emergência atrasadas e o risco de aumento de casos de raiva humanos e em animais (Germano, 1994). O uso de RVGP recombinante poderia ser estendido para o desenvolvimento de uma vacina mais segura, que não incluísse o vírus.

A RVGP foi uma das primeiras proteínas a ser estudada pela sua importância antigênica na infecção com o vírus da raiva (Benmansour *et al.*,1991). A RVGP é organizada como um trímero, é a única proteína exposta na superfície do vírion e é responsável por interagir com receptores celulares mediando uma fusão de membranas pH-dependente, e promovendo a entrada do vírus de um sítio periférico para o sistema nervoso (Pulmanusahakul *et al.*,2008). Além disso, RVGP está envolvida na propagação transsináptica dentro do sistema nervoso central e é um dos principais contribuintes para a patogenicidade do vírus da raiva. Isto é devido à interação eficiente desta proteína com receptores do hospedeiro celular que promovem a absorção eficaz do vírus, resultando em maior virulência. Infecções com vírus que possuem RVGP deficiente mostram-se restritas às células inicialmente infectadas e não transferidas para os neurônios secundários causando nenhum sintoma detectável (Etessami *et al.*,2000).

Je *et al.* (2003) descreveram a produção de um baculovírus recombinante em que uma proteína heteróloga GFP, foi efetivamente incorporada ao corpo de oclusão viral

(poliedros) do baculovírus AcMNPV. Isso também foi feito com peptídeos antimicrobianos (AMPs), em sistemas de expressão recombinante bacteriana. AMPs são agentes antimicrobianos que não podem ser livremente produzidos em bactérias justamente pela toxicidade esperada para estas células hospedeiras. Quando fusionado à proteína poliedrina, AMPs não são tóxicos e ganham estabilidade para serem expressos em um sistema bacteriano. Na fusão com AMP, o corpo de oclusão viral não é formado corretamente. Agregados de proteína fusionados à poliedrina são utilizados apenas como uma estratégia para a obtenção de proteínas recombinantes em bactérias sem o risco de matá-las durante o processo. Mais tarde, a proteína recombinante é purificada e clivada a partir da proteína de fusão (Wei *et al.*,2005). Esta estratégia também foi usada com proteínas inseticidas (δ -endotoxinas) de *Bacillus thuringiensis* (Bt) que têm sido utilizadas como bioinseticidas para controlar populações de pragas de insetos (Chang *et al.*,2003).

A vacina anti-rábica é produzida em linhagens de células de macaco (células Vero) ou células de embrião de galinha purificada (Ravanfar *et al.*, 2009) e alguns países ainda utilizam a vacina Fuenzalida (Diaz *et al.*,1989), feita por meio de purificação do vírus a partir de cérebros de camundongos infectados. Esta vacina descrita por último é menos potente e pode causar efeitos adversos graves em seres humanos, incluindo a encefalomielite alérgica (Rupprecht *et al.*,2002). Soro anti-rábico produzido por inoculação do vírus inativado em cavalos também é usado em pessoas mordidas por animais selvagens raivosos, ou como parte da infecção pós-tratamento (Plotkin, 2000).

Hoje, as vacinas produzidas em culturas de células de mamíferos são inativadas, purificadas e concentradas (Ikonomidou *et al.*,2003). A vantagem das vacinas produzidas em cultura de células de mamíferos, é o alto nível de imunogenicidade obtida, uma

maior pureza do antígeno e eficácia comprovada em ensaios clínicos. A principal desvantagem dessas vacinas são os altos custos de produção (Plotkin, 2000). Assim, a perspectiva de expressar a glicoproteína do vírus da raiva em cultura de células de que facilitem o manuseio, tais como células de inseto, é uma opção muito importante para a produção de antígenos vacinais e de diagnóstico.

Células de inseto têm várias vantagens como sistemas de expressão quando comparadas às células de mamíferos, especialmente apresentando vantagens como a facilidade de cultura, maior tolerância a osmolaridade, concentração do produto e os níveis de expressão (Ikonomou *et al.*,2003). O sistema de expressão em *Drosophila* (DES) consiste em utilizar células de *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (S2) e vetores constitutivos ou induzíveis previamente amplificados em bactérias. DES é descrito como um bom sistema de expressão e apresenta características vantajosas com relação a bioprodução em larga escala como a alta densidade de células alcançada, utilização de meio de cultura de baixo custo e possibilidade de produção contínua (Lemos *et al.*,2009). DES tem sido utilizado para expressar RVGP e sua expressão foi avaliada quantitativamente e qualitativamente (Astray *et al.*, 2008; Batista *et al.*, 2008; Bovo *et al.*, 2008; Pamboukian *et al.*, 2008; Swiech *et al.*, 2008). A proteína produzida tem uma oligomerização preservada e glicosilação adequada, mantendo a sua atividade biológica de induzir resposta imune protetora (Yokomizo *et al.*,2007). Sua produção em alta qualidade é um modelo promissor para a expressão de outras glicoproteínas. (Ventini *et al.*,2010).

A utilização de transfecções com gene estáveis tem algumas vantagens quando comparada ao sistema de expressão de Baculovírus: a ausência da etapa de infecção permite um sistema de bioprocessamento contínuo e não há perda de infectividade com passagens um número crescente pois as células são independentes da infecção pelo vírus

(Yokomizo *et al.*,2007). Apesar disso, baculovírus são usados com sucesso para produzir RVGP (Drigs *et al.*, 1999; Prehaud *et al.*, 1989; Tordo *et al.*, 1993) e podem ser usados tanto em células de inseto (Sissoeff *et al.*, 2005) quanto em células de mamíferos (Drigs *et al.*, 1999). Também podem ser usados em linhagens de células de inseto modificadas capazes de produzir glicoproteínas recombinantes "humanizadas", com cadeias laterais de oligossacarídeos, as quais são geralmente endereçadas na célula como proteínas "humanizadas" por sua semelhança com produtos proteicos das células de mamíferos (Jarvis, 2003). A RVGP produzida com o sistema de expressão de Baculovírus é também descrita como um estímulo imunológico em vacinas de DNA, melhorando a produção de anticorpos neutralizantes (Rath *et al.*,2005). Testes utilizando a imunização com camundongos já foram realizados induzindo a produção de anticorpos neutralizantes específicos anti-RVGP e fortes respostas de células T (Huang *et al.*,2011). A mesma estratégia já está sendo testada para RVGP recombinante produzida pela infecção de células de inseto com vAcPHRVGP. O desafio letal também está sendo realizado com camundongos previamente imunizados com RVGP e logo a funcionalidade da RVGP produzida neste trabalho será totalmente avaliada.

Viral-like-particles (VLP) ou ainda partículas semelhantes ao vírus vêm sendo produzidas em células de insetos e utilizadas em ensaios de vacinas de subunidade para prevenir a infecção pelo vírus da gripe e estudos preliminares demonstraram que estes VLPs são capazes de induzir imunidade contra algumas cepas do vírus influenza (Quan *et al.*,2007). Gut-Winiarska *et al.* (2000) desenvolveu um teste de diagnóstico de ELISA direto usando uma glicoproteína B recombinante (GB), expressa em baculovírus para detectar o vírus da pseudorraiva. Ele mostrou alta sensibilidade e especificidade quando comparado com outros dois testes comerciais com o vírus inteiro. Recentemente, uma vacina baseada no sistema baculovírus de expressão, conferindo proteção contra o

papilomavírus humano (HPV) (agente causador da neoplasia cervical) foi aprovada para uso no Brasil e o Ministério da Saúde está considerando a possibilidade de adotá-la em seu programa de vacinação anual (European medicine Agency).

Em conclusão, nossos dados mostram que a proteína recombinante RVGP derivada da glicoproteína G, expressada em células de inseto fusionada à poliedrina de um baculovírus é reconhecida por anticorpos monoclonais e policlonais que detectam a infecção por raiva no diagnóstico de rotina e, portanto, pode ser útil para diferentes aplicações médicas, desde melhorar o diagnóstico da doença a servir como fonte de antígenos para o desenvolvimento de uma vacina de subunidade.

6.Perspectivas

6.1 Imunizar camundongos com a proteína recombinante PHRVGP e observar se esta é capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes e proteger contra um ensaio letal com o vírus da raiva.

7.Referências bibliográficas

Albertini AAV, Schoehn G, Weissenhorn W, Ruigrok RWH. **Structural aspects of rabies virus replication.** *Cell. Mol. Life Sci.* 2008, **65**:282 – 294.

Astray R M, Augusto E, Yokomizo A Y, Pereira C A: **Analytical approach for the extraction of recombinant membrane viral glycoprotein from stably transfected *Drosophila melanogaster* cells.** *Biotechnology Journal*,2008,**3**: 98–103.

Bassi EJ, Vernal J, Zanluca C, Terenzi H, Zanetti CR: **Expression, purification and immunodetection of a recombinant fragment (residues 179–281) of the G protein from rabies virus ERA strain.** *Protein Expression and Purification* 2008,**59**: 309–313.

Batista F R X, Pereira C A, Mendonça R Z, Moraes A M: **Formulation of a protein-free medium based on IPL-41 for the sustained growth of *Drosophila melanogaster* S2 cells.** *Cytotechnology* 2008, **57**:11–22.

Benmaamara R, Astrayc RM, Wagnera R, Pereira CA: **High-level expression of rabies virus glycoprotein with the RNA-based Semliki Forest Virus expression vector.** *Journal of Biotechnology* 2009, **139**:283–290.

Benmansour A, Leblois H, Coulon P, Tuffereau C, Gaudin Y, Flamand A, Lafay F: **Antigenicity of Rabies Virus Glycoprotein.** *Journal of Virology* 1991,**65 (8)**:4198-4203.

Bovo R, Galesi A L L, Jorge S A C, Piccoli R A M, Moraes A M, Pereira C A, Augusto E F P: **Kinetic response of a *Drosophila melanogaster* cell line to different medium formulations and culture conditions.** *Cytotechnology* 2008, **57**:23–35.

Brochier B, Costy F, Pastoret PP. **Elimination of fox rabies from Belgium using a recombinant vaccinia-rabies vaccine:an update.** *Veterinary Microbiology* 1995, **46**: 269-279.

CDC Morbidity and Mortality Weekly Report. Human Rabies Prevention – United States, 2008.

Chang JH, Choi JY, Jin BR, Roh JY, Olszewski JA, Seo SJ, O'Reilly DR, Jea YH: **An improved baculovirus insecticide producing occlusion bodies that contain Bacillus thuringiensis insect toxin.** *Journal of Invertebrate Pathology* 2003, **84**:30-37.

Charlton KM, Artois M, Prevec L, Campbell JB, Casey GA, Wandeler AI, Armstrong J. **Oral rabies vaccination of skunks and foxes with a recombinant human adenovirus vaccine.** *Arch Virol* 1992,**123**:169-80

Chelbi-Alix MK, Vidy, A, Bougrini, JE, Blondel, D. **Rabies Viral mechanisms to escape the IFN System: The viral protein P Interferes with IRF-3, Stat 1 and PML nuclear bodies.** *Journal of Interferon and Cytokine Research* 2006, **26**: 271-280.

Cleaveland S, Kaare M, Knobel D, Laurenson MK. **Canine vaccination – Providing broader benefits for disease control.** *Veterinary Microbiology* 2006, **117**: 43-50.

Costa MHO. **Construção de vetor baculoviral modificado capaz de produzir proteínas fusionadas à poliedrina.** Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular – Departamento de Biologia celular, Pós Graduação em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

Desmézières E, Maillard A P, Gaudin Y, Tordo N, Perrin P: **Differential stability and fusion activity of Lyssavirus glycoprotein trimers.** *Virus Research* 2003,**91**:181-187.

Diaz AM, Dellepiane N, Palomo LF. **Antirabies vaccine from the brain of the suckling rat: antigen composition and immunogenic capacity.** *Bol Ofic Sanit Panam* 1989, **107**: 185–195.

Drigs A, Jallet C, Chambert B, Tordo N, Perrin P: **Is there an advantage to including the nucleoprotein in a rabies glycoprotein subunit vaccine?.** *Vaccine.* 1999.**17**: 1549-1557.

Etessami R, Conzelmann KK, Ghotbi BF, Natelson B, Tsiang H, Ceccaldi P: **Spread and pathogenic characteristics of a G-deficient rabies virus recombinant: an *in vitro* and *in vivo* study.** *Journal of General Virology* 2000, **81**:2147-2153.

European Medicines Agency: **Cervarix suspension for injection - Human Papillomavirus vaccine [Types 16, 18] (Recombinant, adjuvanted, adsorbed).** *European public assessment Reports*
[http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000721/WC500024632.pdf]

Gaudin, Y. **Rabies Virus-induced membrane fusion pathway.** *The Journal of Cell Biology* 2000, **150(3)**: 601-611.

Germano PML. **Avanços na pesquisa da Raiva.** *Revista de Saúde Pública* 1994, **28(1)** 86-91.

Gómez-Sebastián S, Pérez-Filgueirab DM., Gómez-Casadob E, Nuñezb MC, Sánchez-Ramosa I., Tabarés E, EscribanoJM: **DIVA diagnostic of Aujeszky's disease using**

an insect-derived virus glycoprotein E. *Journal of Virological Methods*.2008.**153**: 29–35.

Granados RR, Guoxun L, Derskse ACG, Mckenna KAA: **A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single nuclear polyhedrosis virus.** *J Invertebr Pathol* 1994, **64**:260-266.

Gut-Winiarska M, Jacobs L, Kerstens H, Bienkowska-Szewczyk K: **A highly specific and sensitive sandwich blocking ELISA based on baculovirus expressed pseudorabies virus glycoprotein B.** *J Virol Methods* 2000, **88**:63-71.

Hemachudha T, Sunsaneewitayakul B, Desudchit T, Suankratay C, Sittipunt C, Wacharapluesadee S, Khawplod P, Wilde H, Jackson AC: **Failure of therapeutic coma and ketamine for therapy of human rabies.** *Journal of NeuroVirology* 2006, **12**:407-409.

Huang H, Xiao S, Qin J, Jiang Y, Yang S, Li T, Gao Y, Li Z, Li T, Su X, Ruan Y, Xu F, Wang H, Chen H, Xia X: **Construction and immunogenicity of a recombinant pseudotype baculovirus expressing the glycoprotein of rabies virus in mice.** *Arch Virol*. 2011.

Ikonomou L, Schneider YJ, Agathos SN. **Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2003, **62**:1–20.

Ito FH. Revisão sobre Raiva dos herbívoros. Adaptado do texto do Dr. Fumio Honma Ito. In: <http://www.agricultura.gov.br>.

Jacob Y, Badrane H, Ceccaldic PE, Tordo NL: **Cytoplasmic Dynein LC8 Interacts with Lyssavirus Phosphoprotein.** *Journal of Virology* 2000, **74 (21)**:10217-10222.

Jallet C., Jacob Y., Bahloul C., Drings A., Desmezieres E., Tordo N, Perrin P., **Chimeric lyssavirus glycoproteins with increased immunological potential**, *J. Virol.* 1993, **73**: 225–233.

Jarvis D L: **Developing baculovirus-insect cell expression systems for humanized recombinant glycoprotein production**. *Virology*.2003.**310**: 1–7.

Je YH, Jin BR, Park HW, Roh JY, Chang JH, Seo SJ, Olszewski JA, O'Reilly DR, Kang SK: **Baculovirus Expression Vectors that Incorporate the Foreign Protein into Viral Occlusion Bodies**. *BioTechniques* 2003, **34(1)**:81-87.

Knobel D, Cleaveland S, Coleman PG, Fevre E, Meltzer MJ, Miranda MEG, Shaw A, Zinsstag Z, Meslin FX. **Re-evaluating the burden of rabies in Asia and Africa**. *Bull. World Health Organ* 2005, **83**: 360-368.

Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL: **Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells**. *Nat Biotechnol* 2005, **23(5)**:567-575.

Lackay SN, Kuang Y, Fu ZF. **Rabies in small animals**. *Veterinary clinics Small animal practice* 2008, **38**:851-861.

Laemmli UK. **Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature* 1970, **227**:680-685.

Lafay F, Benmansour A, Chebli K, Flamand A: **Immunodominant epitopes defined by a yeast-expressed library of random fragments of the rabies virus glycoprotein map outside major antigenic sites**. *Journal of General Virology* 1996, **77**: 339 346.

Lemos MAN, Santos ASS, Astray RM, Pereira CA, Jorge SAC: **Rabies virus glycoprotein expression in Drosophila S2 cells. I: Design of expression/selection vectors, subpopulations selection and influence of sodium butyrate and culture medium on protein expression.** *Journal of Biotechnology*,2009,**143**:103–110.

Li, X, Luo J, Wang S, Shen Y, Qiu Y, Wang X, Deng X, Liu X, Bao W, Liu P, Zhou J, Ding C, Ma Z: **Engineering, expression, and immuno-characterization of recombinant protein comprising multi-neutralization sites of rabies virus glycoprotein.***Protein Expression and Purification* 2010,**70**:179-183.

Lodmell DL, Esposito JJ, Ewalt JC. **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* 2004, **22**:3329–3333.

Luo M, Green TJ, Zhang X, Tsao J, Qiu S: **Conserved characteristics of the rhabdovirus nucleoprotein.** *Virus Research* 2007, **129(2)**:246-251.

Matos TGT, Giugliano LG, Ribeiro BM, Bao SN: **Structural and ultrastructural studies of *Anticarsia gemmatalis* midgut cells infected with the baculovirus *A. gemmatalis* nucleopolyhedrovirus.** *Int J Insect Morphol Embryol* 1999, **28**:195-201.

McGarvey PB, Hammond J, Dienelt MM, Hooper DC, Fu ZF, Dietzschold B, Koprowski H, Michaels FH: **Expression of the Rabies Virus Glycoprotein in Transgenic Tomatoes.** *Nature Biotechnology*,1995,**13**:1484-1487.

Morimoto K, Mcgettigan JP, Foley HD, Hooper DC, Dietzchold B, Schnell MJ. **Genetic engineering of live rabies vaccines.** *Vaccine* 2001,**19**: 3543-3551.

Moscardi F: **Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera.** *Annu Rev Entomol* 1999, **44**:257-289

Motoi Y, Satoa K, Hattac H, Morimotod K, Inouea S, Yamada : **Production of rabies neutralizing antibody in hen's eggs using apart of the G protein expressed in Escherichia coli.** *Vaccine* 2005,**23**: 3026–3032.

Muhamuda K, Madhusudana SN, Desai RA: **Presence of rabies specific immune complexes in cerebro-spinal fluid can help in ante-mortem diagnosis of human paralytic rabies.** *Journal of Clinical Virology* 2006, **37**:162-167.

Noah DL, Drenzek CL, Smith JS. **The epidemiology of human rabies in the United States, 1980 to 1996.** *Ann Intern Med* 1998;**11**:922–30.

O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA: *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual.* New York: W.H. Freeman and Company; 1992

Osorio JE, Tomlinson CC, Frank RS, Haanes EJ, Rushlow K, Haynes JR, Stinchcomb DT. **Immunization of dogs and cats with a DNA vaccine against rabies virus.** *Vaccine* 1999, **17**: 1109-1116

Pamboukian M M, Jorge S A C, Santos M G, Yokomizo A Y, Pereira C A, Tonso A: **Insect cells respiratory activity in bioreactor.** *Cytotechnology* 2008, **57**:37–44.

Pastoret PP, Brochier B. **Development of a recombinant vaccinia-rabies vaccine for oral vaccination of foxes against rabies.** *Devel Biol Standard* 1993, **79**:105-11.

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

Plotkin, SA. **Rabies.** *Clinical Infectious Diseases* 2000, **30**: 4–12

Prehaud, C., Takehara, K., Flamand, A., Bishop, D. H., **Immunogenic and protective properties of rabies virus glycoprotein expressed by baculovirus vectors.** *Virology* 1989, **173**, 390–399.

Prevec L, Campbell JB, Christic SB, Belbeck L, Graham LF. **A recombinant human adenovirus vaccine against rabies.** *J Infect Dis* 1990, **161**:27-30

Pulmanausahakul R, Li J, Schnell MJ, Dietzschold B: **The Glycoprotein and the Matrix Protein of Rabies Virus Affect Pathogenicity by Regulating Viral Replication and Facilitating Cell-to-Cell Spread.** *Journal of Virology* 2008, **82(5)**:2330-2338.

Quan FS, Huang C, Compans RW, Kang SM: **Virus-like particle vaccine induces protective immunity against homologous and heterologous strains of influenza virus.** *J Virol* 2007, **81(7)**:3514-3524.

Raiva CID 10: A82 In: Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica** – 6. ed. – Brasília 2005: 816 p. Série A. Normas e Manuais Técnicos.

Rath A, Choudhury S, Batra D, Kapre SV, Rupprecht CE, Gupta SK: **DNA vaccine for rabies: Relevance of the trans-membrane domain of the glycoprotein in generating an antibody response.** *Virus Research* 2005;**113**:143–152.

Ravanfar P, Satyaprakash A, Creed R, Mendoza N: **Existing antiviral vaccines.** *Dermatologic Therapy* 2009, **22**:110-128.

Rupprecht CE, Hanlon CA, Hemachudha T. **Rabies reexamined.** *Lancet Infectious Disease* 2002, **2** 243–327.

Rupprecht CE, Wiktor TJ, Johnston DH, Hamir AN, Dietzschold B, Wunner WH, Glickman LT, Koprowski H. **Oral immunization and protection of raccoon (Procyon lotor) with a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, **83**:7947-50.

Sakamoto S, Ide T, Tokiyoshi S, Nakao J, Hamada F, Yamamoto M, Grosby JA, Nic Y, Kawachi A: **Studies on the structures and antigenic properties of rabies virus glycoprotein analogues produced in yeast cells.** *Vaccine*,1999,**17**: 205-218.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: **Molecular Cloning: a laboratory manual.** *New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press*; 1989.

Schaefer R, Batista HBR, Franco AC, Rijsewijk FAM, Roehle PM. **Studies on antigenic and genomic properties of Brazilian rabies virus isolates.** *Veterinary Microbiology* 2005, **107**: 161-170.

Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Protocolo para tratamento da raiva humana no Brasil. *Epidemiol. Serv. Saúde* 2009, **18(4)**: 385-394

Seif I, Coulon P, Rollin PE, Flammand A. **Rabies Virulence: Effect on Pathogenicity and Sequence Characterization of Rabies Virus Mutations Effecting Antigenic Site III of the Glycoprotein.** *Journal of Virology* 1985, **53(3)**: 926-934.

Sissoeff L, Mousli M, England P, Tuffereau C: **Stable trimerization of recombinant rabies virus glycoprotein ectodomain is required for interaction with the p75NTR receptor.** *Journal of General Virology.* 2005, **86**:2543–2552.

Swiech K, Silva da C S, Arantes M K, Santos dos, A S, Astray R M, Pereira C A, Suazo C A T: **Characterization of growth and metabolism of *Drosophila melanogaster* cells transfected with the rabies-virus glycoprotein gene.** *Biotechnology and Applied Biochemistry* 2008, **49**: 41–49.

Takayama, N. **Rabies: a preventable but incurable disease.** *J. Infect Chemother* 2008, **14**:8-14.

Tordo, N., Bourhy, H., Sather, S., Ollo, R., **Structure and expression in baculovirus of Mokola virus glycoprotein: an efficient recombinant vaccine.** *Virology* 1993, **194**, 59–69.

Ventini DC, Astray RM, Lemos MAN, Jorge SAC, Riquelme CCR, Suazo CAT, Tonso A, Pereira CA: **Recombinant rabies virus glycoprotein synthesis in bioreactor by transfected *Drosophila melanogaster* S2 cells carrying a constitutive or an inducible promoter.** *Journal of Biotechnology*,2010,**146**:169–172.

Wang X, Ooi BG, Miller LK: **Baculovirus vectors for multiple gene expression and for occluded virus production.** *Gene* 1991, **100**: 131-137.

Wei Q, Kim YS, Seo JH, Jang WS, Lee HL, Cha HJ: **Facilitation of Expression and Purification of an Antimicrobial Peptide by Fusion with Baculoviral Polyhedrin in Escherichia coli.** *Applied And Environmental Microbiology* 2005, **71(9)**:5038-5043.

WHO Expert Consultation on Rabies. Rabies Prevention and Control, Vaccines, Rabies virus, Epidemiologic Surveillance. 2004, Geneva, Switzerland. WHO Technical Report Series; 931.

Wiktor TJ, Macfarlan RI, Reagan KJ, Dietzschold B, Curtis PJ, Wunner WH, Kieny MP, Lathe R, Lecocq JP, Mackett M. **Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1984, **81**:7194–7198.

Willoughby RE, Tieves KS, Hoffman GM, Ghanayem NS, Amlie-Lefond CM, Schwabe MJ, Chusid MJ, Ruprecht CE. **Survival after treatment of Rabies with Induction of Coma.** *New England Journal of Medicine* 2005, **352**: 2508-2514.

Wu J, Bera AK, Kuhn RJ, Smith JL. **Structure of the Flavivirus helicase: implications for catalytic activity, protein interactions and proteolytic processing.** *Journal of Virology* 2005, **79(16)**: 10268-10277.

Yokomizo A, Jorge SAC, Astray RM, Fernandes I, Ribeiro OG, Horton DSPQ, Tonso A, Tordo N, Pereira CA: **Rabies virus glycoprotein expression in Drosophila S2 cells.I. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line.** *Biotechnology Journal*,2007,**2**:102–109.

Anexo

Artigo publicado na revista *Virology Journal*

Barros MCES, Galasso TGCM, Chaib AJM, Degallier N, Nagata T, Ribeiro B. **Yellow fever virus envelope protein expressed in insect cells is capable of syncytium formation in lepidopteran cells and could be used for immunodetection of YFV in human sera.** *Virology Journal* 2011, **8**: 261-271.