



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**Baculovírus como vetor para expressão da
glicoproteína do vírus da raiva em células
de inseto e de mamífero e análise
transcricional de células infectadas com
vírus da dengue**

Greice Kelly Menezes Martins

Brasília, 2011.



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

Baculovírus como vetor para expressão da glicoproteína do vírus da raiva em células de inseto e de mamífero e análise transcricional de células infectadas com vírus da dengue

Greice Kelly Menezes Martins

Orientador: Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Dissertação apresentada ao Departamento de Pós-Graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Brasília, 2011.

Trabalho realizado junto ao programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, sob orientação do Professor Dr. Bergmann Morais Ribeiro e apoio institucional e financeiro do CNPq.

Aprovado por:

Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro (orientador)
Departamento de Biologia Celular
Universidade de Brasília

Dra. Érica Soares Martins
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Prof. Dr. Tatsuya Nagata
Departamento de Biologia Celular
Universidade de Brasília

ÍNDICE

Figuras.....	vii
Tabelas.....	ix
Citação.....	x
Dedicatória.....	xi
Agradecimentos.....	xii
Abreviaturas e símbolos.....	xiv
Resumo.....	xv
Abstract.....	xviii
Introdução Geral.....	19
CAPÍTULO 1: Construção de um vetor viral para a expressão da glicoproteína da raiva em células de inseto de mamífero.....	24
1. Introdução.....	24
1.1. Baculovírus.....	24
1.1.1. Classificação dos baculovírus.....	25
1.1.2. Modo de infecção <i>in vivo</i>	26
1.1.3. Modos de infecção <i>in vitro</i> e regulação da expressão gênica.....	27
1.1.4. Baculovirus como sistema de expressão.....	28
1.1.5. Baculovírus em célula de mamífero.....	30
1.2. Raiva.....	34
1.2.1. <i>Rabies virus</i>	36
1.2.2. Manifestações clínicas.....	39
1.2.3. Profilaxia e tratamento.....	39
1.2.4. Impacto econômico.....	41
2. Objetivos.....	42
2.1. Estratégias.....	42
3. Materiais e Métodos.....	43
3.1. Células.....	43
3.2. Construção do plasmídeo pFastBac1CMV-GPV.....	43
3.3. Transformação de células DH10Bac.....	45
3.4. Transfecção com o bacmídeo BacCMVGPV.....	47
3.5. Análise da expressão da glicoproteína G (GPV) em células de inseto.....	48

3.6.	Titulação do vírus AcCMVGPV.....	49
3.7.	Transdução de células HeLa.....	49
3.8.	Análise da Expressão da glicoproteína G (GPV) em células HeLa.....	50
3.9.	Imunomarcção para análise em microscopia de fluorescência.....	50
3.10.	Análise transcricional (RT-PCR) em células HeLa.....	51
3.11.	ELISA de células HuH7.....	51
4.	Resultados.....	53
4.1.	Construção do plasmídeo pFastBac1CMV-GPV.....	53
4.2.	Transformação de células DH10Bac e obtenção do vírus AcCMV-GPV.....	54
4.3.	Análise da expressão da glicoproteína GPV em células de inseto e mamífero.....	57
4.4.	Transdução de células HepG2 e análise em microscopia de fluorescência.....	58
4.5.	Análise transcricional (RT-PCR) de células HeLa transduzidas com o vírus AcCMV-GPV.....	59
4.6.	ELISA.....	60
5.	Discussão.....	62
6.	Conclusões e perspectivas.....	66
CAPÍTULO 2: Estudo da transcrição gênica de células de mosquito C6/36 infectadas por um arbovírus (Dengue).....		
67		
1.	Introdução.....	67
1.1.	Dengue.....	67
1.2.	Manifestações clínicas.....	69
1.3.	<i>Dengue virus</i>	69
1.4.	Efeitos do DENV em mosquitos e imunidade em insetos.....	72
1.5.	Hibridização subtrativa.....	75
2.	Objetivos.....	77
2.1.	Estratégias.....	77
3.	Materiais e Métodos.....	78
3.1.	Vírus.....	78
3.2.	Células.....	78
3.3.	Extração do RNA total e síntese do cDNA.....	78
3.4.	Hibridização Subtrativa.....	79
4.	Resultados.....	82
4.1.	Hibridização subtrativa.....	82

4.2. Análise das seqüências.....	84
5. Discussão.....	86
6. Conclusões e perspectivas.....	89
Referências bibliográficas.....	90

FIGURAS

Figura 1: Mapa do Brasil mostrando as regiões geográficas e o número de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) em cada região.....	20
Figura 2: Ultraestrutura do baculovírus.....	25
Figura 3: Ciclo de infecção oral do inseto pelo baculovírus.....	27
Figura 4: Sistema Bac-to-Bac de expressão.....	30
Figura 5: Versatilidade dos baculovírus como vetor de expressão.....	34
Figura 6: Ciclos epidemiológicos da raiva.....	35
Figura 7: Áreas com risco de transmissão de raiva em 2010.....	36
Figura 8: A. Representação esquemática do genoma do <i>rabies virus</i>	37
Figura 9: Casos de raiva rural registrados no Brasil entre 2002 e 2010.....	41
Figura 10: Mapa do plasmídeo pFastBac1 (Invitrogen).....	44
Figura 11: Mapa do plasmídeo GPV/PV.....	45
Figura 12: Análise da clonagem do fragmento pCMV-GPV no plasmídeo pFastBac1® (Invitrogen).....	53
Figura 13: Mapa do plasmídeo construído pFastBac1CMV-GPV.....	54
Figura 14: Confirmação da transposição do fragmento de interesse CMV-GPV para o DNA do bacmídeo.....	55
Figura 15: Confirmação da presença do fragmento gênico CMV-GPV no vírus recombinante construído, AcCMV-GPV.....	55
Figura 16: Representação esquemática dos passos executados para a obtenção do baculovírus recombinante AcCMV-GPV.....	56
Figura 17: Análise da expressão da glicoproteína recombinante GPV em células de inseto e mamífero infectadas com o vírus recombinante AcCMV-GPV.....	57
Figura 18: Confirmação da expressão da proteína heteróloga GPV em células de inseto e mamífero.....	58
Figura 19: Análise de células HepG2 transduzidas com o vírus recombinante AcCMV-GPV.....	59
Figura 20: Confirmação da presença do transcrito GPV em células de mamífero HeLa transduzidas com o baculovírus recombinante AcCMV-GPV.	61
Figura 21: Quantificação da proteína GPV produzida em células de mamífero HuH-7 transduzidas com o baculovírus AcCMV-GPV.....	61

Figura 22: Mapa das áreas de risco de contaminação por dengue em 2010.....	67
Figura 23: Mosquito transmissor da dengue, <i>Aedes aegypti</i>	68
Figura 24: Vírus da dengue.....	70
Figura 25: Efeitos citopáticos do vírus da dengue em cultura de células de mosquito C6/36.....	73
Figura 26: Representação esquemática das etapas de hibridização subtrativa através da técnica de análise representativa diferencial (RDA).....	76
Figura 27: Mapa do plasmídeo pGEM T-Easy (Promega).....	80
Figura 28: Síntese do cDNA de células de mosquito e lepidóptera infectadas com o <i>dengue virus 1</i> (DENV1).....	82
Figura 29: Análise dos produtos diferenciais.....	83
Figura 30: Confirmação da presença de inserto gênico em 96 colônias obtidas após a confecção da biblioteca subtrativa.....	84

TABELAS

Tabela 1: Lista de linhagens celulares de mamíferos eficientemente transduzidas por baculovírus.....	32
Tabela 2: Lista de oligonucleotídeos utilizados no trabalho.....	46
Tabela 3: Lista de oligonucleotídeos e adaptadores utilizados para a confecção da biblioteca subtrativa e para o seqüenciamento.....	81
Tabela 4: Lista de genes encontrados após o seqüenciamento dos clones obtidos na biblioteca subtrativa, número de acesso e número de clones obtidos para cada gene.....	84

Aprenda como se você fosse viver para sempre.

Viva como se você fosse morrer amanhã.

(Mahatma Gandhi)

À minha mãe, Hilda, uma mulher forte e batalhadora, que me inspira diariamente, que me ensina como ser alguém melhor e que sempre acreditou em mim.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Bergmann Morais Ribeiro pela oportunidade e pela ótima orientação durante toda minha formação acadêmica. Obrigada por nos ensinar a sermos profissionais melhores e obrigada pela paciência.

Aos demais professores do Laboratório de Microscopia Eletrônica, Dr. Tatsuya Nagata, Dr. Renato Rezende, Dr. José Raimundo e Dra. Sônia Bao, por estarem sempre disponíveis quando precisei de ajuda.

Ao Laboratório de Biologia Molecular, especialmente à professora Dra Andrea Queiroz Maranhão, pelo suporte e ajuda na cultura de células de mamíferos, nas quantificações e no seqüenciamento dos clones da biblioteca. Obrigada por manter as portas do laboratório sempre abertas.

Ao professor Dr Jaime Santana, do Laboratório de Patologia Molecular, por ceder-me as células de mamíferos.

Ao professor Dr. Carlos Augusto e ao Dr. Renato Astray do Instituto Butantã, São Paulo, por nos ter recebido em seu laboratório e pela realização do ELISA.

A todos do Laboratório Central de Saúde Pública (Lacen-DF), ao Msc. Antônio Chaib, pela confiança e por abrir as portas do Lacen para mim. Ao Jorge, querido, pelas conversas agradáveis e principalmente pela música. Ao João, Alexandra e Paulo, por toda ajuda e simpatia.

À minha mãe, Hilda, pois sem os esforços dela eu nunca teria conseguido realizar nada. Mãe, obrigada por existir e ser tão presente em todos os momentos da minha vida, muito obrigada pelo amor!

Ao meu padrasto José Roberto, por já ser minha família, pela paciência, ajuda e por nos manter sempre unidos.

Ao meu tio, Antônio, que sempre esteve presente na minha vida, desde pequena. Obrigada pelo carinho e amor.

Ao meu namorado Leonardo, por estar sempre ao meu lado durante esses anos, por me ouvir e me consolar e por puxar minha orelha quando eu preciso. Obrigada por todos os momentos bons e por todo amor. Obrigada também à sua família, Fátima, Eudes, Leila e Gladson, que me acolheram como se eu fosse da família. Obrigada.

À Lívia, amiga querida, companheira de aventuras. Obrigada pela companhia, pelas conversas, pelas músicas. Obrigada por estar sempre disponível pra me ouvir quando precisei.

À Janete querida, que mesmo estando longe, por esse mundo afora, sempre soube que posso contar com você.

Ao Henrique e Karen, amigos antigos. Não importa o que aconteça, sei que vocês sempre estarão por perto.

À Maria Creuza, pela companhia no laboratório, por me ajudar sempre que eu precisei, pelos cartões e desenhos, pelas risadas e pelos dias de camundongos. Sem você (e sem a Carol, claro!), o trabalho teria sido muito mais difícil.

Ao Daniel, pessoa querida, que descobri ser um grande amigo. Conversa, me ouve, me ajuda e está sempre ali, por mim.

À Larizza, que conheci há menos tempo, mas já percebi que é uma pessoa linda. Obrigada pela companhia e pela ajuda.

À Raquel, ex-baculovírus e que me ajudou muito com o cultivo de células. Obrigada pela ajuda e pela companhia agradável.

Ao Rapha, da Microscopia Eletrônica, por ser esse amigo tão querido, que sempre se lembra de mim.

Aos amigos queridos do laboratório, Bele, Roberto, Briana, Carol, Clarinha, Obrigada a todos “baculovirentos” do laboratório pelos dias agradáveis, pelas risadas, pelas comidas. Obrigada a todos mesmo, aos que estão e aos que já passaram por lá.

À Universidade de Brasília, por me dar a oportunidade de realizar o trabalho.

À Capes pelo suporte financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para minha formação e torceram por mim.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
AA	Aminoácido
AMP	Adenosina monofosfato
Arg	Arginina
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolil fosfato
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos
cDNA	DNA complementar
CMV	Promotor do citomegalovírus
CO ₂	Gás carbônico
DENV	Dengue vírus
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNT	Doença Tropical Negligenciada
dNTP	Deoxinucleotídeos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio de Imunoadsorção Enzimática
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FBS	Soro Fetal Bovino
G	Gramas
Xg	Velocidade de sedimentação em unidade gravitacional
GPV	Glicoproteína do vírus da raiva
H	Hora
h.p.i.	Horas pós-infecção
HCl	Ácido clorídrico
IFN	Interferon
I.M.	Intramuscular
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
Kb	Quilobases
kDa	Quilodalton
M	Molar = mol/L

MG	Miligrama
Min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidade de infecção
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
NBT	<i>Nitro blue tetrazolium chloride</i>
Ng	Nanogramas
°C	Graus Celsius
OD	Densidade ótica
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAHO	Organização Panamericana de Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
PCECV	<i>Purified Chick Embryo Cell-Culture Vaccine</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDEV	<i>Purified Duck Embryo Vaccine</i>
pH	Potencial de hidrogênio
PMSF	Fenilmetanosulfonilfluoreto (inibidor de protease)
PVCV	<i>Purified Vero Cell Rabies Vaccine</i>
RDA	<i>Representational Difference Analysis</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RNAi	RNA de interferência
RSV	Rous sarcoma vírus
RT-PCR	Transcriptase reversa-PCR
RV	Vírus da raiva
SARS	Síndrome Respiratória Aguda Grave
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante em SDS
SNC	Sistema Nervoso Central
TEMED	Tetramethylethylenediamine
Tris	N, N, N', N' - tetrametil etilenodiamina
U	Unidade enzimática

XGal

5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

RESUMO

No Brasil, a raiva e a dengue podem ser citadas como duas doenças que causam prejuízos econômicos. A raiva é uma doença causada por um vírus do gênero *Lyssavirus*, transmitida pela saliva de mamíferos infectados, e uma vez iniciados os sintomas, a mortalidade ocorre em praticamente todos os casos. O vírus da raiva é formado por cinco proteínas: a nucleoproteína, a fosfoproteína, a proteína de matriz, a RNA polimerase e a glicoproteína (GPV), principal proteína viral imunogênica. Neste trabalho, a GPV foi expressa em células de mamíferos utilizando um baculovírus recombinante. Baculovírus são vírus de insetos que têm sido amplamente utilizados como biopesticidas e como ferramenta para a expressão de proteínas heterólogas em células de inseto e de mamíferos. Eles são considerados seguros devido à sua especificidade ao hospedeiro e a incapacidade de se replicar em linhagens de células não-inseto, embora eles possam entrar nas células de mamíferos. Para a construção do vírus recombinante, um fragmento gênico contendo o promotor CMV e o gene GPV foi clonado no vetor pFastBac1. O vírus recombinante AcCMV-GPV foi obtido através do sistema Bac-to-Bac (Invitrogen) e foi usado para infectar células de inseto. O extrato celular foi analisado por SDS-PAGE e a presença da proteína GPV foi confirmada por *western blot* usando um anticorpo anti-vírus da raiva. Células HeLa, derivadas de hepatoma humano, foram transduzidas com o vírus recombinante e o extrato celular também foi analisado por SDS-PAGE e a proteína GPV marcada com o anticorpo anti-vírus da raiva. Células HuH-7, derivadas de hepatócitos humanos, foram transduzidas com o vírus recombinante e a proteína GPV foi quantificada através de um ELISA. Futuramente, testes *in vivo* poderão ser feitos a fim de analisar os efeitos imunogênicos do vírus recombinante. Baculovírus recombinante capaz de expressar GPV em células de mamíferos pode ser uma alternativa para o desenvolvimento de uma vacina contra a raiva a custos mais baixos. A dengue é uma doença tropical e tem se tornado um grave problema de saúde pública. A doença é causada pelo vírus da dengue (*dengue virus*, DENV), um *Flavivirus* composto de quatro sorotipos (DENV-1 a 4), todos transmitidos ao ser humano através da picada da fêmea de mosquitos do gênero *Aedes*. O DENV se replica tanto em células de vertebrados como nas células do mosquito. Há muito conhecimento sobre os mecanismos de entrada e replicação de *Flavivirus* em cultura de células de mamífero e seus efeitos *in vivo*. No entanto, pouco se sabe a respeito dos processos moleculares do vírus no vetor. Dentro desse contexto, o presente trabalho propôs a análise transcricional de células de *Ae. albopictus* (C6/36) infectadas com DENV-1, isolado do Distrito Federal. Doze horas pós-infecção, as células foram coletadas, o RNA total de células infectadas e não infectadas foi extraído e utilizado para confecção da biblioteca subtrativa de cDNA, através da técnica de *Representational Difference Analysis* (RDA). Os cDNAs amplificados foram clonados no vetor pGEM-T *Easy* e seqüenciados. Cerca de 300 clones foram seqüenciados e as seqüências obtidas foram analisadas em um banco de dados. Infelizmente, a maioria das seqüências foi de RNA ribossomal. Tal resultado indica que houve problemas técnicos na construção da referida biblioteca.

Palavras chave: Vírus da raiva; glicoproteína da raiva; baculovírus; célula de mamífero; vírus da dengue; biblioteca subtrativa de cDNA.

ABSTRACT

In Brazil, rabies and dengue fever may be cited as two diseases that cause economic impacts. Rabies is a disease caused by a virus of the genus *Lyssavirus* and it is transmitted through the saliva of infected mammals. Once the symptoms started, the mortality occurs in virtually all cases. The rabies virus is composed of five proteins: nucleoprotein, phosphoprotein, matrix protein, RNA polymerase and glycoprotein (GPV), the main immunogenic viral protein. In this work, the GPV was expressed in mammalian cells using a recombinant baculovirus. Baculovirus are insect viruses that have been widely used as biopesticides and as a tool for expression of heterologous proteins in insect and mammalian cells. They are considered safe due to their host specificity and the inability to replicate in non-insect cell lines, although they can enter in mammalian cells. To construct the recombinant virus, a gene cassette containing the CMV promoter and the GPV gene was cloned into the vector pFastBac1. The recombinant AcCMV-GPV was obtained by Bac-to-Bac system (Invitrogen) and was used to infect insect cells. The cell extract was analyzed by SDS-PAGE and the presence of the GPV protein was confirmed by western blot using an antibody anti-rabies virus. HeLa cells, derived from human hepatoma, were transduced with the recombinant virus, the cell extract was also analyzed by SDS-PAGE and the GPV protein was labeled with the same antibody. Huh-7 cells derived from human hepatocytes were transduced with the recombinant virus and the protein was quantified by ELISA. In future, *in vivo* tests can be done to examine the immunogenic effects of the recombinant virus. Recombinant baculovirus expressing GPV in mammalian cells may be an alternative for the development of vaccine against rabies at lower costs. Dengue is a tropical disease and has become a serious public health issue. The disease is caused by dengue virus (DENV), a *Flavivirus*, which has four serotypes (DENV-1 to 4), all transmitted to humans through the bite of female mosquitoes of the genus *Aedes*. The DENV replicates in both vertebrate and mosquito cells. There are a lot of knowledge about the mechanisms of *Flavivirus* entry and replication in mammalian cell culture and its effects *in vivo*. However, little is known about the molecular processes of the virus in the vector. In this context, this paper proposes cell transcriptional analysis of *Ae. albopictus* cells (C6/36) infected with DENV-1, isolated from Distrito Federal. Twelve hours after infection, cells were collected, total RNA from infected and uninfected cells was extracted and used to construct a subtractive cDNA library, using the technique of Representational Difference Analysis (RDA). The amplified cDNAs were cloned into pGEM-T Easy vector and sequenced. About 300 clones were sequenced and the sequences were analyzed in a database. Unfortunately, most of the sequences were ribosomal RNA. This result indicates that there were technical problems in building the library.

Keywords: Rabies virus, rabies glycoprotein, baculovirus, mammalian cell, dengue virus, subtractive cDNA library

INTRODUÇÃO GERAL

A Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), órgão do governo norte americano, classificaram uma série de doenças como Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN).

A lista é composta por 18 doenças tropicais, as quais foram consideradas negligenciadas, pois atingem quase exclusivamente as populações mais pobres, de países em desenvolvimento, que vivem em favelas, áreas rurais ou zonas de conflito. As doenças listadas pela OMS como Doenças Tropicais Negligenciadas são dengue, raiva, malária, tracoma, úlcera de Buruli, treponematoses (sífilis, boubá e pinta), hanseníase, doença de Chagas, doença do sono, leishmaniose, cisticercose, dracunculíase, equinococose (cisto hidático), infecções transmitidas por alimento causadas por trematodas (fasciolíase e paragomíases), filariose linfática, oncocercose, helmintíases transmitidas pelo solo (ancilostomíase, ascaríase e tricuriase) e esquistossomose (OMS, 2010a).

Cerca de um bilhão de pessoas são afetadas por DTN, principalmente as populações pobres que vivem em países tropicais e subtropicais (África subsaariana, Ásia e América Latina). Mais de 70% dos países e territórios que reportaram a presença de DTN são de baixa renda (OMS, 2010b).

As DTN possuem um enorme impacto na vida das famílias e comunidades afetadas, diminuindo a qualidade de vida e produtividade de trabalho. Infelizmente, as populações atingidas são em sua maioria marginalizadas e possuem pouca força política para influenciar as decisões do governo (OMS, 2010a).

Apesar de afetar bilhões de pessoas e causar milhões de mortes anualmente, as DTN ainda são negligenciadas, também, pelos institutos de pesquisas e pela indústria farmacêutica. Pesquisas são necessárias para o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico e drogas para o tratamento. Dessa forma, o apoio financeiro e o envolvimento de países desenvolvidos e das principais indústrias farmacêuticas são fundamentais para que as DTN possam ser controladas (OMS, 2010a).

A fim de controlar e prevenir as DTN, a OMS recomenda que sejam adotadas cinco estratégias: intensificação da gestão e notificação dos casos; tratamento preventivo com drogas e vacinas; controle de vetores; disposição de água potável e de boas condições sanitárias; e controle intenso de zoonoses (OMS, 2010a).

De acordo com a OMS, há 149 países ou territórios onde DTNs são endêmicas. Em pelo menos 100 deles há a ocorrência de duas ou mais doenças e em 30 países há a presença de seis ou mais agravos (OMS, 2010b).

No Brasil, ocorrem oito DTNs: malária, doença de Chagas, leishmaniose, esquistossomose, dengue, hanseníase, oncocercose e filariose linfática. A OMS inclui também a tuberculose que, embora não seja considerada uma doença tropical, tem uma alta prevalência no Brasil, principalmente em regiões mais pobres do país (Lindoso & Lindoso, 2009). Um mapa feito pelo Ministério da Saúde brasileiro (figura 1) mostra que a incidência dessas doenças é maior nas regiões mais pobres, principalmente no norte e nordeste (Brasil, 2009).

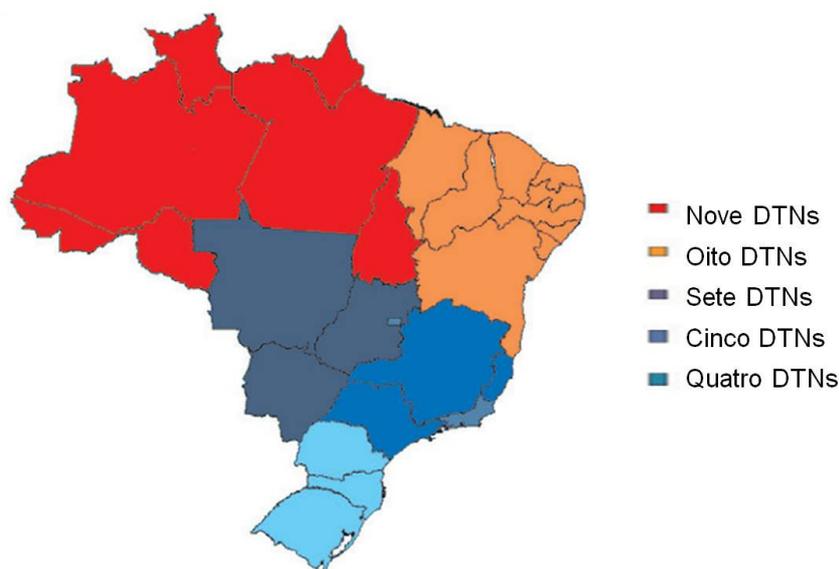


Figura 1: Mapa do Brasil mostrando as regiões geográficas e o número de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) em cada região. As nove doenças registradas no país são malária, doença de Chagas, leishmaniose, esquistossomose, dengue, hanseníase, oncocercose, filariose linfática e tuberculose (adaptado de Brasil, 2009).

Estudos da OMS mostraram que a alta incidência das DTN afeta intensamente a economia e o desenvolvimento dos países (OMS, 2010a). No Brasil, a dengue e a raiva podem ser citadas como duas DTN que causam prejuízos econômicos.

A dengue é uma infecção viral, causada pelo *Dengue virus* (DENV) transmitida pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*. Cerca de um milhão de casos confirmados são reportados anualmente e a OMS acredita que pelo menos 50 milhões de pessoas são infectadas anualmente (Lindoso & Lindoso, 2009). É uma doença que ocorre

principalmente em áreas urbanas e semi-urbanas, com aglomerações humanas e as áreas mais afetadas são a Ásia e a América Latina (Suaya *et al.*, 2009).

Atualmente, a América Latina notifica a maior parte dos casos de dengue. Em 2010, apenas seis países (Brasil, Venezuela, Costa Rica, Colômbia, Honduras e México) representaram 75% de todos os casos da região (OMS, 2010a).

Os gastos públicos gerados pelos surtos de dengue são grandes. Um estudo feito em oito países da Ásia e América Latina (Brasil, Venezuela, El Salvador, Guatemala, Panamá, Camboja, Malásia e Tailândia) indicou que pelo menos 587 milhões de dólares são gastos anualmente no tratamento da dengue (Suaya *et al.*, 2009).

Em 1995, a OMS desenvolveu uma estratégia para prevenção e controle da dengue baseada no controle do mosquito vetor, com participação da comunidade; divulgação de informações sobre as formas de transmissão, sintomas e tratamentos da doença; e capacitação e treinamento dos profissionais da saúde para casos de emergência. Alguns países, como Cuba, Malásia e Singapura, implementaram o programa da OMS e registraram declínios no número de casos de dengue (OMS, 2009).

Atualmente, a melhor forma de controlar a doença é diminuir a população do mosquito. Ainda não há disponível no mercado uma vacina contra dengue, assim não parece ser possível a prevenção das epidemias de dengue, mesmo que a presença do mosquito vetor seja baixa (Câmara & Santos, 2010).

As pesquisas para o desenvolvimento de uma vacina são intensas e foram iniciadas há mais de 50 anos. A principal dificuldade para o desenvolvimento de uma vacina eficaz se deve à existência de quatro sorotipos virais. Quando um indivíduo é infectado por um sorotipo de dengue, os anticorpos produzidos contra o sorotipo não são capazes de neutralizar os outros sorotipos. Dessa forma, é indispensável o desenvolvimento de vacinas tetravalentes, ou seja, que confirmam proteção contra os quatro sorotipos (Bricks, 2004).

Faltam também modelos animais para testar a efetividade da vacina. Ratos e macacos podem ser infectados pelo DENV, mas os sintomas diferem dos apresentados por humanos (Gibbons & Vaughn, 2002).

Entretanto, o laboratório Sanofi Pasteur desenvolveu uma vacina tetravalente, composta por vírus recombinantes atenuados. Estudos pré-clínicos *in vivo* e *in vitro* mostraram que a vacina desenvolvida é genética e fenotipicamente estável, não é hepatotrópica e não infecta mosquitos através da rota oral. A vacina induziu ainda uma resposta imune significativa em macacos (Guy *et al.*, 2010). Os testes clínicos foram

iniciados e já se encontra em fase III de estudo. A fase III de um teste clínico tem como objetivo avaliar a efetividade e o risco-benefício de um medicamento e envolve a participação de centenas a milhares de pacientes. O Brasil está entre os países escolhidos para o desenvolvimento dos testes e acredita-se que até 2013 a vacina já esteja disponível no mercado (Sanofi Pasteur, 2010).

Outra DTN importante é a raiva, uma doença causada por vírus e transmitida pela saliva de mamíferos infectados. A raiva é uma doença grave e uma vez iniciados os sintomas, a mortalidade ocorre em praticamente todos os casos. Em humanos, o avanço do quadro clínico da doença pode ser evitado através de um tratamento profilático pós-exposição (Hemachudha *et al.*, 2002). A cada ano, mais de 15 milhões de pessoas recebem o tratamento profilático pós-exposição e dezenas de milhares de pessoas morrem principalmente na África e na Ásia (OMS, 2010a).

A principal maneira de combater a raiva é através da vacinação. Há diversas vacinas disponíveis no mercado. Para a vacinação de animais, a mais comum é a Fuenzalida & Palácios, produzida em cérebros de camundongos lactentes, infectados com o vírus e posteriormente inativado por β -propiolactona. A vacina Fuenzalida & Palácios também pode ser utilizada em humanos. Há ainda vacinas produzidas em cultura de células de mamífero (Andrade *et al.*, 1999).

Na América Latina, programas nacionais de controle da raiva canina, iniciados no início da década de 1980, foram eficientes e diminuíram a incidência de raiva nas áreas urbanas. Entretanto, ainda são encontrados muitos animais infectados nas áreas com vegetação nativa e nas zonas rurais, principalmente morcegos (Schneider *et al.*, 2007).

A raiva causa grandes impactos econômicos. Ao avaliar os custos causados pela doença, devem ser levados em consideração os gastos com tratamento profilático pré e pós-exposição, campanhas de vacinação em cães e perdas de cabeças de gado em fazendas. Estima-se que os gastos anuais globais excedam um bilhão de dólares (OMS, 2010a).

As DTN, como raiva e dengue, representam atualmente um dos principais problemas de saúde pública em países em desenvolvimento. A falta força política de muitos países afetados piora a situação das populações atingidas. Além disso, os governos de tais países são, em muitos casos, omissos. Há uma falta de políticas de saúde pública, de estatísticas confiáveis e de incentivo à pesquisa. A OMS tem feito esforços para alertar quanto à importância do desenvolvimento de medicamentos,

vacinas e diagnósticos mais eficientes e baratos. Um dos principais desafios apontados é a formação de profissionais especializados nessas doenças nos países afetados (OMS, 2010a).

CAPÍTULO 1

Construção de um vetor viral para a expressão da glicoproteína da raiva em células de inseto de mamífero.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Baculovírus

Baculovírus constituem o maior e mais bem estudado grupo de vírus de artrópodes. A família *Baculoviridae* compreende vírus capazes de infectar diversas ordens de insetos, principalmente das ordens Lepidoptera, Diptera e Hymenoptera (Miller, 1997). Assim eles têm sido amplamente utilizados como biopesticidas para o controle biológico (Castro *et al.*, 1999).

O nome baculovírus é derivado do latim *baculum*, que significa bastão, devido ao seu formato. O nucleocapsídeo viral pode ter de 25 a 50 nm de diâmetro e de 250 a 300 nm de comprimento. Eles possuem genoma circular de DNA dupla fita, cujo tamanho varia de 80 a 180 kb. Os baculovírus são muito comuns na natureza e mais de 600 espécies já foram descritas, todas capazes de infectar apenas artrópodes (Summers, 2006).

Os baculovírus possuem dois fenótipos distintos durante seu ciclo de infecção. Os fenótipos apresentados pelo vírus variam no ciclo de vida viral de acordo com o modo de propagação. O vírus extracelular ou BV (do inglês *budded virus*) é responsável pela transmissão vertical, ou seja, de célula a célula, dentro do mesmo inseto. Já o vírus derivado da oclusão, também conhecido como ODV (do inglês *occlusion derived virus*) está presente durante a transmissão horizontal (figura 2), de inseto para inseto. O ODV é envolto por uma matriz protéica denominada corpo de oclusão (OB, do inglês *occlusion body*) (Smith *et al.*, 1983).

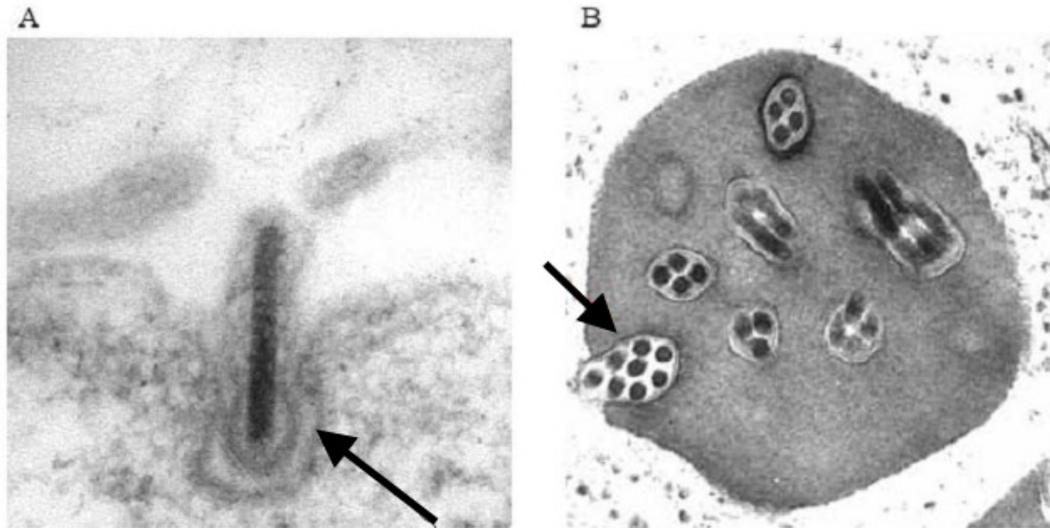


Figura 2: Ultraestrutura do baculovírus. (A) Microscopia eletrônica de um vírus extracelular (BV, *budded virus*) entrando na célula por endocitose. A seta indica a partícula extracelular. Fonte: adaptada de www.chegue.uq.edu.au/research/bioengineering/research/Baculovirus/Baculo2.gif. (B) Microscopia eletrônica de transmissão mostrando as partículas virais oclusas (ODV, *occlusion derived virus*) inseridos na matriz protéica (OB, *occlusion body*). A seta mostra múltiplas partículas virais envelopadas (vírus oclusos) no interior de um poliedro. Fonte: Ribeiro *et al.* (1998)

1.1.1. Classificação dos baculovírus

Os baculovírus pertencem à família *Baculoviridae* de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia Viral e devido a diferenças de morfologia dos seus corpos de oclusão, entre outras características, foram inicialmente classificados em dois gêneros: os *Nucleopolyhedrovirus* ou vírus da poliedrose nuclear (NPV), e os *Granulovirus* ou vírus da granulose (GV) (Funk *et al.*, 1997).

Os vírus do gênero GV possuem corpos de oclusão denominados grânulos, com formato ovicilíndrico e formados pela proteína granulina, proteína de cerca de 30.000 Daltons (Da). O grânulo é uma estrutura pequena, que possui entre 0,3 a 0,5 μm , e cada grânulo contém um víron, e, raramente, dois ou três (Ribeiro, 1998). Já nos vírus do gênero NPV, os ODVs são oclusos dentro de uma matriz cristalina constituída pela proteína poliedrina, formando os corpos de oclusão poliédrica (PIB) ou simplesmente poliedro, com tamanho de 0,15 a 15 μm . Os NPVs são classificados ainda de acordo com o número de nucleocapsídeos oclusos na matriz de poliedrina. Quando há apenas um nucleocapsídeo, eles são chamados de SNPV (*single nucleopolyhedrovirus*) e

quando há vários, eles são denominados *multiple nucleopolyhedrovirus* ou MNPV (O'Reilley *et al.*, 1994).

Entretanto, análises filogenéticas detalhadas, baseadas na seqüência do genoma, modificaram a classificação e a família *Baculoviridae* passou a ser dividida em quatro gêneros: *Alphabaculovirus*, NPV de lepidópteros; *Betabaculovirus*, GV de lepidópteros; *Gammabaculovirus*, NPV de himenópteros e *Deltabaculovirus*, NPV de dípteros (Cartens & Ball, 2009).

1.1.2. Modo de infecção *in vivo*

Nos NPVs, a replicação viral apresenta os dois fenótipos distintos. Vírus extracelulares ou BVs são produzidos na fase inicial da infecção e são responsáveis pela transmissão célula a célula. Com o avanço da infecção, passam a ser produzidos vírus derivados da oclusão ou ODVs, que são envoltos por uma matriz protéica, formando corpos de oclusão denominados de poliedros nos NPVs e grânulos nos GVs, os quais são responsáveis pela transmissão entre os insetos (Summers & Smith, 1978).

No meio ambiente, a transmissão do vírus para o inseto ocorre pela via oral. Quando o inseto ingere um alimento contaminado por poliedros, esses atingem o intestino médio. O pH alcalino do intestino leva à solubilização dos poliedros e à liberação dos vírions. Essas partículas virais atravessam a membrana peritrófica devido à ação de metaloproteases virais (Slack & Arif, 2007). Após romper a barreira da membrana peritrófica, os vírus entram nas células colunares no intestino, através de fusão de membranas (figura 3). O vírus é então transportado para o núcleo através do citoesqueleto (Slack & Arif, 2007).

Inicialmente, são formados os BVs, que deixam as células do intestino, atravessam a membrana basal, atingem a traquéia ou a hemolinfa e assim podem infectar os demais tecidos do inseto, como o tecido adiposo, túbulos de Malpighi e tegumento (Keddie, 1989). Numa fase tardia da infecção, há intensa produção de poliedrina e a formação dos poliedros no núcleo. Após alguns dias, a lagarta morre e os poliedros são liberados no ambiente (Williams & Faulker, 1997). Alguns baculovírus, como a espécie tipo *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), possuem os genes das enzimas catepsina e quitinase, que levam à liquefação do inseto. Tal processo facilita a dispersão do vírus no ambiente (Cory *et al.*, 1997).

Em cultura de células, a infecção é iniciada com os BVs, que entram na célula via endocitose adsortiva. Diferentemente, os ODVs atingem a célula através da fusão direta de membranas (Horton & Burand, 1993).

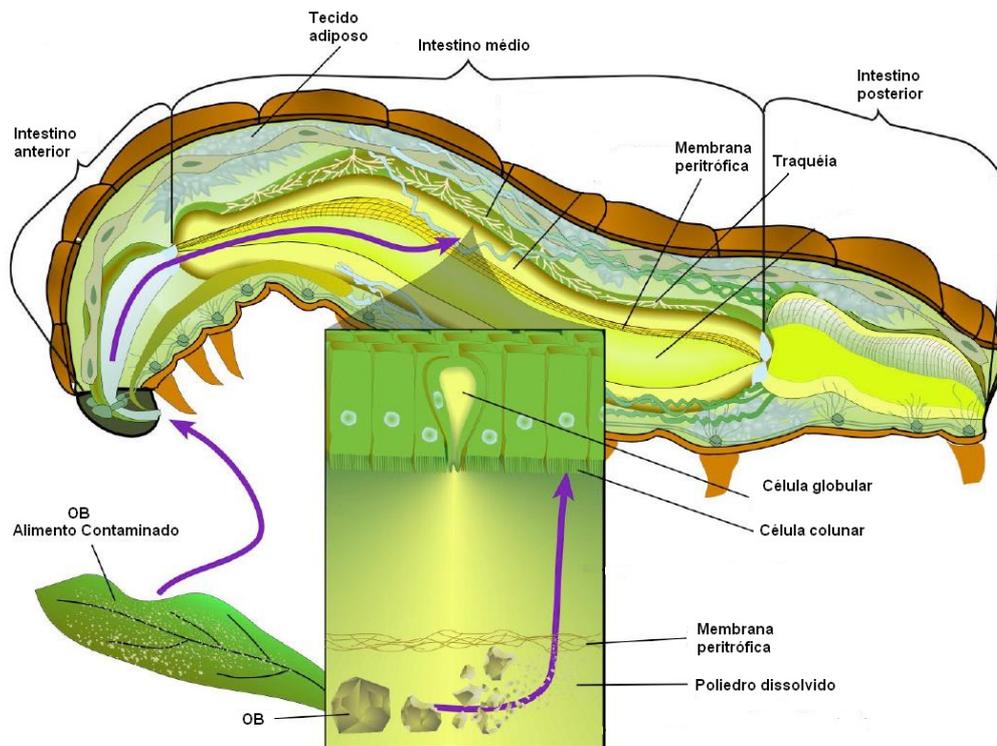


Figura 3: Ciclo de infecção oral do inseto pelo baculovírus. Representação esquemática de uma larva de Lepidoptera. Ao ingerir um alimento contaminado pelos corpos de oclusão (OB), esses atingem o intestino médio do inseto, onde eles são dissolvidos pelo pH alcalino. A partícula viral é liberada e atinge as células colunares do intestino, dando início à infecção (Adaptado de Slack & Arif, 2007).

1.1.3. Modos de infecção *in vitro* e regulação da expressão gênica

Em cultura de célula é possível analisar em detalhes a regulação da expressão gênica em baculovírus, que pode ser dividida em duas fases principais: fase precoce (*early*) e fase tardia (*late*). Essas fases podem ser subdivididas em fase precoce imediata (*immediately early*), cujos genes são expressos nas primeiras horas de infecção, e fase muito tardia (*very late*), que representa os genes que são expressos após 18h de infecção (Maruniak, 1986). A fase precoce imediata se inicia a partir de aproximadamente 20min até 8 h pós-infecção (h.p.i.) e corresponde basicamente a fatores de transcrição, bem como proteínas pertencentes à maquinaria de replicação viral. O DNA do vírus começa então a ser transcrito, ocorrem rearranjos do citoesqueleto e a cromatina da célula

hospedeira se dispersa no núcleo (Friesen, 1997). Quando o DNA viral começa a ser replicado, inicia-se a fase tardia. Nessa fase há intensa produção de proteínas responsáveis pela construção de partículas virais extracelulares (BV), como a proteína GP64, principal constituinte do envelope viral. Essa fase se estende até 24 h.p.i. (Lu & Miller, 1997). Na última fase da infecção (*very late*), que se inicia a partir de 18h, a poliedrina, uma proteína de aproximadamente 30 kDa, é largamente produzida para que haja a formação dos corpos de oclusão. Ao fim ocorre a lise celular (Rohrmann, 1986).

A poliedrina é a principal constituinte do poliedro, que ao ser ingerido pelo inseto é dissolvido no intestino médio devido ao pH alcalino (Funk *et al.*, 1997). Ela compreende mais 95% de todas as proteínas virais na fase *very late* (Jarvis, 1997). Devido a sua alta produção, o locus da poliedrina é comumente utilizado para a construção de baculovírus recombinantes como vetor de expressão (Kost *et al.*, 2005).

1.1.4. Baculovírus como sistema de expressão

O sistema de expressão em baculovírus vem sendo utilizado desde a década de 1980 (Smith *et al.*, 1983). Proteínas de diferentes organismos podem ser expressas através desse sistema. Para isso, o gene de interesse deve ser introduzido no locus de um gene não essencial para a replicação viral, como o gene da poliedrina, sob o comando de um promotor forte (O'Reilly *et al.*, 1994). O promotor da poliedrina é um dos mais utilizados para esse objetivo. Além dele, o promotor da proteína P10 também é amplamente empregado (Roelvink *et al.*, 1992).

Há diversos métodos para a construção de um vírus recombinante e há uma grande opção de vetores e genomas comerciais para a produção desses vírus. A escolha dependerá do estudo a ser realizado (Kost *et al.*, 2005).

A forma tradicional de obtenção de baculovírus recombinantes é através de recombinação homóloga. O gene heterólogo é clonado num plasmídeo de transferência contendo regiões homólogas ao vírus selvagem flanqueando o gene de interesse. O plasmídeo é co-transfectado em células de inseto com o DNA do baculovírus selvagem. Na célula, ocorre a recombinação homóloga, ou seja, o gene original do inseto é substituído pelo gene heterólogo. Nessas células, haverá vírus selvagens e vírus recombinantes. Para isolar o vírus recombinante, é necessária uma seleção por plaqueamento (Castro *et al.*, 1999).

O método mais utilizado para a obtenção de baculovírus recombinantes é pela transposição, através do sistema Bac-to-Bac da empresa Invitrogen (figura 4). Nesse sistema, o gene de interesse é clonado num vetor de transferência, o qual contém o promotor da poliedrina, flanqueado por regiões de transposição. O plasmídeo obtido é então inserido numa bactéria *Escherichia coli* modificada, a qual possui, além de seu genoma, um plasmídeo auxiliar (pHelper), que codifica o gene da transposase, e o bacmídeo, genoma no baculovírus modificado na forma de um plasmídeo, contendo regiões de transposição, origem de replicação, gene de resistência ao antibiótico canamacina e o gene *lacZ* (Manual Bac-to-Bac Expression System, Invitrogen, 2004). O *lacZ* é um dos genes do operon Lac de *E. coli*, responsável pelo transporte e metabolismo da lactose. O *lacZ* codifica a enzima β -galactosidase, a qual quebra a lactose em glicose e galactose. Os genes do operon Lac são expressos apenas na presença da lactose. Além da lactose, a ativação do operon requer a presença de AMP cíclico (cAMP), uma molécula cuja concentração intracelular aumenta quando os níveis de glicose diminuem (Snustad & Simmons, 2001).

Diversas linhagens de *E. coli* foram modificadas a fim de inserir uma deleção na extremidade 5' do gene *lacZ*. Dessa maneira, a enzima β -galactosidase perde a porção amino-terminal e, conseqüentemente, sua função. A fim de complementar a atividade da enzima, a porção do gene deletado do cromossomo bacteriano é inserida no plasmídeo. Ao receber o plasmídeo, a enzima torna-se funcional novamente. A esse processo dá-se o nome de alfa complementação (Madigan *et al.*, 2004).

O gene *lacZ* do bacmídeo funciona como um gene repórter e complementa a deleção do mesmo existente no cromossomo bacteriano. Na presença do substrato cromogênico X-Gal (um análogo de lactose) e do indutor IPTG (um análogo de cAMP), as colônias LacZ+ ficam azuis. Quando ocorre a transposição do gene de interesse para o bacmídeo, o gene *lacZ* é interrompido, logo o substrato X-Gal não é quebrado e as colônias ficam brancas. Para a obtenção do vírus, células de inseto são transfectadas com o DNA do bacmídeo, o qual é infectivo. Dessa maneira, após alguns dias, há formação de partículas virais e expressão da proteína heteróloga (Manual Bac-to-Bac Expression System, Invitrogen, 2004).

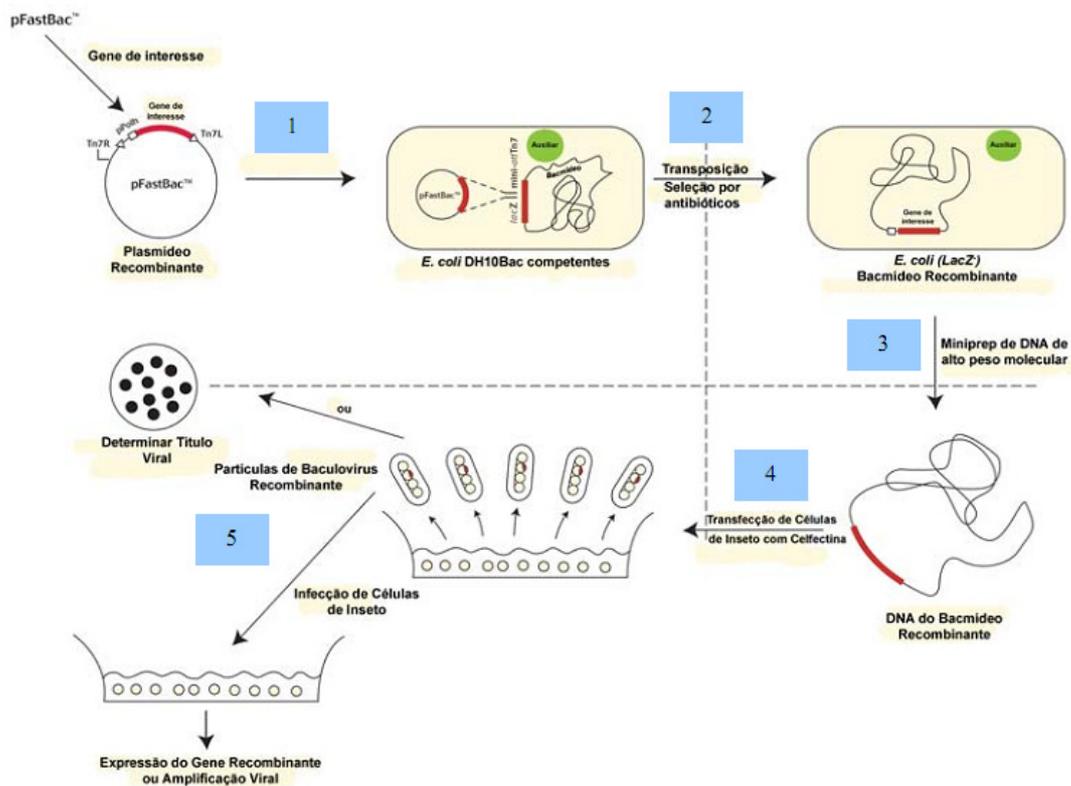


Figura 4: Sistema Bac-to-Bac de expressão. A figura mostra esquematicamente os passos necessários para a obtenção de um vírus recombinante através do sistema Bac-to-Bac. (1) As bactérias DH10Bac, que contém o genoma do baculovirus AcMNPV na forma de um bacmídeo, são transformadas com o plasmídeo pFastBac1, contendo o gene de interesse representado em vermelho. (2) Dentro da célula, ocorre a transposição do gene de interesse para o bacmídeo. (3) O DNA do bacmídeo pode ser purificado e (4) utilizado para transfectar células de inseto. (5) Após alguns dias, os vírus recombinantes são obtidos e podem ser avaliados quanto ao seu título viral ou ainda utilizados para infectar novas células para produção da proteína recombinante. Adaptado de Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System manual (Invitrogen).

1.1.5. Baculovírus em célula de mamífero

Baculovírus são amplamente utilizados como biopesticidas. Dessa forma, sua capacidade de infectar células não-alvo foi amplamente estudada. No início de 1980, foi descoberto que baculovírus pode penetrar células não-alvo, incluindo muitas linhagens de células humanas. Em 1983, Volkman e Goldsmith demonstraram que o baculovírus é capaz de entrar em diversas linhagens de células derivadas de certas espécies de vertebrados. Trinta e cinco linhagens de células não-alvo, 23 humanas e 12 de origem de vertebrados não-humanos, foram expostas ao baculovírus AcMNPV e nenhuma evidência da expressão de genes virais foi obtida.

Em 1985, foi expresso pela primeira vez um gene marcador em células de mamífero utilizando o baculovírus como vetor de expressão (Carbonell *et al.*, 1985). Neste estudo, usou-se um baculovírus recombinante contendo um RSV promotor (promotor da repetição longa terminal do vírus do sarcoma de Rous) e o gene da enzima cloranfenicol acetil-transferase, enzima de *E. coli*, que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol, como gene marcador. Foi observado um baixo nível de expressão do gene marcador nas células estudadas. Portanto, o gene foi levado ao interior da célula através do baculovírus (Carbonell *et al.*, 1985). Dez anos depois, Hofmann e colaboradores (1995) confirmaram os resultados iniciais e demonstraram também que baculovírus poderia causar a expressão gênica eficiente quando o gene marcador está sob o comando de um promotor de mamíferos. Foi demonstrado que o vírus AcMNPV recombinante contendo o gene da luciferase sob o comando do promotor *immediately early* de citomegalovírus (CMV) pode transduzir eficientemente hepatócitos humanos (Huh7 e HepG2), bem como hepatócitos primários de origem humana e de coelho pela detecção da atividade de luciferase de células infectadas. Boyce e Bucher (1996) confirmaram estes resultados e mostraram que um vírus portador do gene repórter *lacZ* sob o controle do promotor RSV levou a um alto nível de expressão do gene marcador na linhagem celular HepG2 de carcinoma hepatocelular humano, bem como em hepatócitos primários de ratos e humanos. A partir desses resultados, a terapia gênica mediada por baculovírus passou a ser proposta.

Outros estudos indicaram que uma alta expressão do gene marcador pode ser alcançada não só em células hepáticas, mas também em uma ampla gama de outras linhagens celulares (Shoji *et al.*, 1997, Yap *et al.*, 1997;. Barsoum *et al.*, 1997;. Hofmann *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1998; et Condreay *et al.*, 1999). Durante a década de 1990, o conceito de transferência de genes mediada por baculovírus foi ainda mais verificado e, hoje, a lista de células transduzidas (tabela 1) continua a aumentar (Airenne *et al.*, 2009).

Tabela 1: Lista de linhagens celulares de mamíferos eficientemente transduzidas por baculovírus. Adaptado de Kost & Condreay (2002).

Células Humanas	Células de Animais
HeLa	Células de Coelho
Huh-7	Hepatócito primário
Hek-293	Células de Primatas Não Humanos
HepG2	Vero
KATO III	COS-7
IMR32	CV1
MT-2	Células de Roedor
143TK	CHO
Células β pancreáticas	BHK
Queratinócitos	RGM I
Fibroblastos de medula óssea	PC12
CHP 212	N2a
Neurônios primários	Células β pancreáticas de camundongo
W12	Hepatócito primário de rato
MRC5	L929
Fibroplasto embrionário de pulmão	Células de Porco
DLD1	CPK
SK-N-MC	FSL13
Saos2	PK-15
WI-38	Células Bovinas
Hepatócito primário	MDB
FLC4	Células Ovinas
MG63	FLL-YFT

Baculovírus recombinantes, contendo o gene da luciferase sob o comando do promotor CMV, foram utilizados para transduzir diversas linhagens celulares. Em 1999, Condreay e colaboradores contruíram um baculovírus recombinante contendo o gene da proteína verde fluorescente (GFP) sob o comando do promotor CMV. Uma alta expressão da proteína foi detectada neste estudo em células de rim de macaco (COS7), células de rim de suíno (CPK) e células de carcinoma de colo do útero humano (HeLa) transduzidas com o vírus recombinante (Condreay *et al.*, 1999). Além dessas, foram eficientemente transduzidas linhagens celulares derivadas de tecidos de rim (Cos-7,

BHK, VC-1, HEK-293), queratinócitos (W12), fibroblastos de medula óssea e células de osteossarcoma (MG-63) e células-tronco (Ho *et al.*, 2005;. Ho *et al.*, 2006;. Chuang *et al.*, 2007;. Chuang *et al.*, 2009;. Tsai *et al.*, 2009). A menor eficiência de transdução e baixos níveis de expressão do gene marcador foram observados em linhagens de células de origem hematopoiéticas, tais como THP-1, U937, K562, RAW264.7 e P388D1 (Kronschnabl *et al.*, 2002).

Além da terapia gênica, baculovírus podem ser utilizados para a expressão de proteínas heterólogas em células de mamíferos, principalmente glicoproteínas, uma vez que os padrões de glicosilação de células de inseto apresentam diferenças fundamentais em relação a células de mamíferos (Jarvis, 2003). Portanto, a expressão de proteínas heterólogas em células de mamíferos por meio de baculovírus recombinantes seria uma boa alternativa para aperfeiçoar a produção de glicoproteínas recombinantes. Além disso, os mamíferos não possuem nenhum anticorpo inato contra baculovírus (Abe *et al.*, 2003), os baculovírus apresentam alta taxa de transdução, eficiência na expressão de transgenes e baixos efeitos citotóxicos em células de mamíferos (Kim *et al.*, 2007).

A expressão de uma proteína viral heteróloga em células de mamíferos pode ser utilizada futuramente para o desenvolvimento de vacinas, pois alguns estudos demonstraram que baculovírus selvagens e recombinantes induziram uma atividade antiviral em células de mamífero. Gronowski e colaboradores (1999) indicaram que BVs do baculovírus AcMNPV estimularam a produção de interferons (IFN) e foram capazes de proteger camundongos *in vitro* (fibroblastos de embriões) e *in vivo* contra os vírus da estomatite vesicular e da encefalomiocardite, bem como células humanas NHDF (*normal human dermal fibroblast*) contra o vírus da encefalomiocardite *in vitro*. Abe e colaboradores (2003) confirmaram que tanto um baculovírus recombinante expressando a hemaglutinina do *Influenza virus A* quanto o AcMNPV selvagem foram capazes de conferir resistência contra vírus da gripe *in vivo* após inoculação intranasal.

Com todas essas descobertas, os baculovírus se destacam como vetores de expressão altamente versáteis (figura 5). Além de funcionarem como vetores de expressão em larvas e células de inseto, eles podem ser utilizados como vetores de terapia gênica e produção de vacinas em cultura de célula de mamíferos.

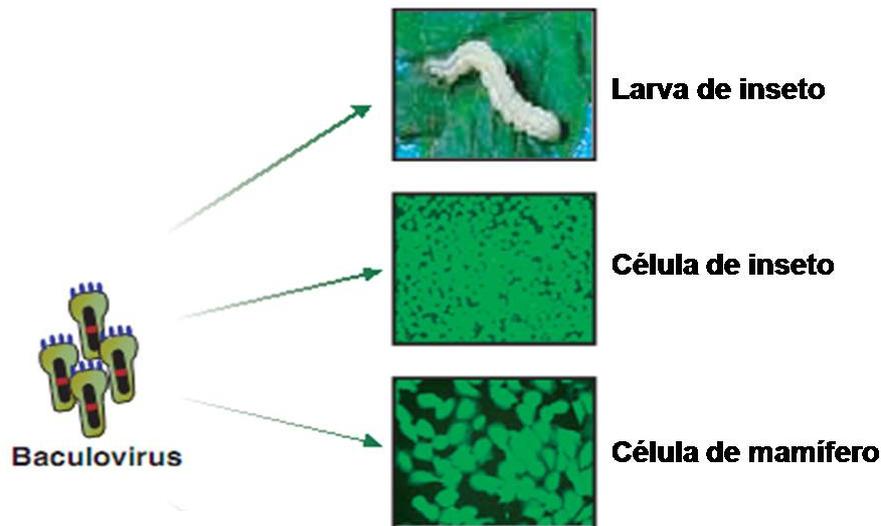


Figura 5: Versatilidade dos baculovírus como vetor de expressão. Os baculovírus recombinantes podem ser usados para uma variedade de aplicações, como a produção de proteínas recombinantes em larvas de inseto e cultura de célula de inseto e mamífero. As células de inseto e mamífero mostradas acima foram tratadas com um baculovírus recombinante expressando a proteína verde fluorescente (GFP).
 Fonte: Adaptado de Kost *et al.* (2005).

1.2. Raiva

O vírus da raiva, ou *Rabies virus* (RV) causa uma encefalite que ataca o sistema nervoso central (SNC) e leva as vítimas a óbito em praticamente 100% dos casos. Ele é transmitido através da saliva de animais infectados. Sua transmissão se dá através de dois ciclos principais, a raiva urbana, diretamente ligada a cães e gatos domésticos, e a raiva silvestre, onde o vírus é mantido por uma variedade de mamíferos silvestres (Childs, 2002). Além dos ciclos urbanos e silvestres, podem se distinguir também os ciclos aéreos e rurais (figura 6). Já foram relatados diversos casos de raiva transmitida pelas vias aéreas, após a permanência em cavernas com grandes populações de morcegos. Um quarto ciclo de infecção com cada vez mais importância no Brasil é o ciclo rural, com um número crescente de herbívoros contaminados (Brasil, 2008).



Figura 6: Ciclos epidemiológicos da raiva. A raiva pode ser transmitida através da mordida de animais infectados; por via aérea, após a permanência em cavernas com grande população de morcegos infectados ou pelo consumo de carne de animais doentes. Fonte: Manual de Diagnóstico de Raiva, Ministério da Saúde. Disponível em: portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_diagnostico_raiva.

O primeiro surto de raiva humana registrada da história data de 1271, no norte da Alemanha. Trinta pessoas morreram após serem mordidas por lobos. Entretanto, foi apenas na segunda metade do século XIX que houve registros de surtos maiores na Europa, Estados Unidos e América do Sul, incluindo o Brasil (Jackson *et al.*, 2003). Atualmente, a raiva humana ainda é uma doença importante nos países em desenvolvimento, causando cerca de 70.000 mortes por ano. No mundo, praticamente todos os países apresentam algum risco de transmissão de raiva (figura 7). Apenas a Nova Zelândia nunca registrou casos de raiva humana ou animal (OMS, 2010a). Na África, Ásia e parte da América Latina, a raiva é predominantemente urbana, sendo a maioria dos casos descritos em cães. No Brasil, a maioria dos casos registrados é de raiva silvestre, causada principalmente por morcegos hematófagos (Brasil, 2008).

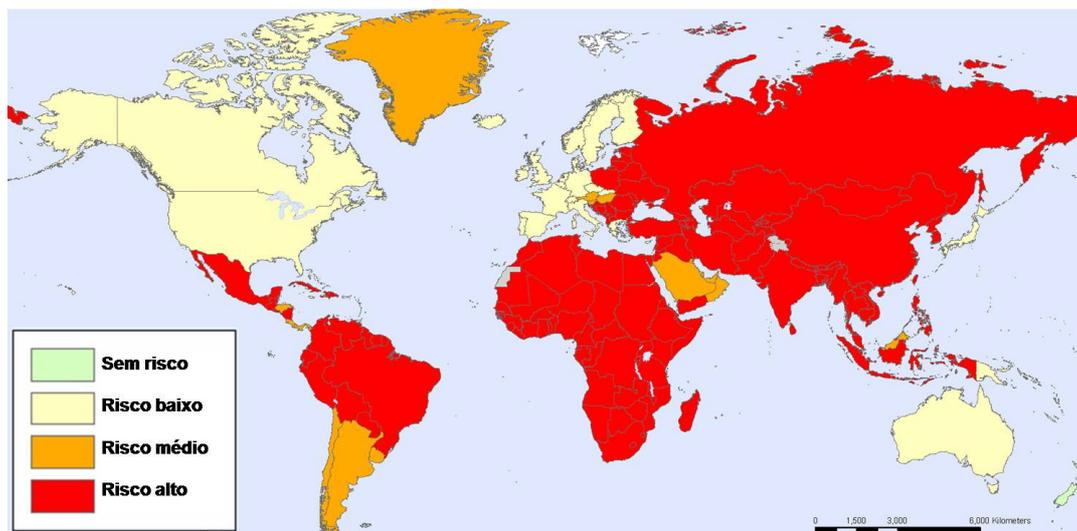


Figura 7: Áreas com risco de transmissão de raiva em 2010. Risco de contaminação pelo vírus da raiva em diversos países. Na América Latina, África e Ásia, o risco é de médio a alto. Apenas a Nova Zelândia nunca registrou nenhum caso de raiva. Fonte: Organização Mundial de Saúde. Disponível em: http://www.who.int/rabies/Global_Rabies_ITH_2010.png.

No Brasil foram registrados 157 casos de raiva humana entre 1980 e 2011, sendo 39% no norte, 54% no nordeste, 6% no Sudeste e 1% no Centro-Oeste. Destes, 60 % eram homens e com idade média de 12 anos. Apenas em um caso houve cura do paciente. Foi em 2008, em Recife, quando um jovem de 15 anos recebeu um tratamento experimental após ser mordido por um morcego (Brasil, 2010).

1.2.1. Rabies virus

O RV pertence ao gênero *Lyssavirus*, família *Rhabdoviridae*. Possui um virion típico em forma de bala, envelopado e um genoma de RNA (Tordo *et al.*, 1986). O vírion tem entre 130-200 nm de comprimento (figura 8). O RNA é de fita simples, com polaridade negativa e a ele, ligam-se moléculas de nucleoproteína (N), fosfoproteína (P) e RNA polimerase (L). Esse conjunto de RNA e proteínas compõe o ribonucleocapsídeo (RNP) do vírion. O envelope viral consiste de uma camada de proteínas de matriz (M) rodeado por uma membrana lipídica, derivada da membrana da célula hospedeira durante o brotamento da partícula viral. No envelope, localiza-se a glicoproteína do vírus da raiva (GPV), na forma de trímeros. (Wunner, 2002). O genoma do vírus da raiva tem aproximadamente 11.932 nucleotídeos (nt) e codifica 5 proteínas ou seja, a nucleoproteína (N), a fosfoproteína (P), proteínas da matriz (M), a glicoproteína (GPV)

e da RNA polimerase viral (L) (figura 8). Essas regiões codificadoras são separadas por curtas regiões intergênicas não codificantes de 2-23nt de comprimento (Finke & Colzemann, 2005).

A.



B.

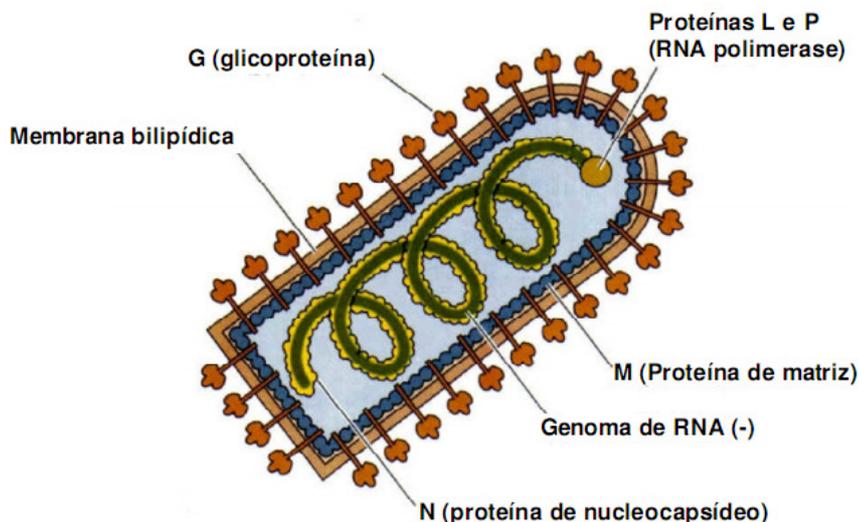


Figura 8: A. Representação esquemática do genoma do *rabies* vírus. O vírus da raiva possui um genoma de RNA fita simples negativa, com cerca de 12kb. Na região 3' há uma seqüência líder (LDR), com cerca de 10 nucleotídeos, seguidos pelos genes N (nucleoproteína), P (fosfoproteína), M (proteína de matriz), G (glicoproteína) e L (RNA polimerase). Fonte: CDC, 2011. Disponível em: <http://www.cdc.gov/rabies/transmission/virus.html>. **B. Esquema vírus rábico e de suas proteínas.** Adaptado de Rupretch (1996).

A nucleoproteína é a principal proteína do núcleo do RNP, tem 450 aminoácidos (aa) e sua principal função é a encapsidação do genoma para impedir sua digestão por ribonucleases endógenas da célula. A nucleoproteína também desempenha um papel na replicação viral, uma vez que a RNA polimerase somente se liga ao RNA viral encapsidado pela nucleoproteína (Tordo *et al.*, 1988; Wunner, 2002).

A fosfoproteína é fosforilada, possui 302 aa e atua como proteína regulatória da replicação viral, pois age diretamente na RNA polimerase viral funcionando como co-fator durante a transcrição e replicação do RNA viral (Chenik *et al.*, 1998).

A proteína da matriz possui apenas 202 aa e é a menor proteína do RV. As múltiplas funções da proteína incluem o revestimento do ribonucleocapsídeo durante a montagem viral, inibindo a transcrição do RNA viral e associando-se com a membrana plasmática. A interação da proteína M com o domínio citoplasmático da proteína GPV facilita o brotamento de novos virions (Finke & Conzelmann, 2003).

A RNA polimerase possui entre 2127-2142 aa e compreende mais da metade do genoma viral. Juntamente com a proteína P, que é o componente catalítico do complexo polimerase, a proteína L é responsável pela maioria das atividades enzimáticas durante a transcrição e replicação do genoma viral. A polimerase não é apenas responsável pela transcrição primária do genoma de RNA, mas também realiza modificações pós-transcricionais como 5' *capping*, metilação e adição de cauda 3' poli-A (Le Mercier *et al.*, 1997).

A GPV possui cerca de 520 aa e 60 kDa, com um peptídeo sinal de 19 aa, um ectodomínio de 439 aa, um domínio transmembrana de 22 aa e um domínio citoplasmático de 44 aa (Rath *et al.*, 2005; Wunner, 2002). O peptídeo sinal fornece o sinal que garante a inserção da proteína GPV na membrana do retículo endoplasmático rugoso. Esse peptídeo é então clivado e gera uma glicoproteína madura de 505 aa.

A GPV é a proteína viral imunogênica, pois induz a formação de anticorpos neutralizantes anti-RV e é também o principal alvo das células T auxiliares e das células T citotóxicas (Rath *et al.*, 2005). Além disso, a glicoproteína GPV determina a neuropatogenicidade do RV, pois ela reconhece receptores neurais específicos, como os receptores nicotínicos de acetilcolina (Lentz *et al.*, 1982).

Vários domínios antigênicos foram identificados na glicoproteína. Destes, o domínio Arg333 é provavelmente o mais bem estudado e tem sido demonstrado que mutações neste domínio podem afetar a patogenicidade do vírus (Seif *et al.*, 1985). A GPV atua também como um mediador da fusão pH-dependente do vírus com a membrana endossomal depois que o vírus é internalizado pela célula (Faber *et al.*, 2004). Além disso, a GPV está envolvida na disseminação trans-sináptica do vírus e promove a entrada do mesmo no SNC a partir do sistema nervoso periférico (Pulmanusahakul *et al.*, 2008). A GPV ainda desempenha um papel importante no brotamento do vírus e na propagação célula-célula (Wunner, 2002).

1.2.2. Manifestações clínicas

O RV é capaz de se replicar em células de diversos mamíferos. Ele afeta o SNC e sua transmissão ocorre através da saliva de animais contaminados. Inicialmente, o vírus se replica nas células musculares ou subepiteliais no local da contaminação. Após atingir uma alta concentração, o vírus alcança as terminações nervosas periféricas, se ligando ao receptor nicotínico da acetilcolina através da glicoproteína G. O vírus segue em direção ao SNC, onde é transportado célula a célula. O período que o vírus leva para atingir o SNC caracteriza o período de incubação, que varia de 20 a 50 dias (Finke & Conzelmann, 2005).

As regiões do SNC mais atingidas pelo vírus são o hipocampo, o tronco cerebral e as células de Purkinje, no cerebelo. Os sintomas costumam variar de acordo com a área cerebral afetada, mas de maneira geral, os sinais da raiva humana incluem febre, cefaléia, agressividade, ansiedade, insônia e fotofobia. Em animais os sintomas são basicamente os mesmos. Uma vez iniciados os sintomas clínicos, não há tratamento para a raiva e o animal infectado invariavelmente morrerá (Hemachudha *et al.*, 2002). No mundo, foram registrados apenas seis casos de cura de raiva humana. Um deles ocorreu em 2008, no Brasil, em Recife, onde um jovem de 15 anos foi curado após ser mordido por morcego (Brasil, 2008). Nesse sentido, a profilaxia é a melhor maneira de combate a raiva (Hemachudha *et al.*, 2002).

1.2.3. Profilaxia e tratamento

Para evitar a disseminação da raiva, a vacinação em massa dos animais domésticos é a melhor maneira. A primeira vacina anti-rábica foi produzida em 1895, por Louis Pasteur. A vacina foi obtida a partir da medula óssea de coelhos infectados, posteriormente tratadas com potássio, a fim de atenuar a virulência (Kotait *et al.*, 2009).

A principal vacina utilizada na América do Sul é a Fuenzalida & Palácios. Para a produção da vacina, o vírus é inoculado no cérebro de camundongos neonatos e é então purificado e inativado por β -propiolactona. Tal vacina tem sido amplamente utilizada em animais como tratamento profilático pré-exposição ao vírus e em humanos, como tratamento profilático pós-exposição ao vírus (Bahloul *et al.*, 1998). Infelizmente,

relatos de reações adversas associadas a aplicações da Fuenzalida & Palácios são comuns. Em humanos, é comum a vacina causar cefaléia e dores no local da aplicação durante um período de até quinze dias (Bonito *et al.*, 2004). Em animais, as reações podem ser ainda mais intensas, podendo apresentar inclusive anorexia, choque anafilático e hemorragias (Brasil, 2010). Na Ásia e na África a vacina mais utilizada é a Semple, produzida em cérebro de carneiro ou bode e inativada por fenol. Já na Europa, a vacina mais comum é a PDEV, produzida em embrião de pato. Há ainda diversas vacinas comerciais produzidas em cultura de célula. As principais são a PCECV, elaborada em células de embrião de galinha, e a PVCV, produzida em cultura de célula Vero. A PVCV vem sendo utilizada no Brasil. Infelizmente, essas vacinas ainda são caras e seu uso se restringe a humanos (Kotait *et al.*, 2009).

Em humanos, o tratamento profilático pré-exposição é recomendado para grupos com alto risco de exposição ao vírus, como veterinários, espeleólogos e profissionais de laboratórios que trabalham com o vírus. A vacina pré-exposição é recomendada ainda para pessoas que forem para áreas com surto de raiva (Kotait *et al.*, 2009).

Após um agravo (agressão ou contato) por mamífero possivelmente contaminado, é altamente recomendado o tratamento profilático pós-exposição. O tratamento deve ser iniciado o mais rápido possível, pois uma vez atingido o SNC, o caso evolui para óbito. O tratamento pode ser baseado apenas na vacinação ou na vacinação e soro e é recomendado que o indivíduo tome cinco doses de vacina anti-rábica produzida em cultura de célula, através da via intramuscular, na região do deltóide. A utilização ou não do soro é analisada de acordo com a probabilidade de o vírus atingir o SNC e depende principalmente do local e profundidade da mordida. O soro é um concentrado de anticorpos anti-rábicos, obtidos a partir do plasma de eqüinos hiperimunizados e deve ser utilizado apenas nos primeiros dias do tratamento profilático, até que o organismo do paciente seja capaz de produzir os próprios anticorpos (Brasil 2008).

1.2.4. Impacto econômico

Na América do Sul, o principal vetor da raiva é o morcego. Entretanto há diversos casos relatados em herbívoros rurais, levando diversos animais a óbito. No Brasil, as espécies mais afetadas são bovinos e eqüinos, seguidos por ovinos e caprinos. Em toda América Latina, morrem 100.000 cabeças por ano e estima-se que em 2009, as mortes causadas pela raiva representaram um prejuízo de mais de dois milhões de reais (Brasil, 2009). Durante os anos de 2009 e 2010 houve uma redução nos casos de raiva rural (figura 9), após campanhas extensivas de vacinação (Brasil, 2010).

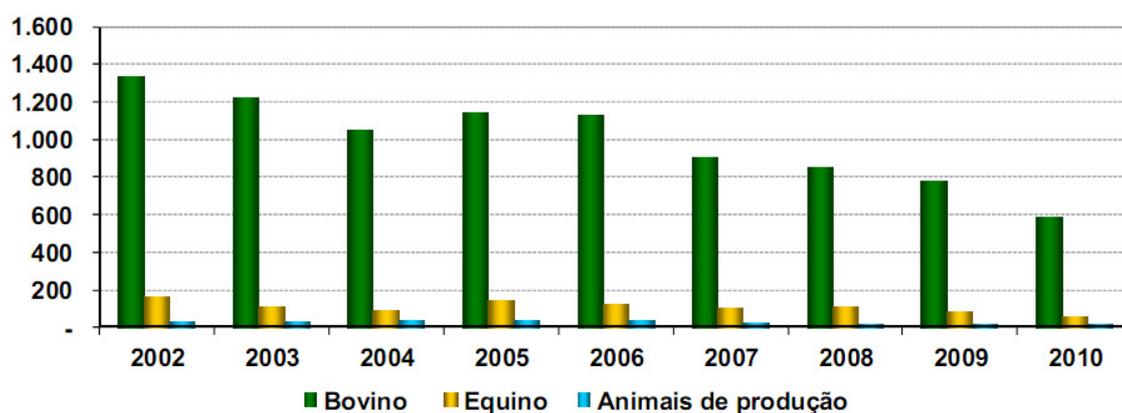


Figura 9: Casos de raiva rural registrados no Brasil entre 2002 e 2010. Fonte: Ministério da Saúde, 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1567.

O Brasil é o maior exportador de carne bovina e possui o segundo maior rebanho do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças. A carne brasileira é exportada para 139 países e gera um rendimento bruto de R\$6 bilhões de reais (Brasil, 2011b). Em 2010, foram registrados cerca de 600 casos de raiva bovina (figura 9). O número parece baixo, mas considerando-se que um boi possui em média 12 arrobas e que o preço médio da arroba é R\$93 (Pecuária, 2011), as mortes causadas pela raiva representam um prejuízo financeiro direto de quase R\$670 mil anuais, além dos prejuízos indiretos com o tratamento de pessoas que tiveram contato com os animais infectados. Devido ao impacto financeiro que a raiva ainda representa, são importantes os estudos que visem o desenvolvimento de vacinas mais baratas e eficazes.

2. OBJETIVOS

Dada a importância da GPV, o presente trabalho tem por objetivo, a expressão da proteína sob o comando do promotor CMV em células de insetos (Sf21), e células de mamíferos (HepG2, HuH7 e HeLa).

2.1. Estratégias

- Isolar o fragmento gênico CMV-GPV com enzimas de restrição;
- Clonar o fragmento CMV-GPV no vetor pFastBac1®;
- Construir o bacmídeo BacAcCMV-GPV;
- Construir o vírus recombinante AcCMV-GPV;
- Analisar a expressão da GPV em células de inseto infectadas com o vírus recombinante;
- Analisar a expressão da GPV em diferentes linhagens de células de mamífero transduzidas com o vírus recombinante.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Células

Para a obtenção do vírus recombinante, foi utilizada a linhagem celular Sf21, derivada de *Spodoptera frugiperda* (Gardiner & Stockdale, 1975), e TN5B, derivada de *Tricoplusia ni* (Granados *et al.*, 1994). As células foram mantidas em meio TC-100 (Invitrogen) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS), a 28 °C.

A linhagem de célula de mamífero HeLa, derivada de tumor cervical humano (Gey Go *et al.*, 1952), e a linhagem HuH-7, derivada de hepatoma humano (Nakabayashi *et al.*, 1982), foram mantidas em meio DMEM (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37 °C, 5% de CO₂ e umidade de 70%. A linhagem de células de mamífero HepG2, derivada de hepatocarcinoma humano (Knowles *et al.*, 1980), foi mantida em meio RPMI (GIBCO), contendo 10% de soro fetal bovino, a 37 °C, 5% de CO₂ e umidade de 70%.

3.2. Construção do plasmídeo pFastBac1CMV-GPV

Para a construção do plasmídeo pFastBac1CMV-GPV, o fragmento, contendo o promotor CMV e o gene GPV, foi clonado no vetor da Invitrogen pFastBac1®.

O plasmídeo GPV/PV, gentilmente cedido pelo Dr. Carlos Augusto Pereira, Instituto Butantã (figura 10), contendo o gene da GPV sob o comando do promotor CMV, foi digerido com as enzimas de restrição *Bgl*III e *Not*I para liberação do fragmento de DNA CMV-GPV. Para a reação foram utilizados 50 ng do DNA do plasmídeo GPV/PV purificado, tampão buffer D 1X(Promega), 5 unidades da enzima *Bgl*III (Promega) e *Not*I (Promega), para um volume final de 50 µL. O fragmento de 2702 pares de base (bp) foi purificado utilizando o kit de eluição GFX DNA and Gel Band Purification (GE) e ligado ao plasmídeo pFastBac1® (Invitrogen) previamente digerido com as enzimas *Bam*HI e *Not*I (figura 11), utilizando-se a enzima T4 DNA Ligase (Promega). A reação de ligação foi feita numa proporção 3:1 (inserto:vetor) e foram utilizados 150 ng do inserto CMV-GPV purificado, 50 ng do plasmídeo pFastBac1® digerido e 5 unidades da enzima T4 DNA ligase (Promega). A reação foi incubada a 4 °C por 16h. Após a incubação, foi feita uma transformação por choque

térmico em células *Escherichia coli* DH5- α quimio-competentes comerciais (Invitrogen). Para o choque térmico, 5 μ L da ligação foi misturada a 100 μ L de células, as quais foram incubadas em gelo por 30min. Em seguida, as células sofreram o choque térmico a 42 °C por 2min e, imediatamente depois, incubadas em gelo por mais 2min. Foi adicionado 1 mL de meio Luria-Bertani, LB (Sambrook *et al.*, 2001) e as células foram incubadas a 37 °C sob agitação constante por 1h. Após esse período, as células foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio LB-ágar e 50 μ g/mL de ampicilina e incubadas a 37 °C por 16h.

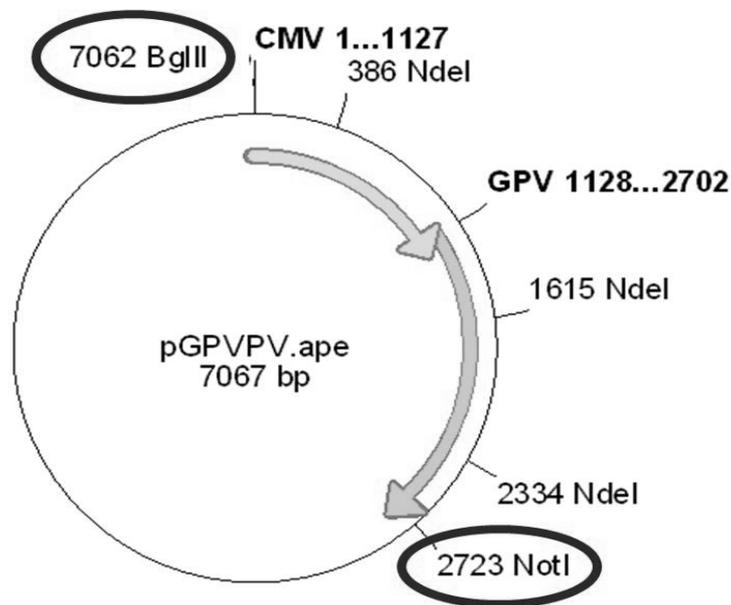


Figura 10: Mapa do plasmídeo GPV/PV. O plasmídeo contém o gene da glicoproteína do vírus rábico (GPV) sob o comando do promotor *immediately early* do citomegalovírus (CMV). Em destaque são apresentadas as enzimas utilizadas para a retirada do fragmento gênico CMV-GPV.

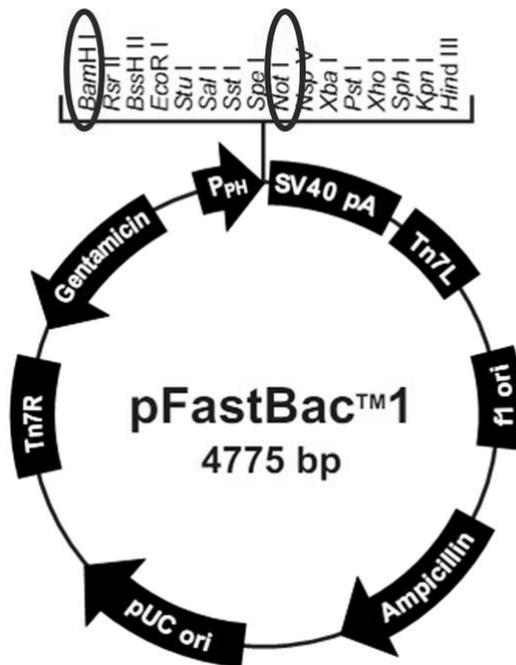


Figura 11: Mapa do plasmídeo pFastBac1 (Invitrogen). Os círculos destacam os sítios das enzimas utilizadas para a construção do vetor do presente trabalho. Fonte: Manual Bac-to-Bac Expression System, Invitrogen, 2004.

Após a incubação, colônias foram isoladas e incubadas em meio LB líquido contendo 50 µg/mL de ampicilina, a 37 °C sob agitação constante. O DNA plasmidial foi purificado através de lise alcalina em pequena escala de acordo com o descrito por Sambrook *et al.* (2001). Para confirmar a construção do plasmídeo pFastBac1CMV-GPV, o transformante foi digerido com a enzima de restrição *NdeI* e analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%. O promotor CMV e o gene GPV possuem sítios internos para a enzima *NdeI*, por isso essa foi a enzima escolhida para a confirmação da clonagem.

3.3. Transformação de células DH10Bac

Células DH10Bac quimio-competentes (Invitrogen) foram transformadas com 50ng do plasmídeo pFastBac1CMV-GPV por choque térmico, conforme descrito acima. Após o choque térmico, as células foram incubadas por 4 h e plaqueadas em placas LB-ágar contendo 50 µg/mL de canamicina, 7 µg/mL de gentamicina, 10 µg/mL de tetraciclina, 100 µg/mL de X-gal e 40 µg/mL de IPTG. As placas foram mantidas a 37 °C por 48h.

Após 48h, foram coletadas as colônias brancas da placa e uma colônia azul, para controle negativo. A colônia branca possui o gene *lacZ* interrompido pelo fragmento gênico transposto. Dessa maneira, o gene *lacZ* do bacmídeo não é capaz de complementar a deleção presente no cromossomo bacteriano. Nas colônias azuis o gene permanece intacto e assim o substrato cromogênico X-Gal é clivado. Cada colônia foi coletada delicadamente com um palito de dente estéril, e colocada em meio LB contendo 50 µg/mL de canamicina, 7 µg/mL de gentamicina e 10 µg/mL de tetraciclina e incubadas sob agitação por 16h. O DNA plasmidial foi purificado por lise alcalina em pequena escala conforme descrito por Sambrook *et al.* (2001). A correta transposição do fragmento CMV-GPV foi confirmada por reação da polimerase em cadeia (PCR), utilizando os oligonucleotídeos GPVF e M13R (tabela 2). Para a reação de PCR foram usados 2,5 µM de cada oligonucleotídeo (GPVF e M13R), 0,4 mM de dNTP, 2,5 mM de MgCl₂, tampão 1X, 1 unidade de Taq DNA polimerase (Fermentas) e 10 ng da amostra a ser confirmada. O programa de PCR consistiu em um ciclo de desnaturação inicial de 94 °C por 10min, seguido por 30 ciclos (94 °C por 1min, 54 °C por 1,5min, 72 °C por 1min) e concluído por um ciclo de polimerização final de 72 °C por 7min. Os fragmentos gerados pelas reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Tabela 2: Lista de oligonucleotídeos utilizados no trabalho.

Oligonucleotídeo	Sequência 5' → 3'	Localização
GPVF	5' TCG AGA ATT CGA GCT CGG TAC C 3'	Anela-se aos 20 últimos nucleotídeos do promotor CMV no plasmídeo pGPV/PV
GPVR	5' CTT ATC AGA TCT GCT CGA AGC 3'	Localizado a 5bp do fim do gene GPV no plasmídeo pGPV/PV
RT-GPVF	5' GGC AAT GTC TTA ATC CCA GAG A 3'	Localizado a 1162 bp do início do gene GPV no plasmídeo pGPV/PV
CMV9_29F	5' GGC CAT TAG CCA TAT TAT TCA TTG 3'	Posicionado a 9bp do início do promotor CMV no plasmídeo pGPV/PV.
CMV_518_495R	5' CCATGGTAATAGCGATGACTAATA 3'	Anela-se ao nucleotídeo 495 do promotor CMV no plasmídeo pGFP/PV.

Tabela 2: Lista de oligonucleotídeos utilizados no trabalho.

Oligonucleotídeo	Sequência 5' → 3' Localização
M13F	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3' Localizado a 145 bp da região esquerda de transposição no bacmídeo (Mini att TN7L)
M13R	5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3' Localizado a 128 bp da região direita de transposição no bacmídeo (Mini att TN7R)
T1	5' CCT GCA GGA TCC TTA GGT TTTTTTTTTTTTTTTTTT 3' Utilizado para RT-PCR (Análise do mRNA de células infectadas com os vírus recombinantes). Anela-se à cauda de Poli-A.
T2	5' CCT GCA GGA TCC TTA GGT T 3' Utilizado para RT-PCR Idêntico aos primeiros 19 nucleotídeos do oligonucleotídeo T1.

3.4. Transfecção com o bacmídeo BacCMVGPV

Meio milhão (5×10^5) de células TN5B foram transferidas para uma placa de 35 milímetros (mm) em diâmetro e incubadas por 1h para que as células aderissem à placa e todo o meio foi retirado. DNA (1 μ g) do bacmídeo BacCMV-GPV foi incubado em outra placa de 35 mm com 250 μ L de meio TC-100 sem soro por 10min à temperatura ambiente. Separadamente, foi incubado 10 μ L de Cellfectina 10 mg/mL (Invitrogen) com 250 μ L de meio TC-100 sem soro por 10min. A seguir, as duas soluções foram misturadas, incubadas por 10min, adicionadas às células TN5B e incubadas por mais 3h. O sobrenadante foi retirado e adicionados 2 mL de meio TC-100 com soro. Sete dias pós-transfecção, o sobrenadante foi coletado e utilizado para infectar uma nova placa de células Sf21. O vírus recombinante foi coletado e o DNA foi extraído. Para a extração do DNA viral, 1,5 mL do sobrenadante foi centrifugado a 1000 xg por 2min, apenas para eliminar o *debris* celular. A seguir, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 12000 xg, por 15min, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 100 μ L da solução *Virus Disruption Buffer* (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM EDTA; 0,25% SDS). Foi adicionado 20 μ g/ μ L de proteinase K e a amostra incubada a 37 °C por 16h. Após este período, foi adicionado 400 μ L de água e 500 μ L de uma solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). A amostra foi centrifugada por 10min, a 21000 xg. O sobrenadante foi coletado e o DNA foi

precipitado com duas vezes o volume inicial de etanol absoluto e 10% do volume inicial de acetato de sódio 3 M (Sambrook *et al.*, 2001).

O DNA purificado foi utilizado em uma reação de PCR para confirmar a presença do fragmento CMV-GPV. Os oligonucleotídeos utilizados foram o CMV9_29F e o GPVR (tabela 2) e as condições da reação foram as mesmas descritas anteriormente no item 3.3.

3.5. Análise da expressão da GPV em células de inseto

Células (10^6) Sf21 foram infectadas com 10 unidades formadoras de placa (pfu)/célula do vírus recombinante AcCMVGPV e do baculovírus selvagem AcMNPV. 120h pós-infecção (h.p.i.), as células foram coletadas e centrifugadas a 2.000 xg por 5min. Foram utilizadas também, células Sf21 não infectadas como controle negativo. O sedimento de células foi lavado três vezes com PBS 1X, ressuspensionado em 300 μ L de PBS 1X e as proteínas foram separadas através de um gel de poliacrilamida desnaturante (SDS PAGE). O gel de poliacrilamida é composto por um gel separador e um gel concentrador. O gel separador contendo 12% de acrilamida foi preparado em tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 contendo SDS 10%, 10 μ L de TEMED e 120 μ L de persulfato de amônio (10%) em volume final de 5 mL. Após a polimerização do gel separador, foi preparado o gel concentrador (acrilamida 4%, Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 10%, 10 μ L de TEMED e 120 μ L de persulfato de amônio 10%). As amostras foram fervidas por 5 min com tampão desnaturante (1X Tris-HCl 0,06 M pH 6,8, SDS 2%, glicerina 10%, bromofenol 0,02%, 50% de 2- β -mercaptoetanol).

A corrida de eletroforese foi realizada em tampão Tris-HCl 0,025 M pH 8,3, glicina 0,18 M, SDS 1% com tensão elétrica de 200 V, utilizando o aparato Mini-Protean II (BioRad). Após a corrida, o gel de poliacrilamida foi corado em uma solução de "Coomassie-blue" R-250 (0,25% em solução de metanol, água e ácido acético – 5:5:1) por 16h. A remoção do excesso de corante foi realizada por sucessivas lavagens com água destilada aquecida. Um segundo gel foi feito sob as mesmas condições. Tal gel não foi corado e suas proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Gibco BRL – Life Technologies) por transferência semi-seca (Trans-Blot® SD – Semi Dry Transfer Cell, Bio-Rad), de acordo com o protocolo do fabricante utilizando o tampão de transferência Towbin (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20%

metanol, pH 8.3). A membrana foi bloqueada por 16h a 4 °C em solução de PBS 1X e 3% de albumina bovina (BSA).

A membrana foi lavada 3 vezes com PBS Tween 0,05% e incubada à temperatura ambiente por 1h em uma solução de PBS 1X com 0,5% de BSA contendo soro imune de camundongo antirábico (gentilmente cedido pelo Instituto Butantã), numa proporção de 1:200. A solução foi descartada, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS Tween 0,05% e incubada a temperatura ambiente por 1h em solução de PBS 1X com 0,5% de BSA contendo *Rabbit Anti-Mouse IgG Alkaline Phosphatase Conjugated* (Zymed), numa proporção de 1:10000. A solução foi descartada, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS Tween 0,05%, a seguir foi lavada com o tampão da enzima fosfatase alcalina (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl pH 9,5) por 5min. A solução reveladora NBT/BCIP (Promega) foi adicionada logo em seguida. A reação foi interrompida através de sucessivas lavagens com água destilada.

3.6. Titulação do vírus AcCMVGPV

Células Sf21 foram diluídas em meio TC-100 com 10% de FBS para obtenção de uma concentração de 10⁵ células /mL. O estoque do vírus AcCMVGPV foi diluído em meio TC-100 com soro. Foram preparadas diluições seriadas de 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ e 10⁻⁸. As diluições 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴ foram descartadas, pois, como a quantidade de vírus presente é alta, todos os poços apresentariam infecção. Dez microlitros de cada diluição viral (10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ e 10⁻⁸) com 200 µL de células foram distribuídos na placa de 96 poços. Quatro poços foram reservados como controle, contendo apenas células. A placa foi incubada a 26 °C por sete dias. Segundo esta metodologia, o título viral é expresso em TCID₅₀/mL (*Tissue Culture Infectious Dose 50*), ou seja, a quantidade de vírus necessária para produzir efeito citopático em 50% das células inoculadas. O cálculo foi feito conforme descrito por O'Reilly *et al.* (1994).

3.7. Transdução de células HeLa

Células Sf21 foram inoculadas com os vírus citados no item 3.5 por 120h. O sobrenadante foi coletado e o vírus titulado conforme descrito no item 3.6.

Células HeLa foram transduzidas com um M.O.I de 100 dos vírus AcCMVGPV, AcMNPV selvagem ou apenas com meio de cultura de acordo com o protocolo descrito por Cheng *et al.* (2004). Células HeLa (10^5) foram incubadas em placas de 35 mm contendo meio DMEM com 10% de soro fetal bovino e lamínulas estéreis para a adesão celular. As lamínulas foram previamente incubadas em solução de NaOH 2 M por 2 h, a seguir incubadas em etanol absoluto por 30min e esterilizadas no fogo. Vinte e quatro h após o cultivo das células HeLa, todo o meio foi removido e foi adicionado 500 μ L do sobrenadante de células Sf21 infectadas, perfazendo um M.O.I de 100. As placas foram incubadas a 37 °C com 5% CO₂ por 8h, o sobrenadante foi removido e foi adicionado meio DMEM com 10% de SFB. As células foram então incubadas a 37 °C CO₂ com 5% CO₂ por 48h.

3.8. Análise da Expressão da GPV em células HeLa

Após a transdução, as células foram tratadas com tripsina-EDTA para se soltarem e foram lisadas com tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,2mM PMSF). Em seguida, as células foram sonicadas e centrifugadas a 2.000 xg por 5min. O sedimento de células foi ressuspensionado em 300 μ L de PBS 1X e as proteínas foram separadas através de um gel SDS-PAGE 12%, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e marcadas com o soro imune de camundongo antirábico, seguindo as mesmas condições descritas no item 3.5.

3.9. Imunomarcção para análise em microscopia de fluorescência

As células HepG2 (10^4), derivadas de hepatoma humano, cresceram aderidas à lamínula, fora transduzidas com um M.O.I de 100 do vírus recombinante AcCMVGPV, do vírus selvagem ou somente com meio de cultura e 48h pós-transdução, as lamínulas foram cuidadosamente coletadas e foi feita uma imunomarcção com soro imune de camundongo antirábico. As células foram fixadas com acetona absoluta gelada por 2h a 4 °C. A acetona foi removida utilizando-se papel filtro e as células foram bloqueadas com uma solução de BSA 10% por 30min. O excesso de BSA foi removido com um papel filtro e o anticorpo primário anti-rábico foi adicionado às células, numa diluição de 1:100 em BSA. As células foram incubadas por 2h e então lavadas 3 vezes com PBS

1X. Foi então adicionado o anticorpo secundário, *anti-rabbit Alexa-488 conjugated* (Invitrogen). A seguir, houve uma incubação de 1h, as células foram novamente lavadas 3 vezes com PBS 1X, seguida por uma lavagem com água destilada. As lamínulas foram secas com um papel filtro e foram montadas sobre lâminas, utilizando-se dois compostos, Image IFX Signal Enhancer (Invitrogen) e 0,2 g/mL de N-Propilgalato. Em seguida, as células foram analisadas em um microscópio de fluorescência (Zeiss Axiovert 200).

3.10. Análise transcricional (RT-PCR) em células HeLa

Células HeLa (10^5) foram transduzidas com um M.O.I de 100 do vírus recombinante AcCMVGPV, do vírus selvagem ou somente com meio de cultura e 24h pós transdução, o sobrenadante foi descartado e as células foram lisadas com 750 μ L TRizol LS (Invitrogen). A seguir, o RNA total foi extraído seguindo protocolo do fabricante. Ao final, o RNA foi dissolvido em 20 μ L de água milliQ livre de RNase. 10 μ L do RNA total foram utilizados para confecção do cDNA, através de transcrição reversa utilizando o kit M-MLV-RT (Invitrogen) e o oligonucleotídeo T1 (tabela 2). O cDNA foi utilizado para uma reação de PCR para amplificar o RNA mensageiro correspondente ao gene GPV. Os oligonucleotídeos utilizados foram RT-GPVF e T2 (tabela 2). Para a PCR foram utilizados 0,4 μ M de cada um dos oligonucleotídeos, 0,4 mM de dNTP, 2 mM de $MgCl_2$, tampão 1X, 1 unidade de Taq DNA polimerase (pHT) e cerca de 10 ng do cDNA produzido. O programa de PCR consistiu em um ciclo de desnaturação inicial de 94 °C por 10min, seguido por 30 ciclos (94 °C por 1min, 54 °C por 1,5min, 72 °C por 1min) e concluído por um ciclo de polimerização final de 72 °C por 7min. O produto de PCR foi digerido com a enzima de restrição *XhoI* (NEB, Biolabs) e analisado em gel de agarose 1,5%.

3.11. ELISA de células HuH7

Células HuH-7 foram cultivadas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino. As células foram tratadas com tripsina-EDTA para se soltarem. A seguir, foram contadas no hemacitômetro e cultivadas em placas de 6 poços por 24h. Cada poço recebeu 10^5 células.

O sobrenadante foi removido e foi adicionado o vírus recombinante, o vírus selvagem ou somente meio de cultura. As células foram incubadas por 90min a 37 °C. O sobrenadante foi removido, foi adicionado 2 mL de meio DMEM com 10% de soro e as células foram incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ por 60h. As células foram tratadas com tripsina-EDTA e lisadas com tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.2 mM PMSF) por 10min. O lisado celular foi utilizado para a quantificação da concentração da proteína GPV através de um ELISA utilizando o kit *Rabies Glycoprotein Enzyme Immunoassay* (Instituto Pasteur, Paris) segundo Astray *et al.* (2008). A densidade ótica (OD) de cada amostra foi lida duas vezes através de leitora de ELISA (Multiskan EX, MJ-Labsystems) a 490 nm. Com base nos valores de OD de uma amostra de GPV de concentração conhecida (amostra padrão), foi traçada uma curva-padrão, a qual permitiu determinar a concentração de GPV em ng/mL a partir da leitura da OD das amostras analisadas. Os dados foram utilizados para a confecção de um gráfico utilizando-se o programa GraphPad Prism.

4. RESULTADOS

4.1. Construção do plasmídeo pFastBac1CMV-GPV

O plasmídeo GPV/PV foi digerido com as enzimas de restrição *Bgl*II e *Not*I para liberação do fragmento de DNA CMV-GPV. O fragmento de 2.702 pares de base (bp) foi purificado e ligado no plasmídeo pFastBac1® (Invitrogen), previamente digerido com as enzimas *Bam*HI e *Not*I. O transformante esperado foi confirmado por restrição com a enzima *Nde*I. Os fragmentos esperados de 5,5 mil pares de base (kb), 1,2 kb e 0,7 kb foram liberados (figura 12).

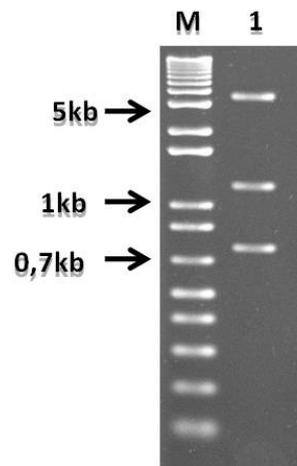


Figura 12: Análise da clonagem do fragmento pCMV-GPV no plasmídeo pFastBac1® (Invitrogen). Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com BrEt. Poços M Marcador 1kb Plus DNA Ladder; 1 Digestão do plasmídeo pFastBac1CMV-GPV com a enzima *Nde*I liberando os fragmentos de 5,499kb, 1,229 kb e 0,719 kb, correspondentes aos sítios internos presentes no promotor CMV e no gene GPV.

A figura 13 mostra o mapa do plasmídeo construído pFastBac1CMV-GPV, indicando as regiões do plasmídeo pFastBac1 e o local onde o fragmento CMV-GPV foi inserido. O clone obtido foi devidamente sequenciado para confirmação da presença do promotor CMV e do gene GPV.

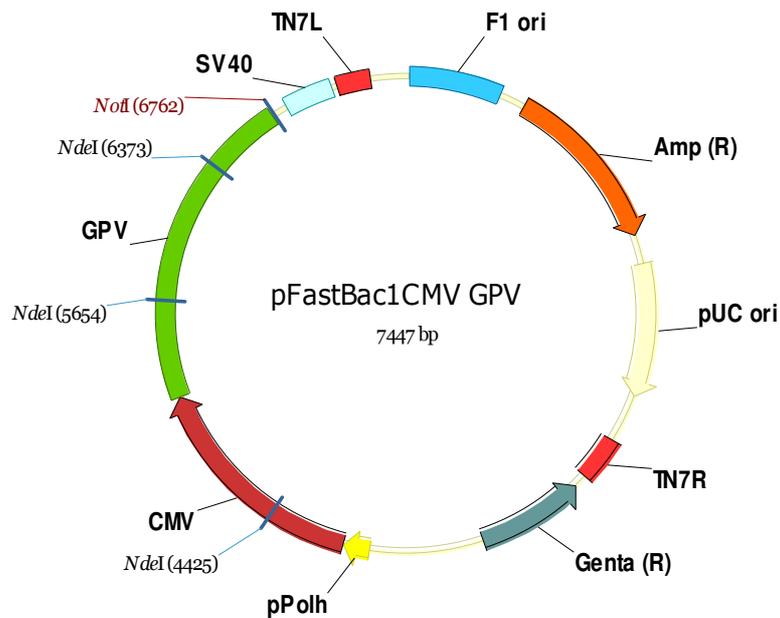


Figura 13: Mapa do plasmídeo construído pFastBac1CMV-GPV. Mapa do plasmídeo pFastBac1CMV-GPV produzido no programa VectorNTi (Invitrogen). No mapa estão indicados o promotor CMV, o gene GPV e a localização dos sítios de restrição da enzimas *NdeI* e *NotI*. São indicados no plasmídeo também as regiões de transposição TN7L e TN7R e os genes de resistência à ampicilina e à gentamicina, todos presentes no plasmídeo pFastBac1.

4.2. Transformação de células DH10Bac e obtenção do vírus AcCMV-GPV

O plasmídeo pFastBac1CMV-GPV foi utilizado para transformar células DH10Bac (Invitrogen). A presença do fragmento gênico CMV-GPV foi confirmada por PCR utilizando os oligonucleotídeos GPVF e M13R, amplificando o tamanho esperado de 2.230 pares de base (figura 14).

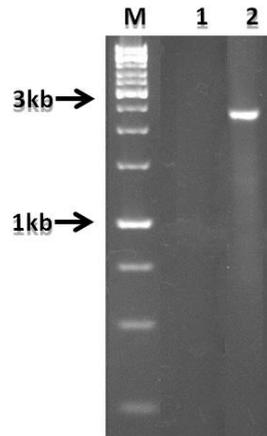


Figura 14: Confirmação da transposição do fragmento de interesse CMV-GPV para o DNA do bacmídeo. Gel de agarose 0,8% corado com BrEt. PCR do bacmídeo com os oligonucleotídeos GPVF e M13R para confirmar a correta transposição do fragmento de interesse. O BacAcCMV-GPV foi obtido a partir da transformação de células DH10Bac com o plasmídeo pFastBac1CMV-GPV. Poço M: 1 kb DNA Ladder (Fermentas); poço 1: controle negativo da reação de PCR (reação contendo todos os reagentes exceto o DNA); poço 2: PCR do bacmídeo BacAcCMV-GPV com os oligonucleotídeos GPVF e M13R.

O bacmídeo BacCMV-GPV foi utilizado para transfectar células TN5B. O DNA do vírus recombinante foi extraído e utilizado em uma reação de PCR a fim de confirmar presença do gene heterólogo no vírus recombinante. Foram utilizados os oligonucleotídeos CMVF e GPVR e o fragmento de cerca de 2,5 kb foi amplificado (figura 15). A figura 16 mostra esquematicamente a construção do vírus AcCMV-GPV.

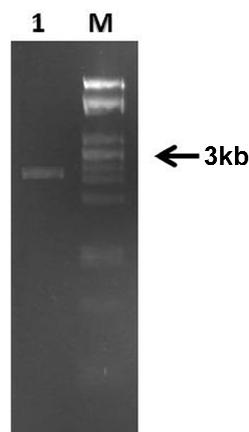
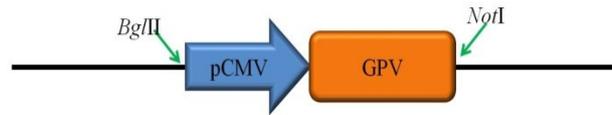
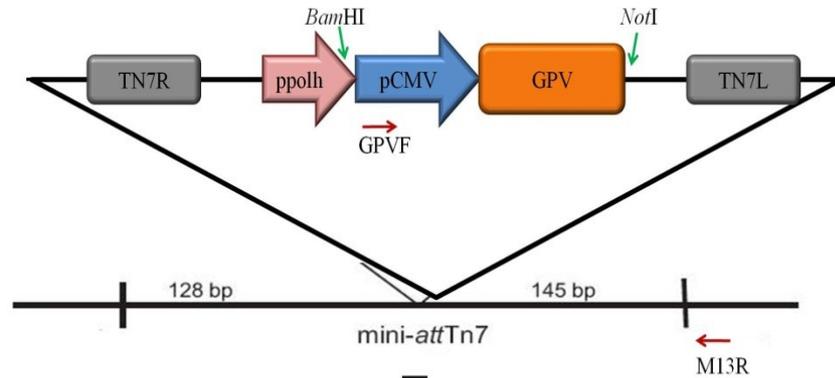


Figura 15: Confirmação da presença do fragmento gênico CMV-GPV no vírus recombinante construído, AcCMV-GPV. Gel de agarose 0,8% corado com BrEt. O DNA do *budded vírus* (BV) foi extraído e a amostra foi utilizada para uma reação de PCR utilizando-se os oligonucleotídeos CMVF e GPVR. O fragmento de 2,5 kb esperado (seta) foi obtido. Poço 1: PCR do DNA de BV utilizando-se os oligonucleotídeos CMVF e GPVR. Poço M: Marcador 1kb DNA Ladder (Fermentas).

a) O fragmento pCMV-GPV foi clonado no plasmídeo pFastBac1



b) O fragmento pCMV-GPV foi transposto para o bacmídeo AcMNPV.



b) Células de inseto Sf21 foram transfectadas com o bacmídeo BacAcCMV-GPV. 72 hpi o vírus AcCMV-GPV foi coletado.

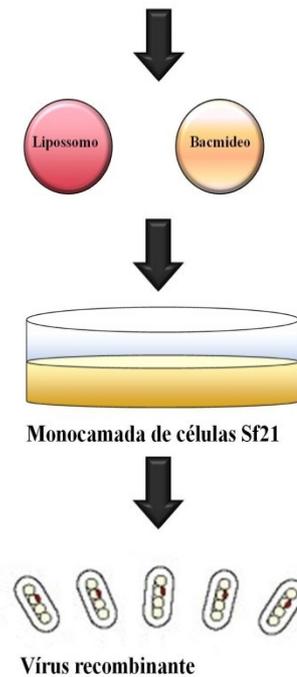


Figura 16: Representação esquemática dos passos executados para a obtenção do baculovírus recombinante AcCMV-GPV. O fragmento gênico contendo gene da glicoproteína da raiva (GPV) sob o comando do promotor do citomegalovírus (CMV), foi retirado do plasmídeo pGPV/PV por restrição. O fragmento foi então clonado no vetor pFastBac1 (Invitrogen). O plasmídeo obtido foi utilizado para transformar células DH10Bac para que o fragmento CMV-GPV fosse transposto para o bacmídeo AcMNPV. O bacmídeo obtido BacAcCMV-GPV foi utilizado para transfectar células de inseto Sf21. 72h pós-transfecção, o vírus recombinante foi coletado. Setas vermelhas indicam o local de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados para confirmar a transposição. Setas verdes indicam os sítios de restrição utilizados para a clonagem no gene de interesse.

4.3. Análise da expressão da GPV em células de inseto e mamífero

Os extratos de células Sf21 infectadas com os vírus recombinante, AcCMV-GPV, e selvagem, AcMNPV, bem como os extratos de células HeLa não transduzidas ou transduzidas com o vírus recombinante e com o vírus selvagem, foram analisadas em um gel de poliacrilamida desnaturante SDS-PAGE (figura 17).

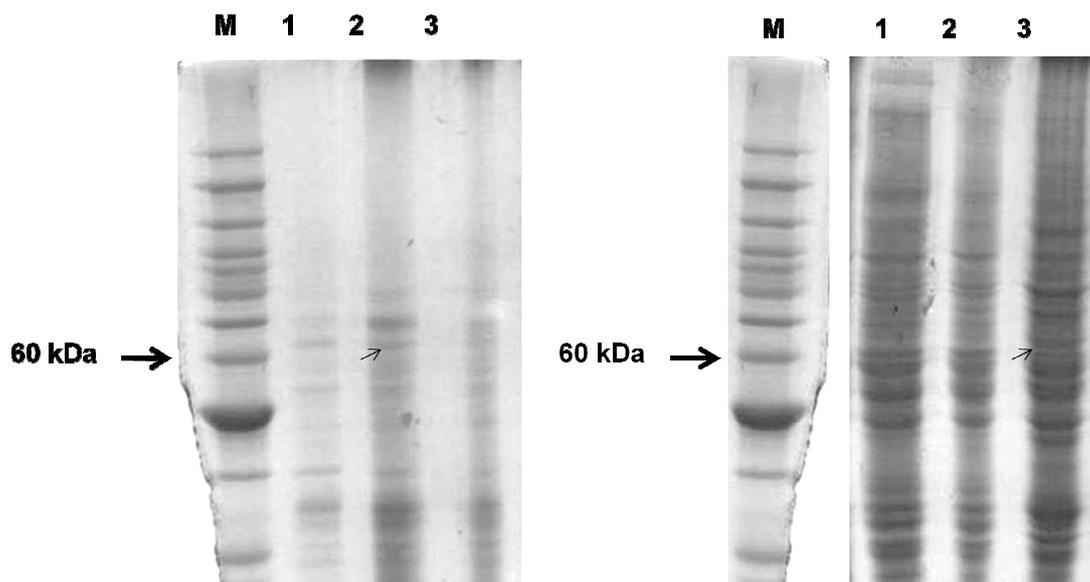


Figura 17: Análise da expressão da glicoproteína recombinante GPV em células de inseto e mamífero infectadas com o vírus recombinante AcCMV-GPV. SDS-PAGE 12% corado com azul de comassie. **A.** As células Sf21 infectadas foram coletadas, centrifugadas 4200 xg por 5min e o sobrenadante descartado. O sedimento celular foi lavado três vezes com PBS 1X. O extrato de células foi então fervido e suas proteínas foram separadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida. Poço M: Bench Mark (Invitrogen). Poço 1: Extrato de células Sf21 não infectadas. Poço 2: Extrato de células Sf21 infectadas com o baculovírus recombinante. Poço 3: Extrato de células Sf21 infectadas com baculovírus selvagem. **B.** As células HeLa foram transduzidas com o vírus selvagem ou recombinante e 48h pos transdução, as células foram tratadas com tripsina-EDTA, lisadas com tampão de lise, sonicadas e centrifugadas a 2.000 xg por 5min. O sedimento de células foi lavado três vezes com PBS 1X, ressuspensionado em 300 μ L de PBS 1X e as proteínas foram separadas através de de eletroforese em gel de poliacrilamida. Poço M: Bench Mark (Invitrogen). Poço 1: células HeLa não transduzidas. Poço 2: células HeLa transduzidas com o baculovírus AcMNPV selvagem. Poço 3: células HeLa transduzidas com o vírus recombinante AcCMV-GPV. Setas indicam o fragmento de 60 kDa cores.

Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e imunomarcadas com um anticorpo anti-rábico. A presença de uma

proteína de 60 kDa foi confirmada, indicando que houve a expressão da proteína heteróloga em células de inseto (figura 18B) e em células de mamífero (figura 18C).

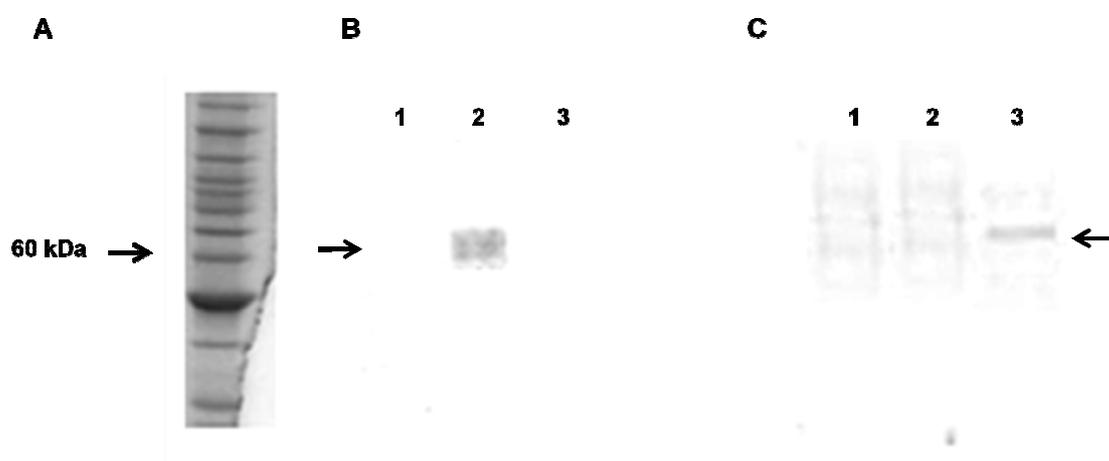


Figura 18: Confirmação da expressão da proteína heteróloga GPV em células de inseto e mamífero.

A. Marcador de massa molecular Bench Mark (Invitrogen). **B.** Imunomarcção. Proteínas de extrato de células Sf21 foram separadas por eletroforese, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e imunomarcadas com anticorpo anti-rábico. A proteína GPV foi detectada apenas no extrato de células infectadas com o vírus recombinante. Poço 1: Extrato de célula Sf21 não infectadas. Poço 2: Extrato de células Sf21 infectadas com o vírus recombinante AcCMV-GPV. Poço 3: Extrato de células Sf21 infectadas com o baculovírus AcMNPV selvagem. **C.** Imunomarcção. Proteínas de extrato de células HeLa foram separadas por eletroforese, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e imunomarcadas com anticorpo anti-rábico. A proteína GPV foi detectada apenas no extrato de células transduzidas com o vírus recombinante. Poço 1: Extrato de célula HeLa não transduzidas. Poço 2: Extrato de células HeLa transduzidas com o baculovírus AcMNPV selvagem. Poço 3: Extrato de células HeLa transduzidas com o vírus recombinante AcCMV-GPV. Seta indica o fragmento de 60 kDa.

4.4. Transdução de células HepG2, imunomarcção e análise em microscopia de fluorescência

Células HepG2 foram transduzidas com o vírus recombinante e 48h pós-transdução, analisadas em microscopia de fluorescência (figura 19). As células foram imunomarcadas, embora o sinal de detecção tenha sido fraco. Tal fato pode ser devido ao uso da acetona para fixação das células. A acetona é um solvente apolar, logo remove os lipídeos da membrana. Como a GPV ancora-se à membrana plasmática, parte da proteína expressa pode ter sido eliminada durante o processo de fixação.

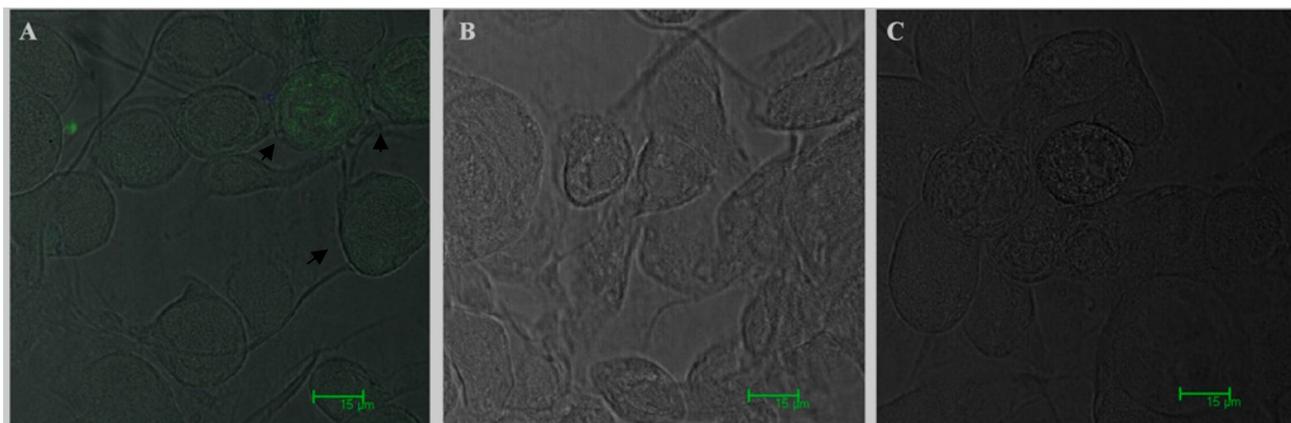


Figura 19: Análise de células HepG2 transduzidas com o vírus recombinante AcCMV-GPV. A. Células HepG2 transduzidas com o vírus recombinante. Setas indicam as células onde a proteína GPV foi marcada. B. Células HepG2 transduzidas com o vírus AcMNPV selvagem. C. Células HepG2 não transduzidas. Zeiss Axiovert 200, 100X.

4.5. Análise transcricional (RT-PCR) de células HeLa transduzidas com o vírus AcCMV-GPV

Células HeLa foram transduzidas com 100 unidades formadoras de placa (pfu)/célula do vírus recombinante AcCMVGPV. 24h pós transdução, o sobrenadante foi descartado, o RNA total foi extraído e utilizado para confecção do cDNA, através de transcrição reversa e um oligonucleotídeo oligo dT. O cDNA foi utilizado para uma reação de PCR para amplificar o RNA mensageiro correspondente ao gene GPV. Os oligonucleotídeos utilizados foram RT-GPVF e T2. O fragmento esperado de 415 bp foi amplificado e para confirmar que o fragmento era correspondente ao gene GPV, ele foi digerido com a enzima de restrição *XhoI* e os fragmentos esperados de 242 bp e 172 bp foram liberados (figura 20).

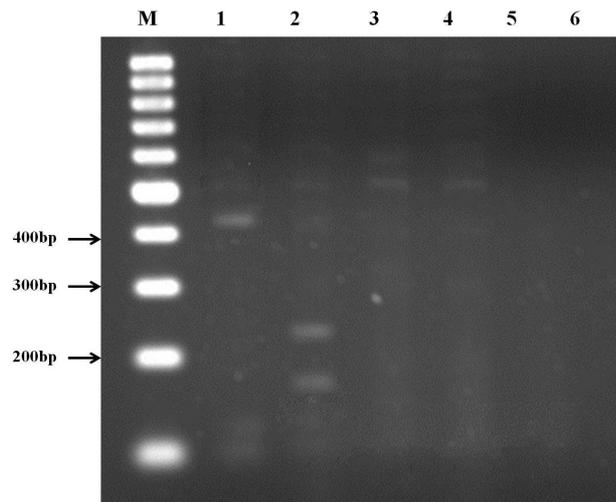


Figura 20: Confirmação da presença do transcrito GPV em células de mamífero HeLa transduzidas com o baculovírus recombinante AcCMV-GPV. Gel de agarose 0,8% corado com BrEt. Células HeLa foram transduzidas com o vírus AcCMV-GPV. 24h pós-transdução, o RNA total foi extraído e o cDNA foi sintetizado através de uma RT-PCR utilizando-se um oligonucleotídeo oligodT e um outro específico para o gene GPV. O produto de PCR foi digerido com a enzima de restrição *Xho*I. Poço M: Marcador 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). Poço 1: RT-PCR a partir do RNA total extraído de células HeLa transduzidas com o vírus AcCMV-GPV. Poço 2: Produto de RT-PCR de células HeLa transduzidas com o vírus recombinante digerido com a enzima *Xho*I. Poço 3: RT-PCR a partir do RNA total extraído de células HeLa transduzidas com o vírus AcMNPV selvagem. Poço 4: Produto de RT-PCR de células HeLa transduzidas com o vírus selvagem digerido com a enzima *Xho*I. Poço 5: RT-PCR a partir do RNA total extraído de células HeLa não transduzidas. Poço 6: Produto de RT-PCR de células HeLa não transduzidas digerido com a enzima *Xho*I. Setas indicam os fragmentos de 400 bp, 300 bp e 200 bp.

4.6. ELISA

Células HuH-7 foram transduzidas com o vírus AcCMV-GPV e a 60h pós-transdução, o lisado celular foi coletado e a proteína GPV foi quantificada através de um ELISA indireto utilizando-se um anticorpo monoclonal anti-GPV (gentilmente cedido pelo Butantã). O ELISA mostrou a produção da proteína heteróloga, pois quando comparado às células transduzidas com o vírus selvagem ou ao controle negativo, o valor da OD foi cerca de cinco vezes maior, correspondente a uma concentração de proteína de 20,98 ng/mL (figura 21).

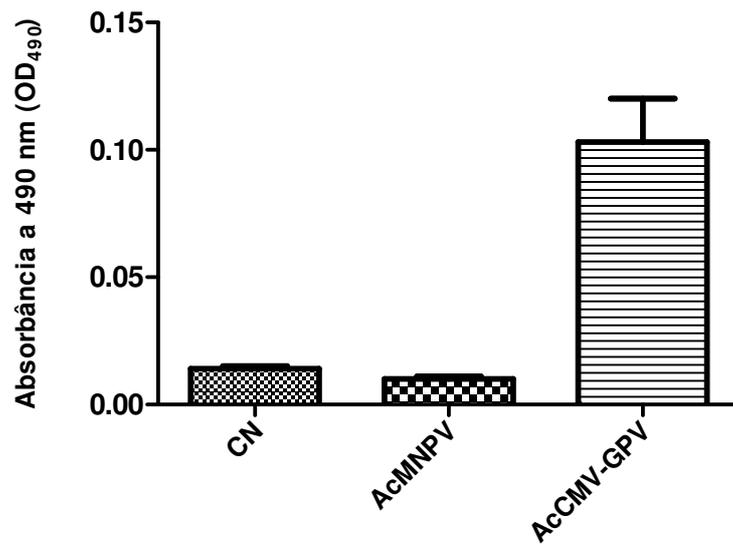


Figura 21: Quantificação da proteína GPV produzida em células de mamífero HuH-7 transduzidas com o baculovírus AcCMV-GPV. Células HuH7 foram transduzidas com o vírus recombinante AcCMV-GPV, com o baculovírus selvagem AcMNPV ou não transduzidas (CN). 60h pós-transdução, o sobrenadante foi coletado para quantificação da proteína GPV através de um ELISA indireto.

5. DISCUSSÃO

A GPV é a única proteína viral exposta no envelope, por isso ela está envolvida na entrada do vírus na célula hospedeira, bem como na resposta imunológica (Walker & Kongsuwan, 1999). Assim, devido ao seu papel central na resposta imune do hospedeiro, esse antígeno viral é o foco de diversas pesquisas para o desenvolvimento de vacinas mais baratas e eficientes (Rath, A. *et al.*, 2005).

Atualmente há uma vacina recombinante comercial, a Raboral V-RG®, a qual vem sendo utilizada nos Estados Unidos para o controle da raiva em animais silvestres, principalmente guaxinins, o principal vetor da doença do país. A Raboral V-RG® é produzida a partir de um vacínia vírus recombinante expressando a GPV (Raboral®, 2011). Entretanto muitos países ainda produzem vacina anti-rábica a partir de cultura de tecido nervoso animal, a qual é cara e pode produzir uma série de efeitos adversos (Rath, *et al.*, 2005). Esse é o caso do Brasil, onde a vacina mais utilizada é a Fuenzalida & Palácios, constituída por vírus inativado e 2% de tecido nervoso originário de cérebro de camundongo (Bahloul, *et al.*, 1998).

A produção de uma vacina mais barata e eficiente poderia levar à erradicação da raiva humana e a uma queda significativa dos casos de raiva animal nos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos, locais onde a incidência da doença é maior (Hemachuda, *et al.*, 2002).

No presente trabalho, a proteína GPV foi expressa com sucesso em células de inseto e mamífero utilizando um mesmo vetor. A GPV foi expressa em células de inseto Sf21 e em células de mamífero HeLa, HepG2 e Huh7 e foi detectada por *western blot*, ELISA e microscopia de fluorescência. O baculovírus recombinante AcCMVGPV contém o gene da proteína GPV sob o comando do promotor CMV. Sabe-se que o promotor CMV tem atividade em células de *Drosophila* (Sinclair, 1987). Sinclair mostrou que o promotor possui forte atividade em cultura de células de *Drosophila melanogaster*, o que explica a eficiente expressão da proteína heteróloga em ambas as células, de inseto e mamífero.

A proteína GPV já foi expressa com sucesso em diversos sistemas. Entre eles, pode-se citar *E. coli* (Yelverton *et al.*, 1987) e levedura (Klepfer *et al.*, 1993). Em ambos os sistemas, o nível de produção da proteína foi alto, entretanto a proteína não apresentou imunogenicidade. Plantas também foram utilizadas como sistema de

expressão. Em tomate (McGarvey *et al.*, 1995) e em tabaco (Ashraf *et al.*, 2005), a proteína produzida foi muito imunogênica, mas os níveis de expressão da proteína heteróloga foram baixos.

Em células de inseto, a GPV foi expressa em altos níveis e a proteína produzida apresentou propriedades imunogênicas. Em 2004, Prehaud *et al.* expressou a GPV em células de inseto Sf21 através do sistema baculovírus de expressão e em 2009, Lemos *et al.* expressou a proteína em células S2 de *Drosophila*.

Por tratar-se de uma glicoproteína, é de suma importância a busca de um vetor de expressão eucarioto. As células de inseto podem fazer diversas alterações pós-traducionais, como o correto dobramento, formação de pontes dissulfuro, adição de fosfatos e açúcares. Entretanto as vias de processamento nas células de inseto podem diferir daquelas presentes em eucariotos mais complexos (Kost *et al.*, 2005).

A glicosilação está entre as modificações pós-traducionais mais importantes. A correta glicosilação determina diferentes funções biológicas da proteína, tais como imunogenicidade, atividade biológica e correto dobramento (Montor & Sogayar, 2003). Estudos mostram que há grandes diferenças nas vias de glicosilação N-ligadas entre células de inseto e mamíferos. As células de inseto, bem como as células de mamífero, produzem precursores N-glicanos ricos em manose. Em mamíferos, essa cadeia pode ser convertida em produtos complexos, com a adição de galactose e/ou ácido siálico. Por outro lado, os insetos convertem a cadeia lateral rica em manose em pacimanose, a qual não costuma ser encontrada em proteínas produzidas em mamíferos (Harrison & Jarvis, 2006).

As variações das vias e do tipo de glicosilação entre um sistema e outro podem alterar as propriedades imunogênicas da proteína. Apesar das diferenças, algumas glicoproteínas foram expressas com sucesso em células de inseto utilizando o sistema baculovirus de expressão. A glicoproteína E2 do vírus da peste suína clássica foi expresso em células de inseto com eficiência. A glicoproteína foi purificada e mostrou-se altamente imunogênica. Há disponível uma vacina comercial contra a peste suína clássica, a Bayovac CSF E2®, produzida a partir do baculovírus recombinante (Depner *et al.*, 2001).

A hemaglutinina, uma glicoproteína do influenza vírus, também foi expressa em células de inseto. Em 1995, Lakey *et al.* desenvolveram uma vacina contra gripe expressando a hemaglutinina das três cepas sazonais do influenza vírus: H1N1, H3N2 e influenza B (Lakey *et al.*, 1996). As proteínas foram purificadas e diversos testes pré-

clínicos e clínicos foram feitos com a vacina trivalente. Os testes mais recentes mostraram que a vacina é eficiente e segura (Cox, 2008). Quase 15 anos após o desenvolvimento da vacina, em 2009, a agência americana FDA (*Food and Drug Administration*), autorizou a comercialização da vacina FluBlok® (FDA, 2009).

Muitas outras glicoproteínas foram expressas em células de inseto utilizando o baculovírus. No entanto, algumas mesmo sendo eficientemente produzidas *in vitro*, não apresentaram bons resultados nos testes *in vivo*. A glicoproteína do corona vírus (SARS) foi expressa em células de inseto, mas não conferiu proteção imunológica a camundongos (Bisht *et al.*, 2005). A glicoproteína B do pseudorabies vírus, um herpesvírus, também foi expressa em células de inseto e não apresentou proteção imunológica em camundongos (Xuan *et al.*, 1995). Em ambos os trabalhos, novos baculovírus recombinantes foram construídos, adicionando-se um promotor ativo em mamífero. As proteínas foram eficientemente expressas em células de mamíferos e conferiram proteção contra os patógenos específicos. A glicoproteína B do pseudorabies vírus foi expressa sob o comando do promotor CAG. A proteína foi expressa em células CPK e BHK e, posteriormente, o vírus foi inoculado através da via intramuscular (i.m.). A produção de anticorpos neutralizantes foi alta, comparada aos controles (Aoki *et al.*, 1999). Já a glicoproteína do corona vírus foi clonada sob o comando do promotor CMV e expressas em células BHK através de um baculovirus recombinante. O trabalho demonstrou que houve uma forte resposta tanto humoral, quanto celular (Bai *et al.*, 2007).

Tais resultados mostram que a proteína expressa em células de inseto não foi tão eficiente quanto a mesma proteína expressa em células de mamífero. Provavelmente, a ativação da resposta imunológica se deve à correta glicosilação da proteína expressa no segundo sistema. Um problema do uso de baculovírus recombinantes contendo um promotor de mamífero é que deve ser utilizada a partícula viral inteira e viva. Há uma série de preocupações quanto ao uso de vetores virais vivos devido à possibilidade de efeitos indesejáveis, como a ativação de uma resposta imune pré-existente ou efeitos tóxicos associados ao vetor (Madhan *et al.*, 2010).

Atualmente, há diversos vetores virais que podem ser utilizados como vacinas. Entre eles podem ser citados os adenovírus, os retrovírus, o vírus da febre amarela e o vacínia vírus. Esses vírus são utilizados como vetor de entrega de um DNA em uma célula humana, o qual expressa um antígeno que ativa uma resposta imunológica. O uso de vetores virais é promissor e testes *in vitro* e *in vivo* indicam que tais vetores podem

gerar resposta imune protetora. Entretanto, há preocupações quanto à segurança do uso desses vetores, como a possibilidade do vetor atuar como patógeno. Além disso, há dificuldades para a produção em larga escala desses vetores (Draper & Heeney, 2010).

Os baculovírus são capazes de entrar, mas não de se replicar em células de mamífero, logo podem ser utilizados para desenvolvimento de vacinas (Kost & Condreay, 2002). Embora sejam considerados seguros a humanos, testes envolvendo os efeitos do baculovirus em mamíferos devem ser realizados. Em nosso laboratório, foram realizados testes com o baculovírus selvagem *in vivo*. O vírus foi inoculado em camundongos através da via intranasal e os efeitos imunológicos foram analisados. Houve uma ativação da resposta imune inata, mas não foi detectada a produção de anticorpos contra o baculovírus ou a ativação de uma resposta inflamatória. Os resultados indicam que o baculovírus é seguro (dados não publicados). Outros trabalhos a respeito da segurança do uso do baculovírus *in vivo* devem ser feitos, testando-se também outras rotas de administração viral, como a i.m.

Em relação a outros vetores virais, o uso do baculovírus como vacina apresenta algumas vantagens. A produção e purificação do vírus em larga escala é mais simples que a de outros vetores como o adenovírus. Além disso, os baculovírus mostram-se mais eficientes na transferência gênica e na expressão de uma proteína heteróloga em cultura de célula de mamífero. O baculovírus foi comparado ao adenovírus, ao retrovírus e ao lipossomo (via comumente utilizada para entrega gênica em células de mamífero). A expressão da proteína heteróloga foi duas vezes, seis vezes e três vezes maior em células transduzidas por baculovírus que por adenovírus, retrovírus ou lipossomo, respectivamente. Ademais, o baculovírus não causou nenhum efeito citotóxico às células, diferentemente dos adenovírus e dos retrovírus (Cheng *et al.*, 2004).

No presente trabalho, foi construído pela primeira vez, um vírus recombinante capaz de expressar a GPV do vírus rábico em células de inseto e de mamífero. Posteriormente serão realizados testes *in vivo* para analisar os efeitos imunogênicos do vírus AcCMV GPV e sua capacidade de conferir proteção contra o vírus rábico.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Construção de um vetor viral para a expressão de glicoproteína da raiva em células de inseto de mamífero.

O presente trabalho teve como objetivo a expressão da GPV sob o comando do promotor CMV em células de insetos (Sf21 e TN5B), e células de mamíferos (HepG2, HuH7 e HeLa). Os resultados indicaram uma eficiente produção da proteína heteróloga em ambos os sistemas (inseto e mamífero).

A produção de um vírus recombinante, expressando eficientemente a GPV sob o comando de um promotor ativo em células de mamífero representa o desenvolvimento de uma potencial vacina contra raiva. Tal vacina seria produzida em cultura de célula de inseto e poderia ser mais barata que as atuais vacinas existentes produzidas em cultura de célula de mamífero, pois células de inseto são de fácil manipulação quando comparadas ao cultivo de células de mamíferos, não necessitando do uso de ambiente com CO₂. Além disso, apenas a partícula viral deveria ser purificada, sem a necessidade de purificação da proteína heteróloga, passo que encarece a produção de vacinas.

Para uso em humanos, a utilização de vetor viral como vacina ainda gera preocupações e somente poderá ser aprovada após intensos estudos sobre os efeitos do vírus em cobaias e humanos. Atualmente não há nenhuma vacina de vetor viral aprovada, embora haja algumas vacinas em fase de teste clínico. Por outro lado, os testes clínicos e pré-clínicos exigidos para a aprovação de uma vacina animal são menos rigorosos e há a possibilidade do uso de vetores virais, havendo doze vacinas de vetor viral aprovadas para uso veterinário. Uma vacina anti-rábica produzida em cultura de células para aplicação animal reduziria a chance de morte após efeitos colaterais causados pela vacina atual (Fuenzalida & Palácios).

CAPÍTULO 2

Estudo da transcrição gênica em células de mosquito C6/36 infectadas por um arbovírus (Dengue)

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dengue

A dengue é uma doença humana de ocorrência tropical e tem se tornado um grave problema de saúde pública, principalmente em médios e grandes centros urbanos (Halstead, 2007). Em 2010, foram registrados 957.093 casos clínicos de dengue e 382 óbitos na América do Sul. Somente no Brasil, no mesmo ano, foram registrados 940.013 casos e 367 mortes (PAHO, 2010). De acordo com a OMS (2010), estima-se que 2,5 bilhões de pessoas vivam em áreas de risco de contaminação por dengue (figura 22).



Figura 22: Mapa das áreas de risco de contaminação por dengue em 2010. Em laranja, estão destacadas as regiões onde a dengue já foi reportada. Fonte: OMS, 2010. Adaptado de: http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_DengueTransmission_ITHRiskMap.png.

A dengue é causada pelo *Dengue virus* (DENV) e é transmitida pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes*, família Culicidae, principalmente pela espécie

Ae. Aegypti (figura 23A), seguido pelo *Ae. Albopictus* (Rothman, 2004). Ambas as espécies são altamente antropofílicas.

O ciclo de vida do mosquito inclui quatro fases distintas: ovo, larva, pupa e adulto, sendo que as três primeiras se desenvolvem na água (figura 23B). A duração dos estágios de desenvolvimento depende diretamente da temperatura e umidade do ambiente (Gubler *et al.*, 1997).

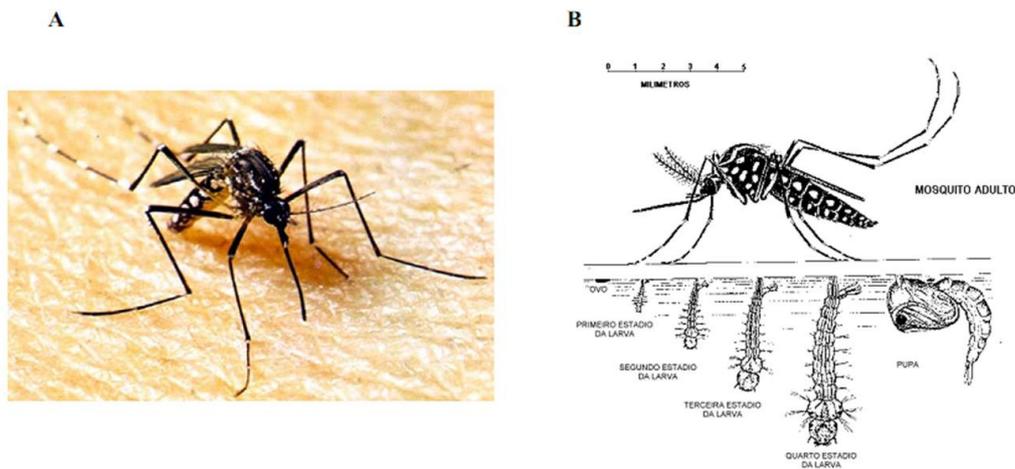


Figura 23: Mosquito transmissor da dengue, *Aedes aegypti*. A. Foto de uma fêmea do mosquito da espécie *Aedes aegypti*. B. Figura mostrando as diferentes fases de desenvolvimento (ovo a adulto) do mosquito *Ae. aegypti*. Adaptado de <http://www.prdu.unicamp.br/dengue/mosquito.html>

A dengue foi descrita pela primeira vez no mundo no final do século XVIII, em Java, uma ilha do sudoeste asiático. No Brasil, as primeiras epidemias foram registradas no estado de São Paulo, em 1916. No entanto, acredita-se que a doença exista no Brasil desde o início da colonização portuguesa. O *Ae. aegypti* é uma espécie africana e é provável que tenha chegado ao Brasil através dos navios negreiros (Brasil, 2011a).

Antes da ocorrência de surtos de dengue, no início do século XX, o Brasil enfrentava uma grande epidemia de febre amarela, doença viral transmitida pela picada de mosquitos da mesma espécie. Foi quando Oswaldo Cruz iniciou uma grande campanha para eliminar o mosquito vetor, o *Ae. aegypti*. As larvas eram eliminadas e doentes eram isolados em locais telados, a fim de evitar que os pacientes fossem picados por outros mosquitos. Durante a década de 1960, foi criado um intenso programa de dedetização e o Brasil foi certificado como país livre de *Ae. aegypti* (Pontes & Ruffino-Neto, 1994).

O controle vetorial intenso não continuou e logo focos do mosquito foram encontrados novamente no país. Em 1967 foram detectadas larvas do *Ae. aegypti* em Belém, Pará (OMS, 2010a). Mas foi somente entre os anos 1981 e 1982, que ocorreu a primeira epidemia de dengue, documentada clínica e laboratorialmente. Foi em Boa Vista, Roraima e desde então há surtos de dengue no Brasil continuamente (Brasil, 2011a).

1.2. Manifestações clínicas

A infecção pelo DENV pode ser assintomática ou pode apresentar um quadro febril que pode resultar em cura espontânea após cerca de uma semana ou agravar-se levando a sintomas hemorrágicos. Essa evolução da doença caracteriza os dois tipos clínicos de dengue, a dengue clássica e a dengue hemorrágica. O período de incubação varia de 3 a 14 dias. Os principais sintomas de dengue clássica são febre alta (> 39°C), dor retro-orbital (atrás dos olhos), mialgia (dores musculares), náusea, vômito e erupções cutâneas. A maioria dos casos evolui para cura cerca de sete dias após o surgimento dos sintomas. Contudo, cerca da metade dos pacientes apresenta sintomas hemorrágicos, os quais incluem pequenas hemorragias na pele e sangramentos no nariz e gengiva. Já na dengue hemorrágica, a sintomatologia inicial é semelhante à dengue clássica, entretanto, após cerca de uma semana, há um agravamento do quadro hemorrágico, com queda significativa da contagem de plaquetas e hemorragia gastrointestinal, podendo levar o paciente a óbito (Gubler, 1997).

O principal método de prevenção da dengue é o controle vetorial. Os mosquitos adultos não necessitam de água e os ovos do mosquito toleram ambientes secos por meses. Entretanto, é necessário que haja ambientes com água parada para o desenvolvimento das larvas e pupas (Gubler, 1997).

1.3. Dengue virus

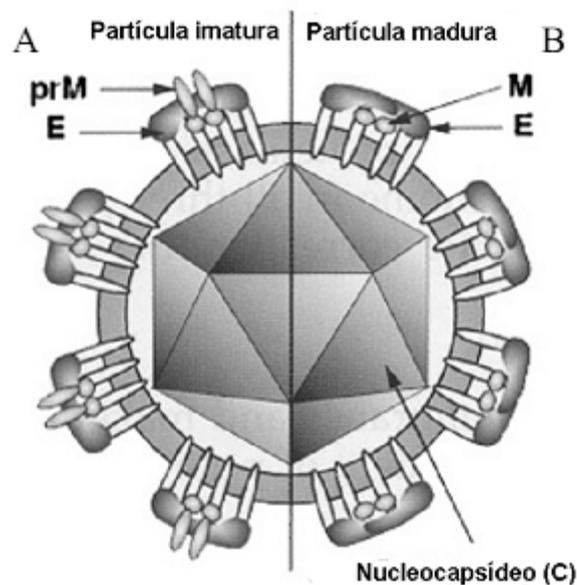
O DENV é icosaédrico, pequeno (30–40nm) e envelopado, pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* (figura 24A). O vírus possui o genoma de RNA simples de polaridade positiva (+ ssRNA). O RNA subgenômico está organizado em uma única fase aberta de leitura (ORF), que codifica uma poliproteína que é, então, processada por

proteases virais e hospedeiras em dez proteínas menores: três estruturais e sete não-estruturais (figura 24B). As proteínas estruturais são capsídeo (C), pré-membrana (pM) e envelope (E); e as não-estruturais são NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (Domingo-Carrasco & Gascón-Bustrenga, 2005)

O genoma é de aproximadamente 11 kb e é flanqueado por regiões não traduzidas conservadas (UTR), as quais formam estruturas secundárias que medeiam a circularização do genoma (Lescar *et al.*, 2008).

O vírion do *Flavivirus* é composto por um envelope derivado da membrana do hospedeiro, três proteínas virais estruturais (M, C e E) e do RNA genômico. O genoma é encapsidado em um capsídeo icosaédrico composto por proteína do capsídeo viral (C), uma proteína pequena que forma dímeros e é encontrada no núcleo das células infectadas (Netsawang *et al.*, 2010).

A.



B.

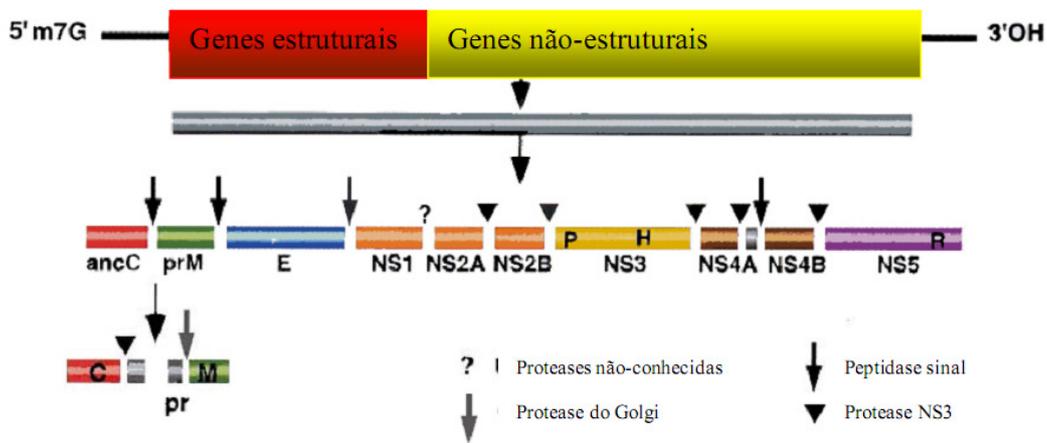


Figura 24: Vírus da dengue. A. Representação esquemática de uma partícula viral (A) madura e (B) imatura. B. Organização genômica dos flavivírus. Estão representados as proteínas estruturais capsídeo (C), pré-membrana (prM) e envelope (E); e as proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Adaptado de Van Regenmortel *et al.* (2000).

Em infecções por *Flavivirus*, são produzidos principalmente anticorpos contra a proteína E e pM. (Rothman, 2004).

Conforme citado, os *Flavivirus* codificam sete proteínas não estruturais. A função de todas elas ainda não está completamente elucidada, no entanto, elas são conhecidas por mediar a replicação do RNA viral e por participar do processamento da poliproteína (Bollati *et al.*, 2009).

A proteína NS1 é uma glicoproteína que forma um multímero e é secretada pelas células infectadas. Durante uma infecção pelo DENV, os pacientes têm níveis mensuráveis de NS1 no sangue, que pode ser utilizado como um marcador diagnóstico da infecção. A NS2a e NS2b são pequenas proteínas associadas à membrana e funcionam como co-fator da proteína NS3. A NS3 tem atividades serino-protease e helicase (Robin *et al.*, 2009). A NS4a e a NS4b também são proteínas associadas à membrana e são responsáveis pelas alterações que ocorrem na membrana durante a replicação (Miller *et al.*, 2007). A proteína NS5 é a RNA polimerase-RNA dependente, responsável pela replicação do genoma viral (Mallet *et al.*, 2007).

Das proteínas não estruturais, sabe-se que a NS1 aumenta a resposta imune mediada por anticorpo. Além disso, a NS1, em conjunto com a NS4b e a NS5 ativam a resposta imune mediada por células T (Rothman, 2004).

O DENV se liga ao receptor da célula hospedeira através da proteína E. Os receptores específicos que permitem a entrada do vírus na célula, bem como a estrutura

da ligação proteína E-receptor, ainda não estão bem caracterizadas. Entretanto, já foram identificados diversos receptores potenciais, como o receptor de manose (Miller *et al.*, 2008) e o receptor de células dendríticas (Navarro-Sanchez *et al.*, 2003) em células humanas e as proteínas de choque térmico (Salas-Benito, 2007) em mosquitos.

A ligação da proteína E ao receptor celular medeia a entrada do vírus na célula por endocitose. Após a internalização, o baixo pH do endossomo promove uma alteração conformacional na proteína E. Com isso, a proteína se funde à membrana do endossomo (Heinz & Allison, 2000). Como resultado, o capsídeo sai do envelope viral e entra no interior da célula. O capsídeo então se dissocia e libera o genoma viral no citoplasma, onde ele é traduzido como uma única poliproteína. A poliproteína é endereçada ao retículo endoplasmático, onde sofre clivagens proteolíticas por proteases virais e hospedeiras até a formação das três proteínas estruturais e das sete proteínas não estruturais e finalmente ocorre a montagem dos vírions (Bartenschlager & Miller, 2008).

A replicação do RNA viral ocorre em estruturas vesiculares associadas ao retículo endoplasmático. O RNA fita positiva viral é inicialmente replicado como um intermediário de sentido negativo, o qual é utilizado para a síntese de novas fitas de RNA positivas. Através de um mecanismo desconhecido, o genoma é empacotado nos capsídeos. Os vírions brotam do retículo endoplasmático como formas virais imaturas, as quais possuem as proteínas E e prM na superfície. Os vírions imaturos são transportados para o complexo de Golgi, onde a proteína prM é clivada e torna-se proteína M, originando um vírion maduro. Tais vírions são transportados para fora da célula por exocitose (Mukhopadhyay & Rossmann, 2005).

Há quatro sorotipos de DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), os quais apresentam diferenças antigênicas, embora sejam fortemente relacionados. Os quatro sorotipos diferem em suas sequências de nucleotídeos em 25-35%. Dentre os quatro sorotipos, o DENV-4 parece ser o mais divergente, seguido pelo DENV-2. Os vírus DENV-1 e DENV3 parecem ser mais relacionados entre si (Fauquet *et al.*, 2005).

1.4. Efeitos do DENV em mosquitos e imunidade em insetos

O DENV não se replica somente em células de vertebrados, mas também nas células do mosquito. Quando a fêmea se alimenta de sangue contaminado, o DENV

invade as células epiteliais do intestino médio e começa a replicar-se. Após a replicação no intestino, o vírus atinge a hemolinfa e, a seguir, demais tecidos do inseto (traquéia, tecido adiposo, tecido nervoso e glândulas salivares). O período de incubação extrínseco, ou seja, o tempo que o vírus leva para atingir as glândulas salivares, varia de 7 a 14 dias. É somente após esse período que o mosquito adquire a capacidade de contaminar novos hospedeiros vertebrados. O vírus pode se replicar na maioria dos tecidos do inseto, mas o número de áreas afetadas e o tempo de incubação dependem da linhagem do mosquito, do sorotipo viral e de fatores ambientais, como umidade e temperatura (Ramos-Castañeda *et al.*, 2008; Xi *et al.*, 2008).

O DENV replica-se em mosquitos e desenvolve uma infecção persistente sem causar efeitos deletérios ao hospedeiro invertebrado (Lin *et al.*, 2007). Entretanto, em cultura de células, é possível observar um efeito citopático nas células de inseto, a formação de sincícios (figura 25).

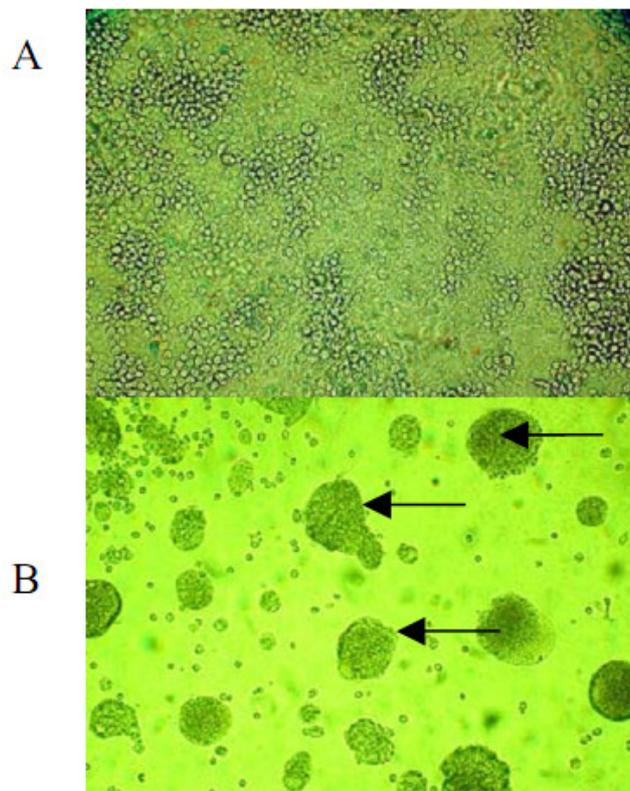


Figura 25: Efeitos citopáticos do vírus da dengue em cultura de células de mosquito C6/36. A) Células não-infectadas; B) células infectadas com o vírus da Dengue. Fotos gentilmente cedidas pelo Msc Antônio de Jesus Melo Chaib (LACEN-DF). Setas indicam a formação de sincícios.

Os insetos são dotados de um sistema imune simples, mas com uma resistência particular a infecções. Eles possuem uma barreira mecânica, formada pela cutícula, e um sistema imune inato, onde ocorre o envolvimento do tecido adiposo e dos hemócitos (Vilmos & Kurucz, 1998). Durante diversas infecções, são produzidas moléculas efetoras, como peptídeos antimicrobianos, além de ativação de mecanismos de fagocitose e encapsulação (Xi *et al.*, 2008). Em infecções virais, o silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi) parece ser o mecanismo mais comum. RNAi é um processo evolutivamente conservado, que leva à degradação de RNA fita dupla (dsRNA) e de qualquer outra seqüência de RNA mensageiro (mRNA) homóloga presente no organismo. O RNAi é um mecanismo eficiente, pois muitos vírus produzem dsRNA durante a replicação. Tal processo já foi encontrado em *Aedes ssp.* (Sanchez-Vargas *et al.*, 2004).

Há modelos propostos e bem aceitos para as vias de silenciamento gênico em *Drosophila*, mas esses processos parecem diferir em mosquitos da família Culicidae. (Li & Ding, 2005). Ainda que as moléculas envolvidas no mecanismo de RNAi de *Aedes* não tenham sido identificadas e caracterizadas, é possível induzir resistência contra DENV nos mosquitos. Células C6/36, derivadas de larva de *Ae. albopictus*, foram transduzidas com um *Sindbis virus* (vírus transmitido por mosquitos para mamíferos, aves, répteis e anfíbios) recombinante, expressando a proteína pM de DENV-2. Como consequência, as células se tornaram resistentes à infecção por DENV-2, mas não pelos outros sorotipos. A resistência pôde ser observada antes que a proteína pM fosse expressa, indicando que o processo ativo foi RNAi (Sanchez-Vargas *et al.*, 2004). Tais resultados indicam que é possível desenvolver resistência a DENV, e provavelmente a outras arboviroses, em *Aedes*.

Há muito conhecimento sobre os mecanismos de entrada e replicação de flavivírus em cultura de células de mamífero (Ruiz-Linares, 1989; Cheng, 1997) e seus efeitos *in vivo* (Yauch & Shresta, 2008). No entanto, pouco se sabe a respeito dos processos moleculares do vírus no vetor.

Chee & Abubakar (2004) identificaram uma proteína de 48 kDa que, provavelmente, é responsável pela ligação do DENV à célula de *Ae. albopictus* C6/36. Recentemente, foi identificada uma proteína (C189), caracterizada como uma tetraspanina, que tem seus níveis de expressão aumentados após uma infecção por DENV em células C6/36. Tal proteína parece ser responsável pelo movimento do vírus célula-célula (Lin *et al.*, 2007). Sabe-se também, que o sistema traqueal do inseto

facilita, de alguma maneira, a dispersão do vírus para os demais órgãos, a partir do intestino médio (Salazar *et al.*, 2007).

1.5. Hibridização subtrativa

Genes são diferencialmente expressos em termos de tempo e espaço nas células de acordo com os estímulos que as mesmas recebem, como por exemplo, a alteração da temperatura ou a presença de determinado patógeno. Atualmente, há uma extensa base de dados de seqüências de proteínas, genes e genomas completos. Dessa forma, isolar e seqüenciar um determinado gene e compreender em que tipo de resposta biológica ele está envolvido pode fornecer dados importantes sobre o metabolismo dos organismos.

Existem diversas técnicas para identificar genes diferencialmente expressos. Todas elas se baseiam no enriquecimento e posterior detecção de uma população de mRNA sem a necessidade do conhecimento de seqüências de genes específicos (Pastorian *et al.*, 2000).

Uma importante técnica para identificação de genes diferencialmente expressos é a análise representativa diferencial (RDA, do inglês, *representational difference analysis*). A técnica baseia-se no enriquecimento de fragmentos de cDNA originários de um tecido ou células tratadas, mas que estejam ausentes na amostra não tratada (Litisyn *et al.*, 1995). A análise da expressão diferencial depende primeiramente em digerir o cDNA de ambas amostras, usando uma enzima de restrição. Em seguida, oligonucleotídeos são ligados aos dois grupos de cDNA, os quais são amplificados inespecificamente por PCR. Como a DNA polimerase utilizada para PCR amplifica mais eficientemente fragmentos de 150 a 1.500 pares de base, a restrição do cDNA permite que cerca de 90% das seqüências sejam reduzidas a esse tamanho. Novos oligonucleotídeos, nesse caso chamados de adaptadores, são ligados apenas aos fragmentos de cDNA originários do tecido tratado. Estes são então hibridizados com um excesso de cDNA do tecido não tratado. Fragmentos de cDNA comum a ambos os tecidos se anelam uns aos outros e, uma vez que os fragmentos de tecidos não tratado estão em excesso, qualquer fragmento de cDNA do tecido tratado comum ao não tratado, irá se anelar a uma fita complementar da amostra não tratada. Dessa forma, esses híbridos possuirão adaptadores em apenas uma das fitas. No entanto, fragmento de cDNA presentes apenas no tecido tratado se anelará neles mesmos. Assim, haverá

adaptadores em ambas as fitas e apenas esses híbridos serão amplificados exponencialmente (figura 26). Várias rodadas de hibridização devem ser executadas para que ao fim haja apenas a representação do cDNA presente no tecido tratado (Gao & Moore, 1996).

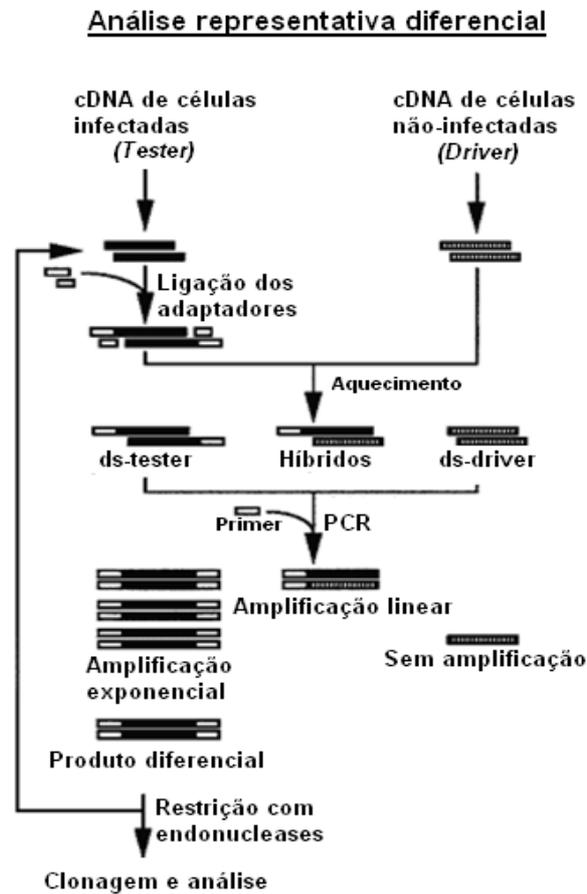


Figura 26: Representação esquemática das etapas de hibridização subtrativa através da técnica de análise representativa diferencial (RDA). Adaptado de Lisitsyn, 2003.

2. OBJETIVOS

Analisar a expressão gênica de células C6/36, derivadas de larvas de *Ae. albopictus*, permissivas, antes e depois de infecção com DENV e células UFL-AG-286 de *Anticarsia gemmatalis*, não permissivas, antes e depois da infecção. Com isso, pretende-se identificar alguns genes que são induzidos ou reprimidos pela replicação do DENV nas células em questão.

2.1. Estratégias

- Extrair o RNA total de células de inseto infectadas ou não pelo DENV;
- Confeccionar uma biblioteca subtrativa de cDNA através da técnica de análise representativa diferencial;
- Clonar o produto diferencial no vetor pGEM-T *easy*®;
- Seqüenciar os clones obtidos;
- Analisar as seqüências encontradas em programas de bioinformática.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Vírus

O dengue vírus sorotipo 1 (DENV-1), isolado do Distrito Federal, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Tatsuya Nagata. Tal isolado foi seqüenciado e caracterizado (Carvalho *et al.*, 2010).

3.2. Células

Células C6/36 (Igarashi, 1978), gentilmente cedidas pelo MSc Antônio Chaib de Melo (Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal, LACEN) foram mantidas em meio Leibovitz (Invitrogen), com 10% de soro fetal bovino (FCS) a 28 °C.

Células UFL-AG-286, derivadas de *A. gemmatalis* (Sienburth & Maruniak, 1988), BTI-Tn5B1-4 (TN5B), derivadas de *Trichoplusia. ni* (Granados *et al.*, 1994), foram mantidas em meio TC-100 (Invitrogen) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), a 28 °C.

3.3. Extração do RNA total e síntese do cDNA

Células C6/36 foram infectadas com o DENV-1 e sete dias pós-infecção o vírus foi titulado por imunofluorescência (Shoepf & Beaty, 1984). Células C6/36, permissivas ao vírus, e células TN5B e UFL-AG-286, não permissivas, foram infectadas com o DENV-1 purificado com um M.O.I de 100. As células foram coletadas 12h pós infecção e o RNA total de células infectadas e não infectadas foi extraído com TRIzol *Reagent* (Invitrogen) de acordo com protocolo do fabricante. O RNA total de ambas as amostras foi utilizado para confecção de um cDNA. 1,5 µg de RNA total foram utilizados na reação para confeccionar a primeira fita através de uma transcrição reversa utilizando 200 U/µL da enzima MMLV (Invitrogen), 10 µM dos oligonucleotídeos CDS e cDNA (tabela 2), 10 mM de dNTP, 10 mM de cloreto de magnésio e 4 mM de DTT. A reação foi incubada a 37 °C por 90min. A primeira fita foi utilizada como molde para a confecção da segunda fita através de uma reação de PCR

(95 °C por 1min, 21 ciclos de 95 °C por 15s, 55 °C por 30s, 68 °C por 5min e extensão final 68 °C por 7min). Para a PCR foram utilizados 3 µL da primeira fita, 10 µM do oligonucleotídeo PCRII (tabela 3) e 5 U/µL da enzima Taq High Fidelity (Invitrogen).

3.4. Hibridização Subtrativa

A biblioteca subtrativa de cDNA foi obtida através da técnica de RDA de acordo com o protocolo descrito por Pastorian *et al.* (2000). O cDNA dupla fita foi digerido com a enzima de restrição *Sau3AI* (Promega). As reações foram purificadas com kit GFX (GE). Primeiramente as amostras de células infectadas foram utilizadas como *tester*, ou seja, a essa amostra foram ligados os adaptadores. O primeiro par de adaptadores é o RBam12mer e o RBam24mer (tabela 2). Para a reação de anelamento (55 °C – 20s, 54 °C – 10s, 53 °C - 1s, 52 °C - 1s, 50 °C - 1s, 45 °C - 5s, 40 °C - 5s, 30 °C – 5s, 25 °C - 5s, 20 °C – 3s, 15 °C – 5s, 10 °C – 5s, 4 °C – 30s) foram utilizados 25 µL do cDNA clivado e 500 µM de cada adaptador. A seguir, foram adicionados 5 U/µL da enzima T4 DNA Ligase (Promega) e a amostra foi incubada a 16 °C por 16h.

A seguir, foi feita a primeira hibridização utilizando-se a amostra infectada com adaptadores como *tester* e a amostra não infectada sem adaptadores como *driver*, numa proporção *tester-driver* de 1:10. Após a primeira hibridização foi feita uma PCR e o produto foi utilizado para a realização de duas hibridizações subseqüentes. Para a segunda hibridização, foram utilizados os adaptadores NBam12mer e NBam24mer e a proporção *tester-driver* foi de 1:100. Na terceira hibridização os adaptadores foram o JBam12mer e o JBam24mer e a proporção *tester-driver* foi de 1:1000.

Paralelamente, as células não infectadas foram utilizadas como *tester*, ou seja, os adaptadores foram ligados ao cDNA de células não infectadas a fim de indentificar-se os genes *downregulados*.

Após a confecção de ambas as bibliotecas subtrativas, os produtos diferenciais foram ligados ao vetor da Promega pGEM T-Easy (figura 27) seguindo as instruções do fabricante.

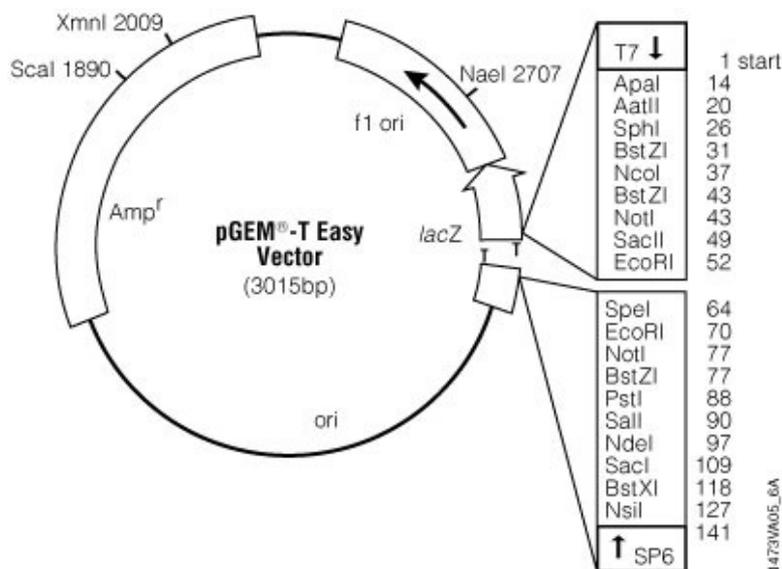


Figura 27: Mapa do plasmídeo pGEM T-Easy (Promega). No mapa estão indicados as timinas (T) nas extremidades para clonagem de fragmento de PCR. Fonte: Manual pGEM (Promega).

A ligação foi utilizada para transformar células *Escherichia coli* DH5- α eletrocompetentes comerciais (Invitrogen). A eletroporação foi feita de acordo com o descrito por Sambrook *et al.* (2001). As colônias isoladas foram inoculadas em meio LB líquido contendo 50 μ g/mL de ampicilina em placas de 96 poços de poço profundo, a 37 °C sob agitação constante. O DNA plasmidial foi purificado através de lise alcalina em placa em pequena escala (Quail, 2003). Algumas amostras tiveram a clonagem confirmada por restrição com a enzima *EcoRI* (Promega). Os clones foram seqüenciados utilizando-se o sequenciador automático MegaBace 1000 (GE HealthCare), utilizando o oligonucleotídeo T7 (tabela 3). O programa Phred foi utilizado para avaliar as seqüências de nucleotídeos dos clones de cDNA e as seqüências de vetores foram removidas. Sequências com pelo menos 100 nucleotídeos e qualidade do Phred maior ou igual a 20 foram analisadas. As seqüências obtidas foram analisadas no banco de dados do GenBank usando o programa BLASTX.

Tabela 3: Lista de oligonucleotídeos e adaptadores utilizados para a confecção da biblioteca subtrativa e para o sequenciamento

Oligonucleotídeos e adaptadores	Seqüência	Utilização
cDNA	5' AGC AGT GGT ATC AAC GCA GAG TAC GCG GG 3'	Síntese da primeira fita.
CDS	5' AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CT ₍₃₀₎ N ₁ N 3' N ₁ = A, G, C N= A, C, G, T	Síntese da primeira fita.
PCRII	5' AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT 3'	Síntese da segunda fita.
JBam12	5' GAT CCG TTC ATG 3'	Adaptador 1 (RDA)
JBam24	5' ACC GAC GTC GAC TAT CCA TGA ACG 3'	Adaptador 1 (RDA)
NBam12	5' GAT CCT CCC TCG 3'	Adaptador 2 (RDA)
NBam24	5' AGG CAA CTG TGC TAT CCG AGG GAG 3'	Adaptador 2 (RDA)
RBam12	5' GAT CCT CGG TGA 3'	Adaptador 3 (RDA)
RBam24	5' AGC ACT CTC CAG CCT CTC ACC GAG 3'	Adaptador 3 (RDA)
T7	5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3'	Sequenciamento dos cDNAs

4. RESULTADOS

4.1. Hibridização Subtrativa

Células C6/36, de mosquito, e células TN5B e UFL-AG-286, de lepdoptera, foram infectadas com o vírus DENV1 e a 12h pós infecção, o RNA total das células foi extraído e o cDNA foi confeccionado a partir de uma transcrição reversa, seguida por PCR (figura 28).

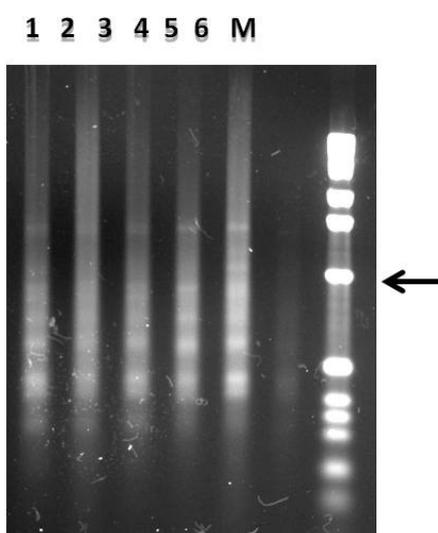


Figura 28: Síntese do cDNA de células de mosquito e lepdóptera infectadas com DENV1. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com BrEt. Células C6/36, TN5B e UFL-AG-286 foram infectadas com o DENV1. 12h pós-infecção, as células foram coletadas, o RNA total extraído e utilizado para confeccionar o cDNA. Poço 1: cDNA de células C6/36 não infectadas. Poço 2: cDNA de células C6/36 infectas com DENV1. Poço 3: cDNA de células TN5B não infectadas. Poço 4: cDNA de células TN5B infectas com DENV1. Poço 5: cDNA de células UFL-AG-286 não infectadas. Poço 6: cDNA de células UFL-AG-286 infectas com DENV1. Poço M: marcador 1 kb DNA ladder (Fermentas). Seta indica o fragmento de 1 kb.

Em seguida foram realizadas as hibridizações. Já logo após a primeira hibridização, não foi possível detectar nenhum produto de PCR a partir do cDNA das células derivadas de lepdópteros, TN5B e UFL-AG-286. Dessa forma, apenas foi possível confeccionar bibliotecas a partir das células C6/36 (figura 29).

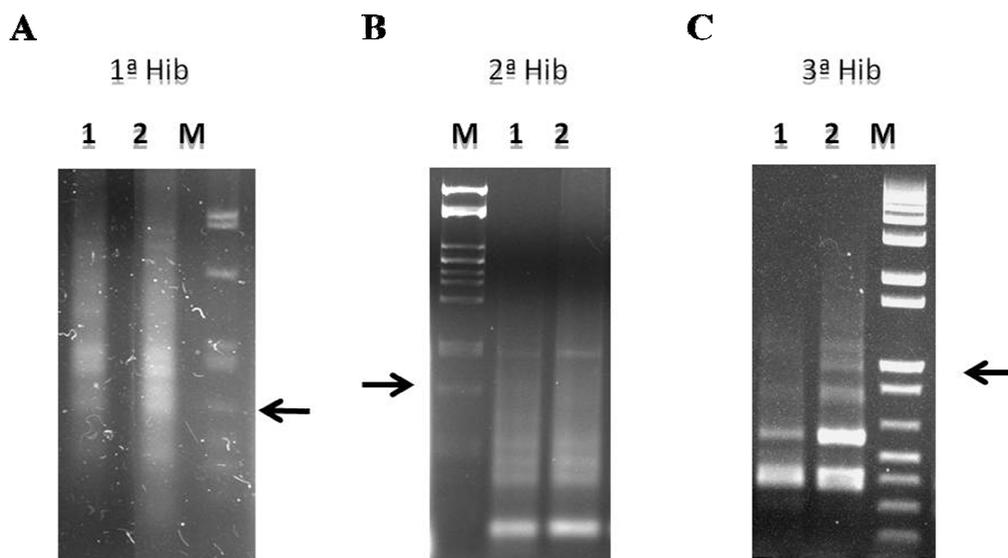


Figura 29: Análise dos produtos diferenciais. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com BrEt. O cDNA obtido a partir de células C3/36 infectadas ou não, foi clivado com a enzima de restrição *Sau3AI*. Para a detecção dos genes induzidos (*upregulados*), o cDNA de células infectadas foram utilizadas como *tester*, ou seja, a ele foram ligados adaptadores. Após a ligação dos adaptadores foram feitas três etapas de hibridização. Para a detecção dos genes reprimidos (*downregulados*), o cDNA das células não infectadas foi utilizado como *tester*. **A)** Primeira hibridização. Poço 1: Células C3/36 não infectadas utilizadas como *tester*. Poço 2: Células C3/36 infectadas utilizadas como *tester*. M: Marcador 1 kb DNA Ladder (Fermentas). **B)** Segunda hibridização. Poço 1: Células C3/36 não infectadas utilizadas como *tester*. Poço 2: Células C3/36 infectadas utilizadas como *tester*. M: Marcador 1k b DNA ladder (Fermentas). **C)** Terceira hibridização. Poço 1: Células C3/36 não infectadas utilizadas como *tester*. Poço 2: Células C3/36 infectadas utilizadas como *tester*. M: Marcador 1 kb plus (Invitrogen). Setas indicam o fragmento de 1 kb.

O produto diferencial foi clonado no plasmídeo pGEM T-Easy. O DNA plasmidial das amostras foi purificado e um total de 96 amostras foram utilizadas em reações de restrição com a enzima *EcoRI* a fim de confirmar a presença de algum fragmento gênico (figura 30). 75, das 96 colônias, apresentaram algum inserto gênico. Pode-se observar a presença de insertos de tamanhos variados, resultado esperado para uma biblioteca de cDNA.

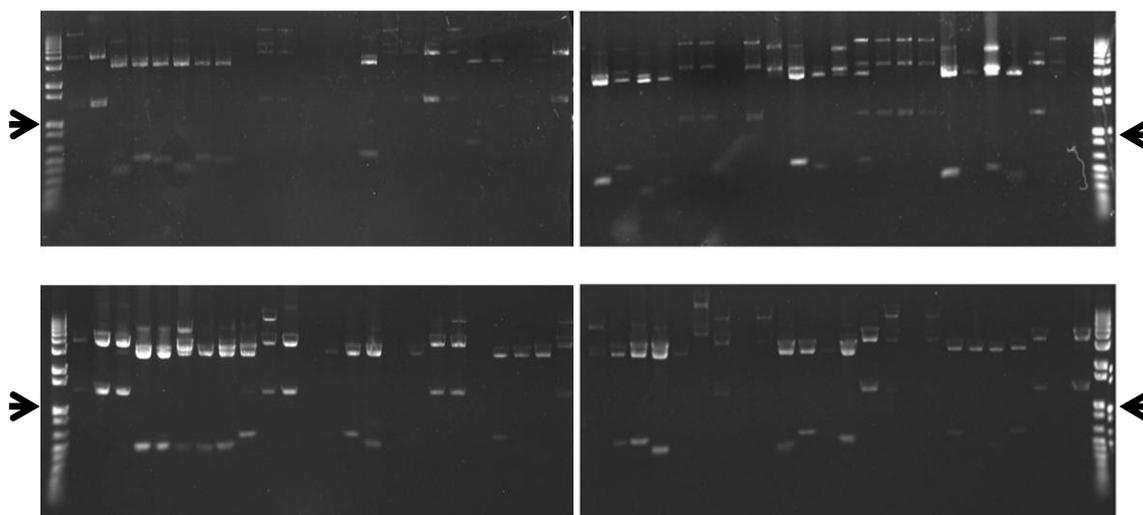


Figura 30: Confirmação da presença de inserto gênico em 96 colônias obtidas após a confecção da biblioteca subtrativa. Eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com BrEt. O produto diferencial obtido após as hibridizações das amostras de células C6/36 infectadas e não infectadas foi clonado no vetor pGEM T-Easy (Promega). Noventa e seis colônias foram selecionadas aleatoriamente, seu DNA extraído e digerido com a enzima de restrição *EcoRI*. Setenta e cinco colônias apresentaram insertos gênicos. Marcador: 1 kb DNA Plus (Invitrogen). Setas indicam o fragmento de 1 kb.

4.2. Análise das seqüências

Um total de 329 clones foram seqüenciados e analisados através do programa BLASTX. Foram 282 clones utilizando as células infectadas como *tester*, ou seja, para a detecção de genes induzidos, e 47 clones utilizando as células não infectadas como *tester*, para detecção de genes reprimidos.

Infelizmente, todas as seqüências encontradas foram de RNA ou proteínas ribossomais (tabela 4). Tal resultado indica que houve problemas técnicos na construção da referida biblioteca.

Tabela 4: Lista de genes encontrados após o seqüenciamento dos clones obtidos na biblioteca subtrativa, número de acesso e número de clones obtidos para cada gene.

Genes induzidos		
Gene Encontrado	Numero de acesso	Repetições
<i>Ae. albopictus</i> 18S rRNA	AB085210.1	93
<i>Smimtropis macroura</i> clone	EF093505.1	40
B05 mRNA sequence		

Tabela 4: Lista de genes encontrados após o seqüenciamento dos clones obtidos na biblioteca subtrativa, número de acesso e número de clones obtidos para cada gene.

<i>Ae. Albipictus</i> 18S	AY433294.1	12
<i>Ae. aegypti</i> 60S ribossomal protein L4	XM_001660494.1	62
<i>Drosophila erecta</i> GG21448 Subunidade maior L5	XM_002044315.1	17
<i>Ae. albopictus</i> 60S	XM_002073011.1	15
<i>Ae. vitattus</i> 18S	GU070863.1	5
TSA: <i>Culex tarsalis</i> Ctar-70 proteína hipotética Subunidade ribossomal menor	EZ000597.1	6
<i>Ae. aegypti</i> proteína ribossolma L5	XM_001648846.1	22
Genes reprimidos		
Gene Encontrado	Numero de acesso	Repetições
<i>Ae. albupctus</i> 18S rRNA	AB085210.1	47
Total de clones		329

5. DISCUSSÃO

Seqüências de nucleotídeos que diferem em abundância entre duas populações de cDNA podem ser clonadas e analisadas após sucessivas rodadas de hibridização e amplificação por PCR. Através de técnicas de hibridização, bibliotecas subtrativas podem ser confeccionadas e, dessa maneira, genes induzidos ou reprimidos podem ser identificados (Milner *et al.*, 1995).

No presente trabalho, foi feita uma biblioteca subtrativa de cDNA a fim de analisar as diferenças transcricionais entre células de mosquito infectadas ou não com DENV1. A técnica utilizada para a confecção da referida biblioteca foi o RDA. De maneira geral, o RNA total de células infectadas e não infectadas foi extraído, cDNA foi confeccionado a partir de uma transcrição reversa, os cDNA de células infectadas e não infectadas foram hibridizados e o produto diferencial foi amplificado por PCR. Os cDNAs amplificados foram clonados no vetor pGEM-T *Easy* e seqüenciados. Cerca de 300 clones foram seqüenciados. As seqüências obtidas foram analisadas em um banco de dados. Infelizmente, a maioria das seqüências foi de RNA ribossomal. Tal resultado indica que houve uma falha técnica na construção da referida biblioteca.

A técnica de RDA baseia-se na presença de duas populações de cDNA a serem hibridizadas. Uma população, denominada *tester*, é enriquecida através da ligação de adaptadores. É a população *tester* que terá seu cDNA diferencial clonado. O cDNA *tester* é então hibridizado com um excesso de cDNA da população *driver*. A eficiência da técnica de hibridização subtrativa depende principalmente da taxa reanelamento, determinada, entre outras coisas, pela concentração de *driver*. Outro fator determinante é o número de rodadas de hibridização utilizadas (Davidson, 1976)

Trabalhos para determinar um modelo cinético de hibridização em bibliotecas subtrativas foram desenvolvidos e indicaram que para bibliotecas de cDNA, devem ser realizados pelo menos três e no máximo seis rodadas de hibridização. Um fator que pode dificultar a hibridização e amplificação dos produtos diferenciais é o tamanho dos fragmentos. Fragmentos grandes, com mais de 2kb são amplificados mais lentamente e podem deixar de ser representados nos produtos clonados (Milner *et al.* 1995).

O protocolo de RDA utilizado no presente trabalho se baseia em três rodadas de hibridização e a após cada etapa de purificação do cDNA, a amostra é clivada com uma enzima de restrição a fim de diminuir a presença de fragmentos grandes (>2kb). De

acordo com o protocolo utilizado, a biblioteca pode ser confeccionada a partir de RNA total ou mRNA com a mesma eficiência (Pastorian *et al.* 2000). No entanto na literatura, há trabalhos que reportam a presença de genes ribossomais em bibliotecas subtrativas quando o RNA total é utilizado (Lysitsyn *et al.*, 1993). O excesso de RNA ribossomal presente na amostra pode levar a um baixo rendimento da fração de cDNA correspondente ao mRNA, o que leva a uma hibridização ineficiente (Matz *et al.*, 1999).

As técnicas de hibridização subtrativa têm diversas aplicações, como a identificação de patógenos, de genes causadores de doenças ou do comportamento celular sob condições determinadas (Gao *et al.*, 1996). Diversos trabalhos utilizaram técnicas de hibridização subtrativa para a identificação de genes importantes. Em 1995, a técnica de RDA foi utilizada em pacientes com esclerose múltipla. O cDNA de amostras de tecido cerebral obtidas por biópsia foram hibridizadas com amostras de doadores saudáveis. Foi identificada uma maior quantidade de um gene do herpesvírus humano (HHV6), um vírus neurotrófico. Embora o vírus tenha sido encontrado também no cérebro de pacientes saudáveis, há uma relação provável entre a infecção viral e a esclerose múltipla. Estudos têm sido realizados ao longo dos anos e até a presente data, a hipótese da esclerose múltipla virótica não foi confirmada nem excluída (Challoner *et al.*, 1995; Kakalacheva & Lunemann, 2011).

Técnicas de hibridização também foram utilizadas para estudar a resposta imune de mosquitos vetores contra patógenos. Kumar & Paily (2008) identificaram a presença de genes de peptídeos antimicrobianos e de defensinas em mosquitos da espécie *Culex quinquefasciatus* infectados com a filária *Wuchereria bancrofti*. Embora a função das proteínas identificadas não seja conhecida, acredita-se que elas estejam envolvidas na melanização do parasita (Kumar & Paily, 2008).

Em 2010, Barón e colaboradores confeccionaram uma biblioteca subtrativa utilizando duas populações de mosquitos *Ae. aegypti* da Colômbia. Uma é naturalmente refratária e a outra é suscetível a infecções com DENV2. Eles identificaram um grande número de genes diferencialmente expressos, incluindo moléculas imunes, inibidores de apoptose e fatores de transcrição como o NFκB (Barón *et al.*, 2010).

Outro estudo realizado com *Ae. aegypti*, determinou quais genes são ativados após um tratamento de choque térmico. Foram encontrados genes como da HSP26 (proteína de choque térmico), envolvida na tolerância ao estresse ambiental, e a HSC70, uma chaperona (Zhao *et al.*, 2009).

A confecção de bibliotecas subtrativas representa um estudo preliminar em relação à resposta imune do inseto. No presente trabalho, esperava-se a identificação de algumas moléculas envolvidas na resposta contra o DENV. Infelizmente, por falhas na técnica, tais genes não puderam ser identificados.

Após a clonagem dos cDNAs, as amostras foram enviadas para seqüenciamento no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília. Por problemas técnicos, a máquina de seqüenciamento ficou parada por muitos meses, o que atrasou a análise dos resultados e inviabilizou a repetição da biblioteca a tempo. A repetição está sendo realizada e foi adicionada uma etapa inicial de purificação de mRNA.

Embora tenha apresentado falhas, a técnica de RDA tem um grande potencial para o estudo de genes diferencialmente expressos durante infecções virais, para determinar o comportamento imune do hospedeiro, bem como a interação patógeno-hospedeiro (Pastorian *et al.*, 2000).

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Capítulo 2: estudo da transcrição gênica em células de mosquito C6/36 infectadas por um arbovírus (Dengue)

O objetivo do trabalho foi analisar a expressão gênica de células C6/36, derivadas de larvas de *Ae albopictus*, antes e depois de infecção com DENV1. Com isso, pretende-se identificar alguns genes que são induzidos ou reprimidos pela replicação do DENV nas células em questão.

O objetivo não foi alcançado, pois após a confecção da biblioteca e análise dos clones obtidos, a maioria das seqüências identificadas era de RNA ribossomal. O resultado indica que houve problemas técnicos na construção da biblioteca. A biblioteca está em fase de repetição.

A identificação dos genes presentes durante uma infecção por dengue vírus é imprescindível a fim de elucidar os efeitos de arbovírus em células de inseto, bem como os mecanismos de resistência viral existentes em mosquitos. O conhecimento desses processos pode levar ao desenvolvimento de compostos capazes de bloquear a replicação viral no vetor ou de vetores transgênicos resistentes aos vírus. Tais pesquisas facilitariam o controle dos vetores nas regiões onde há ocorrência e epidemias de dengue.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe T, Takahashi H, Hamazaki H, Miyano-Kurosaki N, 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.

Airenne KJ, Mahonen AJ, Laitinen OH, Yla-Herttuala S. Baculovirus-mediated Gene Transfer: An Emerging Universal Concept. In: *Gene and Cell Therapy*, New York: Marcel Dekker, Inc, 2009.

Andrade MCR, Oliveira AN, Romijn PC, Kimura LMS. Resposta imune produzida por vacinas anti-rábicas em sagüis (*Callithrix* sp). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1999, 32(5): 533-540.

Aoki H, Sakoda Y, Jukuroki K, Takada A, Kida H, Fukusho A. Induction of antibodies in mice by a recombinant baculovirus expressing pseudorabies virus glycoprotein B in mammalian cells. *Veterinary Microbiology*. 1999, 31;68(3-4):197-207.

Ashraf S, Singh PK, Yadav DK, Shahnawaz M, Mishra S, Sawant SV, Tuli R. High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. *Journal of Biotechnology*. 2005, 22;119(1):1-14.

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

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

Bai B, Lu X, Meng J, Hu Q, Mao P, Lu B, Chen Z, Yuan Z, Wang H. Vaccination of mice with recombinant baculovirus expressing spike or nucleocapsid protein of SARS-like coronavirus generates humoral and cellular immune responses. *Molecular Immunology*. 2008, 45(4):868-75.

Barón OL, Ursic-Bedoya RJ, Lowenberger CA, Ocampo CB. Differential gene expression from midguts of refractory and susceptible lines of the mosquito, *Aedes aegypti*, infected with Dengue-2 virus. *Journal of Insect Science*. 2010, 10: 41.

Barsoum J, Brown R, McKee, M, Boyce FM. Efficient transduction of mammalian cells by a recombinant baculovirus having the vesicular stomatitis virus G glycoprotein. *Human Gene Therapy*. 1997, 8: 2011-2018.

Bartenschlager R, Miller S. Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future Microbiology*. 2008, 3(2):155-65.

Bisht H, Roberts B, Vogel L, Subbarao K, Moss B. Neutralizing antibody and protective immunity to SARS coronavirus infection of mice induced by a soluble recombinant polypeptide containing an N-terminal segment of the spike glycoprotein. *Virology*. 2005, 334(2):160-5.

Bollati M, Milani M, Mastrangelo E, Ricagno S, Tedeschi G, Nonnis S, Decroly E, Selisko B, de Lamballerie X, Coutard B, Canard B, Bolognesi M. Recognition of RNA cap in the Wesselsbron virus NS5 methyltransferase domain: implications for RNA-capping mechanisms in Flavivirus. *Journal of Molecular Biology*. 2009, 9;385(1):140-52.

Bonito RF, Oliveira NM, Nishioka AS. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2004, 37: 7-9.

Boyce FM, Bucher NL. Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proceedings of Natinal Academy of Science of United States of America*. 1996, 93: 2348-2352.

Brasil. Ministério da Saúde. *Manual de diagnóstico da raiva*. 2008. Disponível em: < [portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_diagnostico_raiva](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_diagnostico_raiva.pdf)>. Acesso: 8 mar 2011.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Controle da raiva dos herbívoros: manual técnico*. Brasília: MPA/ACS, 2009.

Brasil. Ministério Da Saúde. Secretaria De Vigilância Em Saúde. Vigilância em Saúde. 2009. Disponível em: <www.saude.gov.br/svs>. Acesso em 20 abr 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Controle, Vigilância e Profilaxia da Raiva. 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/programa_vigilancia_raiva_dados_parciais_11.pdf>. Acesso em 15 mar 2010.

Brasil. *Dengue*: histórico. 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=22207>. Acesso em: 05 mai 2011.

Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. *Bovinos e bubalinos*. 2011. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>> Acesso: 31 ago 2011.

Bricks LF. Vacinas para dengue: perspectivas. *Pediatrics*. 2004, 26(4): 268-81.

Câmara FP, Santos GT. É possível controlar a dengue? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2010, 43(6): 754-755.

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

Carstens EB, Ball LA. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology*. 2009, 154 :1181-8.

Carvalho SES, Martin DP, Oliveira, LM, Ribeiro BM, Nagata T. Comparative analysis of American Dengue virus type 1 full-genome sequences. *Virus Genes*. 2010, 40: 60-66.

Castro MEB, Souza ML, Sihler W, Rodrigues JCM, Ribeiro BM. Biologia molecular do baculovírus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 1999, 34(10): 1733-1761.

Challoner PB, Smith KT, Parker JD, MacLeod DL, Coulter SN, Rose TM, Schultz ER, Bennett JL, Garber RL, Chang M. Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proceedings of Natinal Academy of Science of United States of America*. 1995, 1;92(16):7440-4.

Chee HY, Abubakar S. Identification of a 48kDa tubulin or tubulin-like C6/36 mosquito cells protein that binds dengue virus 2 using mass spectrometry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004, 320(1): 11-17.

Cheng Y. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature Medicine*, 1997, 3: 866-871.

Cheng T, Xu CY, Wang YB, Chen M, Wu T, Zhang J, Xia NS. A rapid and efficient method to express target genes in mammalian cells by baculovirus. *World Journal of Gastroenterology*. 2004, 10(11):1612-8.

Chenik M, Schnell M, Conzelmann KK, Blondel D. Mapping the interacting domain between rabies virus polymerase and phosphoprotein. *Journal of Virology*. 1998, 72:1925-1930.

Childs EC. Epidemiology. *Rabies*. London: Elsevier Science. 113-162, 2002.

Chuang CK, Sung LY, Hwang SM, Lo WH, Chen HC, Hu YC. Baculovirus as a new gene delivery vector for stem cell engineering and bone tissue engineering. *Gene Therapy*. 2007, 14; 1417-1424.

Chuang CK, Wong TH, Hwang SM, Chang YH, Chen GY, Chiu YC, Huang SF, Hu YC. Baculovirus transduction of mesenchymal stem cells: in vitro responses and in vivo immune responses after cell transplantation. *Molecular Therapy*. 2009, 17: 889-896.

Condreay JP, Witherspoon SM, Clay WC, Kost TA. Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proceedings of National Academy of Science of United States of America*. 1999, 96: 127-132.

Cory JS, Hails RS, Sait SM. Baculovirus ecology. *The baculoviruses*. New York: Plenum Press. 7-32, 1997.

Cox MM, Patriarca PP, Teanor J. FluBlok, a recombinant hemagglutinin influenza vaccine. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. 2008, 2(6): 211-9.

Davidson EH. Gene Activity. In *Early Development*. 3. Ed. Orlando: Academic Press, 1976.

Depner KR, Bouma A, Koenen F, Klinkenberg D, Lange E, de Smit H, Vanderhallen H. Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial II. Challenge study in pregnant sows. *Veterinary Microbiology*. 2001, 83: 107-120.

Domingo-Carrasco C, Gascón-Bustrenga J. Dengue y otras fiebres hemorrágicas virales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2005, 23: 615-626.

Draper SJ, Heeney JL. Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer. *Nature Reviews in Microbiology*. 2010, 8(1):62-73.

Faber M, Pulmanusahakul R, Nagao K, Prośniak M, Rice AB, Koprowski H, Schnell MJ, Dietzschold B. Identification of viral genomic elements responsible for rabies virus neuroinvasiveness. *Proceedings of National Academy of Science of United States of America*. 2004, 101:16328–16332.

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

FDA. *FluBlok*: Briefing Document. FDA Vaccines and Related Biological Products. Advisory Committee Meeting. 2009. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/BloodVaccinesandOtherBiologics/VaccinesandRelatedBiologicalProductsAdvisoryCommittee/UCM190837.pdf>>. Acesso em: 05 mai 2011.

Finke S, Conzelmann K. Dissociation of rabies virus matrix protein functions in regulation of viral RNA synthesis and virus assembly. *Journal of Virology*. 2003, 22:12074-12082.

Friesen PD. Regulation of baculovirus early gene expression. *The baculoviruses*. New York: Plenum Press. 7-32, 1997.

Funk CJ, Braunagel SC, Rohrmann G. Baculovirus structure. *The baculoviruses*. New York: Plenum Press. 7-32, 1997.

Gao SJ, Moore PS. Molecular Approaches to the Identification of Unculturable Infectious Agents. *Emerging Infectious Diseases*. 1996, 2(3): 159-167.

Gardiner GR, Stockdale H. Two tissue culture media for production of lepidopteran cells and nuclear polyhedrosis viruses. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1975, 25: 370–383.

Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research*. 1952, 12: 264-265.

Gibbons RV, Vaughn DW. Dengue: an escalating problem. *British Medical Journal*. 2002, 324 : 1563.

Granados RR. Replication phenomena of insect viruses in vivo and in vitro. *Safety Aspects of Baculoviruses as Biological Insecticides*. Bonn: Bundesministerium fur Forschung und Technologie. 163-184, 1978.

Granados RR, Guoxun L, Derksen CG, McKenna KA. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1994, 64 (3): 260-266.

Gronowski AM, Hilbert DM, Sheehan KCF, Garotta G, Schreiber RD. Baculovirus stimulates antiviral effects in mammalian cells. *Journal of Virology*. 1999, 73 (12): 9944- 9951.

Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews*. 1997, 11(3): 480-96.

Guy B, Saville M, Lang J. Development of Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Human Vaccines*. 2010, 6(9): 696-705.

Halstead SB. Dengue. *Lancet*. 2007, 370 (95): 1644-1652.

Harrison RL, Jarvis DL. Protein N-Glycosylation in the Baculovirus–Insect Cell Expression System and Engineering of Insect Cells to Produce “Mammalianized” Recombinant Glycoproteins. *Advances in Virus Research*. 2006, 68:159-91.

Heinz FX, Allison SL. Structures and mechanisms in flavivirus fusion. *Advances in Virus Research*. 2000, 55:231-69.

Hemachudha T, Laothamatas J, Rupprecht CE. Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. *Lancet Neurology*. 2002, 1: 101–09.

Ho YC, Chung YC, Hwang SM, Wang KC, Hu YC. Transgene expression and differentiation of baculovirus-transduced human mesenchymal stem cells. *Journal of Gene Medicine*. 2005, 7: 860-868.

Ho YC, Lee HP, Hwang SM, Lo WH, Chen HC, Chung CK, Hu YC. Baculovirus transduction of human mesenchymal stem cell-derived progenitor cells: variation of transgene expression with cellular differentiation states. *Gene Therapy*. 2006, 13: 1471-1479.

Hofmann C, Sandig V, Jennings G, Rudolph M, Schlag P, Strauss M. Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995, 92: 10099-10103.

Hofmann C, Wolfgang L, Strauss M. The Baculovirus vector system for gene delivery into hepatocytes. *Gene Therapy and Molecular Biology*. 1998, 1: 231-239.

Horton MH, 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.

Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *Journal of General Virology*. 1978, 40(3): 531-44.

Jackson AC, Warrell MJ, Rupprecht CE, Ertl HC, Dietzschold B, O'Reilly M, Leach RP, Fu ZF, Wunner WH, Bleck TP, Wilde H. Management of rabies in humans. *Clinical infectious Disease*. 2003, 36(1):60-3

Jarvis DL. Baculovirus expression vectors. *The baculoviruses*. New York: Plenum Prest, 1997.

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

Kakalacheva K, Lünemann JD. Environmental triggers of multiple sclerosis. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 2011, abr.

Keddie BA, Aponte GW, Volkman LE. The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. *Science*. 1989, 243(4899): 1728-33.

Kim CH, Yoon JS, Sohn HJ, Kim CK, Paik SY, Hong YK, Kim TG. Direct vaccination with pseudotype baculovirus expressing murine telomerase induces anti-tumor immunity comparable with RNA-electroporated dendritic cells in a murine glioma model. *Cancer Letters*. 2007, 250: 276-283.

Klepfer SR, Debouck C, Uffelman J, Jacobs P, Bollen A, Jones EV. Characterization of rabies glycoprotein expressed in yeast. *Archives of Virology*. 1993, 128(3-4): 269-86.

Knowles BB, Howe CC, Aden DP. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*. 1980, 209: 497-499.

Kost TA, Condreay JP. Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends in Biotechnology*. 2002, 20(4):173-80.

Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology*. 2005, 23(5): 567-75.

Kotait I, Carrieri ML, Takaoka NY. *Raiva: Aspectos gerais e clínica*. São Paulo: Instituto Pasteur. 2009.

Kronshnabl M, Marschall M, Stamminger T. Efficient and tightly regulated expression systems for the human cytomegalovirus major transactivator protein IE2 p86 in permissive cells. *Virus Research*. 2002, 83: 89-102.

- Kumar BA, Paily KP. Identification of immune-responsive genes in the mosquito *Culex quinquefasciatus* infected with the filarial parasite *Wuchereria bancrofti*. *Medical and Veterinary Entomology*. 2008, 22(4):394-8.
- Lakey DL, Treanor JJ, Betts RF, Smith GE, Thompson J, Sannella E, Reed G, Wilkinson BE, Wright PF. Recombinant baculovirus influenza A hemagglutinin vaccines are well tolerated and immunogenic in healthy adults. *Journal of Infectious Diseases*. 1996, 174(4): 838-41.
- Lang R. Toward a tetravalent dengue vaccine in Brazil. *Tropical Medicine Meeting, Iguacu Falls*, March 2010.
- Lemos MA, Santos AS, Astray RM, Pereira CA, Jorge SA. 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, 20;143(2):103-10.
- Lescar J, Luo D, Xu T, Sampath A, Lim SP, Canard B, Vasudevan SG. Towards the design of antiviral inhibitors against flaviviruses: the case for the multifunctional NS3 protein from Dengue virus as a target. *Antiviral Research*. 2008, 80: 94-101.
- Le Mercier PL, Jacob Y, Tordo N. The complete Mokola virus genome sequence: structure of the RNA-dependant RNA polymerase. *Journal of General Virology*. 1997, 78:1571-1576.
- Lentz, T, Burrage TG, Smith AL, Crick J, Tignor GH. Is the acetylcholine receptor rabies virus receptor? *Science*. 1982, 4: 182-184.
- Li HW, Ding SW. Antiviral silencing in animals. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 2005, 579(26): 5965-5973.
- Lin CC, Yang CF, Tu C, Huang C, Shih Y, Chuang C, Chen W. A novel tetraspanin C189 upregulated in C6/36 mosquito cells following dengue 2 virus infection. *Virus Research*. 2007, 124(2): 176-83.
- Lindoso JA, Linoso AAB. Neglected tropical diseases in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. 2009, 51(5):247-253.

Lisitsyn NA, Lisitsina NM, Dalbagni G, Barker P, Sanchez CA, Gnarra J, Linehan WM, Reid BJ, Wigler MH. Comparative genomic analysis of tumors: detection of DNA losses and amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995, 92:151-5.

Lu A, Miller LK. Regulation of baculovirus late and very late gene expression. *The baculoviruses*. New York: Plenum Prest. 1997.

Madhan S, Prabakaran M, Kwang J. Baculovirus as vaccine vectors. *Current Gene Therapy*. 2010, 10(3):201-13.

Malet H, Massé N, Selisko B, Romette JL, Alvarez K, Guillemot JC, Tolou H, Yap TL, Vasudevan S, Lescar J, Canard B. The flavivirus polymerase as a target for drug discovery. *Antiviral Research*. 2008, 80(1):23-35.

Mandigan TM, Martinko JM, Parker J. *Microbiologia de Brock*. 10. Ed. São Paulo: Pearson. 2004.

Maruniak JE. Baculovirus structural proteins and protein synthesis. *The Biology of Baculovirus*. Boca Ranton: CRC Press. 1986.

Matz M, Shagin D, Bogdanova E, Britanova O, Lukyanov S, Diatchenko L, Chenchik A. Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. *Nucleic Acids Research*. 1999, 15;27(6):1558-60.

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. *Biotechnology (N Y)*. 1995, 13(13):1484-7.

McIntosh AH, Shamy R. Effects of the nuclear polyhedrosis virus (NPV) of *Autographa californica* on a vertebrate viper cell line. *Annals of New York Academy Science*. 1975, 266: 327-331.

Miller LK. Introduction to the baculoviruses. *The baculoviruses*. New York: Plenum Prest. 1997.

Miller S, Kastner S, Krijnse-Locker J, Buhler S, Bartenschlager R. Non-structural protein 4A of Dengue virus is an integral membrane protein inducing

membrane alterations in a 2K-regulated manner. *Journal of Biological Chemistry*. 2007, 282(12):8873-82.

Milner JJ, Cecchini E, Dominy PJ. A kinetic model for subtractive hybridization. *Nucleic Acids Research*. 1995, 11;23(1):176-87.

Montor WR, Sogayar MC. Insetos como fábricas de proteínas humanas. *Ciência Hoje*. 2003, 33 (196): 17-23.

Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*. 2005, 3(1):13-22.

Nakabayashi H, Taketa T, Miyano K, Yamane T, Sato J. Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium, *Cancer Research*. 1982, 42: 3858-3863.

Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Desprès P. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *European Molecular Biology Organization Reports*. 2003, 4(7):723-8.

Netsawang J, Noisakran S, Puttikhunt C, Kasinrerak W, Wongwiwat W, Malasit P, Yenchitsomanus PT, Limjindaporn T. Nuclear localization of dengue virus capsid protein is required for DAXX interaction and apoptosis. *Virus Research*. 2010, 147 (2): 275–283

O' Reilly DR, Miller LK, Luckow V. *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual*. W. H. Fressman and Company, New York, 1994.

Organização Mundial de Saúde (OMS). *Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. Geneva, World Health Organization. 2009.

Organização Mundial de Saúde (OMS)a. *Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases*. Geneva, 13 out 2010.

Organização Mundial de Saúde (OMS)b. In: Ten facts about tropical neglected diseases. Ago 2010. Disponível em: <http://www.who.int/features/factfiles/neglected_tropical_diseases/en/index.html/>. Acesso em: 20 abr 2011.

Organização Mundial de Saúde (OMS)c. In: Dengue and dengue hemorrhagic fever. Mar 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em: 08 mar 2011.

Pan American Health Organization (PAHO). In: *2010: Number of reported cases of Dengue & Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), region of the Americas (by country and subregion)*. Dez 2010. Disponível em: <<http://www.paho.org/>>. Acesso em: 08 mar 2011.

Pastorian K, Hawell L, Buys CV. Optimization of cDNA representational difference analysis for the identification of differentially expressed mRNAs. *Analytical Biochemistry*. 2000, 283(1): 89-98.

Pecuária. Cotação arroba do boi. Disponível em: <www.pecuária.com.br>. Acesso em 31 ago 2011.

Pontes RJS, Ruffino-Netto A. Dengue em localidade urbana da região sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. *Revista de Saúde Pública*. 1994, 28(3), 218-227.

Prehaud C, Takehara K, Flamand A, Bishop DH. Immunogenic and protective properties of rabies virus glycoprotein expressed by baculovirus vectors. *Virology*. 1989, 173(2):390-9.

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.

Quail MA. High-Throughput Plasmid Extraction Using Microtiter Plates. *Methods in Molecular Biology*, 2003, 235: 89-97.

Raboral. *Raboral VR-G*. 2011. Disponível em: <http://www.raboral.com/veterinarians/about_raboral.asp>. Acesso em 14 abr 2011.

Ramos-Castañeda J, Gonzalez C, Jiménez MA, Duran J, Hernández-Martínez S, Rodríguez MH, Lanz-Mendoza H. Effect of Nitric Oxide on Dengue Virus Replication in *Aedes aegypti* and *Anopheles albimanus*. *Intervirology*. 2008, 51: 335-341.

Rath A, Choudhury S, Batra D, Kapre SV, Rupprecht C, 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.

Ribeiro BM, Souza ML, Kitajima EW. Taxonomia, Caracterização e bioquímica de vírus de insetos. *Controle Microbiano de Insetos*. São Paulo; UNESP. 1998: 481-503.

Robin G, Chappell K, Stoermer MJ, Hu SH, Young PR, Fairlie DP, Martin JL. Structure of West Nile virus NS3 protease: ligand stabilization of the catalytic conformation. *Journal of Molecular Biology*. 2009, 6;385(5):1568-77

Roelvink PW, Vanmeer MMM, Dekort CAD, Possee RD, Hammock BD, Vlak JM. Dissimilar expression of *Autographa-californica* multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis-virus polyhedron and p10 genes. *Journal of General Virology*. 1992, 73: 1481-1489.

Rothman AL. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *Journal of Clinical Investigation*. 2004, 113(7): 946-951.

Rohrmann GF. Polyhedrin Structure. *Journal of General Virology*. 1986, 67(8): 1499- 1513.

Ruiz-Linares A. Processing of yellow fever virus polyprotein: role of cellular proteases in maturation of the structural proteins. *Journal of Virology*. 1989, 63: 4199-4209.

Rupretch CE. Rhabdoviruses: rabies virus. *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galverston. 1996.

Salas-Benito J, Reyes-Del Valle J, Salas-Benito M, Ceballos-Olvera I, Mosso C, del Angel RM. Evidence that the 45-kD glycoprotein, part of a putative dengue virus

receptor complex in the mosquito cell line C6/36, is a heat-shock related protein. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*. 2007, 77(2):283-90.

Salazar, M. I. *et al.* Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BioMed Central Microbiology*. 2007, 7: 1-13.

Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

Sanchez-Vargas I, Travanty EA, Keene KM, Franz AW, Beaty BJ, Blair CD, Olson KE. RNA interference, arthropod-borne viruses, and mosquitoes. *Virus Research*. 2004, 102(1): 65-74.

Sanofi-Pasteur. *Sanofi Pasteur Expands Global Dengue Vaccine Clinical Study Program in Brazil*. 21 September, 2010. Disponível em: <http://www.sanofipasteur.com/sanofipasteur2/front/index.jsp?siteCode=SP_CORP&codeRubrique=34&codePage=PAG_34_PR12&lang=EN&xtmc=dengue_vaccine&xtcr=2>. Acesso em 18 mai 2011.

Schneider MC, Belotto A, Adé MP, Hendrickx S, Leanes LF, Rodrigues MJ, Medina G, Correa E. Current status of human rabies transmitted by dogs in Latin America. *Cadernos de Saúde*. 2007, 23:2049–2063.

Seif I, Coulon P, Rollin PE, Flamand A. *Rabies virus* virulence: Effect on pathogenicity and sequence characterization of mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. *Journal of Virology*. 1985, 53:926-935.

Shoepp RJ, Beaty BJ. Titration of dengue viruses by immunofluorescence in microtiter plates. *Journal of Clinical Microbiology*. 1984, 20(5): 1017-1019.

Sinclair JH. The human cytomegalovirus immediate early gene promoter is a strong promoter in cultured *Drosophila melanogaster* cells. *Nucleic Acids Research*. 1987, 5(5): 2392.

Shoji I, Aizaki H, Tani H, Ishii K, Chiba T, Saito I, Miyamura T, Matsuura Y. Efficient gene transfer into various mammalian cells, including non-hepatic cells, by baculovirus vectors. *Journal of General Virology*. 1997, 78: 2657-2664.

Slack JM, Arif BM. The Baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function. *Virus Research*. 2007, 69: 99-165.

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(1): 215-225.

Suaya JA, Shepard DS, Siqueira JB, Martelli CT, Lum LCS, Tan LH, Kongsin S, Jiamton S, Garrido F, Montoya R, Armien B, Huy R, Castillo L, Caram M, Sah B. K, Sughayyar R, Tyo KR, Halstead SB. Cost of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: a prospective study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009, 80:846–855.

Summers MD, Smith GE. Baculovirus structural polypeptides. *Virology*. 1978, 84(2): 390–402.

Summers, MD. Milestones Leading to the Genetic Engineering of Baculoviruses as Expression Vector Systems and Viral Pesticides. *Advances in Virus Research*. 2006, 68: 3-73.

Snustad DP, Simmons MJ. *Fundamentos de genética*. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. 2001.

Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith G, Rougeon F. Walking along the rabies genome: Is the large G-L intergenic region a remnant gene? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986, 83:3914-3918.

Tordo N, Poch O, Ermine A, Keit, G, Rougeon F. Completion of the Rabies Virus genome sequence determination: Highly Conserved Domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA viruses. *Virology*. 1988, 165: 565-576.

Tsai CT, Chuang CK, Hu YC. Baculovirus-mediated gene transfer into mesenchymal stem cells. *Methods in Molecular Biology*. 2009, 515: 339-351.

Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Cartens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, Mcgeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB. *Virus*

taxonomy. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2000.

Vilmos P, Kurucz E. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters*. 1998, 62: 59-66.

Volkman LE, Goldsmith PA. In vitro Survey of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Interaction with Nontarget Vertebrate Host Cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 1983, 45: 1085-1093.

Walker PJ, Kongsuwan K. Deduced structural model for animal rhabdovirus glycoproteins. *Journal of General Virology*. 1999, 80: 1211-20.

Williams GV, Faulkner P. Cytological changes and viral morphogenesis during baculovirus infection. *The baculoviruses*. New York: Plenum Press. 1997.

Wunner WH. Rabies Virus. In, *Rabies*. London: Elsevier Science. 2002.

Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G. The *Aedes aegypti* Toll pathway controls dengue virus infection. *Public Library of Science Pathogens*. 2008, 4(7): 12, 2008.

Xuan X, Nakamura T, Ihara T, Sato I, Tuchiya K, Nosetto E, Ishihama A, Ueda S. Characterization of pseudorabies virus glycoprotein gII expressed by recombinant baculovirus. *Virus Research*. 1995, 36(2-3):151-61.

Yap CC, Ishii K, Aoki Y, Aizaki H, Tani H, Shimizu H, Ueno Y, Miyamura T, Matura Y. A hybrid baculovirus-T7 RNA polymerase system for recovery of an infectious virus from cDNA. *Virology*. 1997, 231: 192-200.

Yauch LE, Shresta S. Mouse models of dengue virus infection and disease. *Antiviral Research*. 2008, 80(2): 87-93.

Yelverton E, Norton S, Obijeski JF, Goeddel DV. Rabies virus glycoprotein analogs: biosynthesis in *Escherichia coli*. *Science*. 1983, 219(4585): 614-20.

Zhu Y, Qi Y, Liu Z, Xiao G. Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Science in China*. 1998, 41: 473-478.

Zhao L, Pridgeon JW, Becnel JJ, Clark GG, Linthicum KJ. Identification of genes differentially expressed during heat shock treatment in *Aedes aegypti*. *Journal of Medical Entomology*. 2009, 46(3):490-5.