

ALEXANDRA SOUZA DOS SANTOS

Estudo comparativo entre a eficiência de co-transfecção e
transfecção de vetores portadores do gene da glicoproteína
do vírus rábico (GPV) em células de *Drosophila*
melanogaster S2

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

São Paulo
2008

ALEXANDRA SOUZA DOS SANTOS

Estudo comparativo entre a eficiência de co-transfecção e transfecção de vetores portadores do gene da glicoproteína do vírus rábico (GPV) em células de *Drosophila melanogaster* S2

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Prof^ª.Soraia Attie Calil Jorge
Co-orientador: Dr.Carlos Augusto Pereira

São Paulo
2008

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

© reprodução total

Santos, Alexandra.

Estudo comparativo entre a eficiência de co-transfecção e transfecção de vetores portadores do gene da glicoproteína do vírus rábico (GPV) em células de *Drosophila melanogaster* S2 / Alexandra Santos. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Soraia Attie Calil Jorge.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Biologia Molecular.

Versão do título para o inglês: Comparison of RVGP expression in S2 cells co-transfected with pAcRVGP (expression vector) and pCoHygro (selection vector) or transfected with a pAcRVGPHYgro (expression and selection gene vector).

Descritores: 1. Biologia Molecular 2. Células de inseto 3. Transfecção 4. Expressão 5. *Drosophila melanogaster* 6. Célula S2
I. Jorge, Soraia Attie Calil II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pos Graduação em Biotecnologia
III. Título.

ICB/SBIB190/2008

**Dedico este trabalho aos meus amores
Paulo(marido) e Paulo Sérgio (meu filho) e
aos meus queridos pais Marly e Apolinário
pelo amor, apoio, ajuda e compreensão.**

AGRADECIMENTOS

À Prof^{ta} Dr^a. Soraia Attie Calil Jorge pelos conhecimentos passados e por sua forma maravilhosa de ensiná-los, pela paciência em esclarecer dúvidas, companheirismo, dedicação e amizade em todos os momentos de nossa convivência.

Ao Dr. Carlos Augusto Pereira pela oportunidade de desenvolver este projeto em seu laboratório.

Ao Dr. Jorge Mário C. Júnior por sua prontidão e colaboração nas análises feitas em citometria de fluxo.

Ao Alexsander Souza Seixas por todo auxílio prestado na utilização do Microscópio Confocal.

A Milene, pela amizade, ajuda e pela colaboração, durante todo o trabalho.

Ao meu marido Paulo Pereira dos Santos, pelo amor, dedicação, ajuda constante e pela paciência.

Ao meu filho Paulo Sérgio Pereira dos Santos, pela ajuda e paciência.

À minha mãe Marly pela ajuda, pela compreensão e pelas palavras incentivadoras e meu pai Apolinário pela ajuda no transporte, pelo apoio e carinho.

Ao amigo Marcos Alexandre Nobre Lemos pelo vetor cedido, pela amizade e pela ajuda constante.

Ao Renato Astray Mancini pela ajuda nas horas que precisei.

Ao colegas Luciana Ribeiro, Fabiana, Kátia, Luciana por ajudarem prontamente quando necessitei e em especial pela companhia nos momentos de descontração.

Aos funcionários do laboratório Maria Lúcia, Dulcinéia, Margarida, Francisca que diariamente auxiliaram na manutenção do laboratório e providenciaram tudo que foi necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a todos do Laboratório de Vacinas Anaeróbicas e em especial a Dra. Aryene Góes, ao coordenador de equipe Marcelo Estima, Sônia Regina e Rosângela O. Pinto pela ajuda e pelo apoio para o encerramento desta dissertação de mestrado.

À Dra. Tatiane Rodrigues de Oliveira pela ajuda e pela paciência para a padronização do “Western Blot”.

À todos os amigos que dividiram comigo momentos dessa trajetória e contribuíram mesmo sem saber com palavras de afeto e descontração.

E finalmente a Fapesp, CNPq, CAPES e Fundação Butantan pelo suporte e auxílio financeiro.

“O maior erro que se pode cometer na vida
É o medo constante de cometer erros.”
(Elbert G. Hubbard)

RESUMO

SANTOS, A.S. **Estudo comparativo entre a eficiência de co-transfecção e transfecção de vetores portadores do gene da glicoproteína do vírus rábico (GPV) em células de *Drosophila melanogaster* S2.** 2008. 89 f. Dissertação (Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, São Paulo, 2008.

A utilização de culturas celulares para a expressão de proteínas heterólogas tem sido amplamente difundida em diversos laboratórios de pesquisa e produção. Neste sentido, culturas de células de inseto caracterizam-se por possuir alta taxa de crescimento e simplicidade em serem manipuladas, agregando com isto um baixo custo de manutenção. Suas condições de cultivo requerem temperatura ambiente (28 °C) e não necessitam de atmosfera de gás carbônico para controle de pH. Dentre as vantagens do sistema de expressão gênica em células de drosófila observa-se ainda o estabelecimento rápido de linhagens estáveis de células que secretam de forma eficiente a proteína recombinante. Neste trabalho, utilizamos células de *Drosophila melanogaster* S2 para estudar a expressão de proteína viral (GPV-glicoproteína do vírus rábico). Temos estabelecidas populações de células co-transfectadas S2AcGPV e transfectadas S2AcGPVHy. O objetivo deste trabalho é a comparação da expressão de GPV em células S2 co-transfectadas com os vetores pAcGPV (vetor de expressão) e o pCoHygro (vetor de seleção) ou transfectadas com um único vetor pAcGPVHygro (contendo o vetor de expressão e seleção). As populações obtidas foram analisadas em relação à expressão de GPV em imunoenaios: teste ELISA, “Dot Blot”, géis de SDS-PAGE, “Western Blot”, citometria de fluxo (FACS) e microscopia confocal. Os ensaios de imunofluorescência em citometria de fluxo (FACS) realizados demonstraram que as células transfectadas e co-transfectadas estão expressando a proteína GPV. Valores entre 0,3 e 4 µg/10⁷ células foram obtidos. Além disso, anticorpos monoclonais anti-GPV foram capazes de reconhecer a proteína GPV, sugerindo que a antigenicidade da proteína recombinante é mantida.

Palavras-chave: *Drosophila melanogaster*; Proteína GPV; Vírus rábico.

ABSTRACT

SANTOS, A. **Comparison of RVGP expression in *Drosophila melanogaster* S2 cells co-transfected with pAcRVGP (expression vector) and pCoHygro (selection vector) or transfected with a pAcRVGPHygro (expression and selection gene vector).** 2008. 89 p. Master thesis (Biotechnology) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, São Paulo, 2008.

The use of cell cultures for expression of heterologous proteins has been widely disseminated in research and production laboratories. Accordingly, the insect cell cultures are characterized by having high growth rate and simplicity to be manipulated, adding that with a low cost of maintenance. These cells require (28 °C) room for culture, and no carbon dioxide atmosphere for pH control. Among the insect cells systems the *Drosophila melanogaster* S2 gene expression system has the advantage of rapid establishment of a stable cell line that secret efficiently recombinant protein. In this work, we used of *Drosophila melanogaster* S2 cells to study the expression of the rabies virus glycoprotein (GPV). We have established co-transfected (S2AcGPV) and transfected (S2AcGPVHy) cell populations. The objective of this study was compare the expression of GPV in S2 cells co-transfected with vector pAcGPV (expression vector) and pCoHygro (selection vector) with S2 cells transfected with a single vector pAcGPVHygro (obtained by the fusion of expression and selection vectors) The populations were analyzed to the GPV expression by immunoassays: ELISA, Dot Blot, the SDS-PAGE gels, Western Blot, flow cytometry (FACS) and confocal microscopy. Tests of immunofluorescence and flow cytometry (FACS) have shown that co-transfected and transfected cells are expressing the GPV. Values between 0.3 µg and 4 µg of GPV/10⁷ cells were obtained. Moreover, monoclonal anti-GPV conformational antibodies were able to recognize the GPV suggesting that the antigenicity of the recombinant protein is maintained.

Key words: *Drosophila melanogaster*; GPV protein; Virus rabico.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura Da Higromicina B.....	23
Figura 2: Esquema do vírus rábico e suas proteínas.....	25
Figura 3: Mapa da construção do vetor pAcGPV.....	32
Figura 4: Mapa do vetor pCoHygro.....	33
Figura 5: Mapa da construção do vetor pAcGPVHygro.....	33
Figura 6: Esquema do procedimento de “Western Blot” para detecção da proteína GPV.....	43
Figura 7: Gel de agarose das digestões dos vetores pAcGPVHygro e pAcGPV com a enzima HpAI ou Ecl HKI.....	49
Figura 8: Viabilidade celular de células selvagens, co-transfectadas e transfectadas mantidas com 600 µg/mL de higromicina B.....	51
Figura 9: Expressão de GPV em células S2AcGPVHy (2) e S2AcGPV (2).....	52
Figura 10: Análise de expressão de GPV em células S2 recombinantes por imunofluorescência em citometria de fluxo (FACS).....	54
Figura 11: Fotomicroscopia confocal.....	56
Figura 12: Expressão da proteína GPV detectada por teste ELISA. Subpopulações de S2AcGPV (2) e S2AcGPVHy (2).....	57
Figura 13: Gráfico de imunofluorescência em células (co) transfectadas por citometria de fluxo em diferentes tempos.....	59
Figura 14: Viabilidade de células S2 selvagem, S2AcGPVHy transfectada com cellfectina ou lipofectamina após seleção com 600 µg/mL de higromicina B.....	61
Figura 15: Expressão da proteína GPV detectada por teste ELISA. S2AcGPVHy (3) transfectada com cellfectina e S2AcGPVHy (4) transfectada com lipofectamina.....	61
Figura 16: Análise de expressão de GPV em células S2 recombinantes por imunofluorescência em citometria de fluxo (FACS).....	63
Figura 17: Expressão da proteína GPV em células S2 S2AcGPV (2) e S2AcGPVHy (4) submetidas a um 2º tratamento com higromicina B (+) ou não (-).....	64
Figura 18: Esquema utilizado para verificar a ação a pressão seletiva na expressão de GPV em células S2AcGPV e S2AcGPVHy.....	66
Figura 19: Expressão da proteína GPV em células S2AcGPVHy (4) e S2AcGPV (2) submetidas a um 2º tratamento com higromicina B ++ ou não +/-.....	67
Figura 20: Cinética de crescimento de células S2 selvagens e células geneticamente modificadas em meio SF 900 II.....	68
Figura 21: Cinética de crescimento de células (A) S2AcGPVHy (4) e (B) S2AcGPV (2) geneticamente modificadas e cultivadas em meios diferentes TC -100, SF 900 II e Insect Express.....	71
Figura 22: Expressão da proteína GPV em células (A) S2AcGPVHy (4) e (B) S2AcGPV (2) em meios de cultura diferentes.....	73
Figura 23: Cinética celular de células S2AcGPV (2) e S2AcGPVHy (4) e meio SF 900 II com adição de 5mM butirato de sódio no 3º dia de cultivo.....	75
Figura 24: Expressão da proteína GPV em células S2AcGPVHy (4) e S2AcGPV (2) em meio SF 900 II com adição de 5 mM butirato de sódio na cultura.....	76
Figura 25: “Dot Blot” de lisado celular.....	77
Figura 26: Padrão de migração eletroforética em géis de poliacrilamida 12,5%	78

Figura 27: Ensaio imunoenzimático utilizando a técnica de “Western Blot”	78
Figura 28: Ensaio imunoenzimático utilizando a técnica de “Western Blot”	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Comparativo entre células de inseto e células de mamíferos.....	17
Tabela 2- Vantagens e desvantagens dos vetores de transfecção.....	21
Tabela 3- Transfecções e co-transfecções realizadas.....	50

LISTA DE ABREVIACOES

DH5 α - cepa de bactéria *Escherichia coli*

S2 - células Schneider 2 de *Drosophila melanogaster*

Sf9 - células de *Spodoptera frugiperda*

pCoHygro - vetor genético portador do gene de resistência a higromicina B

pAcGPV - vetor genético portador do gene da glicoproteína G do vírus rábico

pAcGPVHy - vetor genético portador do gene da glicoproteína G do vírus rábico e do gene de resistência a higromicina B

Hy (-) - células não tratadas com o antibiótico higromicina B

Hy (+) - células tratadas com o antibiótico higromicina B

+ But.- células tratadas com o butirato de sódio

FACS - "fluorescence activated cell

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Expressão de genes heterólogos em culturas celulares.....	16
1.2 Sistema de expressão em células de Drosophila.....	18
1.3 Transfecção em células de Insetos.....	21
1.3.1 Transfecção com lipossomas em células de Drosophila.....	22
1.4 Antibiótico Higromicina B.....	23
1.5 A raiva e o vírus rábico.....	24
1.6 Expressão da GPV.....	26
2 OBJETIVO.....	28
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos Específicos.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Cultura de Bactérias.....	29
3.2 Introdução do DNA Plasmidial em Bactérias.....	30
3.3 Obtenção de bactérias competentes.....	30
3.4 Transformação de bactérias competentes.....	31
3.5 Extração de DNA Plasmidial.....	31
3.6 Vetores de Expressão Gênica.....	32
3.7 Cultura de Células Schneider 2 (S2).....	34
3.8 Manutenção das células S2.....	34
3.9 Contagem de viabilidade celular.....	34
3.10 Transfecção e Co-transfecção em células S2.....	34
3.11 Meios de Cultura para células de inseto.....	35
3.12 Preparo de Soluções.....	35
3.12.1 Soluções para as preparações do gel de poliacrilamida 12,5% - SDS-PAGE.....	36
3.12.4 Soluções de coloração por Prata em géis de poliacrilamida.....	37
3.13 Soluções para “Dot Blot” e “Western Blot”.....	39
3.14 Congelamento e Descongelamento de células S2 selvagens e recombinantes”.....	43
3.15 Imunofluorescência Direta das Células S2 em Citometria de Fluxo (FACS “fluorescence activated cell sorter”).....	44
3.16 Análise em Microscopia confocal.....	45
3.17 Teste ELISA para Detecção da Glicoproteína G do Vírus Rábico.....	46
3.18 Solução de Butirato de sódio.....	48
3.19 Análise estatística.....	48
4 RESULTADOS.....	49
4.1 Transfecção e Co-transfecção.....	49
4.2 Expressão da GPV em células recombinantes.....	51
4.2.1 Comparação da expressão de GPV entre células transfectadas e co-Transfectadas.....	51
4.2.2 Obtenção de subpopulações em células recombinantes.....	52
4.2.3 Análise por imunofluorescência em citometria de fluxo de células (co)	

transfectadas com diferentes tempos de incubação do anticorpo monoclonal.....	58
4.2.4 Comparação de expressão de proteína GPV em células transfectadas com lipofectamine e cellfectin.....	60
4.2.5 Adição de nova pressão seletiva nas células S2 recombinantes.....	62
4.3 Comparação de cinéticas entre células co-transfectadas S2AcGPV (2) e transfectadas S2AcGPVHy (4).....	68
4.3.1 Comparação da cinética de crescimento de células S2 selvagens e Recombinantes.....	68
4.3.2. Cinéticas com diferentes meios de cultura.....	69
4.3.3 Indução da expressão da proteína G do vírus rábico em células S2AcGPV (2) e S2AcGPVHy (4) com Butirato de sódio.....	74
4.4 Caracterização da GPV expressa em células S2AcGPV (2) e S2AcGPVHy (4).....	76
5 CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
ANEXOS.....	87

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

1.1 Expressão de genes heterólogos em culturas celulares

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

Visando um alto nível de produção, diferentes sistemas de expressão gênica foram desenvolvidos, uma vez que há a necessidade de se inserir o gene heterólogo de interesse para a produção da proteína nas culturas celulares. Células eucarióticas, por exemplo, são capazes não só de traduzir uma determinada proteína heteróloga através da adição do seu respectivo gene, como também processá-la realizando as alterações pós-traducionais necessárias para sua manutenção, localização e função. Entre as células animais que têm sido usadas para este fim, encontramos as células de mamíferos, que embora tenham capacidade de incorporar, manter, expressar e processar convenientemente genes heterólogos, exigem condições de cultura delicadas e dispendiosas em laboratório (TARTAGLIA e PAOLETTI, 1990; JORGE et al., 1995; JORGE et al., 1996; KAZANJI et al., 1997). Células de insetos, como as células de *Spodoptera frugiperda* (SF9) têm sido, pelas suas condições simples de cultura, largamente usadas para expressão de genes transportados por vírus (baculovírus). Este sistema mostra, no entanto, o inconveniente de se constituir num sistema de expressão gênica transiente e não permanente, além de exigir especificamente o sistema derivado de baculovírus (SUMMERS e SMITH, 1987; PFEIFER et al., 1997). Alternativamente, têm-se desenvolvido sistemas de expressão em células de drosófila. Estes sistemas mostram resultados comparáveis aos demais, produzindo um elevado nível de expressão das proteínas heterólogas (BUCKINGHAM et al., 1996; BRIGHTY et al., 1991). Isto se deve, provavelmente, ao uso de promotores gênicos eficientes e ao elevado número de cópias de plasmídeos encontrados por célula transfectada (MCCARROLL e KING, 1997). Porém, dificuldades em crescer culturas em baixa densidade foram observadas (JORGE et al., 2008), podendo limitar os processos iniciais de obtenção de linhagens recombinantes. Ainda assim, estratégias de produção de proteínas têm sido desenvolvidas em células de drosófila, visando um elevado

nível de expressão de genes heterólogos (BENTING et al., 2000; LEE et al., 2000; DEML et al., 1999a; BUCKINGHAM et al., 1996; SHOTKOSKI et al., 1996; CULP et al., 1991). Segue abaixo uma tabela comparativa entre células de inseto e células de mamíferos para utilização em bioprocessos e propagação celular.

Tabela 1- Comparativo entre células de inseto e células de mamíferos.

Fatores	Células de inseto	Células de Mamíferos
Manutenção	Média	Difícil
Remoção das células	Mecânica (Fluxo e refluxo)	Enzimática
Crescimento celular	Alto	Baixo
Suporte para crescimento	Não necessitam, pois crescem em suspensão ou em semi-aderência.	Necessitam de uma superfície de aderência
Temperatura	28°C	37°C
Densidade celular para preparação de ensaios	Não Cresce em baixa densidade celular	Cresce em baixa densidade celular
Estufa de CO ₂	Ausente	Presente
Demanda de Oxigênio	Alta	Baixa
pH	Baixa sensibilidade a alterações de pH	Alta sensibilidade a alterações de pH

1.2 Sistema de expressão em células de *Drosophila*

Cerca de 94 linhagens de células de drosófila são independentemente cultivadas, das quais 12 aproximadamente têm sido mais facilmente manipuladas. Para a expressão de genes heterólogos 2 linhagens de células Schneider têm sido bastante utilizadas, as linhagens S2 e S3 (CHERBAS et al., 1994). Ambas constituem células semi-aderentes derivadas de uma cultura primária de embriões em estágio tardio de desenvolvimento.

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

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

O antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), também já foi expresso em células S2 através da co-transfecção de um vetor sob controle de um promotor da metalotioneína (pMT) juntamente com um vetor de seleção, este constitutivo contendo o gene da dihydrofolato redutase sob o comando do promotor da actina 5C de drosófilas. O HBsAg também já foi expresso pela transfecção de um único vetor, este contendo o gene de seleção no próprio vetor. Observou-se com estas abordagens que os clones de células selecionadas expressaram o antígeno viral, sendo que os melhores resultados são provenientes das co-transfecções e alcançaram concentrações superiores a 4,75 µg/mL em detrimento aos resultados obtidos nas transfecções de um único vetor onde a expressão do antígeno chegou a apenas 2,95 µg/mL (DELM et al., 1999a).

Células S2 foram recentemente co-transfectadas com o plasmídeo contendo o gene da EGFP (proteína verde fluorescente) sob o controle de um promotor da metalotioneína e com um outro vetor contendo o gene de seleção (higromicina). Após a seleção com higromicina

aproximadamente 90% de células S2MtEGFP estavam fluorescentes após o 5º dia de indução (SANTOS et al., 2007).

A glicoproteína G do vírus rábico (rRVGP) também foi expressa em células S2 (YOKOMIZO et al., 2007) alcançando concentrações de 300 µg/L de proteína. Da mesma forma a proteína E do vírus de encefalite japonesa (JEV) foi expressa em células S2. A expressão da proteína E (JEV) foi analisada por imunofluorescência, microscopia confocal e “Western Blot”. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que a proteína produzida apresentava o mesmo peso molecular esperado, além de manterem antigenicidade contra 3 diferentes anticorpos monoclonais (ZHANG et al., 2007).

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

Em um trabalho recente o sistema de expressão em células S2 destacou-se por sua utilização na intervenção terapêutica para doença de Alzheimer. Chang et al., em 2005 publicaram seu trabalho onde expressaram em células de drosófila a β -secretase, enzima responsável pela formação de um amilopeptídeo $\alpha\beta$ presente nas placas que se formam no desenvolvimento da doença de Alzheimer. O foco desse estudo foi utilizar um sistema de expressão para produção de β -secretase ativa, uma vez que a glicosilação desta proteína é essencial para sua atividade e a produção da enzima é de crucial importância para o desenvolvimento de um inibidor da β -secretase para futuros estudos de controle da doença. Para isso os autores optaram por co-transfectar um vetor de expressão onde a β -secretase se encontra sob comando de um promotor indutível (pMT) e um outro vetor contendo os cDNAs da β 1, 4 galactosiltransferase, e α 2,6 siaciltransferase (enzimas responsáveis por algumas modificações pós-traducionais) e ainda o vetor de seleção pCoHygro. Foi constatado que o peso molecular da proteína expressa aumentou de 56 KDa para 61 KDa e que a β -secretase

recombinante possuía resíduos de galactose e ácido siálico ligados em sua estrutura. A atividade da enzima expressa pelas células S2 co-transfectadas mostrou-se 260% maior quando comparada com células S2 transfectadas somente com o vetor de expressão da β -secretase, demonstrando a possibilidade de introduzir o cDNA de glicosiltransferases humano em células S2 para aumentar a capacidade de glicosilação das células S2 e com isso aumentar a atividade das proteínas recombinantes produzidas neste sistema.

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

Além disso, culturas de células de insetos despertam grande interesse, uma vez que possuem alta taxa de crescimento e são simples de serem manipuladas com baixo custo. Suas condições de manutenção requerem temperatura ambiente e não necessitam de cultivo em soro fetal e atmosfera de gás carbônico. Essas características tornam a cultura de células de insetos mais vantajosa economicamente, pois requer baixo custo para sua manipulação.

Por estas razões neste trabalho optamos pela escolha de sistemas de expressão em células de drosófilas para o estudo da expressão do antígeno do vírus rábico (GPV). Acreditamos que a expressão do gene heterólogo de nosso interesse será não somente obtida de maneira eficaz em células S2, como também facilmente monitorada por ensaios ELISA. Também comparamos a expressão de GPV em células S2 transfectadas com um único vetor contendo os genes de seleção e expressão e células co-transfectadas com 2 vetores um contendo o gene de seleção e outro de expressão. Em ambas as estratégias há vantagens e desvantagens que se encontram sumarizadas na tabela 2.

Tabela 2- Vantagens e desvantagens dos vetores de transfecção.

Vetor utilizado	Vantagens	Desvantagens
Vetor de expressão (pAcGPV) + vetor de seleção (pCoHygro)	Vetores menores, com maior eficiência de integração.	Possível seleção de células com apenas o vetor de seleção
Um único vetor contendo o vetor de expressão e o vetor de seleção (pAcGPVHygro)	Seleção de células com os genes de expressão e de seleção em um único vetor	Vetores maiores com menor eficiência de integração

1.3 Transfecção em células de Insetos

A transfecção constitui na introdução de um vetor genético em uma célula hospedeira. O termo transfecção para métodos utilizando vetores é mais frequentemente utilizado em referência a células de mamíferos, ao passo que a transformação é o termo preferido para descrever transferência do vetor para o interior de bactérias e células eucarióticas não animal, como fungos, algas e plantas.

Para facilitar a penetração do DNA no interior das células e sua transferência dentro do núcleo e possivelmente no genoma, vários métodos de transfecção, com uma grande variedade de protocolos, têm sido utilizados. Uma das técnicas mais utilizadas para transfecção em células eucarióticas é através do uso de lipossomas, ainda assim alguns outros métodos têm sido utilizados com sucesso, como transfecções mediadas por DEAE-Dextran, por fosfato de cálcio e também por eletroporação. Em qualquer método utilizado as condições ideais de cada transfecção devem ser estabelecidas através da adaptação dos protocolos de transfecção já existentes (GUY, 1997).

A diversidade de métodos reflete a necessidade de aumentar a eficiência de transfecção de genes heterólogos nas células hospedeiras, já que a porcentagem de células que expressam a proteína de interesse é geralmente baixa. Isso se deve ao fato de que na maioria

das vezes poucas células recebem o gene heterólogo e ainda assim em pequena quantidade (GUY, 1997).

Em uma transfecção, um fator limitante para a expressão de um gene pode ser o número de cópias deste encontrado na célula. Já tendo sido observada uma correlação entre a quantidade de proteína produzida e o número de cópias do gene presente no genoma (CALOS et al., 1983; RAZZAQUE 1983). Sendo importante ressaltar que após a transfecção o DNA é integrado no genoma de poucas células (mesmo que em quantidades elevadas) e que a eficiência da expressão do gene heterólogo está ligada à região do genoma em que este gene foi inserido. Ou seja, o gene mesmo que integrado ao genoma celular pode ficar inativo se localizado em regiões de heterocromatina, uma vez que esta integração constitui em um evento aleatório (GUY, 1997).

Para minimizar estes problemas é imprescindível estabelecer um protocolo eficiente de transfecção. Para isso é recomendável a utilização de uma proteína de fácil detecção para que as células transfectadas ou co-transfectadas possam ser avaliadas fácil e rapidamente segundo a expressão do gene inserido.

1.3.1 Transfecção com lipossomas em células de *Drosophila*

Visando melhorias na eficiência de transfecção, uma molécula lipídica catiônica DOTMA (N- [1- (2,3-dioleyloxy) propyl]- N,N,N- trimethylammonium chloride) foi especialmente sintetizada pela invitrogen® em forma de vesículas com carga positiva para capturar ácidos nucléicos. Estes lipossomas fundem-se com a membrana plasmática liberando o DNA ou RNA para o interior das células (GUY, 1997).

A preparação destas vesículas DOTMA é vendida comercialmente com o nome de Lipofectamine e Cellfectin Invitrogen®. Estes lipossomas provaram ser particularmente mais eficientes para transfecção em vários tipos de células, incluindo as células de *Drosophila*. Além disso, este lipossoma favorece a utilização pela sua ampla gama de aplicações (DNA, RNA em expressão transiente ou expressão estável) e sua simplicidade para o uso (GUY, 1997).

1.4 Antibiótico Higromicina B

Após a transfecção é possível selecionar populações celulares que foram transfectadas através da adição de antibióticos. Esta seleção só é possível se genes de resistência forem introduzidos por transfecção nas culturas celulares. A higromicina B é um antibiótico muito utilizado nestes casos. A higromicina B é um antibiótico aminoglicosídico produzido por *Streptomyces hygroscopicus*, capaz de inviabilizar bactérias, fungos e células eucarióticas. Atua na transcrição inibindo a síntese protéica e é usado para a seleção em células eucarióticas transfectadas com o vetor contendo o gene de resistência a higromicina B. O gene de resistência codifica uma fosfotransferase que modifica a higromicina B, através da fosforilação de uma hidroxila na 4ª posição do anel cíclico (hiosamina) como mostra a figura 1.

O antibiótico higromicina B é adicionado ao meio de cultura em concentrações que variam de acordo com o tipo de células utilizadas. Recomenda-se a concentração para a seleção de células transfectadas com vetores que contenham o gene de resistência a higromicina B entre 25 - 1000 $\mu\text{g/mL}$. Comumente usa-se concentrações para seleção de células resistentes a higromicina B que variam de 200 $\mu\text{g/mL}$ para células de mamíferos, 20-200 $\mu\text{g/mL}$ para células de plantas e para bactérias e fungos de 200- 1000 $\mu\text{g/mL}$. De qualquer forma, uma curva de resistência pode ser facilmente obtida através da análise da sobrevivência das células em diferentes concentrações do antibiótico.

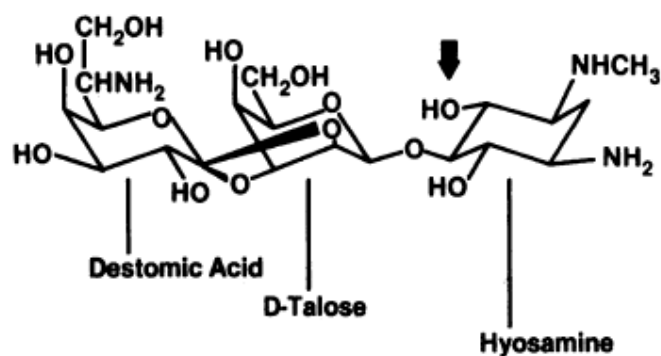


Figura 1: Estrutura da higromicina B. A seta indica o grupo 4 hidroxila no qual ocorre a fosforilação, inibindo sua ação (RAO et al., 1983).

1.5 A raiva e o vírus rábico

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

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

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

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

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

A vacina contra a raiva foi inicialmente produzida através da purificação e inativação do vírus rábico de cérebro de camundongos infectados. Esta vacina ainda tem sido utilizada em muitos países tanto para uso humano quanto veterinário. Atualmente, o vírus rábico purificado e inativado de culturas celulares têm sido comercialmente disponível para a vacinação contra a raiva e novas tecnologias têm sido estudadas para eliminar-se a utilização do cultivo do vírus rábico na produção da vacina. Além da vacina, a produção de soro anti-rábico também é importante no controle da doença, uma vez que o tratamento pós-exposição

através de soro e vacina mostra-se bastante protetor (BAHLOUL et al., 1998). Como mostra a figura 2 o vírus rábico é um vírus em forma de projétil, que possui uma fita simples de RNA negativo como material genético, com diâmetro de 75 nm e comprimento que varia de 100-300 nm. É um vírus não-lítico que não produz efeitos citopáticos, tendo grande afinidade por neurônios (DEBRÉ & CELERS, 1970). Produz cinco proteínas: a nucleoproteína N, a fosfoproteína NS, uma RNA polimerase L, a proteína de matriz e a glicoproteína de superfície G, ou GPV. As proteínas N, NS e L se unem formando um complexo ribonucleoprotéico conhecido como RNP, a glicoproteína G (GPV) é uma proteína transmembrana que forma o envelope viral (DELAGNEAU et al., 1981) e induz a produção de anticorpos neutralizantes (VNAb) que protegem contra o ataque viral (PERRIN et al., 1985). Alguns estudos demonstraram também a indução de resposta imune através dos complexos RNP em camundongos e macacos.

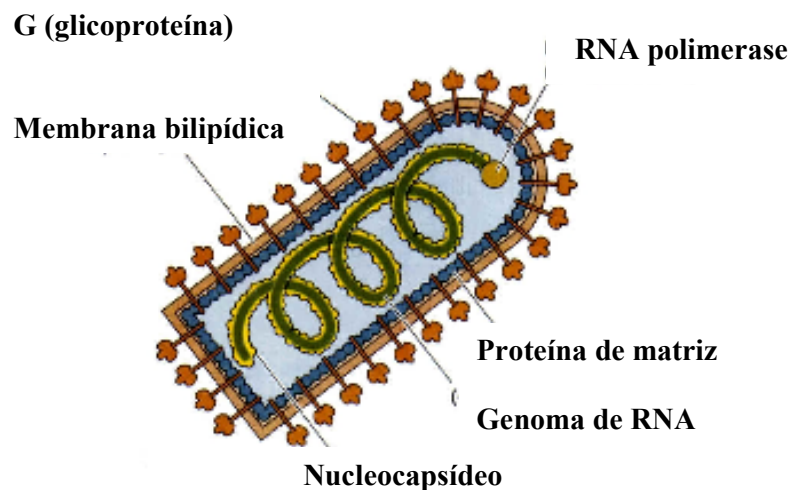


Figura 2: Esquema do vírus rábico e suas proteínas. CCAUFES - Centro de ciência agrária da universidade federal do Espírito Santo.

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

1.6 Expressão da GPV

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

A GPV tem sido reconhecida como um antígeno capaz de induzir anticorpos neutralizantes do vírus, conferindo imunidade protetora contra raiva, resultando no interesse de produzi-la nos mais diversos sistemas de expressão conhecidos. Por esta razão a expressão do gene da GPV tem sido estudada tanto em células eucarióticas (LATHE et al., 1984; LECOCQ et al., 1985) quanto em procarióticas (KIENY et al., 1984; PREHAUD et al., 1989). A proteína expressa em bactérias falhou na proteção de camundongos após desafio, provavelmente porque procariotos não são capazes de realizar adequadamente a glicosilação de proteínas (modificações pós-traducionais) que seriam fundamentais para a atividade da GPV. Neste sentido, sistemas de expressão em células de mamíferos também foram testados. Morimoto et al., 1992, construíram um vetor derivado de retrovírus contendo o gene da GPV. Esse vetor permitiu a expressão de GPV em células de neuroblastoma (NA) e células de rim de hamster (BHK-21). A proteína produzida foi corretamente glicosilada apenas em células BHK-21, sugerindo que as alterações pós-traducionais dependem também das condições celulares sob as quais a proteína é metabolizada. Mochizuki et al., 1998, utilizaram HIV-1 defeutivo e também observaram produção de GPV em células humanas 293-T.

Em leveduras *Sacharomices cerevisiae*, Klepfer et al., 1992, expressaram a proteína G do vírus rábico utilizando um vetor de expressão sob controle de um promotor indutível (metalotioneína) e um promotor constitutivo (triose desidrogenase). A glicoproteína foi glicosilada e encontrou-se associada à membrana das leveduras, porém extratos de levedura

contendo a proteína G protegeram animais em desafio intramuscular, mas não no desafio intracerebral com camundongos.

Estudos da expressão da GPV em células de inseto *Spodoptera frugiperda* (SF9) utilizando um baculovírus recombinante foram realizados. Prehaud et al., 1989, demonstraram através da construção de um baculovírus recombinante com o gene da GPV sob comando do promotor da poliedrina que a GPV expressa manteve as características estruturais e imunogênicas nessas culturas. Tuchiya et al., 1992, verificaram que a GPV produzida por baculovírus recombinante é capaz de se fundir formando complexos em condições de baixo pH.

Assim, neste contexto, entre os produtos virais de nosso interesse do ponto de vista de produção de imunobiológicos optamos pela glicoproteína G do vírus da raiva (GPV), por se encontrar na superfície do vírus e ser responsável pela indução de resposta imunológica protetora, sendo um constituinte fundamental da vacina anti-rábica.

A perspectiva de expressão do gene responsável por esta proteína em células de fácil manipulação e cultivo, como as células de *Drosophila*, possibilitariam uma opção bastante interessante para a produção de antígenos vacinais contra a raiva. Porém os procedimentos e materiais para a detecção dessa proteína atualmente disponíveis são de alto custo e de difícil obtenção. Assim, nos propusemos neste trabalho também a estudar formas alternativas para a detecção desta proteína (citometria de fluxo, microscopia confocal, “Dot Blot”, “Western Blot”), otimizando estes procedimentos para a detecção da GPV em células de drosófilas.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho possui como objetivo principal, comparar a expressão de GPV em células S2 obtidas por co-transfecção dos vetores pAcGPV + pCoHygro e por transfecção de um único vetor pAcGPVHygro .

2.2 Objetivos Específicos

1. Padronização do protocolo de “Western Blot” e realização de forma qualitativa do teste para detecção da glicoproteína G do vírus rábico (GPV) ;
2. Padronização do protocolo de detecção da glicoproteína G do vírus rábico por citometria de fluxo (FACS) e microscópio confocal;
3. Padronização do protocolo de detecção da glicoproteína G do vírus rábico através de teste quantitativo ELISA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de Bactérias

Nos experimentos de transformação bacteriana foi utilizada a cepa de *Escherichia coli* DH5 α é:

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

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

LB

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

SOB

2% bactotripton - (Oxoid)

0,5% extrato de levedura - (Oxoid)

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

pH 6,8 -7,0

SOC

Meio SOB

20 mM de glicose - (Gibco)

3.2 Introdução do DNA Plasmidial em Bactérias

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

3.3 Obtenção de bactérias competentes

Segue abaixo as soluções utilizadas para obtenção de bactérias competentes:

RF I

100 mM KCl

50 mM MnCl₂

30 mM acetato de potássio

10 mM CaCl₂

15% glicerol - (Invitrogen[®])

RF II

NaMOPS

10 mM KCl

75 mM CaCl₂

15% glicerol - (Invitrogen[®])

As bactérias competentes para transformação por choque térmico foram obtidas da seguinte maneira: Após as bactérias terem sido estriadas por esgotamento em placa LB ágar e incubadas a 37 °C por 20 horas, uma colônia foi inoculada em 3 mL de meio SOB e mantida a 37 °C por 16 horas sob agitação de aproximadamente 250 rpm. Quando o meio de cultura já

estava ligeiramente turvo, foram adicionados 100 mL de meio SOB e as bactérias foram novamente incubadas a 37 °C com agitação, por aproximadamente 2 horas, até a cultura atingir uma DO entre 0,3 e 0,5 a 600 nm.

A essa suspensão foi adicionado 1 mL de solução de MgCl₂ (1 M), mantida no gelo por 15 minutos e precipitada por centrifugação a 3.000 rpm por 12 minutos a 4 °C (centrífuga Eppendorf). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 20 mL de solução RF I, mantendo os tubos no gelo por 15 minutos.

Passado esse tempo a suspensão foi novamente centrifugada a 3.000 rpm por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 4 mL de solução RF II. Aliquotas de 400 µL em microtubos foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -70 °C.

3.4 Transformação de bactérias competentes

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

3.5 Extração de DNA Plasmidial

A extração de DNA para transfecção nas células S2 foi feita por lise alcalina seguida pela ligação do DNA plasmidial em uma afinidade utilizando Qiagen® Plasmid Maxi Kit.

Este método tem como princípio a extração por lise alcalina modificada, seguida pela ligação do DNA plasmidial a uma resina de troca aniônica, sob apropriadas condições de baixo sal, pH, RNA, proteínas, corantes e impurezas de baixo peso molecular são removidas pela lavagem em meio com sal. O DNA plasmidial é eluído em tampão com alta concentração de sal e, então, concentrado e dessalinizado por precipitação com isopropanol.

3.5 Vetores de Expressão Gênica

Neste trabalho foi utilizado o vetor pAcGPV obtido em nosso laboratório (YOKOMIZO et al., 2007). Neste vetor o cDNA da GPV encontra-se sob o controle do promotor da actina de *Drosophila melanogaster* (pAC) e possui o sinal de poliadenilação do vírus SV40, além do gene que confere resistência a ampicilina e a origem de replicação em bactérias (*E. coli*) (Figura 3). Outro vetor utilizado foi o pCoHygro (Invitrogen®) (Figura 4) que contém um gene de resistência a higromicina B permitindo a seleção de células resistentes a higromicina B após os procedimentos de transfecção e co-transfecção. Utilizou-se também o vetor pAcGPVHy que consiste em um vetor que possui o gene de interesse (expressão) e o gene de seleção (Figura 5). Este vetor foi obtido em nosso laboratório e gentilmente cedido pelo colega Marcos Alexandre Nobre Lemos.

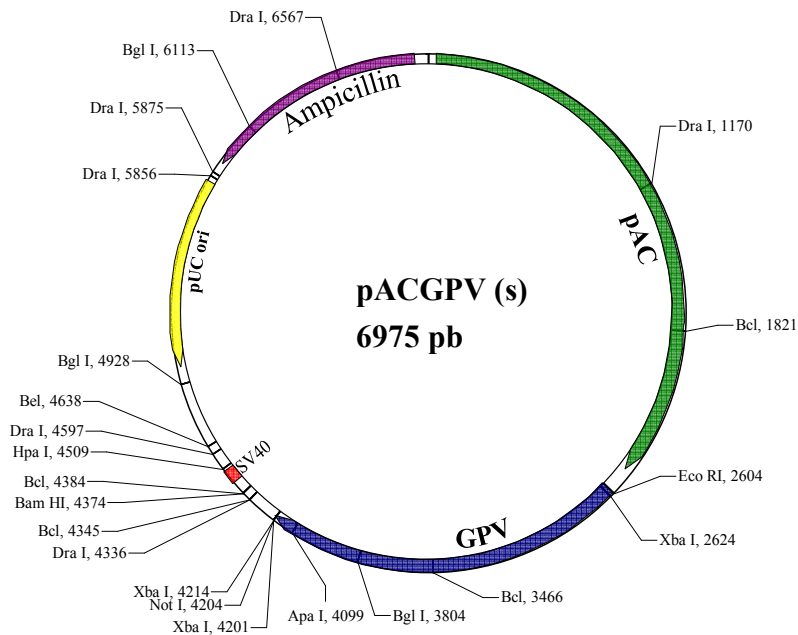


Figura 3: Mapa da construção do vetor pAcGPV. pAC corresponde ao promotor da actina de *Drosophilamelanogaster*, SV40 sinal de poliadenilação do vírus SV40. Ori *E. coli* e Ampicillin correspondem a sequência de origem de replicação e de resistência ao antibiótico ampicilina em *E. coli* e respectivamente GPV corresponde ao cDNA da glicoproteína G do vírus da raiva.

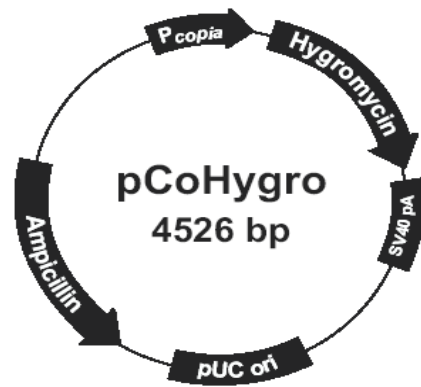


Figura 4: Mapa do vetor pCoHygro (Invitrogen). P_{copia} corresponde ao promotor gênico para expressão do gene que confere resistência à higromicina B (Hygromycin). SV40 pA à seqüência de poli-adenilação do vírus SV40. Ampicillin e pUC ori são seqüências para replicação e seleção do vetor em bactérias.

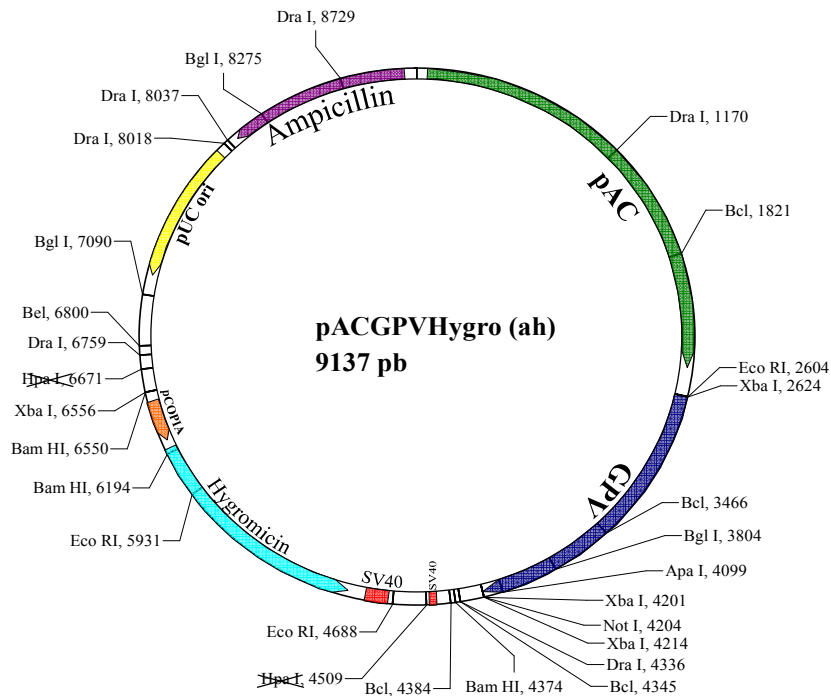


Figura 5: Mapa da construção do vetor pACGPVHygro. pAc corresponde ao promotor da actina de *Drosophila melanogaster*, SV ao sinal de poliadenilação do vírus SV40. Ori E.coli e Ampicillin correspondem a seqüência de origem de replicação e de resistência ao antibiótico ampicilina em *E. coli*. GPV corresponde ao cDNA da glicoproteína G do vírus da raiva. P_{copia} corresponde ao promotor gênico para expressão do gene que confere resistência à higromicina B (Hygromycin). SV40 pA à seqüência de poli-adenilação do vírus SV40.

3.6 Cultura de Células Schneider 2 (S2)

Culturas de células de *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (S2)(SCHNEIDER, 1972), selvagens (S2) e recombinantes (S2AcGPV e S2AcGPVHygro) foram cultivadas em frascos de cultura celular estéreis de T 25 cm² e T 75 cm² e frascos agitados estéreis de 100 mL com volume de trabalho de 15 ou 20 mL, sob agitação de 100 rpm em agitador orbital. Todas as culturas foram mantidas a 28 °C.

3.7 Manutenção das células S2

Para o repique das células foram utilizados 500 µL de células adicionando 4,5 mL de meio de cultura. Geralmente, os repiques foram feitos 2 vezes por semana em meio Insect Express (Cultilab) e 1 vez por semana em meio SF900 II (Gibco). O repique é necessário para a manutenção das células viáveis que foram utilizadas nos ensaios biológicos.

3.8 Contagem de viabilidade celular

Para contagem de células viáveis foi utilizado o método de exclusão por Azul de Trypan. Foram utilizados 90 µL de suspensão celular e adicionados 10 µL de Azul de Trypan 0,02% e a concentração celular foi determinada por contagem de células viáveis em câmara de Neubauer.

3.10 Transfecção e Co-transfecção em Células S2

O método de transfecção e co-transfecção em células S2 foi realizado segundo o método sugerido pelo fabricante (Life Technologies) com algumas modificações feitas em nosso laboratório (SANTOS et al., 2007).

1. As culturas de células foram repicadas 24 horas antes da transfecção e co-transfecção na concentração de 5×10^6 células em garrafas de cultura (T-25 cm²) completando com 5 mL de meio SF900 II SFM (Gibco).
2. As soluções de transfecção e co-transfecção foram preparadas em placas de poliestireno da seguinte maneira:

Solução A: Para cada transfecção, foi diluído 2 µg do plasmídeo (na co-transfecção uma proporção de 1:20 de pCoHygro : pAcGPV foi utilizada, totalizando 2 µg de DNA) em 500 µL de meio SF-900 II SFM (Gibco).

Solução B: Para cada transfecção e co-transfecção foram diluído 10 µL de CellFectin (Invitrogen®) ou Lipofectamine (Invitrogen®) em 500 µL de meio SF-900 II SFM (Gibco)

3. As duas soluções foram combinadas, misturando-as gentilmente e incubando em temperatura ambiente por 15 minutos.

4. Para cada transfecção e co-transfecção foi adicionado 1 mL de solução de transfecção contendo o complexo de lipídeos e DNA. Foi aspirado o meio das células e gotejado o complexo de DNA e lipídeos diluído.

5. As células foram incubadas por 5 h a 28 °C sob agitação lenta

6. Após incubação, foi adicionado 4 mL de meio SF-900 II SFM (Gibco).

7. As células foram selecionadas em trocas de meio que foram feitas a cada 5 dias com meio SF900 II SFM (Gibco) com 600 µg/mL de higromicina B.

8. A análise da expressão da proteína GPV para determinar o melhor método de transfecção nas células foi feita por vários métodos (ELISA, citometria de fluxo (FACS), “Western Blot” e microscopia confocal) após a obtenção de linhagens selecionadas.

3.11 Meios de Cultura para células de inseto

Em grande parte dos ensaios biológicos descritos utilizamos o meio SF900 II (Gibco), livre de soro fetal bovino e adicionado de 1% de antibiótico Anfotericina B, este meio possui formulação fechada. Também foram utilizados para ensaios biológicos outros meios tais como: TC-100 (Cultilab), complementado com 10% de soro fetal bovino e Insect Express (Bio-Whittaker), sendo que em ambos foi adicionado 1% de antibiótico Anfotericina B. Todos os meios foram armazenados em geladeira a 4 °C.

3.12 Preparação de Soluções

3.12.1 Soluções para as preparações do Gel de Poliacrilamida 12,5% - SDS-PAGE

Gel de separação

H ₂ O	3,44 mL
30% acrilamida	4,2 mL - (Plusone)
1.5 M Tris (pH 8.8)	2,6 mL - (Serva)
10% SDS	104 µL
10% Persulfato de amônio	104 µL - (Vetec)
TEMED	4,2 µL - (Plusone)

Gel de empilhamento

H ₂ O	4,1 mL
30% acrilamida	1,0 mL - (Plusone)
1.5 M Tris (pH 6.8)	750 µL - (Serva)
10% SDS	60 µL
10% Persulfato de amônio	60 µL - (Vetec)
TEMED	6 µL - (Plusone)

3.12.2 Tampão de amostra 1X

50 mM de Tris (pH 6.8) 2 mL
2% SDS peso/V 0,4g
0,1% azul de bromofenol 0,02g
10% de glicerol 2 mL
Completar com H₂O milliQ para 200 mL

3.12.3 Tampão de corrida pH 8.3

3 g Tris - (Serva)
14,4 g Glicina - (Invitrogen™)
1 g SDS

Completar com H₂O milliQ para 1000 mL acertar pH 8.3 com solução de HCl e manter a 4 °C

Procedimento para a corrida do gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Limpamos com água destilada as placas de vidro, espaçadores e pentes. Preparamos as soluções do gel de separação de acordo com as quantidades indicadas (em material e métodos). Com o auxílio de uma micropipeta entre as placas de vidro, com cuidado para não formar bolhas de ar, a solução é colocada até a marca traçada. Foi colocada água destilada sobre a superfície da solução do gel de separação para evitar que a superfície de polimerização fique irregular e ressecada. Após a polimerização do gel, foi removida a água da superfície do gel.

Em seguida adicionamos neste gel de separação já polimerizado a solução do gel de empilhamento e colocamos o pente, antes do gel começar a polimerizar. Deixamos em repouso até o gel de empilhamento polimerizar (aproximadamente 30 minutos). As amostras com tampão de amostra 1X e o padrão molecular nos poços do gel de empilhamento foram colocadas. Iniciamos a eletroforese aplicando uma voltagem menor (80 V) até a frente de corrida atingir o gel de migração, então aumentamos a voltagem para 150 V. Após a corrida removemos o gel das placas de vidro e coramos o gel com corante Coomassie Blue ou corante de prata.

3.12.4 Soluções de coloração por Prata em géis de poliacrilamida

3.12.5 Fixador

(50% metanol, 12% ácido acético, 50% formaldeído)

50 mL metanol - (Merck)

12 mL ácido acético - (Merck)

50 µL de formaldeído - (Merck)

Completar para 100 mL de água destilada

3.12.6 Tiosulfato de sódio

40 mg de tiosulfato de sódio - (Vetec) em 200 mL de água destilada

3.12.7 Nitrato de Prata - (Serva)

200 mg em 100 mL de água destilada

75 µL de formaldeído (para 100 mL)

3.12.8 Revelador

6 g de carbonato de sódio - (Dinâmica)

50 µL de formaldeído

2 mL da solução de tiosulfato

Completar para 100 mL de água destilada

3.12.9 Solução de parada “Stop”

50 mL de metanol - (Merck)

12 mL de ácido acético - (Merck)

Completar para 100 mL de água destilada

Procedimento para a coloração

Após a corrida o gel foi submerso em 100 mL de solução fixadora e foi colocado em forno de microondas (potência alta) durante 30 segundos. Após este período foi agitado por 5 minutos e lavado com 100 mL de etanol 30%, novamente colocado em forno de microondas (potência alta) durante 30 segundos. Após este período foi agitado durante 5 minutos a temperatura ambiente e então, adicionado 100 mL de solução de tiosulfato de sódio. Colocamos novamente em forno de microondas durante 30 segundos e então agitamos durante 2 minutos a temperatura ambiente. O gel foi lavado com água destilada durante 30 segundos, levado em forno de microondas e em seguida foi agitado por 2 minutos em temperatura ambiente. Foi lavado novamente com água em forno de microondas e agitado por mais 2 minutos. O gel foi submerso em 100 mL de solução de prata durante 30 segundos em forno de microondas e agitado por 5 minutos a temperatura ambiente, após este procedimento foi lavado com água destilada durante 20 a 60 segundos. Juntamos então 100 mL de solução

reveladora e incubamos durante 5-6 minutos a temperatura ambiente. Paramos a reação com solução de parada “STOP”.

3.13 Soluções para “Dot Blot” e “Western Blot”

3.13.1. Tampão de transferência

3 g Tris - (Serva)

14,4 g Glicina - (Invitrogen™)

200 mL metanol - (Merck)

Completar com H₂O milliQ até o volume de 1000 mL e armazenar a 4 °C

3.13.2 Tampão de Bloqueio da membrana

PBS 1X 100 mL

5% de leite em pó desnatado (5 g) - (Nestlé)

0,2% de Tween 20 - (Sigma)

Armazenar a 4 °C

3.13.3 Tampão de lavagem (1)

8,76 g NaCl - (Quimex)

1,21 g Tris

Completar com H₂O milliQ para 1000 mL e armazenar a 4 °C

3.13.4 Substrato Cromógeno (solução reveladora)

1 pastilha de 30 mg de 4-chloro-1-naphthol tablets

10 mL de metanol

17 mL de solução de lavagem

100 µL de H₂O₂

A pastilha foi dissolvida em 10 mL de metanol e 3 mL desta solução de lavagem

3.13.5 Tampão de lavagem (2)

PBS 1X 100 mL

0,2% de Tween 20 - (Sigma)

3.13.6 Solução de Pouceau-S

500 mg de corante Pouceau-S

1 mL de ácido acético glacial - (Merck)

Completar para 100 mL com água destilada

3.13.7 Kit para detecção - ECL (GE Healthcare)

1 mL de Solução de detecção 1

1 mL de Solução de detecção 2

3.13.8 Revelação

200 mL Fixador (Kodak)

200 mL de Revelador (Kodak)

1 Hyperfilm (GE Healthcare)

Procedimento para a realização do “Dot Blot”

Quadriculamos a membrana de nitrocelulose (1x1 cm) , aplicamos 2 μ L de amostra na membrana de nitrocelulose e esperamos secar. Após a secagem, bloqueamos a membrana com solução de Bloqueio por 30 minutos e então lavamos a membrana 3 vezes com tampão de lavagem (2). Diluímos o anticorpo primário policlonal na solução de bloqueio (1:500) e mergulhamos a membrana de nitrocelulose nesta solução por 1 hora a 37 °C. Após este procedimento, lavamos novamente a membrana 3 vezes com tampão de lavagem (2). Diluímos o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:2000) em solução de bloqueio e a membrana foi submersa nesta solução por 1 hora a 37 °C. Lavamos a membrana 3 vezes

com tampão de lavagem (2) e revelamos com solução reveladora até o aparecimento da marcação quando então paramos a reação em água destilada.

Procedimento para a realização do “Western Blot”

Logo após a corrida do gel de poliacrilamida SDS-PAGE, imergimos o gel e a membrana de nitrocelulose previamente cortada do tamanho do gel no tampão de transferência por 15 minutos. Esta etapa remove os sais do tampão de eletroforese e permite o encolhimento prévio do gel no tampão de transferência que contém metanol.

Para a transferência foi feita a seguinte montagem: 1- papel filtro (Whatmann 3 MM) 2- membrana de nitrocelulose (Transfer Blot - Transfer Médium- Bio Rad, Pure Nitrocellulose Membrane 0,45 μm) 3- gel, 4- papel filtro (Whatmann 3 MM) e em seguida foi feita a transferência por eletroforese a 20 V 16 horas.

Para verificarmos a eficiência de transferência, a membrana foi tratada com o corante Ponceau S para verificação da possível existência de bandas, posteriormente, descorada com água destilada. A membrana foi mantida em tampão de bloqueio por 1 hora e lavada com tampão de lavagem (2). O anticorpo primário policlonal foi diluído 1:100 em tampão de bloqueio no qual a membrana foi mantida por 1 hora. A membrana foi lavada 3 vezes solução de lavagem (2) por 5 minutos cada lavagem. O anticorpo secundário foi diluído em tampão de bloqueio, numa proporção de 1:2000 no qual a membrana foi mantida por 1 hora. Foram feitas 3 lavagens de 5 minutos cada com solução de lavagem (2) e a membrana foi revelada com a solução de cromógeno A reação foi parada com água destilada.

Outra maneira da realização do Western blot é após a separação eletroforética, a proteína foi transferida para membrana de nitrocelulose (NC) (Hybond N-Amersham) a 350 mA por 1 h usando equipamento “Semi-dry transfer unit” (Amersham Biosciences). A eficiência da transferência foi feita pela coloração da membrana de nitrocelulose com Ponceau-S 0,1% (em ácido acético a 10%).

Em seguida, a membrana de nitrocelulose foi incubada durante a noite, a 4 °C, em solução contendo PBS-leite Molico 5% e BSA 2,5%. Após o bloqueio, a membrana foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente com o anticorpo primário policlonal anti-GPV (1:200) diluído no lisado celular da células S2 (adsorção prévia). Após 3 lavagens de 10 minutos com PBS/Tween 20 a 0,05% foi realizada uma incubação por 1h a temperatura ambiente com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase e a revelação feita por

quimioluminescência utilizando o kit ECL Western Blotting Analysis System (GE). Um esquema do procedimento descrito acima está apresentado na figura 6.

Transferência das proteínas separadas em gel de poliacrilamida para membrana de nitrocelulose

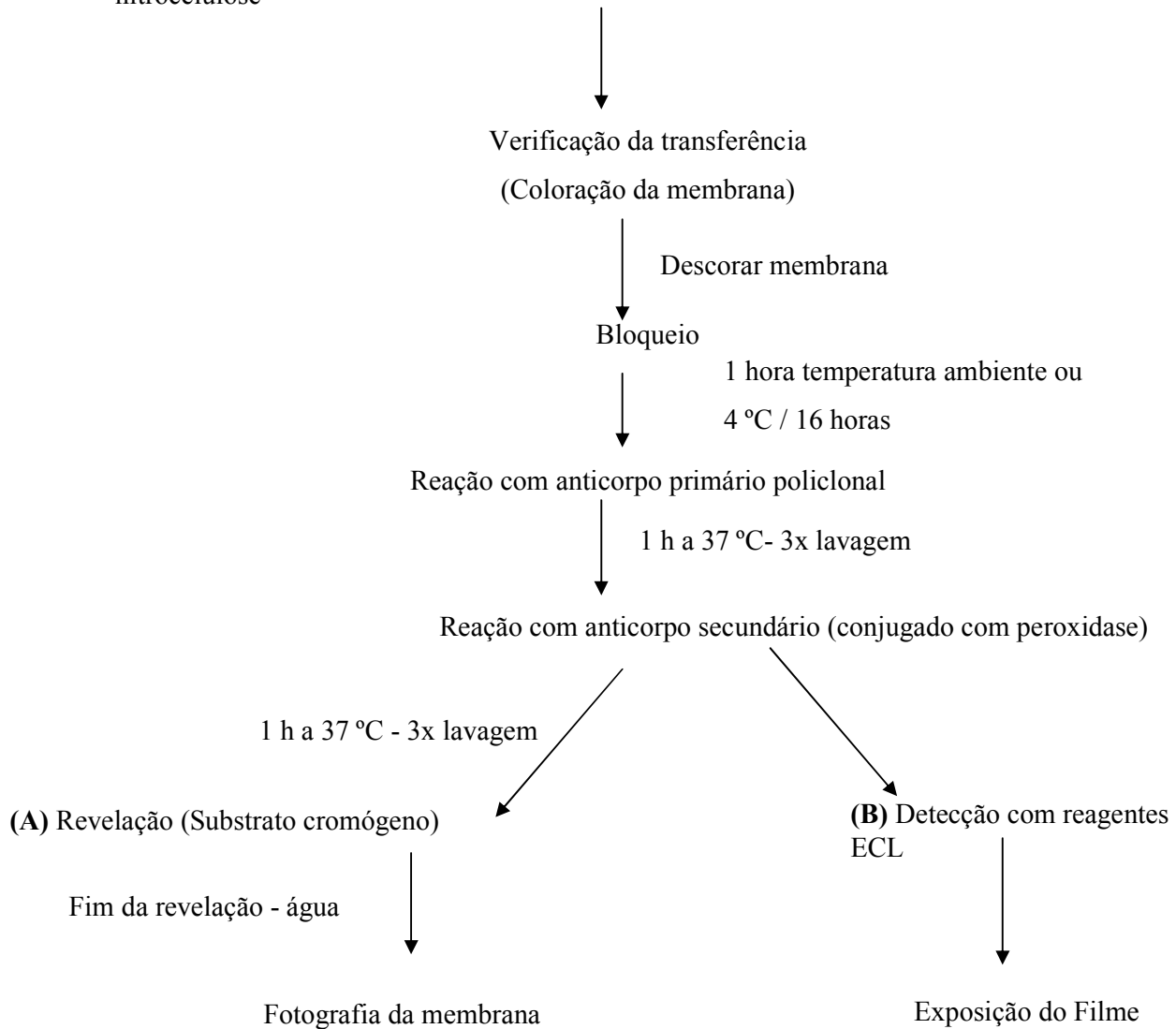


Figura 6: Esquema do procedimento de “Western Blot” para detecção da proteína GPV em (A) revelação com cromógeno e (B) revelação com reagentes ECL

3.14 Congelamento e Descongelo de Células S2 Selvagens e Recombinantes

Segue abaixo protocolo padronizado em nosso laboratório para congelamento e descongelamento de células S2 selvagens e S2 recombinantes:

3.14.1 Protocolo para congelamento de células S2

Para o congelamento das células necessitamos de:

1. Cultura de célula na fase exponencial
2. Meios de congelamento (50% de Soro fetal bovino, 40% de meio cultura novo e 10% de DMSO) e criotubos estéreis

Procedimento

Para o congelamento necessitamos de 1×10^7 células/mL, estas células são submetidas a centrifugação a 1000 rpm 28 °C por 5 minutos. Descartamos o meio e ressuspendemos as células no meio de congelamento (50% de Soro fetal bovino, 40% de meio cultura novo e 10% de DMSO). Após este procedimento distribuimos até 1 mL por criotubo sempre homogeneizando a suspensão. Deixamos descansar por 15 a 20 minutos (incluindo o tempo de distribuição) em temperatura ambiente e colocamos no refrigerador -80 °C por 24 horas. Após as 24 horas, transferimos os criotubos para N₂ líquido.

3.14.2 Protocolo para Descongelamento das células S2

Para o descongelamento, 5 mL de meio de cultura são adicionados a um tubo de centrífuga de polietileno (Falcon), retiramos o criotubo contendo as células do nitrogênio e descongelamos rapidamente em banho-maria a 37 °C então colocamos o conteúdo do criotubo no tubo de centrífuga de polietileno (Falcon). Centrifugamos a 1000 rpm, 28 °C por 5 minutos. Após a centrifugação descartamos o sobrenadante e ressuspendemos lentamente em 5 mL de meio de cultura, transferimos a suspensão para a garrafa T 25 cm² e finalmente incubamos esta garrafa por 3 dias a 28 °C antes de utilizar as células.

3.15 Imunofluorescência Direta das Células S2 em Citometria de Fluxo (FACS “fluorescence activated cell sorter”)

Todas as análises foram realizadas no setor de citometria de fluxo do Instituto Butantan supervisionado pelo Dr. Jorge Mário da C. F. Junior do laboratório de

Imunoquímica. A análise feita em citometria de fluxo foi realizada em um aparelho FACSCALIBUR da Becton Dickinson (FACS). O FACS foi configurado com base em células em suspensão, células S2, células transfectadas e co-transfectadas.

Segue abaixo o protocolo padronizado em nosso laboratório para a análise destas células marcadas com o anticorpo monoclonal anti-GPV marcado com fluoresceína em citometria de fluxo.

3.15.1 Protocolo para imunofluorescência em citometria de fluxo (FACS)

Material

1 x 10⁶ células

Anticorpo monoclonal anti-GPV marcado com fluoresceína

PBS 1X

Procedimento

Centrifugamos 1x 10⁶ células a 1000 rpm, 28 °C por 5 minutos, após este procedimento descartamos o sobrenadante. Diluímos o anticorpo monoclonal 1:400 em PBS 1X e ressuspendemos as células em 50 µL de solução de anticorpo com PBS 1X. Deixamos por 30 minutos a 4 °C. Após a incubação centrifugamos a 1000 rpm por 5 minutos a 28 °C, descartamos o sobrenadante e ressuspendemos as células em 1 mL de PBS 1X e levamos ao citômetro de fluxo (FACS).

3.16 Análise em Microscópio Confocal

As análises em microscópio confocal foram feitas em um microscópio Carl Zeiss modelo LSM 510 meta com o auxílio da Dra. Toshie Kawano e do Sr. Alexander de Souza Seixas no laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan. Foram utilizados no microscópio confocal objetiva 63X e zoom nível 2 .

3.16.1 Protocolo para detecção da proteína por fluorescência em microscópio confocal Em Lâmina

Colocamos uma gota de cultura celular na lâmina, aguardamos de 20 a 30 minutos as células sedimentarem. Retiramos o sobrenadante, colocamos acetona 80% e incubamos a 4 °C por 20 minutos. Após os 20 minutos retiramos a acetona e deixamos a lâmina secar, colocamos o 50 µL de anticorpo monoclonal anti-GPV conjugado com FITC diluído 1:400 em azul de Evans, deixamos a 1 hora a 37 °C e então lavamos 3 vezes esta lâmina com PBS 1X. Após as lavagens colocamos uma gota de glicerol 50% na lâmina e levamos ao microscópio confocal para a análise.

3.17 Teste ELISA para Detecção da Glicoproteína G do Vírus da Raiva

Na análise por ELISA foi utilizado o kit “Rabies Glycoprotein Enzyme Immunoassay” do Instituto Pasteur, Paris. Nesse imunoenensaio foi utilizado o anticorpo IgG monoclonal anti glicoproteína G do vírus rábico (D1-25N°I-1805), o qual reconhece o sítio III da glicoproteína da cepa PV. Segue abaixo as soluções utilizadas para a realização do teste ELISA.

3.17.1 Tampão Carbonato:

0,05 M Carbonato - (Dinâmica)
pH 9,6

3.17.2 Solução de Bloqueio

0,3% BSA - (Sigma)
5% Sacarose - (Merck)
Tampão Carbonato - (Dinâmica)

3.17.3 Solução de Lavagem

PBS (pH 7,0)
0,005% Tween 20 - (Sigma)

3.17.4 Solução de Diluição

PBS (pH 7,0)

0,05% Tween 20 - (Sigma)

0,5% BSA - (Sigma)

3.17.5 Solução Substrato-cromógeno

40 mM Citrato tri-sódio diidratado - (Grupo Química)

10 mM Ácido cítrico monoidratado - (Grupo Química)

30% H₂O₂

2 mg/mL OPD

3.17.6 Solução de Parada

4 N Ácido sulfúrico - (Synth)

Procedimento para realização do Teste ELISA

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

Para a obtenção de amostras, as células foram cultivadas em meio SF900 II SFM (Gibco), centrifugadas a 1 Krpm por 5 minutos e lavadas em PBS. Para as primeiras análises, as células foram lisadas com tampão de lise (50 mM Tris, 150 mM NaCl e 1% Nonidet P-40) por 10 minutos ou por sonicação. Quando a análise não ocorreu no mesmo dia da coleta, a amostra de células (precipitadas por centrifugação) foi congelada a -80 °C. Nas demais análises, 10⁶ células foram precipitadas por centrifugação, lavadas com PBS e congeladas secas a -20 °C. No momento da análise, as amostras foram descongeladas e ressuspensas no tampão de lise descrito acima. Para as amostras de sobrenadante do cultivo, 300 µL de meio foram armazenados a -20 °C. No momento da análise, estas amostras foram

descongeladas e lisadas com 1 mL do tampão de lise. Como as amostras de sobrenadante foram diluídas 4,334 vezes, os valores de GPV em ng/mL obtidos dessas amostras foram corrigidos multiplicando por 4,334.

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

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

3.18 Solução de Butirato de sódio (C₄H₇NaO₂ 1M)

Foi utilizado 5 mM da solução de butirato de sódio que estava a 1 M para realização do experimento adicionando butirato de sódio no cultivo celular. A solução foi mantida a 4 °C. Para sua utilização a solução foi filtrada em membrana esterilizante com poros de 0,22 µm.

3.19 Análise estatística

As análises estatísticas dos resultados de crescimento celular ou de expressão de GPV para as diferentes linhagens celulares foram feitas através de análise de variância das médias. Para completar essa análise foi aplicado o teste de Tukey com nível de significância de 5%, somente quando a análise anterior mostrava diferença entre as médias de cada linhagem e tratamento. A média foi considerada estatisticamente diferente quando $p > 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Transfecção e Co-transfecção

Os vetores pAcGPV e pAcGPVHygro foram linearizados com as enzimas específicas Hpa I ou com a enzima Ecl Hk1 (Figura 6), para diminuir a possibilidade de ocorrer uma integração rompendo o gene de interesse. Além disso, a linearização do vetor possibilita uma maior probabilidade da incorporação do vetor no DNA genômico celular, embora aumente a possibilidade do vetor ser digerido por nucleases da própria célula.

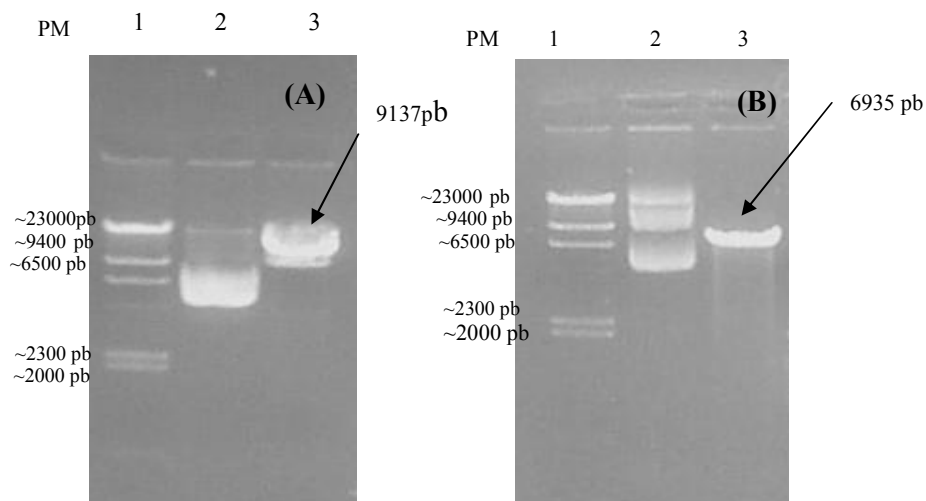


Figura 7: Gel de agarose das digestões dos vetores pAcGPVHygro e pAcGPV com a enzima HpaI ou Ecl Hk1. **(A):** 1 - Padrão de peso molecular λ Hind III 2- vetor pAcGPVHygro não digerido - vetor pAcGPVHygro digerido. **(B):** 1- Padrão de peso molecular λ Hind III 2- vetor pAcGPV não digerido 3- vetor pAcGPV digerido.

Células S2 foram co-transfectadas com os vetores pAcGPV e pCoHygro ou transfectadas com o vetor pAcGPVHygro linearizados. Vários procedimentos de (co) transfecção foram realizados, a fim de se obter células com expressão satisfatória de GPV. A tabela 3 mostra as transfecções e co-transfecções que foram realizadas neste trabalho.

Tabela 3- Transfecções e co-transfecções realizadas

Células obtidas	Vetores Transfectados	Agente de transfecção	Meio de transfecção	Observações
S2AcGPV 1	pAcGPV+ pCoHygro	Cellfectina	SF 900II	subpopulação
S2AcGPVHy 1	pAcGPVHygro	Cellfectina	SF 900II	subpopulação
S2AcGPV 2	pAcGPV+ pCoHygro	Cellfectina	SF 900II	subpopulação
S2AcGPVHy 2	pAcGPVHygro	Cellfectina	SF 900II	subpopulação
S2AcGPVHy 3	pAcGPVHygro	Cellfectina	SF 900II	subpopulação
S2AcGPVHy 4	pAcGPVHygro	Lipofectamina	SF 900II	subpopulação

Após dois dias da (co) transfecção foram adicionados nas células S2, 600 µg/mL higromicina B para seleção das mesmas.

Estas culturas foram repicadas a cada 7 dias, trocando-se o meio e adicionando meio de cultivo fresco com 600 µg/mL higromicina B. A viabilidade celular foi analisada após a adição de higromicina B (Figura 8) e comparada a de células selvagens na presença do antibiótico. À medida que as células S2 tornam-se inviáveis, as células recombinantes sobrevivem. No término de 21 dias todas as células S2 estão inviáveis enquanto as co-transfectadas apresentavam 65% de células viáveis no 7º dia e no 21º dia havia uma viabilidade celular de 84%, ou seja, possivelmente as células viáveis possuíam os vetores de expressão e seleção inseridos em seu genoma celular. Já as células transfectadas apresentavam no 7º dia 80% de células viáveis e no 21º dia de seleção 94% de células viáveis, sugerindo que a seleção foi melhor nas células transfectadas com um único vetor em relação às células co-transfectadas. Assim, uma vez que todas as células S2 selvagens tornam-se inviáveis admitimos o término da seleção e o estabelecimento de uma nova população celular transformada geneticamente, que denominamos S2AcGPVHy e S2AcGPV portadoras dos vetores pAcGPVHygro e pAcGPV + pCoHygro, respectivamente. Após a seleção, as células S2AcGPVHy e S2AcGPV foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos e após a centrifugação transferidas para uma nova garrafa T 25 cm² com meio fresco SF 900 II (Gibco) e não mais adicionado a higromicina B porque em teoria como o vetor se integra no genoma

celular não há necessidade de manter a pressão seletiva. Como mostrado na tabela 3, 2 populações de células S2AcGPV (1 e 2) foram obtidas e 4 de S2AcGPVHy (1, 2, 3 e 4)

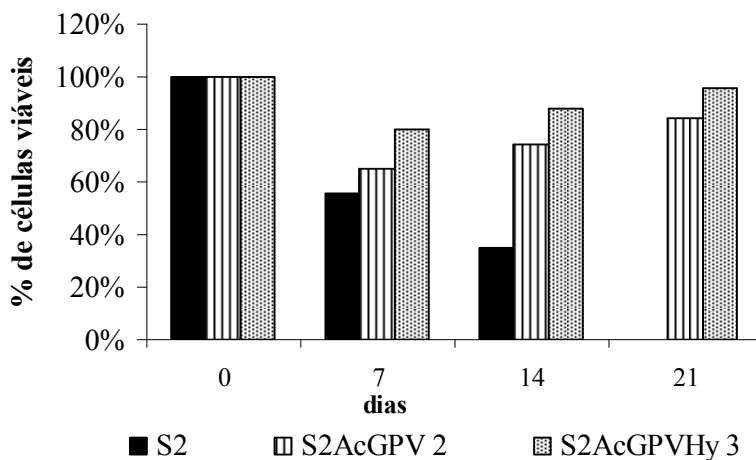


Figura 8: Viabilidade celular de células selvagens, co-transfectadas e transfectadas mantidas com 600 $\mu\text{g/mL}$ de higromicina B.

4.2 Expressão da GPV em células S2 recombinantes

4.2.1 Comparação da expressão de GPV entre células transfectadas e co-transfectadas

Para verificarmos se as células transfectadas S2AcGPVHy (2) e co-transfectadas S2AcGPV (2) estavam expressando a proteína GPV, amostras de culturas do 5º dia de cultivo foram analisadas por teste ELISA (Figura 9). Amostras de sobrenadante da cultura não foram dosadas.

Foi observada uma expressão da proteína GPV maior em células S2AcGPVHy (2) obtendo uma expressão de proteína GPV de 26,91 $\text{ng}/10^7$ células em relação à célula S2AcGPV (2), que obteve uma expressão de proteína GPV e 20,81 $\text{ng}/10^7$ células. Este dado sugere que as células transfectadas S2AcGPVHy (2) possuem melhor eficiência de expressão da proteína GPV em relação à co-transfectadas, possivelmente por ter no mesmo vetor o gene de seleção e o gene de expressão, garantindo que as células resistentes a higromicina B também possuam o gene de expressão, garantia essa que não podemos afirmar (apenas inferir) nas células S2AcGPV (2).

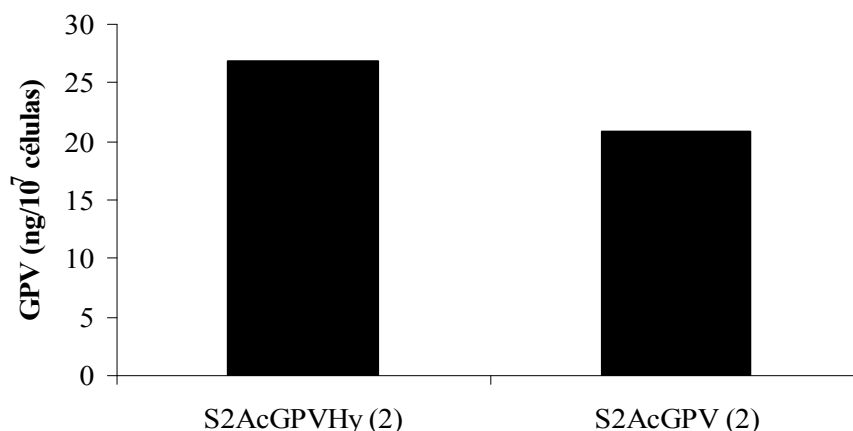


Figura 9: Expressão de GPV em células S2AcGPVHy (2) e S2AcGPV (2) cultivadas por 5 dias em garrafas T 5 cm² com 5 mL de meio SF 900 II. Valores obtidos por teste ELISA.

4.2.2 Obtenção de subpopulações em células recombinantes

Devido ao caráter aleatório de introdução e integração dos vetores no genoma celular, populações de células geneticamente modificadas nem sempre homogêneas são obtidas. Este fato pode levar a uma baixa expressão de proteína recombinante. Na tentativa de encontrar subpopulações de células (co) transfectadas mais homogêneas, diferentes diluições de células S2AcGPVHy (2) e S2AcGPV (2) foram plaqueadas em placas com 12 poços em meio SF 900 II (Gibco).

Após 40 dias de manutenção e ampliação das subpopulações amostras de 48 subpopulações foram analisadas por imunofluorescência em citometria de fluxo (FACS). Para isso as populações e subpopulações foram marcadas com o anticorpo anti-GPV conjugado com FITC e analisadas seguindo o procedimento de citometria de fluxo citado em material e métodos.

Foram adquiridos 10.000 eventos para cada amostra analisada, sendo que os eventos considerados foram aqueles que compõem a população homogênea da amostra (R1), usando o protocolo estabelecido em material e métodos. A aquisição dos resultados foi feita com a utilização de laser com comprimento de onda de 488 nm. O isocianato de fluoresceína (FITC) fluoresce a aproximadamente 530 nm quando excitado por um comprimento de onda de 488 nm, esta fluoresceína foi mensurada pelo detector apropriado do citômetro de fluxo. O FACS foi configurado, a cada análise, com base em uma suspensão de células (co) transfectadas em

meio de cultura SF-900 II SFM (Gibco), sendo esta a fluorescência controle negativo, somente valores acima desses puderam ser considerados como resultados positivos para células (co) transfectadas expressando a proteína. Utilizamos a porcentagem de células fluorescentes resultante dos histogramas gerados pelas amostras analisadas em citometria de fluxo para compararmos os diferentes grupos experimentais.

Como pode ser observado nos dados apresentados na figura 10, as subpopulações de células S2AcGPVHy (2) obtiveram uma porcentagem de células fluorescentes maiores em relação à população, sugerindo que conseguimos selecionar uma subpopulação com maior quantidade de células que estão expressando a proteína GPV.

Ressalta-se que todas as 48 amostras foram analisadas por este método, mas somente foram escolhidas estas subpopulações por apresentarem um maior número de células fluorescentes em relação à população S2AcGPVHy (2).

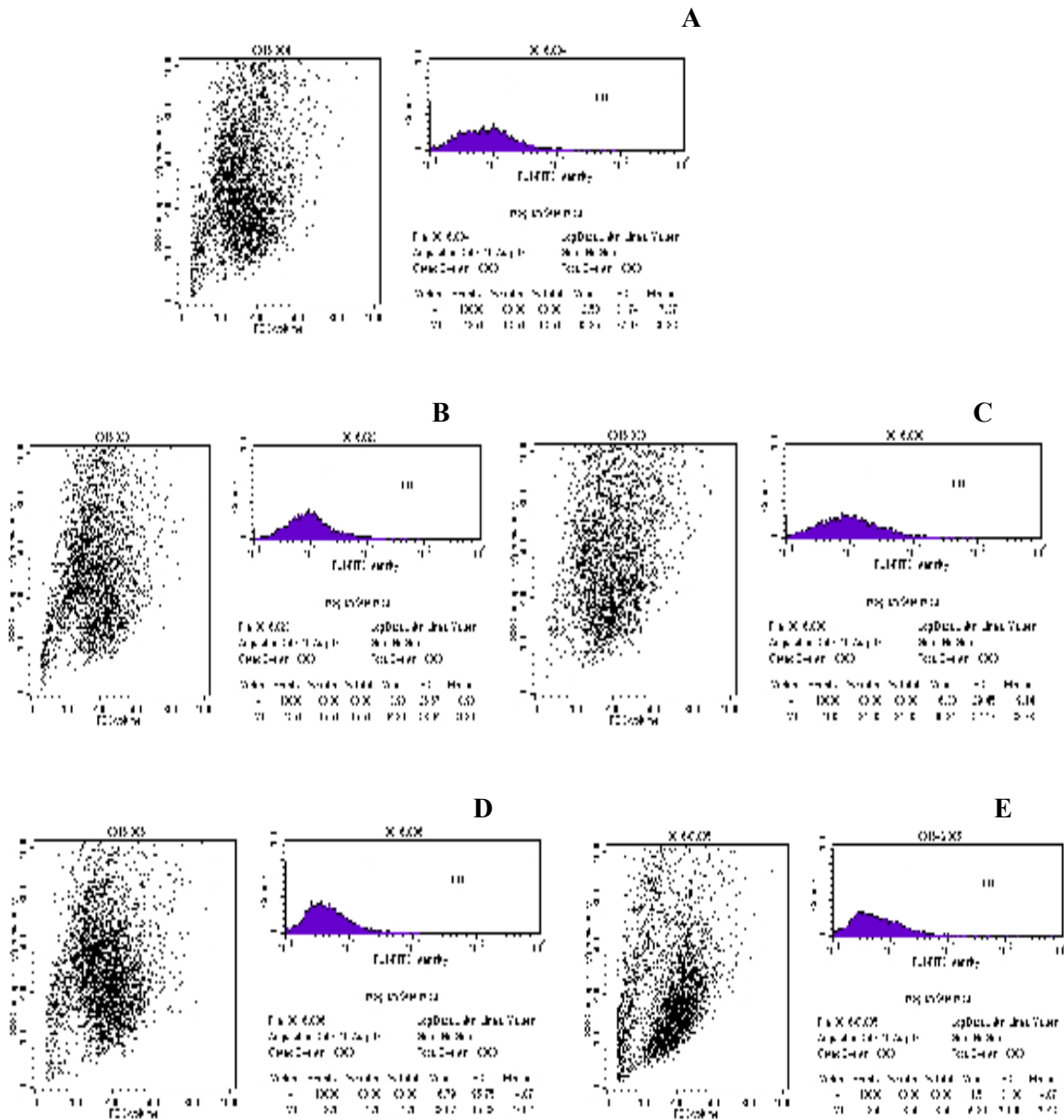


Figura 10: Análise de expressão de GPV em células S2 recombinantes por imunofluorescência em citometria de fluxo (FACS). (A) S2AcGPVHy (2) (B) S2AcGPVHy (2) subpopulação 17. (C) S2AcGPVHy (2) subpopulação 24 (D) S2AcGPV (2) (E) S2AcGPV(2) subpopulação 5.

Também foram analisadas as amostras das subpopulações por microscopia confocal. Para isso, foi coletada uma amostra de cada cultura das subpopulações e da célula S2 selvagem onde foi fixada em uma lâmina de vidro e marcada com anticorpo monoclonal anti-GPV com FITC juntamente com azul de Evans para criar contraste.

A figura 11 mostra as fotografias obtidas em microscopia confocal das diferentes populações e subpopulações estudadas. Todas as subpopulações escolhidas apresentavam células marcadas com fluoresceína, corroborando com os dados anteriores que indicaram mais células fluorescentes nas subpopulações S2AcGPVHy (2) 17 e 24 e S2AcGPV (2) 5.

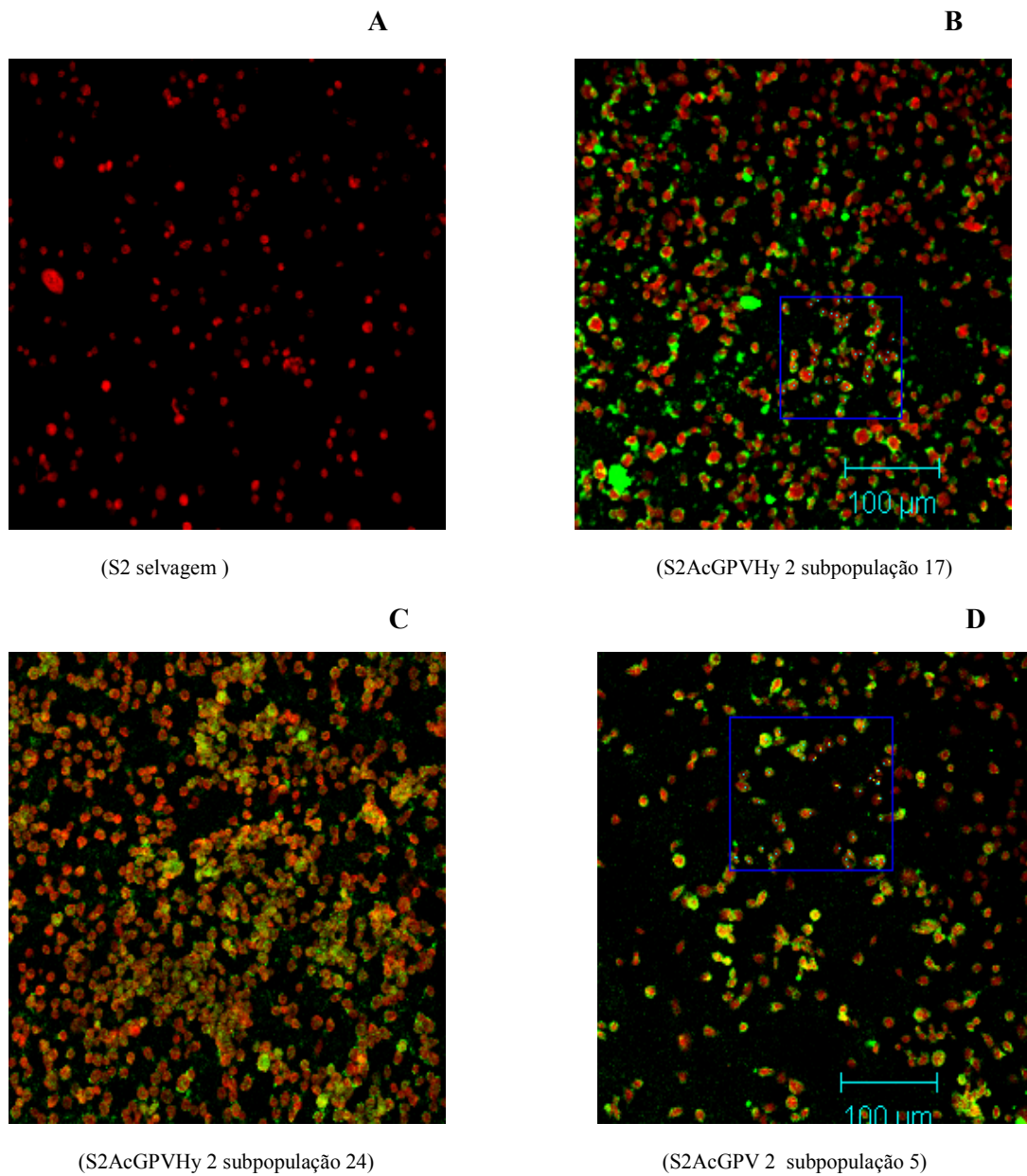


Figura 11: Fotomicroscopia confocal: (A) células S2 selvagem (B) células S2AcGPVHy (2) subpopulação 17 (C) S2AcGPVHy (2) subpopulação 24 (D) S2AcGPV (2) subpopulação 5. Todas as amostras foram tratadas com anticorpos anti-GPV marcado com fluoresceína.

Assim, através de ambas as análises, foram escolhidas 3 subpopulações, 2 subpopulações de S2AcGPVHy (2) e 1 de S2AcGPV (2). Estas subpopulações foram então analisadas por ensaio ELISA (Figura 12).

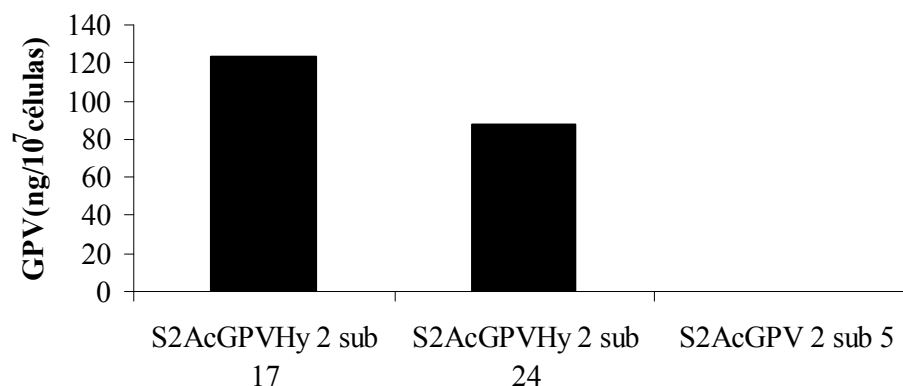


Figura 12: Expressão da proteína GPV detectada por teste ELISA. Subpopulações de S2AcGPV (2) e S2AcGPVHy (2) foram cultivadas em garrafas T 25 cm² por 5 dias com 5 mL de meio de cultura SF900 II. Amostras contendo 10⁶ células foram lisadas com tampão de lise e então analisadas por ELISA.

Observou-se que houve uma expressão da proteína GPV nas subpopulações S2AcGPVHy (2) 17 e 24. Já nas células S2AcGPV (2) na subpopulação 5 selecionada pelo ensaio de microscopia confocal e FACS não houve expressão da proteína GPV. Ainda assim, um aumento de mais de 400% na expressão de GPV pode ser observado nas subpopulações de S2AcGPVHy em relação à população original. Nota-se também que há uma maior expressão da proteína GPV na subpopulação 17 de S2ACGPVHy (2) em relação a subpopulação 24, corroborando com a idéia de que haja realmente uma heterogeneidade da população recombinante que pode refletir diretamente na expressão da GPV. Este dado sugere ainda a necessidade da seleção de subpopulações em células (co) transfectadas procedimento este também limitado para células S2, devido a sua característica de possuir baixa eficiência de crescimento celular em baixa densidade.

4.2.3 Análise por imunofluorescência em citometria de fluxo de células (co) transfectadas com diferentes tempos de incubação do anticorpo monoclonal

Como nos imunoenaios com microscopia confocal observamos um maior número de células fluorescentes que em FACS e por sugestão de pesquisadores que participaram da banca de qualificação deste trabalho, realizamos uma cinética de tempo de incubação do anticorpo monoclonal nas células recombinantes. Para isso um ensaio de imunofluorescência em citometria de fluxo foi feito utilizando o protocolo padronizado em nosso laboratório (30 minutos de incubação), acrescentando 2 outros tempos de incubação (3 e 16 horas) do anticorpo monoclonal nas células S2AcGPV(2) e S2AcGPVHy (4), com o objetivo de verificar se haveria um aumento de porcentagem de células fluorescentes com outros tempos de incubação.

Como mostra a figura 13 foi observado que as células co-transfectadas S2AcGPV (2) e transfectadas S2AcGPVHy (4) que foram incubadas com o anticorpo monoclonal anti-GPV por 30 minutos, 3 e 16 horas apresentaram diferenças estatísticas na porcentagem de células fluorescentes.

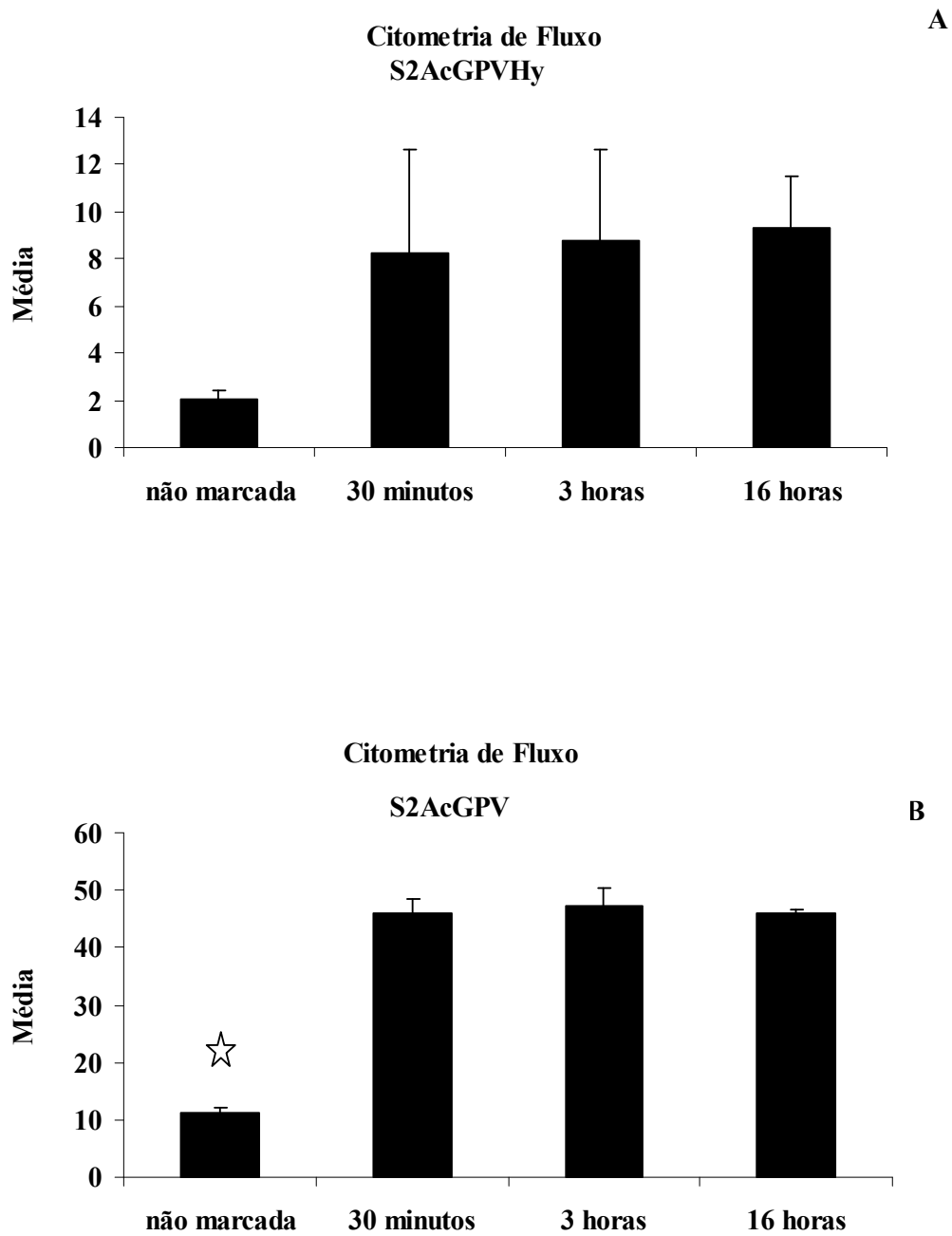


Figura 13: Gráfico de imunofluorescência em células (co) transfectadas por citometria de fluxo em diferentes tempos. **(A)** S2AcGPVHy **(B)** S2ACGPV a marcação na amostra não marcada indica que há diferenças entre as amostras.

4.2.4 Comparação de Expressão de proteína GPV em células transfectadas com lipofectamine e cellfectin (Invitrogen®)

Mesmo tendo sido observado aumento de concentração de GPV em subpopulações celulares, os níveis de expressão ainda mantiveram-se baixos. Como observamos um nível melhor de expressão em células portadoras do vetor pAcGPVHy, duas novas transfecções com este vetor foram realizadas visando uma melhoria na produção de GPV. Para isto, realizamos uma transfecção usando os lipossomas cellfectina já utilizados em transfecções anteriores e testamos também o lipossoma lipofectamina.

Após dois dias da transfecção foram adicionados nas células S2 selvagem e nas células transfectadas, 600 µg/mL higromicina B para seleção das mesmas. Observou-se que a célula transfectada com lipofectamina obteve uma viabilidade celular no 21º dia de 80% em relação às células que foram transfectadas com o lipossoma cellfectina, as quais obtiveram no 21º dia uma viabilidade celular de 70% (Figura 14). Assim, novamente, uma vez que todas as células S2 selvagens estão inviáveis, admitimos o término da seleção e o estabelecimento de uma nova população celular transformada geneticamente, que denominamos S2AcGPVHy (3) e (4) (tabela 3). Realizamos um ensaio imunoenzimático (ELISA) (Figura 15) para verificar a expressão da proteína GPV, após a seleção e o estabelecimento das populações transfectadas com os agentes de transfecção lipofectamina e cellfectina. Para isto crescemos as células S2AcGPVHy (3) e (4) em garrafas T 25 cm² com 5 mL de meio SF 900 II. Amostras das células foram utilizadas para dosagem de GPV por ELISA.

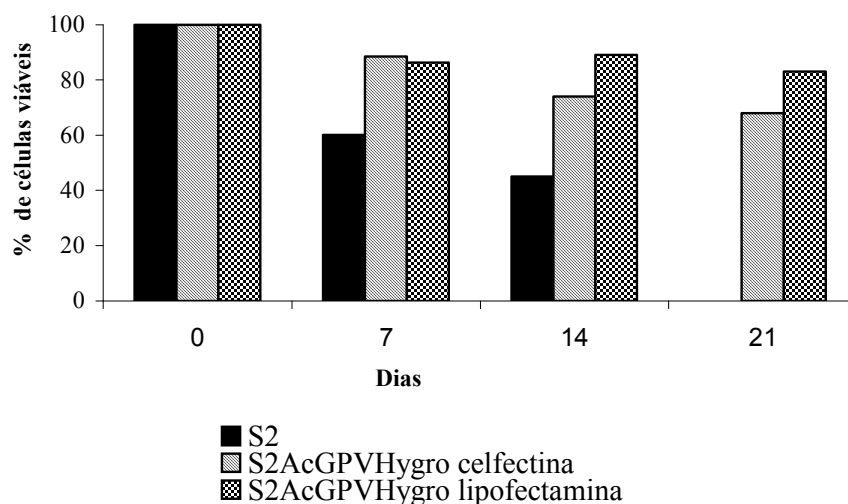


Figura 14: Viabilidade de células S2 selvagem, S2AcGPVHy transfetada com cellfectina ou lipofectamina após seleção com 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de higromicina B.

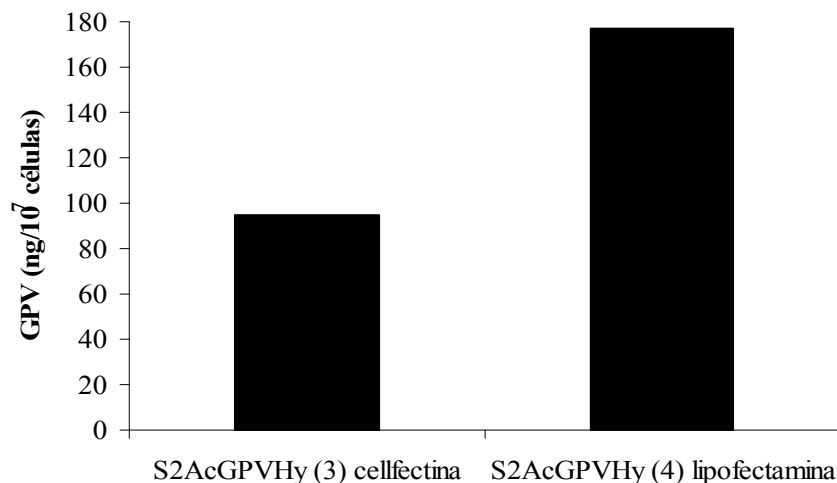


Figura 15: Expressão da proteína GPV detectada por teste ELISA. S2AcGPVHy (3) transfetada com cellfectina e S2AcGPVHy (4) transfetada com lipofectamina. Foram cultivadas em garrafas T 25 cm^2 por 5 dias com 5 mL de meio de cultura. Amostras contendo 10^6 células foram lisadas com tampão de lise e então analisadas por ELISA.

Observou-se que células transfetadas com o agente de transfecção lipofectamina obtiveram uma maior expressão da proteína GPV chegando a $177 \text{ ng}/10^7$ células, já as células transfetadas com o agente de transfecção cellfectina obtiveram $80 \text{ ng}/10^7$ células.

Estes resultados indicam que a lipofectamina foi mais eficiente que a cellfectina para a obtenção de células que expressam GPV.

4.2.5 Adição de nova pressão seletiva nas células S2 recombinantes

Uma outra estratégia visando melhorar a expressão da proteína de interesse foi realizada. Neste caso, adicionamos nova pressão seletiva nas células S2AcGPVHy (4) e S2AcGPV (2). Para isto, utilizamos a higromicina B novamente.

Adicionamos ao meio de cultura de células S2AcGPV (2) e S2AcGPVHy (4) 300 µg/mL de higromicina B e mantivemos estas culturas em garrafas T 25cm². Em paralelo mantivemos também as mesmas populações celulares sem a adição de higromicina B. Após 5 semanas de cultivo com higromicina B, as culturas celulares foram analisadas. Amostras de células cultivadas na presença ou não de higromicina B foram retiradas e submetidas a ensaios de imunofluorescência em citometria de fluxo (Figura 16). Essas amostras também foram lisadas com tampão de lise por 1 hora e utilizadas para ensaios ELISA (Figura 17). Para a análise em citometria de fluxo, as populações co-transfectadas e transfectadas foram marcadas com o anticorpo anti-GPV monoclonal conjugado com FITC.

Podemos observar na figura 16 que a população S2AcGPV (2) (Figura 16 C) tratada com higromicina B obteve 8% de células fluorescentes em relação à população não tratada com higromicina B, a qual obteve 1% de células fluorescentes (Figura 16 B). As células S2AcGPVHy (4) tratadas com higromicina B obtiveram 6% de células fluorescentes (Figura 16 F), já as células não tratadas com higromicina B obtiveram 3% células fluorescentes (Figura 16 E).

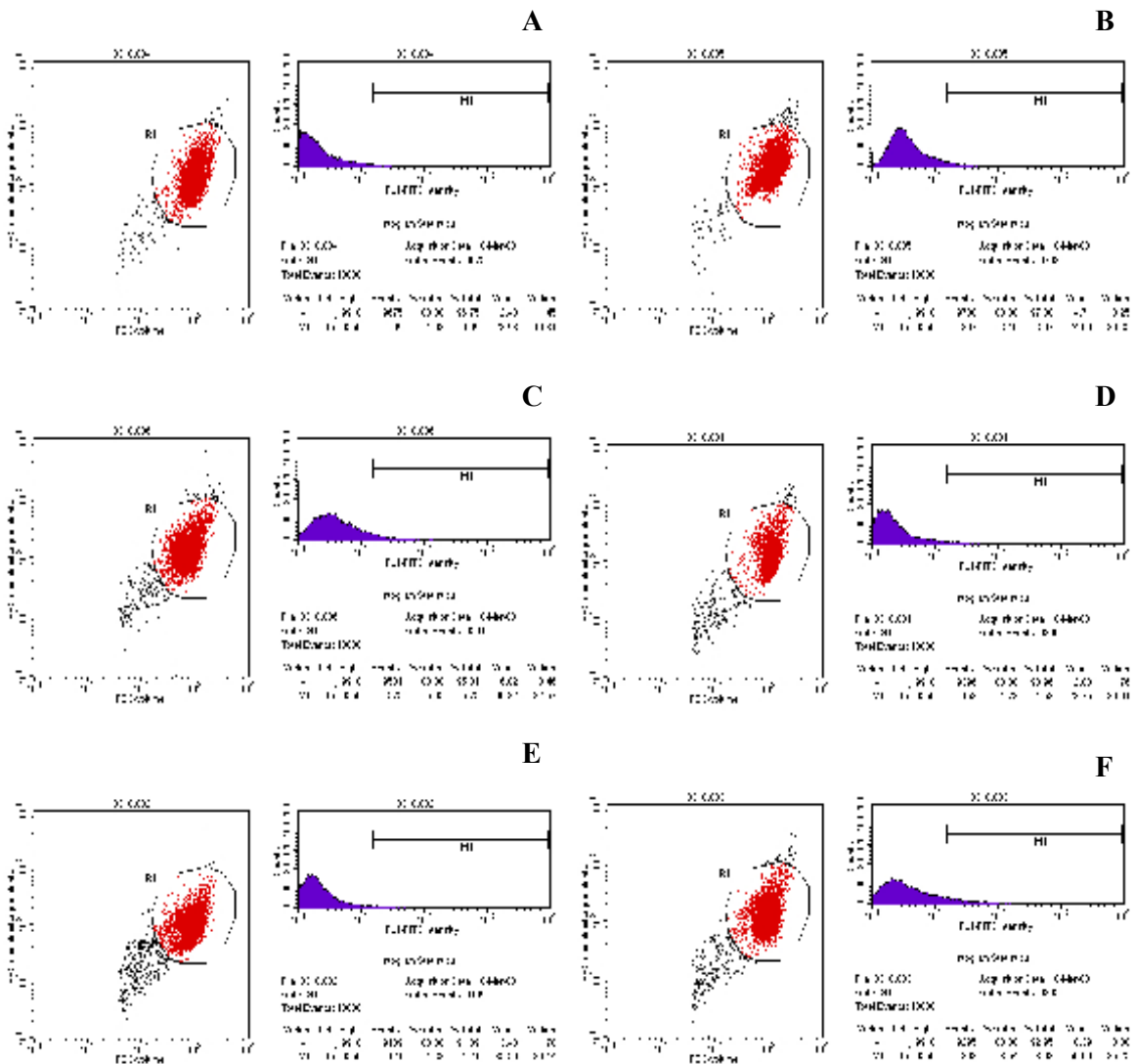


Figura 16: Análise de expressão de GPV em células S2 recombinantes por imunofluorescência em citometria de fluxo (FACS). **(A)** S2AcGPVHy (4) sem marcação de anticorpo anti-GPV **(B)** S2AcGPVHy (4) sem tratamento com higromicina B Hy (-) **(C)** S2AcGPVHy (4) com tratamento com higromicina B Hy (+) **(D)** S2AcGPV (2) sem marcação de anticorpo anti-GPV **(E)** S2AcGPV (2) sem tratamento com higromicina B Hy (-) **(F)** S2AcGPV (2) com tratamento com higromicina B Hy (+).

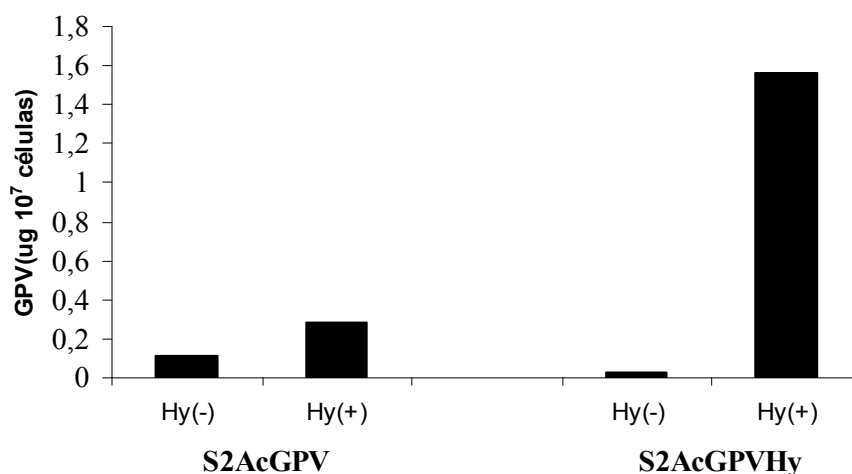


Figura 17: Expressão da proteína GPV em células S2 S2AcGPV (2) e S2AcGPVHy (4) submetidas a um 2º tratamento com higromicina B (+) ou não (-).

Os dados de ensaios ELISA obtidos corroboram com o encontrado nas análises por FACS. É possível notar que as amostras submetidas a um novo tratamento com higromicina B obtiveram melhores resultados de expressão de GPV comparados com as amostras que não foram tratadas com higromicina B. Obtivemos um aumento de 4627% na expressão de GPV em células S2AcGPVHy (4) tratadas novamente com higromicina B S2AcGPVHy (Hy+) comparado com a amostra S2AcGPVHy (Hy-) sem o tratamento e um aumento de 263% nas células S2AcGPV (Hy-) tratadas com higromicina B (S2AcGPV(Hy+)) comparado à amostra S2AcGPV sem tratamento (Figura 17). Embora, em teoria todas tenham sido selecionadas a princípio por conter o gene de resistência a higromicina B, possivelmente um novo tratamento com higromicina poderia estar “re-selecionando” populações celulares onde o gene estaria transcricionalmente ativo. O fato de as células S2AcGPVHy (4) terem apresentado um aumento tão expressivo na concentração de GPV, poderia ser explicado pelo fato dos 2 genes (de seleção e de expressão) estarem próximos e populações com a transcrição do gene de seleção ativo (maior resistência a higromicina B), provavelmente teria em consequência o gene de expressão (GPV) também ativo, refletindo no aumento de expressão de GPV, fato não observado nas células S2AcGPV (2) onde ambos os genes encontram-se em vetores genéticos diferentes.

Em citometria de fluxo as células co-transfectadas tratadas com o antibiótico higromicina B apresentaram uma porcentagem de células fluorescentes maiores em relação às células transfectadas tratadas com higromicina B. Porém, os dados obtidos por ELISA

demonstraram que as células transfectadas tratadas com higromicina B obtiveram uma maior expressão de proteína GPV. Por serem métodos (ELISA e FACS) diferentes e em momentos diferentes é possível que as células transfectadas S2AcGPVHy (4) e co-transfectadas tenham uma variabilidade intrínseca da célula S2 que dificulte a comparação entre os ensaios, momentos e testes diferentes.

Como uma das abordagens futuras deste estudo tem a finalidade de auxiliar no estabelecimento de linhagens celulares para utilização em bioprocessos, o ideal seria que as células recombinantes não precisassem ser mantidas na presença de higromicina B, já que seu custo financeiro é alto. Para tentarmos esclarecer em quanto tempo as culturas celulares perdem a expressão de GPV e, portanto, se ao menos em termos de bioprocessos seria factível a manutenção das células na ausência da higromicina B, as culturas celulares tratadas com higromicina B foram separadas em duas garrafas T 25 cm², onde mantivemos uma com higromicina B e outra sem (um esquema da estratégia utilizada está apresentado na Figura 18). Após duas semanas nessas condições, amostras de células foram retiradas, lisadas e submetidas a um ensaio ELISA (Figura 19).

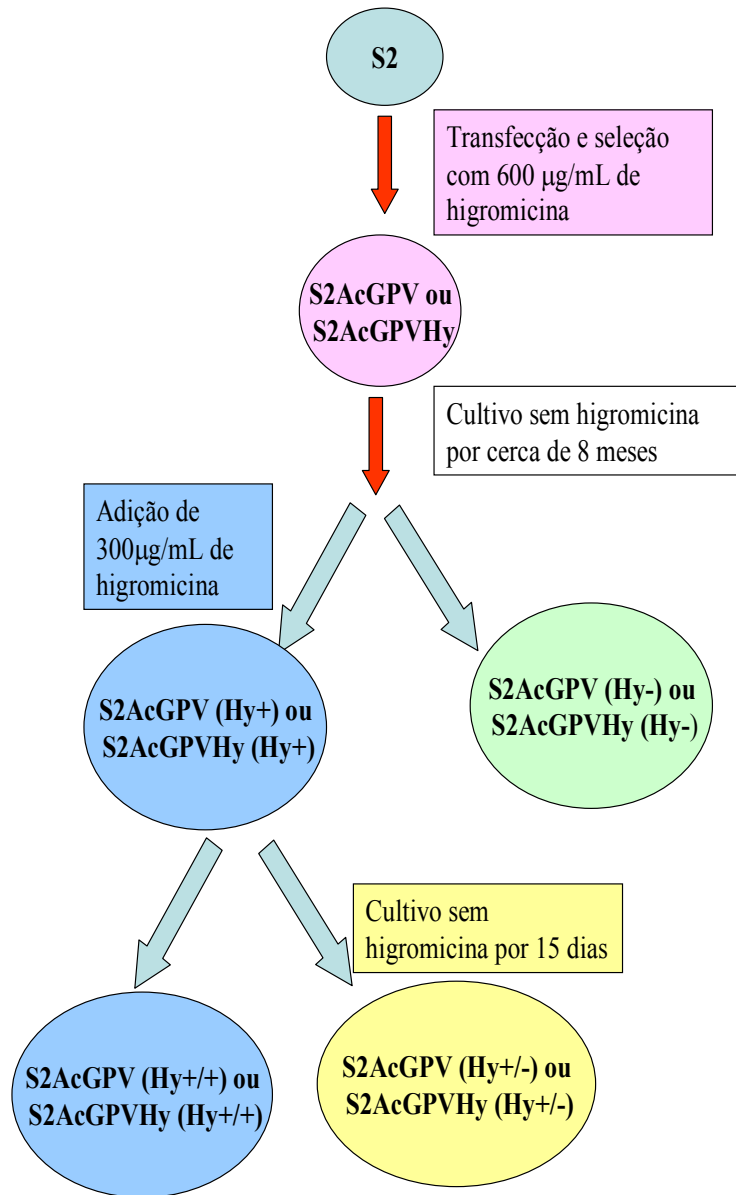


Figura 18: Esquema utilizado para verificar a ação a pressão seletiva na expressão de GPV em células S2AcGPVe S2AcGPVHy.

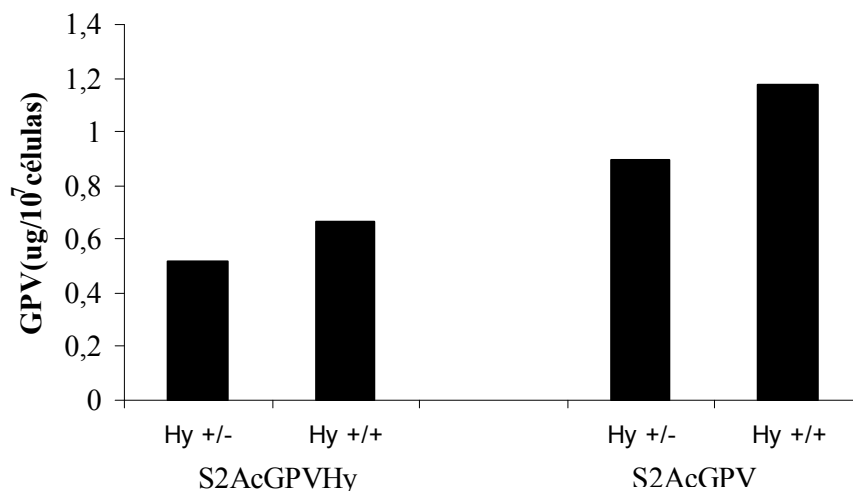


Figura 19: Expressão da proteína GPV em células S2AcGPVHy (4) e S2AcGPV (2) submetidas a um 2º tratamento com higromicina B +/- ou não +/-

Como observado na figura 19, as células mantidas com higromicina B S2AcGPV (Hy +/+) ou S2AcGPVHy (Hy +/+) mantinham a expressão de GPV em concentrações maiores que as tratadas com higromicina B, mas não mais mantidas com higromicina B S2AcGPV(Hy +/-) ou S2AcGPVHy (Hy +/-), sugerindo uma rápida perda da expressão após a retirada da pressão seletiva. É importante notar que nestes ensaios inversamente do observado até então, as células co-transfectadas obtiveram uma maior concentração da proteína GPV em relação às células transfectadas. Houve uma redução de expressão da proteína GPV na população S2AcGPVHy (4) e um aumento na população S2AcGPV (2). Este dado reforça o observado até então em relação à variabilidade das células S2 (dados não mostrados).

4.3 Comparação de Cinéticas entre células co-transfectadas S2AcGPV (2) e transfectadas S2AcGPVHy (4)

4.3.1 Comparação da cinética de crescimento de células S2 selvagens e recombinantes

Para verificarmos se haveria diferenças de crescimento celular entre células S2 selvagens e células recombinantes S2AcGPV (2) e S2AcGPVHy (4) realizamos uma cinética de crescimento celular.

As cinéticas celulares foram realizadas em frascos agitados em 20% do seu volume total sob agitação orbital em agitador com temperatura de 28 °C e agitação de 100 rpm. As culturas celulares foram iniciadas com 1×10^6 células/mL e o meio utilizado neste ensaio foi o meio SF 900II (Gibco). A cada 24 horas foram coletadas amostras para determinação da concentração celular. A concentração celular foi determinada por contagem de células viáveis em câmara de Neubauer após exclusão com azul trypan (Figura 20).

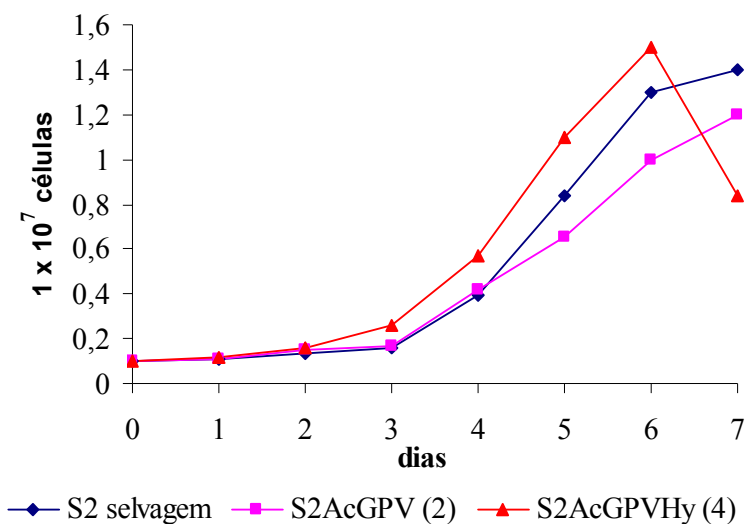


Figura 20: Cinética de crescimento de células S2 selvagens e células geneticamente modificadas em meio SF900 II.

Podemos observar que as células S2 e as células recombinantes até o 3º dia tiveram um período de adaptação e após o 3º dia começaram a crescer. As células S2 selvagens no 7º dia obtiveram $1,4 \times 10^7$ células, já as células S2AcGPV (2) obtiveram um crescimento celular no 7º dia de $1,2 \times 10^7$ células e as células S2AcGPVHy (4) tiveram um crescimento celular no 6º

dia de $1,5 \times 10^7$ células, mas a partir daí começaram a morrer. Porém, observamos que não houve diferenças de crescimento significativas entre as culturas celulares.

4.3.2 Cinéticas com diferentes meios de cultura

Com o objetivo de verificarmos se haveria diferenças de crescimento celular e de expressão de proteína GPV em células recombinantes S2AcGPV (2) e S2AcGPVHy (4), mantidas em meios de cultura diferentes, testamos a cinética de crescimento e expressão em células cultivadas em meio TC-100, SF 900 II e Insect Express que são meios de cultura específicos para células de inseto. As células S2AcGPV (2) e S2AcGPVHy (4) foram adaptadas previamente em cada um destes meios por 10 passagens e mantidas sob pressão seletiva com $300 \mu\text{g/mL}$ de higromicina B. A pressão seletiva foi somente retirada quando as células foram cultivadas em frascos agitados.

As cinéticas celulares foram realizadas em frascos agitados com os diferentes meios em 20% do volume total do frasco e em duplicatas, sob agitação orbital em agitador com temperatura de $28 \text{ }^\circ\text{C}$ e agitação de 100 rpm. As culturas celulares foram iniciadas com 5×10^5 células/mL. Foram coletadas as amostras nos dias 1, 3, 5, 7, 9 e 10 para a determinação da concentração celular e 10^6 células foram coletadas para a realização do teste ELISA. A concentração celular foi determinada por contagem de células viáveis em câmara de Neubauer após exclusão com azul trypan.

Na figura 21 podemos verificar que entre as células co-transfectadas S2AcGPV (2) adaptadas em meios diferentes não houveram diferenças estatísticas de crescimento celular. Ressalta-se que as células S2AcGPV (2) adaptadas em meio TC-100 não chegaram ao término do ensaio, pois no quinto dia de cultivo celular estavam 100% inviáveis. Já as células transfectadas S2AcGPVHy (4) no quinto dia obtiveram diferenças de crescimento entre células adaptadas ao meio SF 900 II e células adaptadas ao meio Insect Express, sendo que as células adaptadas ao meio SF 900 II tiveram um crescimento celular maior. Já as células adaptadas ao meio TC -100 tiveram um crescimento menor em relação às células adaptadas ao meio Insect Express. No décimo dia também houveram diferenças de crescimento celular entre as células transfectadas S2AcGPVHy (4) adaptadas ao meio SF 900 II, as quais cresceram mais do que as células adaptadas ao meio TC -100. As células adaptadas ao meio de cultura SF 900 II cresceram mais em relação às células adaptadas ao meio Insect Express e

as células adaptadas ao meio Insect Express cresceram mais em relação às células adaptadas ao meio TC-100.

Em média as células S2AcGPVHy (4) cultivadas em meio SF 900 II obtiveram $1,5 \times 10^7$ células /mL e em meio Insect Express em média obtiveram $1,1 \times 10^7$ células/mL. Já as células S2AcGPV (2) cultivadas em meio SF 900 II em média obtiveram um crescimento celular de $1,2 \times 10^7$ células/mL e em meio Insect Express obtiveram $2,6 \times 10^6$ células/mL.

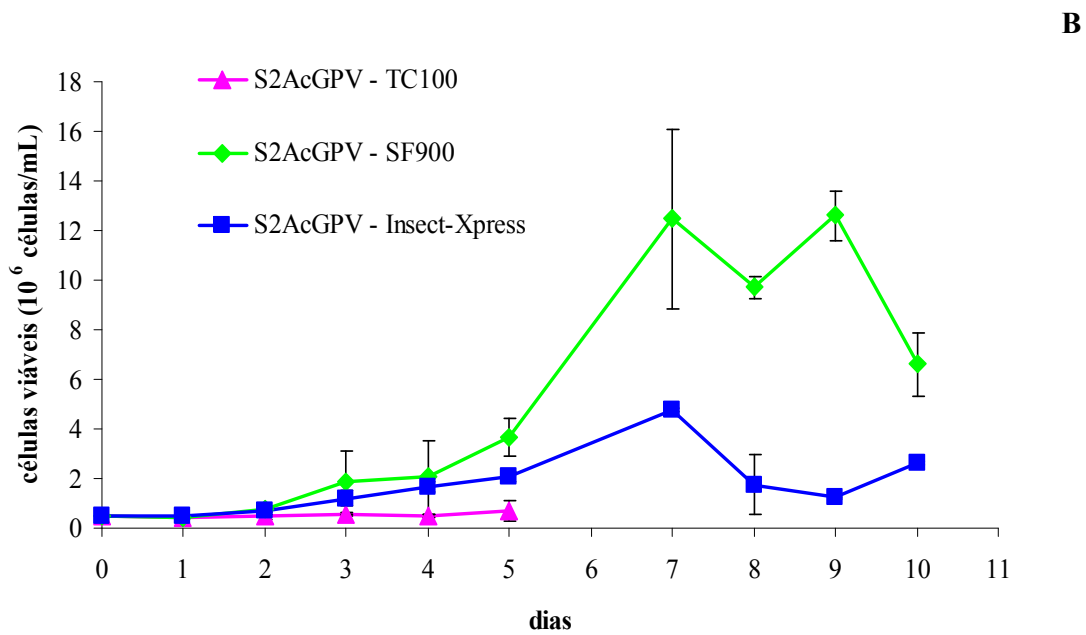
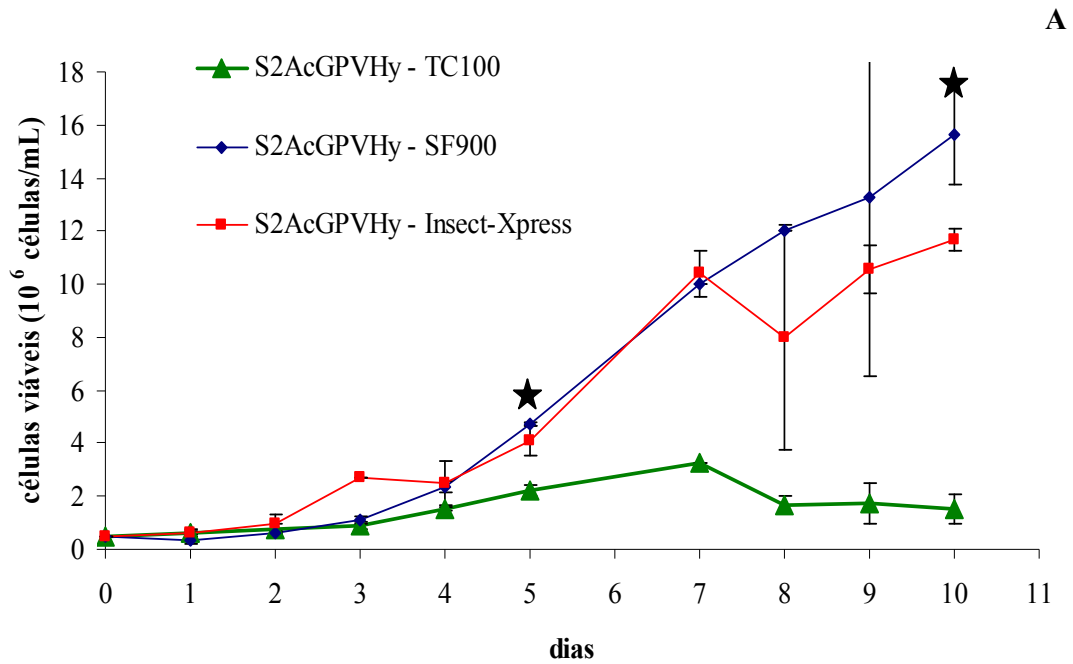


Figura 21: Cinética de crescimento de células **(A)** S2AcGPVHy (4) e **(B)** S2AcGPV (2) geneticamente modificadas e cultivadas em meios diferentes TC -100, SF 900 II e Insect Express. A marcação indica diferença estatística neste dia.

10^6 células de S2AcGPV (2) e S2AcGPVHy (4) adaptadas em meios diferentes foram coletadas nos dias 1, 3, 5, 7, 9 e 10 e lisadas com tampão de lise e o lisado celular foi analisado por teste ELISA para verificarmos a expressão da proteína GPV (Figura 22).

Não foram observadas diferenças estatísticas de expressão da proteína GPV entre as células S2AcGPVHy (4) adaptadas em meios diferentes. Já as células S2AcGPV(2) apresentaram diferenças de expressão da proteína GPV nos dias 1 e 3 onde as células cultivadas em SF 900 II obtiveram uma maior expressão da proteína em relação às células adaptadas em meio TC-100 e Insect Express. Verificamos também que as células S2AcGPV cresceram menos e produziram mais proteína por dia em relação às células S2AcGPVHy (que cresceram mais e produziram menos GPV por dia). No teor total de GPV encontramos nas células S2AcGPV (2) cultivadas em meio SF 900 II 33 μg de GPV, nas cultivadas em meio Insect Express 9,5 μg e em meio TC-100 0,15 μg de GPV. Nas células S2AcGPVHy (4) foram obtidos no cultivo em meio SF900 II 130 μg de GPV, 95 μg no cultivo em meio Insect Express e 0,28 μg no meio TC-100. Assim, podemos observar que no teor total de GPV expressa um valor maior de GPV foi observado nas células S2AcGPVHy (4). Estas diferenças podem estar relacionadas ao crescimento celular, porém, tanto o meio SF 900 II quanto o Insect Express podem ser considerados meios eficientes para o crescimento celular e para expressão de proteínas heterólogas.

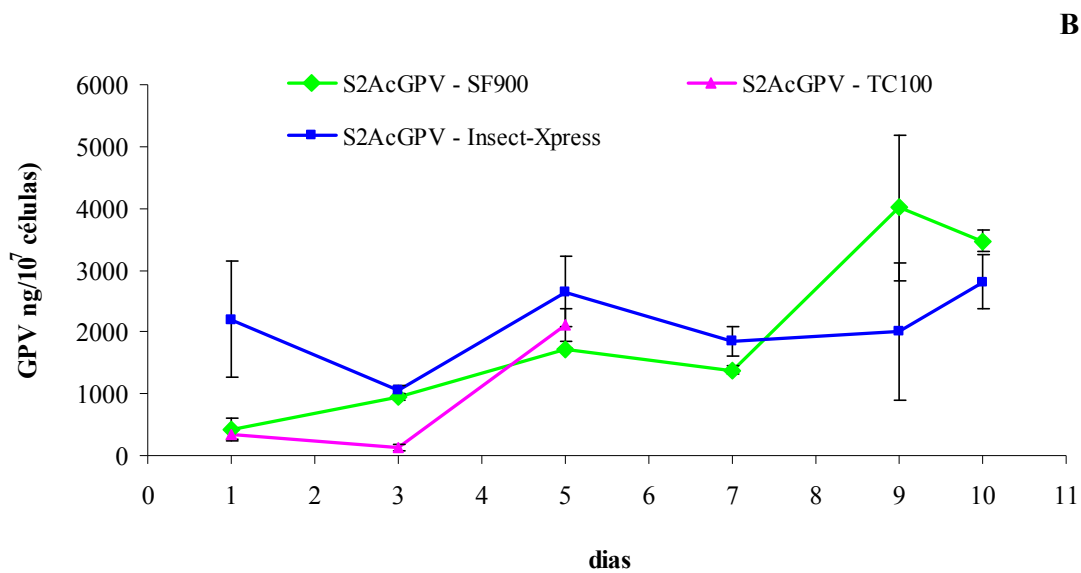
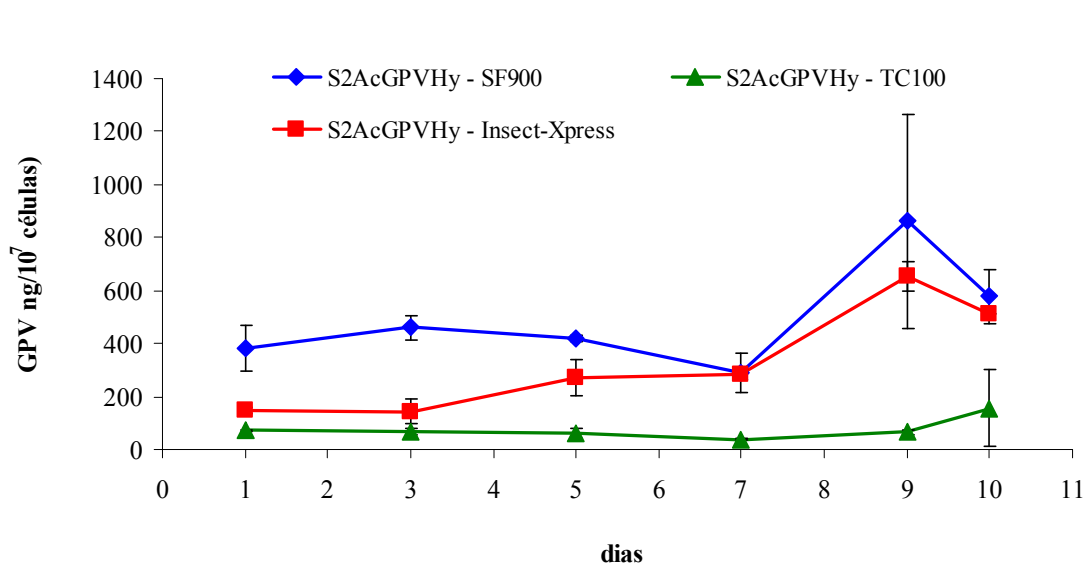


Figura 22: Expressão da proteína GPV em células (A) S2AcGPVHy (4) e (B) S2AcGPV (2) em meios de cultura diferentes. A marcação indica diferenças estatísticas nestes dias.

4.3.3 Indução da expressão da proteína G do vírus rábico em células S2AcGPV (2) e S2AcGPVHy (4) com Butirato de sódio (NaBu)

Na tentativa de aumentarmos a expressão da GPV em nossas culturas celulares, realizamos uma cinética de crescimento celular e expressão de GPV com adição de butirato de sódio. Este composto atua na acetilação das histonas, inibindo a sua desacetilação, dessa forma, descondensando o DNA. Esta descondensação do DNA levaria a um aumento generalizado da expressão gênica, devido ao maior acesso dos fatores de transcrição às fitas do DNA (DORNER et al., 1989; CHEN et al., 2002; LI e LI, 2006; ZHAO et al., 2006; PING et al., 2006; SONG et al., 2006; SANTOS et al., 2007).

Neste ensaio utilizamos frascos agitados com volume de meio de 20% do volume total do frasco (em duplicatas), sob agitação orbital em agitador com temperatura de 28 °C e agitação de 100 rpm. As culturas celulares foram iniciadas com 5×10^5 células/mL. Foram coletadas amostras de 10^6 células nos dias 1, 3, 5, 7 e 10 para a determinação da concentração celular e realização do teste ELISA. A concentração celular foi determinada por contagem de células viáveis em câmara de Neubauer após exclusão com azul trypan (Figura 23). Neste ensaio foi adicionado 5 mM de butirato de sódio no 3º dia de cultivo celular.

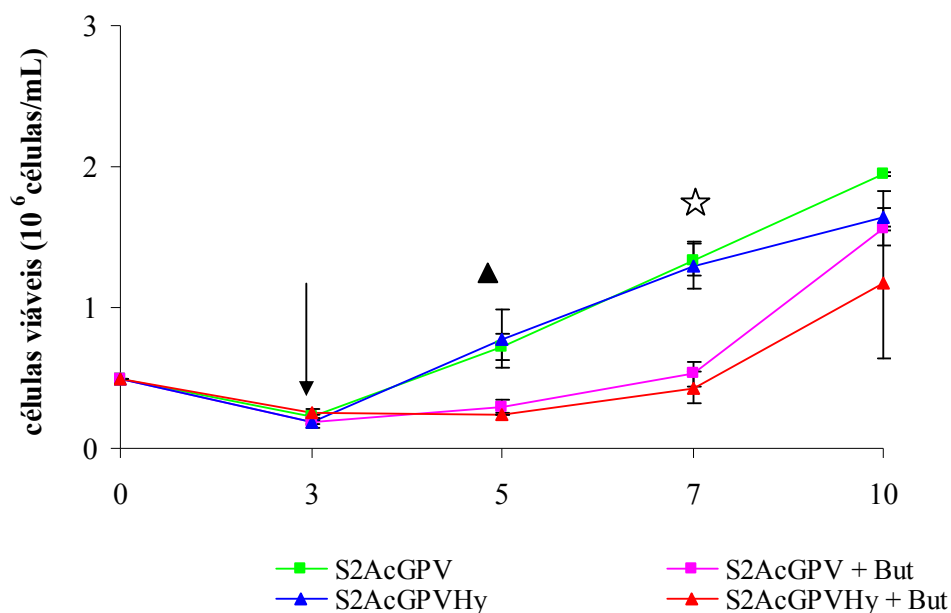


Figura 23: Cinética celular de células S2AcGPV (2) e S2AcGPVHy (4) e meio SF 900 II com adição de 5mM butirato de sódio no 3º dia de cultivo. A seta indica adição de butirato no 3º dia. As marcações indicam diferenças estatísticas. + But - indica com butirato de sódio.

Observamos neste ensaio um crescimento menor das células cultivadas com butirato em comparação com as células não cultivadas com butirato de sódio. Também encontramos no dia 5 diferença estatística de crescimento celular entre as células S2AcGPV (2) em relação às células S2AcGPVHy (4) + But. Já no 7º dia encontramos diferenças de crescimento celular entre as células S2AcGPVHy (4) em relação as S2AcGPV (2) + But e S2AcGPVHy (4) + But.

No 3º dia de cultivo após adição de butirato de sódio as células S2AcGPV (2)+ But e S2AcGPVHy (4)+ But apresentaram uma redução de crescimento celular, provavelmente devido a ação do butirato de sódio.

A expressão da proteína GPV também foi analisada nestes ensaios. Para isto, 10⁶ células foram lisadas e o lisado celular utilizado para quantificação da GPV através do teste ELISA. A figura 24 mostra os resultados obtidos.

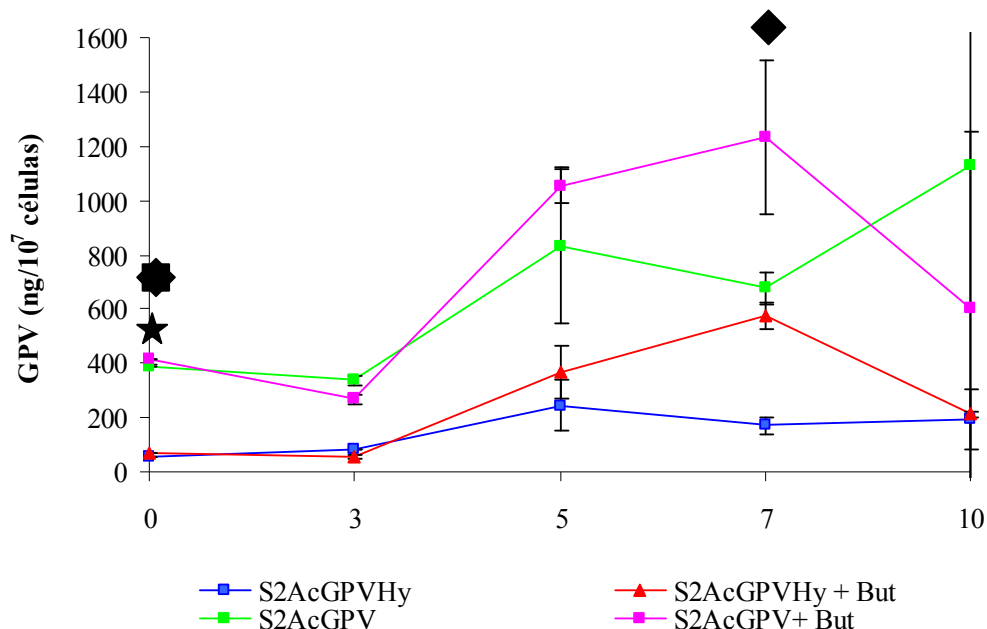


Figura 24: Expressão da proteína GPV em células S2AcGPVHy (4) e S2AcGPV (2) em meio Sf 900 II com adição de 5 mM butirato de sódio na cultura. A marcação indica diferenças estatísticas nestes dias. + But. - indica com butirato de sódio

Em relação à expressão da glicoproteína G do vírus rábico verificamos que houve diferenças estatísticas no dia 0 entre as células S2AcGPV (2) que expressaram mais GPV em relação às células S2AcGPVHy (4) e S2AcGPVHy (4) +But e as células S2AcGPV + But que expressaram mais proteína em relação às células S2AcGPVHy (4) e S2AcGPVHy (4)+ But. Também houveram diferenças estatísticas no dia 7 entre as células S2AcGPV (2) que expressaram mais proteína em relação as células S2AcGPVHy (4) +But.

Este ensaio sugere que em nossas condições o butirato de sódio não interfere na expressão da GPV, possivelmente pelo gene GPV encontrar-se inserido em regiões ativas do genoma destas células.

4.4 Caracterização da GPV expressa em células S2AcGPV(2) e S2AcGPVHy (4)

Para tentarmos caracterizar a GPV recombinante expressa em células S2, realizamos ensaios imunoenzimáticos também utilizando a técnica de “Western Blot”. Foram necessários para isso vários experimentos para a padronização da técnica. Verificamos pela técnica de “Dot Blot”, por exemplo, que as amostras fervidas a 100 °C não eram marcadas com o anticorpo policlonal e as não fervidas eram marcadas. A partir daí resolvemos não mais ferver as amostras e pudemos então sugerir que a GPV estava degradando-se em altas temperaturas.

Assim tivemos que utilizar sistemas de resfriamento para não degradar as proteínas produzidas pelas células e principalmente a nossa proteína de interesse (GPV).

Passamos a lisar as células S2AcGPVHy (4) e S2AcGPV (2) com tampão de lise e inibidores de proteases. Além disso, as amostras lisadas foram utilizadas no mesmo dia, para que não houvesse com o congelamento deste lisado a degradação da proteína de interesse. Este lisado celular foi utilizado tanto para a técnica de “Dot Blot” como de “Western Blot”.

A figura 25 apresenta os resultados encontrados em “Dot Blot”. É possível notar que há marcação com peroxidase apenas no controle positivo (vírus rábico) e nas células recombinantes, confirmando a expressão da GPV nestas células. Este dado sugere também que a antigenicidade da proteína recombinante é mantida. A partir do momento que houve o reconhecimento do anticorpo pela nossa proteína de interesse resolvemos realizar então a migração das amostras do lisado celular em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% (Figura 26), como já descrito em material e métodos. Foram realizadas várias migrações em géis de proteína que foram corados tanto com Coomassie Blue como com coloração de prata. Após a corrida eletroforética, as amostras foram também transferidas pelo para a membrana de nitrocelulose para a realização do “Western Blot”.

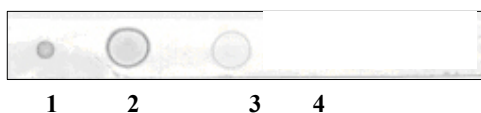


Figura 25: “Dot Blot” de lisado celular : 1-Vírus 2- lisado celular S2AcGPVHy (2) 3- lisado celular S2AcGPV (2) 4- lisado celular S2 selvagem .

A figura 26 apresenta o padrão de migração eletroforética encontrado para as proteínas de amostras de lisado. Não é possível perceber nenhuma proteína (banda) diferente entre as células S2 selvagens e as recombinantes. Porém, quando há tratamento com anticorpo anti-GPV policlonal (Figura 27), a marcação pode ser percebida no peso molecular esperado, indicando mais uma vez a expressão da GPV em nosso sistema. Assim, através das várias técnicas utilizadas, podemos constatar a expressão da GPV em células S2 recombinantes.

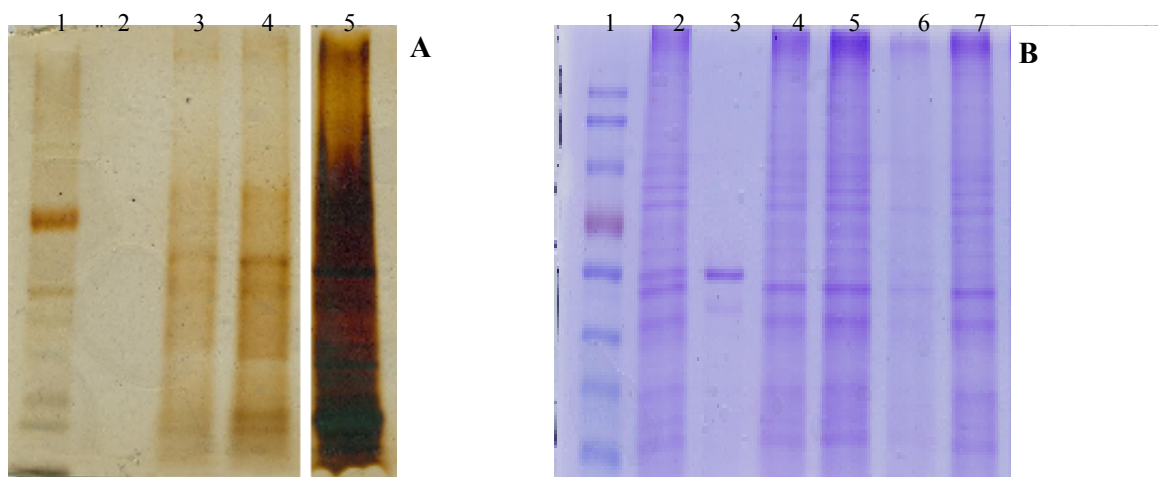


Figura 26: Padrão de migração eletroforética em géis de poliacrilamida 12,5%. **Gel (A)** Coloração prata **(B):** coloração Coomassie Blue **(A):** 1- PM 2- vírus rábico 3- lisado celular S2ACGPVHy 4- lisado celular S2ACGPV 5- lisado celular S2 selvagem **(B):** 1- PM 2- S2 selvagem 3- vírus rábico 4- lisado celular S2ACGPVHy (2) – lisado celular S2ACGPVHy (2) 6-lisado celular S2AcGPV (2) 7- lisado celular S2AcGPV (2).

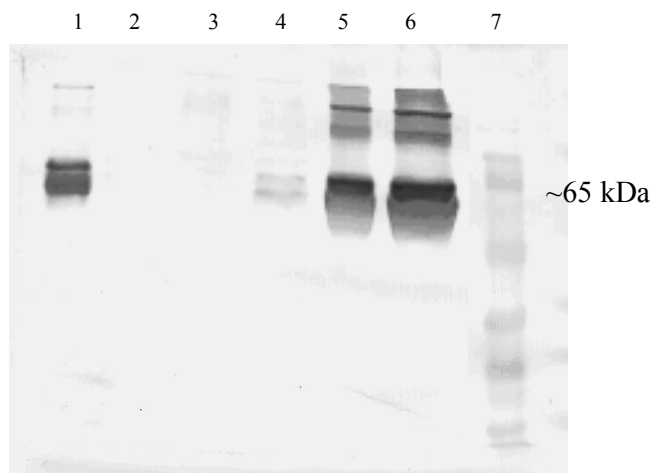


Figura 27: Ensaio imunoenzimático utilizando a técnica de “Western Blot”. 1- vírus rábico 2- lisado celular S2 selvagem 3 - lisado celular S2AcGPV (2) 4- lisado celular S2AcGPVHy (2) 5- lisado celular S2AcGPV (2) células cultivadas em meio mínimo TC-100 6- lisado celular S2AcGPVHy (2) células cultivadas em meio mínimo TC-100 7- peso molecular.

Para melhor compreensão a respeito da possível degradação da proteína por aquecimento (observada em procedimentos de “Dot Blot”) e por sugestão dos pesquisadores participantes da banca de qualificação deste trabalho, realizamos um “Western Blot” a fim de

verificar se haveria a degradação da GPV após ferver a amostra a 100 °C por 3 minutos (Figura 28).

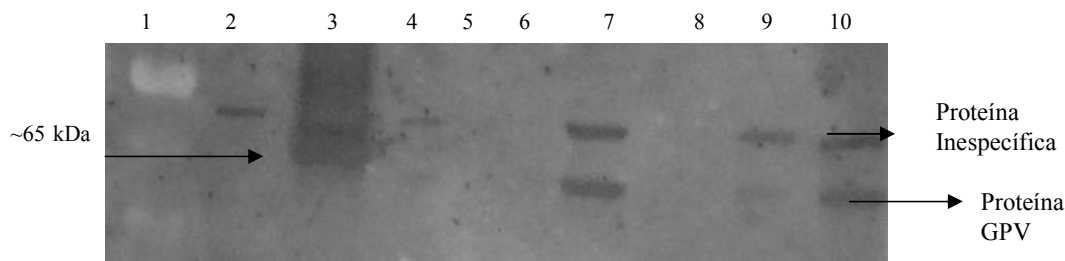


Figura 28: Ensaio imunoenzimático utilizando a técnica de “Western Blot”. 1- Peso Molecular 2 – lisado celular S2 selvagem 3 - Vírus rábico 4 – lisado celular S2AcGPVHy (4) 5- S2AcGPVHy (4) restos celulares - lisado celular S2AcGPVHy (4) fervida 7- lisado celular S2AcGPV (2) 8- S2AcGPV (2) restos celulares 9 – lisado celular S2AcGPV (2) fervida. 10 – lisado celular S2AcGPV(2). Ressalta-se que as amostras 7 e 10 são as mesmas amostras (duplicata).

Neste “Western Blot” realizamos uma adsorção prévia de 25% das células S2 selvagens, ou seja, lisamos com tampão de lise 10^6 células e o lisado celular, diluímos o anticorpo policlonal na proporção de 1:200 e incubamos a membrana por 1 hora a temperatura ambiente. Realizamos esta adsorção prévia para eliminarmos futuras marcações inespecíficas.

Como podemos observar na figura 28 devemos aumentar a porcentagem de adsorção prévia das células S2 para 50% para que assim, possamos diminuir ou desaparecer estas marcações inespecíficas.

As amostras 6 e 9 foram fervidas a 100 °C por 3 minutos e podemos verificar que houve um reconhecimento do anticorpo policlonal, demonstrando que fervendo a 100 °C por 3 minutos não houve a degradação da proteína. Possivelmente a degradação da proteína não ocorra na fervura a 100 °C por 3 minutos e sim durante o sistema de transferência do gel de proteína para a membrana, devido ao aumento excessivo de temperatura do sistema de transferência. Para resolvermos este problema utilizamos uma voltagem de 10 V por uma hora e não mais 20 V por 16 horas como citado no material e métodos. Para verificarmos se haveriam proteínas ancoradas nos restos celulares (débrix), resolvemos lisá-los com Uréia a 9 M. Na figura 28 podemos verificar que as amostras dos restos celulares não apresentaram marcações, sugerindo a ausência de GPV no “débrix” celular.

5 CONCLUSÕES

Este trabalho apresenta a construção de vetores de expressão para a proteína G do vírus rábico em células de drosófilas. A partir desses vetores foi possível obter populações celulares recombinantes capazes de expressar GPV. A proteína recombinante foi analisada por diferentes métodos, como ELISA, citometria de fluxo, microscopia confocal, “Dot Blot” e “Western Blot”. Os resultados dos ensaios realizados durante este trabalho sugerem as seguintes conclusões:

As células S2 constituem um sistema eficiente para a expressão de proteínas heterólogas. Tanto o agente de transfecção cellfectina como a lipofectamina foram eficientes para a introdução do DNA em células de inseto. Devido a casualidade da introdução e integração do vetor no genoma celular, populações muito heterogêneas são geralmente obtidas, procedimentos de clonagem com a obtenção de subpopulações recombinantes podem otimizar a expressão da proteína heteróloga neste sistema.

Além disso, os ensaios com análise em microscopia confocal demonstraram não ser esta a melhor técnica para a seleção de subpopulações celulares que expressem de forma mais eficiente a GPV, sendo ideal para isso o ensaio quantitativo usando o teste ELISA ou imunofluorescência em citometria de fluxo.

Os nossos resultados, porém, não nos permitem concluir qual sistema de obtenção das populações celulares, se é por transfecção ou co-transfecção seria o melhor, embora fique claro que mesmo com tamanho maior do vetor pAcGPVHy, este é introduzido eficientemente nas células S2, sendo que esta possível desvantagem é desprezível se levarmos em conta a garantia de estarmos selecionando com higromicina B, células portadoras do vetor contendo o gene de seleção e expressão juntos.

Não observamos em estudo cinético diferenças significativas de crescimento celular entre S2 selvagens, co-transfectadas e transfectadas, mesmo sendo as duas últimas, células geneticamente modificadas. Também verificamos que os meios SF 900 II e Insect Express são meios de cultura eficientes para serem utilizados nos cultivo celular, favorecendo o aumento da densidade celular. Tanto o “Dot Blot”, quanto o “Western Blot” são técnicas eficientes para a detecção da proteína GPV e foram padronizados neste trabalho nas condições do nosso laboratório.

Neste trabalho podemos inferir ainda que a GPV recombinante expressa em células de drosófilas mantém suas características antigênicas, uma vez que os ensaios imunoenzimáticos

e de imunofluorescência com anticorpos monoclonais anti-GPV foram positivos nas amostras de células recombinantes lisadas.

No sentido de otimizar a expressão da GPV, alguns procedimentos foram realizados. Podemos sugerir, por exemplo, que a manutenção da higromicina B nos cultivos celulares permite o aumento da expressão de GPV nas células recombinantes. A padronização de um meio de cultura adequado também possibilita um aumento de expressão.

Assim, este trabalho descreveu a obtenção de células de drosófilas que expressam a proteína G do vírus rábico, além da padronização de diferentes imunoenaios capazes de detectar a proteína GPV expressa nestas células. Também como parte deste estudo, algumas alternativas foram analisadas no sentido de otimizar a expressão da proteína heteróloga nas nossas culturas celulares. Ainda assim, testes de antigenicidade e imunogenicidade deverão ser realizados, a fim de caracterizar as propriedades da GPV expressa nas células de drosófilas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

BAHLOUD, C.; JACOB, Y.; TORDO, N.; PIERRE, P. DNA-based immunization for exploring the enlargement of immunological cross-reactivity against the lyssaviruses. **Vaccine**, v.16, p. 417-425, 1998.

BENTING, J.; LECAT, S.; ZACCHETTI, D.; SIMONS, K. Protein expression in *Drosophila* Schneider cells. **Anal. Biochim.**, v. 278, p. 59-68, 2000.

BRIGHTY, D.W.; ROSENBERG, M.; CHEN, I. S. Y.; IVEY, H. M. Envelope proteins from isolates of human immunodeficiency virus type-I that are refractory to neutralization by soluble CD4 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88, p. 7805, 1991.

BUCKINGHAM, S. D.; MATSUDA, K.; HOISE, A. M.; BAYLIS, H. A.; SQUIRE, M. D.; LANSDALL, S. J.; MILLAR, N. S.; SATELLE, D. B. Wild-type and insecticide resistant homo-oligomeric GABA receptors of *Drosophila melanogaster* stably expressed in a *Drosophila* cell line. **Neuropharmacology**, v. 35, p. 1393-1401, 1996.

CALOS, M.P.; LEBKOWSKI, J.S.; BOTCHAN, M.R. High mutation frequency in DNA transfected into mammalian cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 80, p. 3015–3019, 1983.

CHANG, K.H.; YANG, J.M.; CHUN, H.O.K.; CHUNG, I.S. Enhance activity of recombinant β -secretase from *Drosophila melanogaster* S2 cells transformed with cDNAs encoding human β 1, 4-galactosyltransferase and Gal β 1,4-GlcNac α 2,6-sialyltransferase **J. Biotechnol.**, v.116, p. 359-367, 2005.

CCAUFES - Centro de ciência agrária da universidade federal do Espírito Santo. Disponível em: <<http://www.cca.ufes.br>>. Acesso em: 28 mai. 2007.

CHERBAS, L.; MOSS, R.; CHERBAS, P. Transformation techniques for *Drosophila* cell lines. **Meth. Cell. Biol.**, v. 44, p. 161-179, 1994.

CULP, J. S.; JOHANSEN, H.; HELLMIG, B.; BECK, J.; MATTHEWS, T. J.; DELERS, A.; ROSENBERG, M. Regulated expression allows high level production and secretion of HIV-1 gp 120 envelope glycoprotein in *Drosophila* Schneider cells. **Biotechnology**, v. 9, p.173-178,1991.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

DEBRÉ, R.; CELLERS, J. The Evaluation and Management of Human Viral Infections. **Clin. Virol.**, p. 138-154. 1970.

DELAGNEAU, J.F.; PERRIN, P.; ATANASIU, P. Structure Of The Rabies Virus: Spatial Relationships Of Ibe Proteins G, M1, M2 And N. **Ann. Inst. Pasteur Virol.**, v. 132e, p. 473-493, 1981.

DELM, L.; WOLF, H.; WAGNER, R. Hight level expression of hepatitis B virus superface antigen in stably transfected Drosophila Schneider-2 cells. **J. Virol. Methods**, v.79, p. 191-203, 1999.

GUPTA, K.P.; SHARMA, S.; WALUNJ, S.S.; CHATURVEDI, K.V.; RAUT, A.A.; PATIAL, S.; RAI, A.; PANDEY, D.K.; SAINI, M. Immunogenic and antigenic properties of recombinant soluble glycoprotein of rabies virus. **Vet. Microbiol.**, v. 108, p. 207-214, 2005.

HANAHAN, D. Studies on transformation of E. coli with plasmids. **J. Mol. Biol.**, v.166, p. 557-580, 1983.

IVEY, H. M. Recombinant gene expression in cultured Drosophila melanogaster cells. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.2, p.704-707, 1991.

JORGE, S. A. C.; HERA, C.; SPINA, A. M. M.; PINHO, J. R. R.; MENCK, C. F. M. Transient expression of Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) gene in monkey cells by a SV40-based virus vector. **Biotechnol. Lett.**, v.17, p.1285-1290, 1995.

JORGE, S. A. C.; HERA, C.; SPINA, A. M. M.; MOREIRA, R. C.; PINHO, J. R. R.; MENCK, C. F. M. Expression Of The Hepatitis B virus surface antigen in mammalian cells using an Epstein-Barr virus derived vector. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 46, p. 533-537, 1996.

JORGE, S.A.C.; SANTOS, A.S.; SPINA, A. ; PEREIRA, C.A. Expression of the Hepatitis B Virus Surface Antigen in Drosophila S2 cells. **Cytechnonology**, v. 57 p. 51-59, 2008.

KAZANJI, M.; BOMFORD, R.; BESSEREAU, J. L.; SCHULZ, T. Expression and immunogenicity in rats of recombinant adenovirus 5 DNA plasmids and vaccinia virus containing the HTLV-I env gene. **Int. J. Cancer**, v. 71, p. 300-307, 1997.

KLEPFER, R. S.; DEBOUCK, C.; UFFELMAN, J.; JACOBS, P.; BOLLEN, A.; JONES, V. E. Characterization of rabie glycoprotein expressed in yeast. **Arch. Virol.**, v. 128, p. 269-286, 1993.

KIENY, M. P.; LATHE, R.; DRILLIEN, R.; SPEHNER, D.; SKORY, S.; SCHMITT, D.; WIKTOR, T.; KOPROWSKI, H.; LECOCQ, J. P. Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccine virus. **Nature**, v. 312, p.163, 1984.

LATHE, R.; KIENY, M. P.; SCHIMITT, D.; CURTIS, P.; LECOCQ, J. P. M13 bacteriophage vector for expression of foreign proteins in Escherichia coli: The rabies glycoprotein. **J. Mol. Appl. Gen.**, v. 2, p. 331, 1984.

LEE, J. M.; PARK, J. H.; PARK, J. O.; CHANG, K. H.; CHUNG, I. S. Expression of recombinant erythropoietin in stably transformed Drosophila melanogaster S2 cells. **Vitro Cell. Dev. Biol.**, v. 3, p. 348-350, 2000.

LI, B.; TISING, S.; KOSAKA, A. H.; NGUYEN, B.; OSEN, E. G.; BACH, C.; CHAN, H.; BARNETT, J. Expression of Human Dopamine β Hydroxylase in Drosophila Schneider 2 Cells. **Biochem. J.**, v. 313, p.57-64, 1996.

LECOCQ, J. P.; KIENY, M. P.; LEMONINE, Y.; DRILLIEN, R.; WILKTOR, T. J.; KOPROWSKI, H.; LATHE, R. New rabies vaccines: Recombinant DNA approaches. In: WORLD'S DEBT TO PASTEUR: PROCEEDINGS OF A CENTENNIAL SYMPOSIUM COMMEMORATING THE FIRST RABIES VACCINATION, HELD AT THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA, January, 17-18, 1985, New York. **Proceedings...** New York: Liss, 1985. p. 259-271.

MCCARROLL, L.; KING, L. A. Stable insect cell cultures for recombinant protein production. **Cur. Opin. Biotechol.**, v. 8, p. 590-594, 1997.

MOCHIZUKIK, H.; SCHUWARTZ, J.P.; TANAKA, K.; BRADY, R.O.; REISER, J. High-titer human immunodeficiency virus type I based vector systems for gene delivery into nondividing cells. **J.Virol.**, v. 72, p. 8873-8883, 1998.

MORIMOTO, K.; KAWAI, A.; MIFUNE, K. Comparison of rabies virus G proteins produced by cDNA-transfected animal cells that display either inducible or constitutive expression of the gene. **J. Gen.Virol.**, v. 73, p. 335-345, 1992.

NILSEN, S. L.; CASTELLINO, F. J. Expression of human plasminogen in Drosophila Schneider S2 cells. **Protein Expr. Purif.**, v. 16, p. 136-143, 1999.

PERRIN, P.; THIBODEAU, L.; SUREAU, P. Rabies Immunosomes (sub-unit. vaccine)structure and immunogenicity. Pre-and post-exposure protection studies.**Vaccine**, v.3, p.325-332, 1985.

- PFEIFER, T. A.; HEGEDUS, D. D.; GRIGLIATTI, T. A.; THEILMANN, D. A. Baculovirus immediate-early promoter-mediated expression of the Zeocin resistance gene for use as a dominant selectable marker in dipteran and lepidopteran insect cell lines. **Gene**, v. 188, p. 183-190, 1997.
- PREHAUD, C.; COULON, P.; DIALLO, A.; MARTINET E. C.; FLAMAND, A. Characterization of a new temperature sensitive and avirulent mutant of rabies virus. **J. Gen. Virol.**, v. 70, p.133-143,1989.
- RAO, R. N.; ALLEN, J. N.; J, N. HOBBS; JR, W. E. ALBORN; H. A. KIRST; J. W. Genetic and enzymatic basis of hygromycin B resistance in Escherichia coli. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 24 p. 689-695, 1983.
- SANTOS, M.G.; JORGE, S.A.C.; BRILLET, K.; RIBEIRO, O. M.; YOKOMIZO, A.; PEREIRA, C. A. Improving Heterologous Protein Expression In Stably Transfected Drosophila S2 Cells As Assessed By Egfp Expression. **Cytotechnology**, v. 54, p.15-24, 2007.
- SCHATZMAYR, H. G. Emerging and reemerging viral diseases. **Cad. Saúde Pública**, v. 17, p. 209-213, 2001.
- SCHNEIDER, I. Cell Lines Derived from Late Embryonic Stages of Drosophila melanogaster. **J. Embryol. Exp. Morphol.**, v. 27 p. 363-365, 1972.
- SHOTKOSKI, F.; ZHANG, H. G.; JACKSON, M. B.; FRENCH, C. R. H. Stable expression of insect GABA receptors in insect cell lines: Promoters for efficient expression of Drosophila and mosquito Rdl GABA receptors in stably transformed mosquito cell lines. **FEBS Lett.**, v. 30, p. 257-262, 1996.
- SUMMERS, M. D.; SMITH, G. E. **A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedure**. College Station, US, 1987. p.1-56. (Texas Agricultural Experiment Station Bulletin, 1555).
- TARTAGLIA, J.; PAOLETTI, E. Live recombinant viral vaccines. In: VAN REG, M. H. V.; NEURATH, A. R. (Ed.). **Immunochemistry of Viruses II: The Basis for Serodiagnosis and Vaccines**. Amsterdam: Elsevier Science, 1990. p.125-151.
- TUCHIYA, K.; MATSURA, Y.; KAWAI, A.; ISHIHAMA, A.;UEDA, S. Characterization of rabies virus glycoprotein expressed by recombinant baculovirus. **Virus Res.**, v. 25, p.1-13, 1992.
- VALLE, M. A.; KESTER, M. B.; BURNS, A. L.; MARX, S. J.; SPIEGEL, A. M.; SHILOACH, J. Production and purification of a human menin from Drosophila melanogaster S2 cells using stirred tank reactor. **Cytotechnology**, v. 35, p.127-135, 2001.

YOKOMIZO, A. Y.; JORGE, S. A. C.; ASTRAY, R. M.; FERNANDES, I.; RIBEIRO, O. G.; HORTON, D. S. P. Q.; TONSO, A.; TORDO, N.; PEREIRA, C. A.. Rabies virus glycoprotein expression in Drosophila S2 cells. I. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line. **Biotechol. J.**, v. 2, Issue 1, p.102 -109, 2007.

ZHANG, F.Q.; MA, W.; ZHANG, LI.; AASA,C. M.; ZHANG, H.. Expression of particulate-form of Japanese encephalitis virus envelope protein in a stably transfected Drosophila cell line.**Virol. J.**, v.4, p.17, 2007.

ANEXO A

Expression of the Hepatitis B Virus Surface Antigen in Drosophila S2 cells

JORGE, S. A.C.1; SANTOS, A. S.1; SPINA, A. 2; PEREIRA, C. A.1.

1 Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil, 2 Laboratório.
Virologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil.

Address for correspondence: Av. Vital Brazil, 1500. Laboratório de Imunologia Viral
CEP 05503-900- Brazil, São Paulo, SP- Phone: 55.11.3726-7222 ext. 2105
Fax: 55.11.3726-1505, email: sacjorge@butantan.gov.br. **Cytotechnology**, v. 57 p. 51-59,
2008.

ANEXO B

Characterization of growth and metabolism of *Drosophila melanogaster* cells transfected with the rabies-virus glycoprotein gene

SWIECH, K., SILVA, C.; SILVA,S.; MABEL ,A. K.; SANTOS, A.S.; ASTRAY, R.;
PEREIRA,C. A.; SUAZO, C,A.T.

Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, Via Washington Luis, Km 235, Cep:13565-905 São Carlos-SP Brazil, and laboratório de Imunologia Viral, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500 CEP 05503-900, São Paulo, Brazil . **Biotech. Appl. Biochem.** p. 41–49, 2008.

ANEXO C

Curva Padrão do Teste Elisa - Proteína GPV

