

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**



**ÊNIO JOSÉ BASSI**

**EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO  
IMUNOLÓGICA DE UM FRAGMENTO RECOMBINANTE  
(RESÍDUOS 179-281) DA PROTEÍNA G DO VÍRUS RÁBICO**

**FLORIANÓPOLIS  
2008**

**ÊNIO JOSÉ BASSI**

**EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO  
IMUNOLÓGICA DE UM FRAGMENTO RECOMBINANTE  
(RESÍDUOS 179-281) DA PROTEÍNA G DO VÍRUS RÁBICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia. Área de Concentração: Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti

**FLORIANÓPOLIS**

**2008**

BASSI, Ênio José

Expressão, purificação e caracterização imunológica de um fragmento recombinante (resíduos 179-281) da proteína G do vírus rábico/ Ênio José Bassi. Florianópolis, 2008. 120 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2008.

Orientador: Carlos Roberto Zanetti

1. Vírus rábico – 2. Proteína G – 3. Expressão e purificação de proteínas – 4. Propriedades imunológicas – 5. Epítomos lineares

*Dedico este trabalho a minha mãe, Zilma  
Ornelas Bassi, ao meu irmão Denis Bassi  
e a minha namorada Letícia Anderson*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo dom da vida e por iluminar cada passo da minha caminhada em busca da realização dos meus sonhos.

Ao meu pai, Jayme Bassi (in memoriam), pela proteção que me concede todos os dias e por ter me mostrado a importância da honestidade, simplicidade e perseverança.

À minha mãe, Zilma Ornelas Bassi, pelo seu amor incondicional, por acreditar e estimular os meus objetivos, ouvir minhas frustrações, partilhar minhas alegrias e rezar pela minha proteção.

Ao amor da minha vida, minha namorada Letícia Anderson, maior motivo de minha felicidade, estando sempre ao meu lado em todos os momentos, pelo amor, carinho, atenção e cumplicidade.

Ao meu querido irmão, Denis Bassi, pelo seu amor, orações e pensamento positivo, torcendo sempre pela minha felicidade.

Ao professor e amigo, Carlos Roberto Zanetti, pela acolhida como seu aluno, pela brilhante orientação, tanto intelectual como pessoal e por seus ensinamentos que me fizeram compreender melhor o verdadeiro significado e valorização da vida.

Ao professor Hernán Terenzi, pela acolhida e oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

Ao pesquisador e amigo Javier Vernal, fundamental para fase inicial deste trabalho, pela acolhida e pelos seus ensinamentos, tirando minhas dúvidas sempre quando necessário.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Aplicada (LIA), pelos momentos agradáveis que passamos juntos no desenvolvimento deste trabalho.

À amiga Camila Zanluca, por participar ativamente do desenvolvimento desse trabalho, me auxiliando na realização dos experimentos e compartilhando seus conhecimentos.

Aos amigos do Centro de Biologia Molecular Estrutural, pelo inesquecível convívio durante os meses que passamos juntos, pelo auxílio e ensinamentos prestados e também pelos momentos de alegria e descontração.

Aos amigos, Álvaro Celmer e Jefferson Rotta, pelo companheirismo e amizade nesse tempo que moramos juntos.

Ao meu tio Luiz Carlos Ornelas, que sempre esteve disposto a me ajudar, por participar da busca incessante pela realização de meus sonhos.

Ao professor Aginaldo Roberto Pinto, por disponibilizar o plasmídeo pSG5r.gpT434, fundamental para o início deste trabalho e pela disponibilidade em fazer suas correções e sugestões participando da banca examinadora.

Aos professores Bóris Juan Carlos Ugarte Stambuk, Cláudia Maria Oliveira Simões e Cláudia Nunes Duarte dos Santos pela disponibilidade em fazer suas correções e sugestões, participando da banca examinadora.

A todos os professores das disciplinas que cursei, pelos ensinamentos e paciência, por estimularem cada vez mais minha curiosidade científica.

Aos colegas de turma, pelos momentos de alegria, pelo inesquecível convívio, durante esses dois anos que podemos passar juntos.

A todos do LVA e Laboratório de Protozoologia, pela disponibilidade e auxílio sempre que necessário possibilitando a realização deste trabalho.

À Patrícia Hermes Stoco e ao professor Edmundo Carlos Grisard, pela realização do sequenciamento de DNA.

À Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, por disponibilizar todo o suporte técnico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo financiamento da minha bolsa de mestrado, sem a qual não seria possível a realização dessa etapa importante em minha vida.

À Universidade Federal de Santa Catarina, por possibilitar minha formação profissional e humana de qualidade, me conscientizando a respeito da importância de uma educação pública e gratuita, direito de todo cidadão brasileiro.

A todas as pessoas e situações que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, as quais, direta ou indiretamente, participaram da construção da minha história como profissional e ser humano, a minha eterna gratidão,

Muito Obrigado,

*Enio José Bassi*

Florianópolis, 2008.

***“O acaso favorece apenas as mentes  
preparadas...” (Louis Pasteur)***

Por isso...

***“Não apresse o rio... Ele corre sozinho”  
(Citação Zen)***

## RESUMO

A proteína G do vírus rábico contém 505 aminoácidos em sua forma nativa, sendo exposta na superfície da partícula viral. Esta proteína é importante para a infectividade viral e imunidade protetora, sendo o antígeno que induz anticorpos neutralizantes contra o vírus. Diversos epítomos lineares, identificados por anticorpos monoclonais, foram identificados na região central da proteína. Nesse estudo, uma região compreendendo esses epítomos (resíduos 179-281, cepa ERA), denominada rGERA179-281, foi clonada e expressa em *Escherichia coli* cepa Rosetta, ligada a uma cauda de histidina na região N-terminal. A expressão resultou na formação de agregados insolúveis da proteína em corpos de inclusão. Os corpos de inclusão foram solubilizados com cloreto de guanidina 6M e a proteína foi purificada por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados, em condições desnaturantes, sendo sua identidade confirmada por espectrometria de massa. A proteína purificada (13,8 kDa) foi reconhecida por anticorpos presentes na preparação comercial de imunoglobulina anti-rábica humana (HRIG), por meio de *immunoblotting*. Além disso, por um método de inibição de neutralização, a rGERA179-281 levou a uma redução mensurável na atividade neutralizante da HRIG. Para analisar a imunogenicidade da proteína, camundongos foram imunizados com a rGERA179-281. Observou-se, pela técnica de imunofluorescência indireta, que amostras de soro destes animais foram capazes de reconhecer o vírus rábico na forma nativa em células infectadas, embora não tenha sido observada uma indução de títulos neutralizantes acima de 0,5 UI/ml. Esses resultados, juntamente com o bom rendimento obtido, geram perspectivas de estudos posteriores mais detalhados das propriedades imunológicas da rGERA179-281, além da sua possível aplicação no desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico.

Palavras-chave: Vírus rábico, proteína G, expressão e purificação de proteínas, imunogenicidade, epítomos lineares.

## ABSTRACT

The G protein, which coats the outer surface of the rabies virus, contains 505 amino acids in its native form and it is important for virus infectivity and induction of the protective immunity. In this study, the region comprising linear epitopes (residues 179 to 281, ERA strain), named rGERA179-281, was cloned in frame with a hexahistidine tag coding sequence at its N-terminal end and overexpressed in *Escherichia coli* Rosetta strain. The expression yielded insoluble protein aggregates in the form of inclusion bodies. The inclusion bodies were solubilized with 6M guanidine HCl and the protein was purified by immobilized metal affinity chromatography under denaturing conditions. Mass spectrometry data confirmed the identity of the protein. The purified protein (13.8 kDa) showed significant reactivity with antibodies present in a therapeutic human rabies immune globulin (HRIG), as demonstrated by immunoblotting analysis. In addition, by an *in vitro* inhibition neutralization assay, rGERA179-281 led to a measurable reduction in the ability of HRIG to neutralize rabies virus. For analyzing the immunogenic property of the protein, mice were immunized with rGERA179-281. The antibodies elicited in the mouse serum samples recognized the native form of rabies virus in the virus-infected cells by immunofluorescence assay. However, significant titers of virus neutralizing antibodies were not detected. These results, along with the good yield obtained, encourage further studies on the more detailed immunological properties of rGERA179-281 and the production of anti-G monoclonal antibodies, which together, might be useful for the development of new diagnostic methods.

Key-words: Rabies virus, G protein, protein expression and purification, immunological properties, linear epitopes.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Morfologia do vírus rábico observada por microscopia eletrônica.	<b>19</b>
<b>Figura 2:</b> Esquema representando a estrutura do vírus rábico.	<b>20</b>
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática do genoma do vírus rábico, com seus cinco genes estruturais (N, P, M, G e L).	<b>21</b>
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática do ciclo de replicação do vírus rábico em uma célula hospedeira.	<b>23</b>
<b>Figura 5:</b> Estrutura e principais regiões antigênicas da proteína G do vírus rábico em diferentes cepas virais.	<b>31</b>
<b>Figura 6:</b> Representação esquemática do vetor pET-14b.	<b>48</b>
<b>Figura 7:</b> Esquema das etapas de purificação da rGERA179-281 por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados.	<b>56</b>
<b>Figura 8:</b> Esquema do ensaio de inibição da atividade neutralizante da HRIG pela rGERA179-281.	<b>60</b>
<b>Figura 9:</b> Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, mostrando amplificação do fragmento de interesse (336 pb) pela PCR, a partir do plasmídeo pSG5r.gpT434.	<b>64</b>
<b>Figura 10:</b> Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, mostrando eluições da purificação do inserto por meio do <i>MinElute Gel Extraction Kit</i> (QIAGEN).	<b>65</b>

- Figura 11:** Eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio, mostrando purificação do inserto e do plasmídeo pET14-b, após restrição com as enzimas *Bam*HI e *Nde*I utilizando-se o *Concert*<sup>TM</sup> *Rapid PCR Purification System*. 66
- Figura 12:** Gel de agarose a 1,0% corado com brometo de etídio, para triagem, por PCR, das colônias resultantes da transformação com o plasmídeo pGERA179-281. 68
- Figura 13:** Eletroforese em gel de agarose a 1,0 % corado com brometo de etídio, mostrando os produtos de PCR dos plasmídeos provenientes das colônias 9 e 10 (Fig.12), após purificação. 69
- Figura 14:** (A) = Seqüência de nucleotídeos codificante para os resíduos 179-281 da proteína G do vírus rábico cepa ERA presente no plasmídeo recombinante pGERA179-281, determinada por sequenciamento de DNA. (B) = Plasmídeo pRARE presente na *E. coli* Rosetta suprindo RNAs para os códons raros AUA, AGG, AGA, CUA, CCC e GGA. 72
- Figura 15:** Análise da indução da expressão da rGERA179-281 por SDS-PAGE16% em diferentes tempos e temperaturas. 73
- Figura 16:** Expressão da rGERA179-281 após 15h de indução com IPTG após adição de etanol a 2% v/v. 74
- Figura 17:** Análise por SDS-PAGE 16% das etapas de purificação da rGERA179-281. 77
- Figura 18:** Alinhamento da seqüência dos resíduos 179-281 da proteína G do vírus rábico cepa ERA com diferentes cepas do vírus rábico. 79

<b>Figura 19:</b> Caracterização da rGERA179-281 por <i>Immunoblotting</i> .	<b>81</b>
<b>Figura 20:</b> Inibição da atividade neutralizante da HRIG pela rGERA179-281.	<b>82</b>
<b>Figura 21:</b> Imunofluorescência indireta em células N2A infectadas com vírus rábico cepa PV.	<b>84</b>
<b>Figura 22:</b> Imunofluorescência indireta em células BHK-21 infectadas com vírus rábico cepa PV.	<b>85</b>

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Classificação do gênero *Lyssavirus*, Família Rhabdoviridae. **18**
- Tabela 2:** Variações nas quantidades de inserto e plasmídeo (eluições da purificação após restrição) misturados na reação de ligação, para transformação de *E.coli* DH5 $\alpha$ . **67**
- Tabela 3:** Títulos dos soros dos camundongos determinados por ensaios de soroneutralização. **87**

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 O VÍRUS RÁBICO.....	17
1.1.1 Classificação.....	17
1.1.2 Morfologia e estrutura viral.....	19
1.1.3 Organização genômica e replicação do vírus rábico.....	20
1.2 RIBONUCLEOPROTEÍNA.....	24
1.3 ENVELOPE VIRAL.....	27
1.3.1 Proteína G.....	28
1.3.1.1 Sítios antigênicos.....	33
1.2 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	36
1.4.1 Sistemas procarióticos.....	36
1.4.2 Sistemas eucarióticos.....	38
1.4.2.1 Leveduras.....	38
1.4.2.2 Células de mamíferos e insetos.....	39
1.5 PROTEÍNA G DO VÍRUS RÁBICO RECOMBINANTE E SUAS APLICAÇÕES.....	40
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	44
2.1 OBJETIVO GERAL.....	44
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
2.2.1 Clonagem, expressão, purificação e caracterização da rGERA179-281...44	44
2.2.2 Ensaios de propriedades imunológicas da rGERA179-281.....	45
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	46
3.1 Animais.....	46
3.2 Considerações éticas.....	46
3.3 Imunização.....	46
3.4 Cepas bacterianas, plasmídeos e reagentes químicos.....	48
3.5 Vírus e células.....	49

<b>3.6</b>	<b>Clonagem, expressão, purificação e caracterização da rGERA179-281</b> .....	50
3.6.1	<i>Desenho dos iniciadores</i> .....	50
3.6.2	<i>Amplificação do fragmento de interesse a partir do plasmídeo pSG5r.gpT434</i> .....	50
3.6.3	<i>Construção do vetor de expressão</i> .....	51
3.6.4	<i>Transformação de bactérias competentes</i> .....	52
3.6.5	<i>Expressão da rGERA179-281</i> .....	53
3.6.6	<i>Purificação da rGERA179-281</i> .....	54
3.6.7	<i>Eletroforese em géis de agarose e poliacrilamida (SDS-PAGE)</i> .....	57
3.6.8	<i>Espectrometria de massa</i> .....	58
<b>3.7</b>	<b>Ensaio de propriedades imunológicas da rGERA179-281</b> .....	58
3.7.1	<i>Immunoblotting</i> .....	58
3.7.2	<i>Inibição da atividade neutralizante da HRIG</i> .....	59
3.7.3	<i>Determinação do reconhecimento do vírus rábico na forma nativa pelos anticorpos induzidos pela rGERA179-281 por imunofluorescência indireta</i> .....	61
3.7.4	<i>Determinação da capacidade neutralizante dos anticorpos induzidos pela rGERA179-281</i> .....	62
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	64
<b>4.1</b>	<b>Amplificação do fragmento de interesse a partir do plasmídeo pSG5r.gpT434</b> .....	64
<b>4.2</b>	<b>Clonagem, expressão, purificação e caracterização da rGERA179-281</b> .....	66
4.2.1	<i>Construção do vetor de expressão</i> .....	66
4.2.2	<i>Expressão da rGERA179-281</i> .....	70
4.2.3	<i>Purificação da rGERA179-281</i> .....	75
4.2.4	<i>Caracterização da rGERA179-281 por espectrometria de massa</i> .....	78
<b>4.3</b>	<b>Ensaio de propriedades imunológicas da rGERA179-281</b> .....	80
4.3.1	<i>Immunoblotting</i> .....	80
4.3.2	<i>Inibição da atividade neutralizante da rGERA179-281</i> .....	81

4.3.3	<i>Determinação do reconhecimento do vírus rábico na forma nativa pelos anticorpos induzidos pela rGERA179-281 por imunofluorescência indireta.....</i>	83
4.3.4	<i>Determinação da capacidade neutralizante dos anticorpos induzidos pela rGERA179-281.....</i>	85
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>		89
5.1	<b>Clonagem, expressão, purificação e caracterização da rGERA179-281...</b>	89
5.2	<b>Ensaio de propriedades imunológicas da rGERA179-281.....</b>	96
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>		102
<b>6 PERSPECTIVAS.....</b>		104
<b>REFERÊNCIAS.....</b>		105

## 1 INTRODUÇÃO

A raiva é considerada uma antropozoonose de etiologia viral, tendo como agente etiológico o vírus rábico, pertencente à Família Rhabdoviridae, gênero *Lyssavirus* (RAVKOV et al., 1995). A doença acomete os mamíferos, sendo transmitida pela inoculação do vírus contido na saliva de animais infectados, principalmente através de mordeduras, ocasionando uma encefalite fatal, na maioria dos casos (WUNNER, 2002). É uma das doenças mais conhecidas pela humanidade, sendo descrita desde a Antiguidade (WILKINSON, 2002).

A palavra raiva deriva do latim *rabies*, que significa “fúria”, “delírio” e do sânscrito *rhabas*, que significa “loucura”, “demência” (STEELE; FERNANDEZ, 1991), condizendo o fato de esta ser uma das mais temidas entre as doenças humanas, devido aos seus sintomas neurológicos.

Esta doença é um problema de saúde pública em muitos países, sendo que a maioria das 55.000 mortes relatadas anualmente, ocorre na Ásia e na África. As crianças somam a maior parte das vítimas, sendo que 30% a 50% dos casos são observados em menores de 15 anos de idade (WHO, 2006). A cada ano, mais de dez milhões de pessoas, a grande maioria sem vacinação, experimenta ansiedade e medo, após a exposição a um animal suspeito da doença (FU, 1997; MESLIN; STÖHR, 1997; WARREL; WARREL, 2004).

## 1.1 O VÍRUS RÁBICO

### 1.1.1 Classificação

A Família Rhabdoviridae, que agrupa vírus que infectam vertebrados, invertebrados e algumas espécies de plantas, possui cinco gêneros: *Vesiculovirus*, *Ephemerovirus*, *Cytorhabdovirus*, *Nucleorhabdovirus* e *Lyssavirus* (MURPHY et al., 1995). Os vírus desta família são constituídos basicamente de RNA (2-3%), proteínas (67-74%), lipídeos (20-26%) e carboidratos (3%) (WUNNER, 1991). Apenas os gêneros *Vesiculovirus*, cujo representante é o vírus da estomatite vesicular, e o *Lyssavirus*, representado pelo vírus rábico, podem infectar hospedeiros mamíferos, apresentando morfologia, estrutura química e ciclo de vida similar (WUNNER, 2002).

O gênero *Lyssavirus* é dividido atualmente em sete genótipos, compreendendo o vírus rábico (RABV, genótipo 1, sorotipo 1), primeiro a ser identificado como agente etiológico da raiva, e os chamados *Lyssavirus* relacionados à raiva, que refletem a diversidade genética existente nesse gênero. Os *Lyssavirus* relacionados à raiva incluem o vírus *Lagos Bat* (LBV, genótipo 2, sorotipo 2), vírus Mokola (MOKV, genótipo 3, sorotipo 3), vírus Duvenhage (DUVV, genótipo 4, sorotipo 4), *European bat lyssavirus* tipo 1 (EBLV-1, genótipo 5), *European bat lyssavirus* tipo 2 (EBLV-2, genótipo 6) e *Australian bat lyssavirus* (ABLV, genótipo 7) (Tabela 1).

TABELA 1 – Classificação do gênero *Lyssavirus*, Família Rhabdoviridae

FONTE - SMITH, 2002; WARREL; WARREL, 2004. Adaptado.

GENÓTIPO	VÍRUS	FONTE	DISTRIBUIÇÃO
1	RABV	Cachorro, gato, raposa, morcego, e outros	Mundial
2	LBV	Morcegos, gatos; ainda não detectado em seres humanos	África (raro)
3	MOKV	Morcegos insetívoros	África
4	DUVV	Morcegos insetívoros	África (raro)
5	EBLV-1	Morcegos insetívoros	Dinamarca, Holanda, Alemanha, Polônia, Hungria, Rússia, França, Espanha
6	EBLV-2	Morcegos insetívoros	Holanda, Finlândia, Suécia, Ucrânia, Suíça
7	ABLV	Morcegos insetívoros e frutíferos	Austrália

O gênero pode ser dividido ainda em dois grupos, filogrupos I e II. O filogrupo II é formado pelo vírus Mokola e *Lagos Bat*, sendo menos patogênicos. Todos os outros genótipos pertencem ao filogrupo I, podendo causar encefalite semelhante à raiva em seres humanos. Outros três vírus estão incluídos no gênero *Lyssavirus*, mas eles possuem relações distantes com as outras espécies do gênero e não estão envolvidos com a raiva em mamíferos (WUNNER, 2002).

A grande maioria dos vírus pertencentes ao gênero *Lyssavirus* apresentam muitas características biológicas e físico-químicas em comum, utilizando mecanismos similares

para entrada nas células susceptíveis do hospedeiro, expressar e replicar seu RNA genômico e liberar partículas virais maduras da membrana plasmática das células infectadas (WUNNER, 2002).

### 1.1.2 Morfologia e estrutura viral

O vírus da raiva possui a morfologia de um projétil (Figura 1), apresentando uma extremidade plana e a outra arredondada, sendo que seu diâmetro médio é de 75 nm e seu comprimento varia entre 100 a 300 nm (DAVIES et al., 1963; TORDO, 1996).

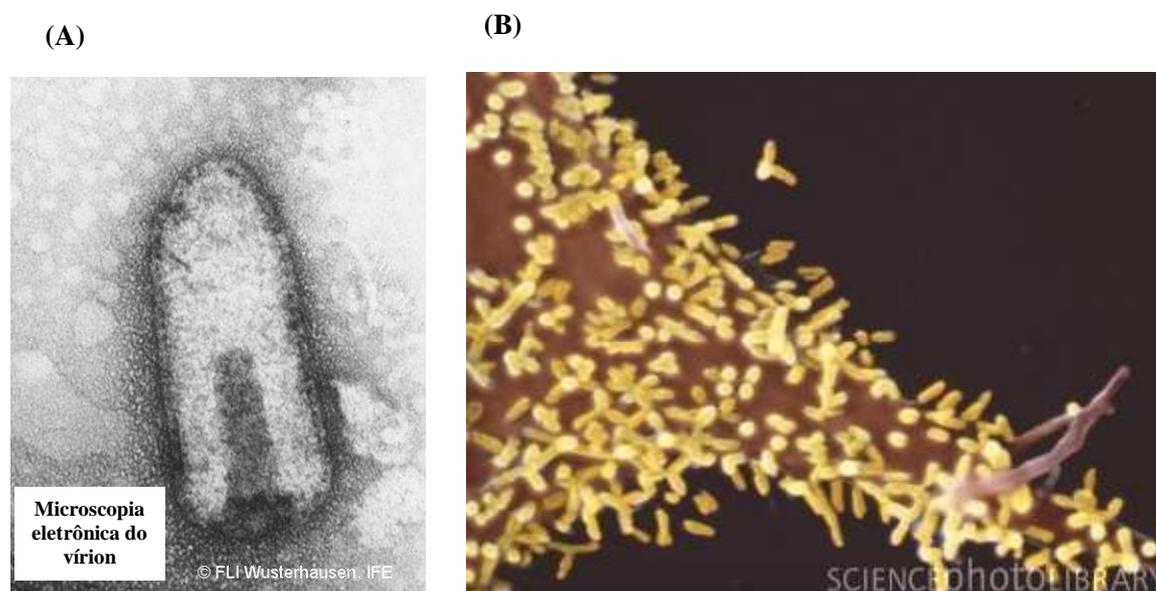


FIGURA 1 – Morfologia do vírus rábico observada por microscopia eletrônica. (A) Vírion observado por microscopia eletrônica mostrando sua morfologia em forma de projétil. (B) Micrografia eletrônica do vírus infectando uma célula de mamífero.

FONTE – Adaptado de FLI (2006) e Science Photo Library.

A estrutura viral é formada pela combinação de cinco proteínas estruturais (Figura 2): nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), glicoproteína (G) e a RNA polimerase RNA-dependente (L) (GUPTA et al., 2005). Estas cinco proteínas se agrupam constituindo dois elementos estruturais principais: a ribonucleoproteína (RNP) e o envelope viral envolvendo a RNP (WUNNER, 2002).

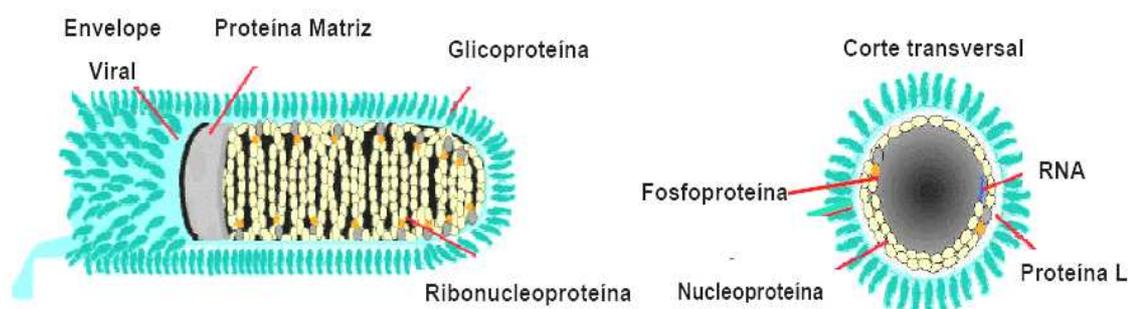


FIGURA 2 – Esquema representando a estrutura do vírus rábico.  
 FONTE – Adaptado de CDC, 2003.

### 1.1.3 Organização genômica e replicação do vírus rábico

O genoma do vírus rábico é não-segmentado, constituído por RNA fita simples de polaridade negativa, não podendo ser diretamente traduzido em proteínas pela maquinaria enzimática celular da célula do hospedeiro. Dessa forma, o primeiro evento da infecção, é a transcrição do RNA genômico para produção de moléculas de RNAs mensageiros monocistrônicos complementares (senso positivo) para cada gene viral presente no genoma, capazes de produzir novas partículas virais (TORDO, 1996).

A organização e características gerais do RNA genômico do vírus rábico é similar a outros vírus de RNA fita negativa integrantes da ordem *Mononegavirales*, em particular, a outros rbdovírus, sendo constituído de 11.932 nucleotídeos (TORDO et al., 1992). A porção 3' inicial (primeiros 58 nucleotídeos) possui uma seqüência líder (Le) não-codificante, extragênica. Imediatamente após essa seqüência Le, estão localizados os 5 genes estruturais: N, P, M, G e L (Figura 3). Os genes estão separados por seqüências relativamente curtas (dinucleotídeos ou pentanucleotídeos) que representam as regiões não-codificantes intergênicas do genoma (NC). A região intergênica remanescente entre os genes G e L ( $\Psi$ ) é constituída por 423 nucleotídeos, representando um gene em potencial, mas não possui uma ORF (*open reading frame*) para uma proteína detectável no vírus rábico, sendo considerada um pseudogene (TORDO et al, 1986).

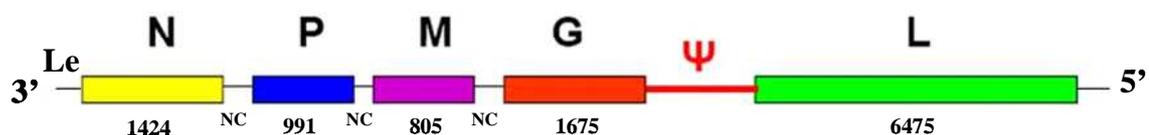


FIGURA 3 – Representação esquemática do genoma do vírus rábico, com seus cinco genes estruturais (N, P, M, G e L). Le: seqüência líder; NC,  $\Psi$ : regiões não-codificantes.

FONTE – Adaptado de CDC, 2003.

A seqüência de eventos da replicação do vírus rábico pode ser dividida em três fases. A primeira inclui a adsorção viral aos receptores da célula susceptível do hospedeiro, fusão do vírus à membrana plasmática e membrana endossomal, seguido da liberação da RNP no citoplasma. A segunda fase inclui a transcrição e a replicação do genoma viral. Na

terceira fase, ocorre a montagem dos nucleocapsídeos e formação de novas partículas do vírus, sendo que as células permanecem metabolicamente competentes.

As proteínas N, P, M, G e L são traduzidas a partir dos seus respectivos RNAm em ribossomos no citoplasma celular e a proteína G é traduzida a partir do RNAm-G em ribossomos aderidos ao retículo endoplasmático rugoso. Complexos moleculares de N e P podem produzir corpos de inclusão citoplasmáticos (chamados de corpúsculos de Negri “in vivo”), importantes marcadores de diagnóstico da infecção viral (MIYOMOTO; MATSUMOTO, 1965). Todas as fases da replicação viral podem ser esquematicamente visualizadas na Figura 4 (WUNNER, 2002).

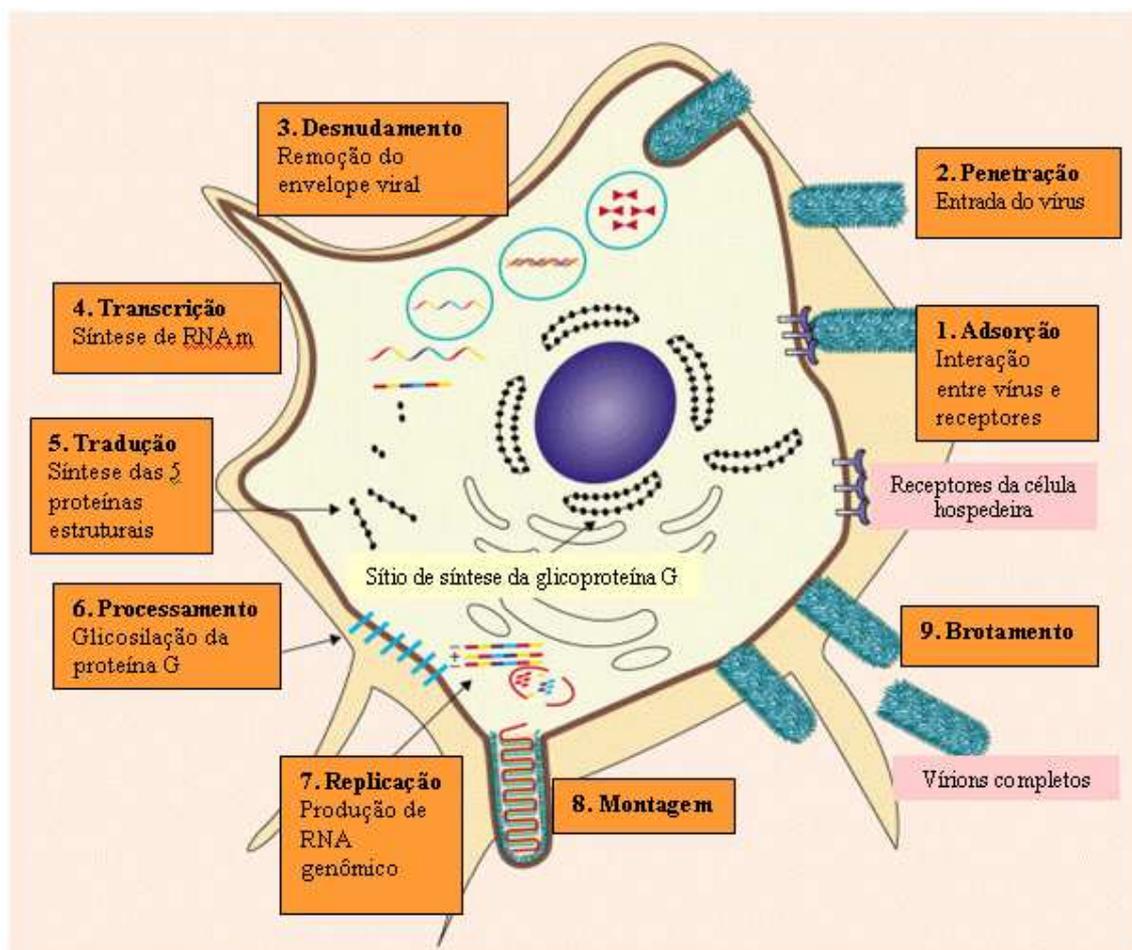


FIGURA 4 - Representação esquemática do ciclo de replicação do vírus rábico em uma célula hospedeira.

FONTE - Modificado de RUPPRECHT, HALON; HEMACHUDHA (2002).

## 1.2 RIBONUCLEOPROTEÍNA

A RNP ou nucleocapsídeo apresenta-se sob a forma de um complexo helicoidal constituído de RNA fita simples associado à nucleoproteína (N), a uma fosfoproteína (P) e a RNA polimerase-RNA dependente (L) envolvidas na atividade RNA-polimerase do vírion (WUNNER, 2002). De estrutura lábil, a RNP linearizada pode atingir um comprimento de 0,2 a 0,65 nm (SOKOL et al., 1969).

### - Nucleoproteína N

A nucleoproteína N é fosforilada, composta de 450 aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 57 kDa, sendo considerada o mais conservado de todos os componentes virais, considerando-se a seqüência de aminoácidos, entre os diversos genótipos (WUNNER, 2002). É o maior componente do vírus e a maior proteína do nucleocapsídeo. Sua principal função é estrutural, além de ser muito importante para as etapas de transcrição e replicação (TORDO, 1996).

Esta proteína participa do processo de encapsidação do RNA genômico viral e proteção do RNA frente à atividade de ribonucleases (SOKOL et al., 1969; WUNNER, 1991). O sítio de ligação ao RNA parece estar localizado no domínio N-terminal (primeiros 376 aminoácidos), possivelmente entre os resíduos 298 e 352 da seqüência protéica (KOUZNETZOFF et al., 1998). Depois de se ligar ao RNA viral, a proteína N sofre alterações conformacionais, adquirindo vários epítomos e é fosforilada em um resíduo de serina na posição 389 (KAWAI et al., 1999).

A proteína N é a segunda proteína do vírus rábico mais extensivamente analisada com relação a sua função e estrutura antigênica. O interesse imunológico relacionado a essa proteína iniciou-se a partir da observação que o nucleocapsídeo induz imunidade protetora contra um desafio periférico com vírus rábico, em animais (DIETZSCHOLD et al., 1987; TOLLIS et al., 1991). Duas características distintas associadas à nucleoproteína N estão relacionadas com a imunoproteção conferida pelo RNP: capacidade de proteção contra um desafio viral periférico em animais, na ausência de anticorpos neutralizantes detectáveis (TOLLIS et al., 1991); e aumento na produção de anticorpos neutralizantes para o vírus na imunização subsequente de animais com vacinas anti-rábicas inativadas (DIETZSCHOLD et al., 1987; TOLLIS et al., 1991).

#### **- Fosfoproteína (P, M1 ou NS)**

A fosfoproteína (P) é constituída de 297 aminoácidos, peso molecular de 38-41 kDa, sendo relativamente bem conservada entre as diferentes amostras de vírus rábico, apresentando uma similaridade média de 95% (KAWAI; MARIMOTO, 1994). É uma proteína interna, não estrutural (também denominada NS – *nonstructural protein*), fosforilada em vários resíduos de serina e treonina, tendo importante papel de regulação na replicação viral (WUNNER, 2002). A fosforilação e a grande quantidade de resíduos de aminoácidos como aspartato e glutamato promove uma carga negativa a proteína.

É uma proteína multifuncional que ao interagir com a proteína N, atua como peça chave do complexo da RNA polimerase associada ao vírion, como proteína regulatória da replicação do genoma viral. Entre as suas várias funções, a P age como uma chaperona da

proteína N solúvel recém-traduzida, prevenindo sua agregação e ligações inespecíficas ao RNA celular (WUNNER, 2002).

#### **- RNA polimerase-RNA dependente (L)**

A proteína L é a maior proteína do vírus rábico, possuindo 2.142 aminoácidos, sendo que seu gene ocupa mais da metade (54%) do genoma do vírus rábico. É responsável pelas atividades enzimáticas necessárias à transcrição e replicação viral, sendo considerada o componente catalítico do complexo da polimerase viral (TORDO, 1996; WUNNER, 2002). Tem um papel muito importante no início da infecção viral, iniciando a transcrição primária do RNA genômico viral, liberado no citoplasma da célula infectada (WUNNER, 2002).

### 1.3 ENVELOPE VIRAL

O envelope viral é composto por uma bicamada lipídica a qual estão associadas duas outras proteínas: a proteína M e a glicoproteína ou proteína G. O número de moléculas de G e M por vírion é estimado em torno de 1205 e 1148, respectivamente, segundo Flamand et al. (1993).

Os lipídeos constituem 50% da bicamada lipoprotéica formando o envelope viral, que envolve a RNP. Esses lipídeos são provenientes da membrana celular do hospedeiro, incluindo: fosfolipídeos (aproximadamente 42%), principalmente esfingomiéline, fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina; lipídeos neutros (em torno de 58%), como triglicerídeos e colesterol; e glicolipídeos, em menor quantidade (SCHLESINGER et al., 1973; BLOUGH et al., 1977).

#### **- Proteína de Matriz (M)**

A proteína M possui 202 aminoácidos e peso molecular de 23 KDa, estando relacionada com a ligação entre o envelope e o complexo RNP, mantendo a morfogênese viral. Além disso, é considerada uma proteína multifuncional, interagindo com outras proteínas virais e proteínas da membrana celular, sendo importante na regulação da transcrição viral (ITO et al., 1996).

A região central da proteína possui um domínio hidrofóbico (resíduos 89-107) que pode interagir com lipídeos de membrana (CAPONE; GHOSH, 1984).

### 1. 3.1 Proteína G

A proteína G é uma proteína transmembrana tipo I, consistindo de um domínio citoplasmático, um domínio transmembrana e um ectodomínio exposto na forma de trímeros, formando aproximadamente 400 espículas que se distanciam 8,3 nm da superfície viral (GAUDIN et al., 1999; CDC, 2003). Única proteína exposta na superfície da partícula viral, sendo mediadora da ligação aos receptores celulares e entrada na célula do hospedeiro e, por isso, é o único antígeno que induz imunidade protetora (anticorpos neutralizantes) contra o vírus rábico (COX et al., 1977; COLL, 1995). É a mais estudada de todas as proteínas do vírus rábico, tanto a nível estrutural como imunológico.

Esta proteína é expressa como um polipeptídeo de 524 aminoácidos (65 KDa). Os primeiros 19 resíduos de aminoácidos formam um peptídeo sinal, que é clivado quando a proteína é processada no retículo endoplasmático da célula do hospedeiro (COLL, 1995). As regiões remanescentes da proteína podem ser subdivididas em: um ectodomínio exposto na superfície com 439 aminoácidos, contendo 14 cisteínas formando pontes dissulfeto (GAUDIN, 1997); o domínio transmembrana com 22 aminoácidos (resíduos 439-461) (GAUDIN et al., 1992); e o endodomínio com 44 aminoácidos, localizado na porção C-terminal interagindo com a proteína M, N e NS do vírion (DELAGNEAU et al., 1981; JOHNSON et al., 2002).

O ectodomínio está envolvido na indução de anticorpos neutralizantes para o vírus rábico promovida por meio da vacinação pré e pós-exposição (PERRIN et al., 1985). Os anticorpos neutralizantes para o vírus induzidos por esta proteína de alta imunogenicidade podem proteger contra a infecção pelo vírus rábico, juntamente com a indução de linfócitos

T citotóxicos e linfócitos T auxiliares (MACFARLAN et al., 1986; CELIS et al., 1988).

A proteína G é um dos mais importantes determinantes das propriedades de neurotropismo e neurovirulência, sendo a arginina na posição 333 essencial para a virulência viral (DIETZSCHOLD et al., 1983; PREHAUD et al., 1988; FABER et al., 2005). Mutações pontuais em cepas que apresentam glutamina, isoleucina, glicina, metionina ou serina substituindo a arginina na posição 333, resulta em um fenótipo que é menos patogênico ou virulento em comparação à cepa selvagem, quando realizada inoculação intracerebral em camundongos adultos imunocompetentes (DIETZSCHOLD et al., 1983; TUFFEREAU et al., 1989).

Takayama-Ito et al. (2006) realizaram uma mutação pontual na cepa atenuada do vírus rábico HEP-Flury, substituindo o aminoácido glutamina na posição 333 por arginina. Neste estudo, observou-se um aumento na patogenicidade viral, verificada por inoculação viral intracerebral, assim como uma capacidade de espalhamento do vírus para outras células do SNC, característica não observada na cepa selvagem.

A proteína G é uma proteína de fusão que media a entrada do vírus nas células do hospedeiro. Após a ligação aos receptores celulares, o vírus é internalizado, e as espículas formadas pela proteína fundem-se, em um processo pH-dependente com as membranas endossomais, adentrando dessa forma o endossomo. Com o decorrer do processamento, a proteína pode assumir no mínimo três estados conformacionais diferentes: o estado nativo (N), detectado na superfície viral em um pH em torno de 7, que é provavelmente responsável pela ligação ao receptor; o estado hidrofóbico ativado (A), que interage com a membrana alvo no primeiro passo do processo de fusão; e a conformação fusão-inativa (I), havendo um complexo equilíbrio pH-dependente entre esses estados. O estado

conformacional I é 3 nm maior do que o estado conformacional N, do qual é também antigenicamente distinto (GAUDIN et al., 1999).

Durante a síntese protéica, a proteína G recém-traduzida assume uma conformação semelhante ao estado de conformação inativa, enquanto é transportada por meio do complexo de Golgi até a superfície celular, onde adquire sua conformação e estrutura nativa (GAUDIN et al., 1995).

Essa proteína tem dois a quatro sítios potenciais a N-glicosilação (Figura 5), dos quais somente um ou dois são glicosilados, dependendo da cepa viral, sendo importantes para a correta conformação da proteína (WUNNER et al., 1985). Os grupamentos glicosídicos são majoritariamente compostos por D-manose, L-fucose, D-galactose, N-acetil-glicosamina e de ácido siálico (DIETZSCHOLD, 1977). Os oligossacarídeos representam 10-12% da massa total da proteína e 3% da massa total do vírion (WUNNER, 1991).

Os oligossacarídeos são ligados a resíduos de asparagina (N-glicosilação) na seqüência asparagina-X-serina ou treonina, onde X pode ser qualquer aminoácido, exceto prolina (TORDO, 1996; WOJCZYK et al, 2005).

O sítio de glicosilação na posição 319 é provavelmente o de maior importância, estando presente em todas as cepas do gênero *Lyssavirus* seqüenciadas, sendo essencial para a correta e completa formação da estrutura tridimensional da proteína G nascente, e subsequente transporte para a superfície celular (SHAKIN-ESHLEMAN et al., 1992). É a única região que apresenta homologia com a proteína G do vírus da estomatite vesicular (ROSE et al., 1982). Os outros sítios de glicosilação variam entre as diferentes cepas virais do vírus rábico, conforme mostrado na Figura 5.

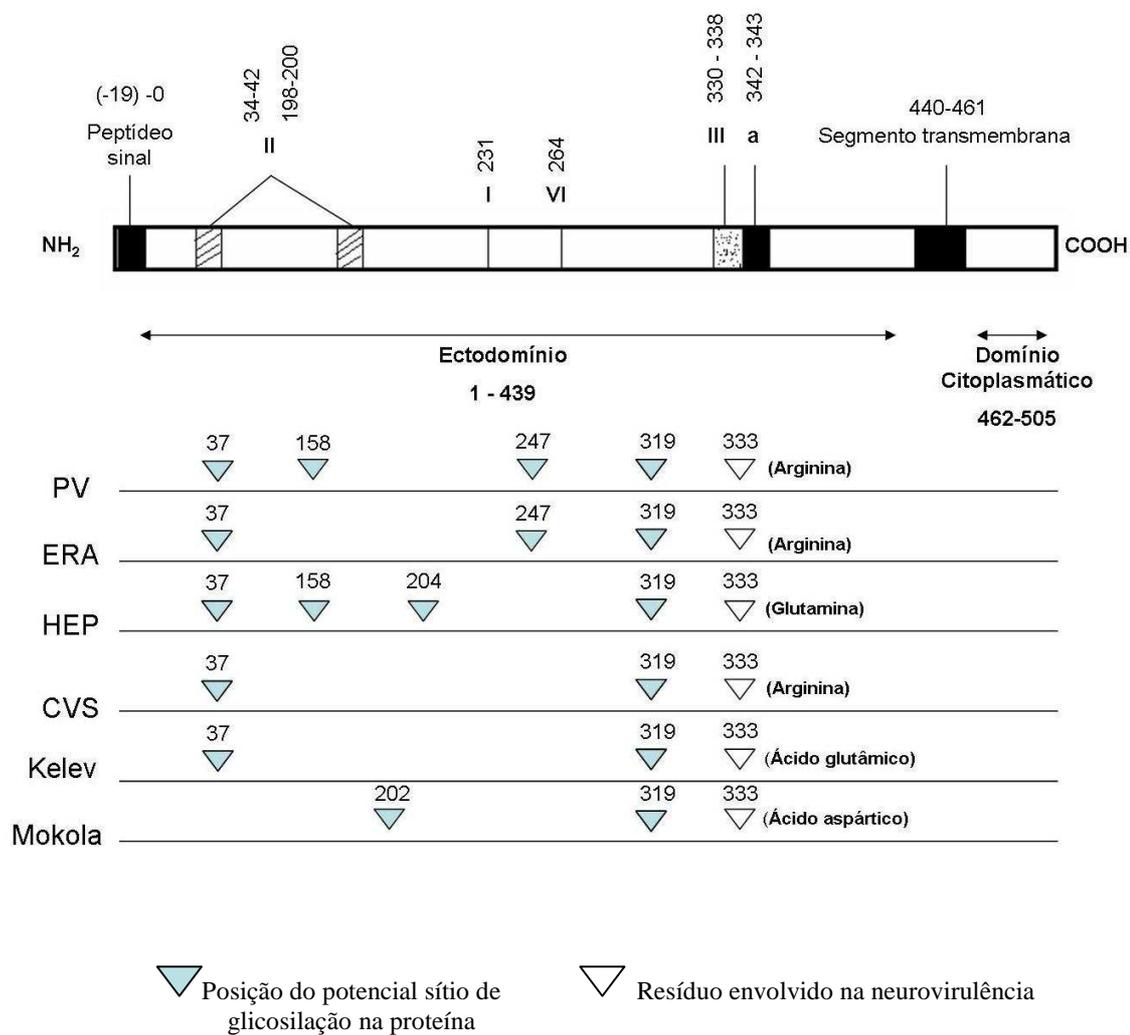


FIGURA 5 – Estrutura e principais regiões antigênicas da proteína G do vírus rábico em diferentes cepas virais. (PV, ERA, HEP, CVS, Kelev e Mokola) Cepas virais; (I) Sítio antigênico I; (II) Sítio antigênico II; (III) Sítio antigênico III; (VI) Sítio antigênico VI; (a) Sítio antigênico a.

FONTE – Adaptado de TORDO, 1996.

Os resíduos de carboidratos da N-glicosilação são pré-sintetizados na célula e transferidos como uma unidade precursora ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ )\* para o resíduo de asparagina, na seqüência asparagina-X-serina ou treonina, da molécula de proteína G nascente. Tipicamente, a transferência ocorre quando a proteína é sintetizada nos ribossomos e durante a translocação para a membrana do retículo endoplasmático citoplasmático. Depois que a unidade precursora é transferida, a mesma é processada no lúmen do retículo endoplasmático rugoso e vesículas do complexo de Golgi, formando a ligação monoglicosídica do oligossacarídeo (N-ligação) na molécula madura da proteína G (KORNFELD; KORNFELD, 1985; KAPLAN et al., 1987).

A proteína G também é modificada pela adição do ácido palmítico (palmitoilação) no aminoácido cisteína na posição 461, localizado na região C-terminal do resíduo transmembrana. Embora a importância funcional da palmitoilação não seja inteiramente compreendida, presume-se que ela possibilite um efeito de estabilização das espículas triméricas ancoradas na membrana e possa facilitar a interação entre a proteína G e a proteína M, no processo de brotamento viral a partir da membrana celular (GAUDIN et al., 1991; WUNNER, 2002).

---

\* Glc = glicose; Man = manose; GlcNac = N-acetil-glicosamina

### *1.3.1.1 Sítios antigênicos*

Os anticorpos monoclonais têm sido instrumentos de elucidação dos sítios antigênicos da proteína G, que são classificados em sítios conformacionais e lineares (não-conformacionais). No mínimo oito sítios antigênicos foram localizados no ectodomínio de diferentes cepas virais, sendo denominados: I a VI, “a” e G1 (BENMANSOUR et al., 1991).

Dois maiores sítios são dominantes, o sítio II e o sítio III. O sítio antigênico II é formado por duas sub-regiões: uma localizada entre os resíduos 34 e 42 e outra entre os resíduos 198 e 200, provavelmente ligadas por ponte dissulfeto, sendo, portanto, um sítio conformacional descontínuo (PREHAUD et al., 1988; BENMANSOUR et al., 1991). O sítio antigênico III é formado pela região entre os resíduos 330 e 338 (SEIF et al., 1985). Há evidências de que estes sítios antigênicos são estruturalmente conservados entre todas as rabdoviroses (WALKER; KONGSUWAN, 1999) e a imunodominância foi evidenciada pela observação de que 97% de diferentes anticorpos monoclonais testados, reconheceram estes sítios (BENMANSOUR et al., 1991).

Além desses sítios antigênicos principais, o mapeamento de epítomos de ligação a anticorpos monoclonais neutralizantes têm identificado sítios não-conformacionais e resíduos de aminoácidos importantes antigenicamente, presentes na região central do ectodomínio (BUNSCHOTEN et al., 1989; DIETZSCHOLD et al., 1990; HEIJDEN et al., 1993; LAFAY et al., 1996; LUO et al, 1997).

Métodos alternativos de mapeamento de sítios antigênicos utilizaram fragmentos resultantes de clivagem por brometo cianogênico (CNBr) da glicoproteína purificada

(DIETZSCHOLD et al., 1982) e pequenos fragmentos peptídicos da proteína expressos em levedura (LAFAY et al., 1996). Segundo Dietzschold et al. (1982), as principais regiões reconhecidas por soro de coelhos imunizados, foram sítios internos, entre os resíduos 103 e 330. O estudo posterior de Lafay et al. (1996), que utilizou anticorpos monoclonais, identificou uma pequena região entre os resíduos 223 e 276 como imunodominante.

Nos últimos anos têm-se identificado vários epítomos lineares para anticorpos monoclonais neutralizantes, como os encontrados nas posições adjacentes a 251 (LAFAY et al., 1996), 263 (NI et al., 1995) e 264 (DIETZSCHOLD et al., 1990). Dietzschold et al. (1990) mapearam um epítomo linear, entre os resíduos 253 a 275, sendo que a síntese de um peptídeo sintético da região adjacente a 264 induziu a formação de anticorpos neutralizantes em camundongos. Um epítomo linear, nomeado G5, foi definido como um octapeptídeo (LHDFRSDE) entre os resíduos 260 e 267 (DIETZSCHOLD et al., 1990; HEIJDEN et al., 1993).

Recentemente, um novo epítomo linear neutralizante reconhecido por anticorpos monoclonais humanos, entre os resíduos 218 e 240, foi identificado, e a região mínima de ligação foi determinada como sendo os aminoácidos KLCGVL (resíduos 226 a 231) (MARISSSEN et al., 2005).

Para investigar a resposta imune em cachorros domésticos e coelhos após a vacinação, quatro fragmentos truncados da proteína G (cepa PV) foram expressos em *Escherichia coli*, compreendendo os seguintes resíduos: resíduos 1-128, 123-227, 222-332 e 327-443. A resposta imunológica dominante dos anticorpos a sítios não-conformacionais, analisada por *immunoblotting*, foi direcionada principalmente a uma região da G entre os resíduos 222 a 332 (JOHNSON et al., 2002).

Um fragmento da proteína G do vírus rábico cepa CVS-11 (resíduos 201 e 300) expressa em *E. coli* foi capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes em ovos de galinha, que se ligaram à células infectadas com o vírus rábico. Estes anticorpos apresentaram ainda uma atividade neutralizante para o vírus, promovendo proteção em camundongos, quando administrados imediatamente após o desafio viral (MOTOI et al., 2005).

## 1.4 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

As proteínas recombinantes são requeridas em várias pesquisas biológicas para investigação de atividades enzimática, interação com ligantes, interações protéicas, entre outras funções, além de muitas serem alvos farmacêuticos, como medicamentos e vacinas.

O mercado farmacêutico de proteínas recombinantes está continuamente ganhando importância na medicina e esperam-se grandes avanços no tratamento, prevenção e diagnóstico de um grande número de doenças. Atualmente, aproximadamente 30 medicamentos recombinantes (não considerando os anticorpos) já estão disponíveis no mercado, correspondendo um faturamento anual em torno de 50 a 60 bilhões de dólares. Estima-se ainda que cerca de 300 novos compostos estejam sendo desenvolvidos ao redor do mundo (SCHMIDT, 2004).

Diversos sistemas de expressão, tanto procariotos como eucariotos, são utilizados na indústria farmacêutica para várias aplicações em saúde humana.

### 1.4.1 Sistemas procarióticos

A extensa caracterização genética e fisiológica, altas taxas de crescimento, facilidade de manipulação, processo de fermentação estabelecido, baixo custo, e a capacidade de acumular grande quantidade de proteínas heterólogas (aproximadamente até 20% das proteínas totais) tornaram a *Escherichia coli* o microorganismo procariótico mais utilizado para expressão de proteínas recombinantes. Entretanto, devido à falta de modificações pós-traducionais, uma secreção eficiente para o meio de cultivo torna-se

dificultada. Sendo assim, na indústria farmacêutica, a maioria das proteínas produzidas em *E. coli* é purificada a partir de corpos de inclusão (SCHMIDT, 2004).

Devido à estrutura de membrana, pequena quantidade de chaperonas e foldases e elevada concentração de proteases no espaço periplásmico, sistemas secretórios utilizando *E. coli* possibilitam um baixo rendimento da proteína de interesse, sendo vantajoso somente para produtos de alto valor agregado. A empresa Genentech<sup>®</sup>, por exemplo, patenteou um sistema secretório para produção de hormônio do crescimento humano em *E. coli* (GREGORY; HEYNEKER, 1988). As principais estratégias para aumentar a eficiência de secreção compreendem: emprego de sistemas de secreção caracterizados, como o sistema  $\alpha$ -hemolisina (GENTSCHEV et al, 2002); co-expressão de chaperonas, foldases e geração de mutantes deficientes em proteases (LUND, 2001).

Uma outra espécie utilizada para expressão de proteínas heterólogas é o *Bacillus subtilis*. Olmos-Soto e Contreras-Flores (2003) utilizaram esse microorganismo para expressão de proinsulina, obtendo um rendimento de 1 mg/ml, sendo 90% da proteína secretada no meio de cultivo. Estreptomicetos também são considerados potencialmente susceptíveis para o desenvolvimento de sistemas de secreção eficientes, como por exemplo, a espécie *Streptomyces lividans* (PIERCE et al., 2002).

Dentre os vários medicamentos recombinantes produzidos em sistemas de expressão procariótico, destacam-se: hirudina, insulina humana, hormônio de crescimento, interferon, fator de necrose tumoral, entre outros (SCHMIDT, 2004).

## 1.4.2 Sistemas eucarióticos

### 1.4.2.1 Leveduras

As leveduras são microorganismos muito utilizados para expressão de proteínas heterólogas, sendo um sistema vantajoso, considerado de baixo custo, rápido e adaptável à fermentação de alta densidade celular. Além disso, possuem um complexo mecanismo de modificação pós-traducional e podem secretar mais eficientemente a proteína de interesse no meio de cultivo. Várias espécies já estão estabelecidas em procedimentos de produção industrial, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris* e *Hansenula polymorpha*. Vários medicamentos recombinantes, como por exemplo, soro albumina humana, interleucina-2, hirudina, fitase, glucagon, eutropina (derivado do hormônio do crescimento), insulina, entre outros, são produzidos atualmente, com excelente rendimento, em leveduras.

Embora *S. cerevisiae* seja o organismo eucariótico melhor caracterizado geneticamente e a espécie de levedura prevalente em processos de produção farmacêutica, *P. pastoris*, empregada primeiramente por Phillips Petroleum, é a espécie de levedura mais frequentemente utilizada para expressão de proteínas heterólogas em geral (SCHMIDT, 2004). Nos últimos anos foi relatada a expressão de mais de 400 proteínas nesta levedura, sendo considerada superior a qualquer outra espécie de levedura conhecida, considerando a eficiência de secreção (LIN CEREGHINO; CREGG, 2000; LIN CEREGHINO et al., 2002).

#### ***1.4.2.2 Células de mamíferos e insetos***

A utilização de cultura de células de mamíferos para expressão de proteínas heterólogas constitui o sistema mais similar às células humanas, considerando-se o padrão e capacidade de modificações pós-traducionais. Entretanto, o cultivo dessas células é mais complexo e de custo elevado, usualmente apresentando um rendimento mais baixo de produção, quando comparado a bactérias e leveduras.

Diversas proteínas terapêuticas utilizando células animais já estão comercialmente disponíveis no mercado farmacêutico, como fatores de coagulação sanguínea (VII, VIII e IX), eritropoetina, hormônio folículo estimulante, hormônio luteinizante, gonadotropina, fatores de crescimento, utilizando as células BHK (*baby hamster kidney*) e CHO (*chinese hamster ovary*), preferencialmente utilizadas na produção farmacêutica como sistemas celulares de mamíferos (SCHMIDT, 2004).

Entre os sistemas celulares destacam-se as células de inseto transformadas com *baculovirus* recombinantes. Este sistema apresenta como vantagens a facilidade de manipulação e alta produção, quando comparadas aos sistemas celulares de mamíferos (IKONOMOU et al, 2003). Células de inseto da espécie *Drosophila melanogaster* também têm sido utilizadas, apresentando resultados promissores (IVEY-HOYLE, 1991; YOKOMIZO et al., 2007).

## 1.5 PROTEÍNA G DO VÍRUS RÁBICO RECOMBINANTE E SUAS APLICAÇÕES

A tecnologia do DNA-recombinante pode oferecer diferentes opções de obtenção da proteína G recombinante do vírus rábico, tais como a expressão de proteínas em células de mamíferos, células de inseto, plantas, leveduras e células bacterianas (YELVERTON et al., 1983; PREHAUD et al., 1989; SAKAMOTO et al., 1999; ASHRAF et al., 2005; YOKOMIZO et al., 2007).

Devido as suas propriedades imunológicas a obtenção desta proteína recombinante possibilita diversas aplicações biotecnológicas importantes como: produção de anticorpos monoclonais anti-G, produção de imunoglobulina anti-rábica, desenvolvimento de vacinas de subunidades e kits de diagnóstico.

A proteína G purificada a partir da expressão em células eucarióticas, em sua forma glicosilada, tem-se demonstrado eficaz na indução de proteção contra o vírus rábico. Yokomizo et al. (2007) utilizaram células de *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (S2) para expressão da glicoproteína. A imunização de camundongos com a proteína obtida levou a indução de anticorpos contra o vírus rábico e proteção contra a infecção viral experimental.

Uma forma solúvel da proteína G (sem o domínio citoplasmático e transmembrana) foi identificada no meio extracelular de células infectadas com o vírus rábico “in vitro” (DIETZSCHOLD et al, 1983). Esta forma solúvel da glicoproteína expressa em células CHO apresentou propriedade antigênica (WOJCZYK et al., 1995). Gupta et al. (2005) transfectaram células MDBK (*Madin Darby bovine kidney*) com um plasmídeo codificante para a forma solúvel da proteína. Os anticorpos presentes no soro de coelhos imunizados

com a proteína recombinante purificada reconheceram a proteína G nativa do vírus rábico.

Nos últimos anos, a utilização de plantas transgênicas tem sido considerada uma alternativa segura e eficaz para produção de proteínas recombinantes. No caso da raiva, foi verificada uma expressão estável da proteína G em tomates transgênicos, embora não tenha sido reportada a capacidade de imunoproteção induzida pela proteína (MCGARVEY et al., 1995). A expressão em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) correspondeu a 0,38% das proteínas totais solúveis presentes na folha da planta e a imunização de camundongos pela via intraperitoneal com a proteína purificada induziu imunidade protetora em camundongos desafiados (via intracerebral) com o vírus rábico (ASHRAF et al., 2005).

A expressão de proteína G em *Saccharomyces cerevisiae*, tanto utilizando um promotor induzível, como constitutivamente, foi realizada por Klepfer et al. (1993), obtendo-se polipetídeos de 65-68 kDa, que são reconhecidos por soro anti-rábico em ensaios de *Immunoblotting*. Neste estudo também foi verificada a indução da proteção contra o desafio viral, administrando-se o vírus rábico pela via intramuscular em porcos imunizados com extrato das leveduras contendo a proteína recombinante. A proteína, porém, não induziu a proteção em camundongos desafiados com o vírus pela via intracerebral, conforme observado por Klepfer et al. (1993).

Além da utilização da proteína G purificada a partir de células eucarióticas, diversos estudos utilizando vetores virais recombinantes, como adenovírus, expressando a proteína para obtenção de possíveis vacinas para imunização via oral, têm sido realizados, obtendo-se a indução de anticorpos neutralizantes (FRIES et al., 1996; YAROSH et al. 1996; MORIMOTO et al., 2001; ASPDEN et al., 2002; RUPPRECHT et al., 2005).

O desenvolvimento de métodos de diagnóstico utilizando a proteína G do vírus

rábico oferece a possibilidade da detecção de anticorpos neutralizantes no soro de animais vacinados, necessária para avaliação da imunoproteção. Gupta et al. (2005), por exemplo, relataram a potencial utilização da proteína G recombinante obtida a partir de células MDBK como antígeno no método de ELISA para detecção de anticorpos anti-glicoproteína no soro de cães vacinados.

A obtenção de anticorpos monoclonais neutralizantes anti-G possibilita o desenvolvimento de métodos de quantificação da glicoproteína no processo de produção de vacinas, como o ELISA, por exemplo, podendo ser importante para determinação da potência e controle de qualidade vacinal (LAFON et al., 1984; PERRIN et al., 1990; NAGARAJAN et al., 2006). Atualmente essa determinação é realizada pelo teste NIH, que apresenta vários problemas de reprodutibilidade, além da vasta utilização de animais (BARTH et al., 1988; WILBUR; ALBERT, 1996).

Embora a expressão de proteínas em células bacterianas possa ser considerada a mais conveniente e menos onerosa, sabe-se que raramente proteínas glicosiladas podem ser expressas em bactérias, como a *Escherichia coli*, devido à falta de maquinaria celular de modificação pós-traducional, incluindo a glicosilação. Foi observado, no entanto, que soros de coelhos e cachorros vacinados com vírus rábico inativado, continham principalmente anticorpos que se ligavam na porção compreendida entre os resíduos 222 e 332 de um fragmento truncado da proteína G, sintetizado em *E. coli* (JOHNSON et al., 2002).

Motoi et al. (2005) expressaram em *E. coli* parte da proteína G do vírus rábico da cepa CVS-11 (entre os resíduos 201 a 300), abrangendo uma região de epítomos lineares, identificados previamente (DIETZSCHOLD et al., 1990; NI et al., 1995; LUO et al., 1997). Os anticorpos presentes em ovos de galinhas imunizadas com esta região da G

apresentaram significativa atividade neutralizante para o vírus, promovendo proteção suficiente contra infecção pelo vírus rábico em camundongos, quando administrado imediatamente após o desafio viral.

A proposta deste trabalho foi expressar em *E. coli* uma região da proteína G do vírus rábico da cepa ERA (resíduos 179-281, nomeada rGERA179-281) contendo epítomos lineares e avaliar suas propriedades imunológicas para possíveis aplicações biotecnológicas na área da saúde.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Expressar e purificar um fragmento recombinante da proteína G do vírus rábico (rGERA179-281) em *Escherichia coli* e determinar sua imunogenicidade.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#### 2.2.1 Clonagem, expressão, purificação e caracterização da rGERA179-281

- Amplificar o fragmento de DNA correspondente à região da proteína G, compreendida entre os aminoácidos 179 a 281, a partir do plasmídeo pSG5r.gpT434;
- Realizar a clonagem do inserto no vetor de expressão pET-14b;
- Confirmar a inserção do fragmento de interesse por meio do sequenciamento de DNA;
- Padronizar as condições de expressão da proteína rGERA179-281 em *E. coli*;
- Padronizar as condições de purificação da rGERA179-281, por meio de cromatografia de afinidade, utilizando resina com íons metálicos imobilizados (IMAC);
- Caracterizar a proteína por meio de espectrometria de massa (MALDI-TOF).

### 2.2.2 Ensaio de propriedades imunológicas da rGERA179-281

- Avaliar se a rGERA179-281 é reconhecida por anticorpos anti-rábicos presentes na preparação de imunoglobulina anti-rábica humana (soro anti-rábico comercial - HRIG), por meio de ensaios de *immunoblotting*;
- Avaliar se a rGERA179-281 tem capacidade de ser reconhecida por anticorpos anti-rábicos neutralizantes presentes na HRIG, por meio de ensaios de inibição de neutralização;
- Avaliar se a imunização de camundongos com a rGERA179-281 tem a capacidade de induzir anticorpos que reconheçam o vírus rábico em sua forma nativa, por meio de ensaios de imunofluorescência indireta;
- Avaliar se a imunização de camundongos com a rGERA179-281 tem a capacidade de induzir anticorpos neutralizantes contra o vírus rábico, por meio de ensaios de soroneutralização em cultura celular.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Animais**

Foram utilizados neste estudo sete camundongos adultos, da linhagem isogênica Balb/c, criados e mantidos em condições apropriadas no Biotério Setorial do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina. A reposição de água e ração foi realizada diariamente e a limpeza das caixas efetuada duas vezes por semana.

### **3.2 Considerações Éticas**

Devido à utilização de camundongos para imunização este projeto foi encaminhado à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC, para devida análise, sendo aprovado em 08/08/2007 (protocolo CEUA-PP00124).

### **3.3 Imunização**

Os camundongos foram imunizados com a rGERA179-281 purificada, sendo as doses administradas conforme o esquema abaixo:

1ª Dose - Dia 0: 25 µg de rGERA179-281 em 50% adjuvante completo de Freund, volume final de 0,5 ml, via intraperitoneal – i. p.;

2ª Dose - Dia 7: 25 µg de rGERA179-281 em 50% adjuvante incompleto de Freund, volume final de 0,5 ml, via i. p.;

3ª Dose - Dia 14: 25 µg de rGERA179-281 em PBS, volume final de 0,5 ml, via i.p.;

4ª Dose - Dia 28: 25 µg de rGERA179-281 em PBS, volume final de 0,5 ml, via i. p.

A coleta de sangue foi realizada por punção retro-orbital, sete dias após a administração da 4ª dose, sendo precedida de anestesia com 2,78 mg de cloridrato de cetamina (Dopalen, Vetbrands) e 0,12 mg de cloridrato de xilazina (Rompum, Bayer), em volume de 50 microlitros administrados por via i.p. Em um grupo separado de três camundongos, após a 4ª dose de imunização com a rGERA179-281, foi inoculado vírus rábico da cepa PV pela via subcutânea (“foot pad”). Uma semana após o desafio com o vírus, amostras de sangue desses animais foram coletadas, conforme descrito anteriormente. Paralelamente, da mesma forma e nas mesmas datas, foram coletadas amostras de sangue de animais sadios não imunizados e de animais não imunizados e desafiados com o vírus.

Todos os animais desafiados com vírus foram observados quanto ao aparecimento de sintomas de raiva (pelos eriçados, dificuldade de ambulação e perda de peso). Após sete dias, os animais que tinham sido imunizados com rGERA179-281 foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo seus baços removidos para utilização dos esplenócitos na produção de anticorpos monoclonais.\*

---

\* Projeto de Dissertação de Mestrado em Biotecnologia - Universidade Federal de Santa Catarina, desenvolvido pela aluna Camila Zanluca no Laboratório de Imunologia Aplicada.



As bactérias transformadas foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) (Sigma-Aldrich) suplementado com ampicilina (100 µg/ml) e cloranfenicol (30 µg/ml). Para purificação por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados foi utilizada a resina “*Chelating Sepharose Fast Flow*” (GE Healthcare). O isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), antibióticos e outras substâncias químicas foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

### 3.5 Vírus e Células

Para as reações de soroneutralização, competição de neutralização e de imunofluorescência indireta foram utilizadas as linhagens de células N2A (células de neuroblastoma murino) e BHK-21 (*baby hamster kidney*) utilizadas rotineiramente para propagação do vírus rábico “in vitro” (WEBSTER; CASEY, 1996; KING, 1996). A cepa de vírus rábico PV (*Pasteur virus*) foi utilizada como desafio viral.

As culturas celulares foram mantidas em meio DMEM-F12 (Dulbecco MEM/ Nutriente HAM F-12, Cultilab) suplementado com 14 mM de bicarbonato de sódio, 10% (v/v) de soro fetal bovino (Cultilab) para célula BHK-21 e 20% (v/v) para N2A e 1% de solução antibiótico-antimicótico (solução contendo 1000UI penicilina/ml, 10 mg de estreptomicina/ml, 25 µg de anfotericina B/ml) a 37°C em atmosfera de 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>.

### 3.6 Clonagem, expressão, purificação e caracterização da rGERA179-281

#### 3.6.1 Desenho dos iniciadores

Os iniciadores específicos para região codificante entre os aminoácidos 179 a 281 foram desenhados com base na seqüência de nucleotídeos do RNA mensageiro da proteína G do vírus rábico, cepa ERA, disponível no GenBank (Acesso nº JO2293). Na construção foram inseridos os sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI no iniciador anti-sense (CAT ATG) e *Nde*I no iniciador sense (GGA TCC). As seqüências dos oligonucleotídeos sintetizados foram:

- ERA 179-281F: 5'- ACC ATT CAT ATG CCC GAG AAT CCG – 3'

- ERA 179-281R: 5'- TGC ATC CAG GGA TCC TCA CTC TCT CTT CCT – 3'

Os iniciadores sintetizados liofilizados foram suspensos em água ultra purificada.

#### 3.6.2 Amplificação do fragmento de interesse a partir do plasmídeo pSG5r.gpT434

O fragmento do gene da proteína G do vírus rábico codificante para os aminoácidos da posição 179 a 281 (sem considerar o peptídeo sinal) foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir do plasmídeo pSG5r.gpT434. Este plasmídeo direciona a síntese de um fragmento truncado da proteína G do vírus rábico, cepa ERA, estando ausentes o domínio citoplasmático e o domínio transmembrana (XIANG et al., 1995).

A PCR foi realizada em uma mistura contendo 100 ng de DNA plasmidial (pSG5r.gpT434), 4 $\mu$ M de cada iniciador (ERA 179-281F e ERA 179-281R), 200 $\mu$ M de cada dNTP, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub> e 2,5 U de ULTRA *Taq DNA Polimerase* (MGM) em tampão de reação 1X. A reação foi realizada em um termociclador (MiniCycler PTC-150, MJ-Research/BioRad), consistindo de uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 5 min; seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 s, anelamento dos iniciadores a 50° C por 35 s e extensão a 72°C por 1 min; e uma extensão final a 72°C por 10 min.

### **3.6.3 Construção do vetor de expressão**

Para isolar somente o fragmento de DNA de interesse (336pb) amplificado por PCR, foi realizada a extração da banda correspondente ao fragmento a partir de um gel de agarose 1%, utilizando o *MinElute Gel Extraction Kit* (QIAGEN), conforme recomendações do fabricante, para purificação do inserto.

O fragmento de DNA obtido (inserto, 336pb) e o vetor de expressão pET14-b (Figura 5) foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Nde*I, por 15h a 37°C. Após a digestão o inserto e o vetor pET14-b foram submetidos à purificação, utilizando o kit *Concert™ Rapid PCR Purification System* (LIFE Technologies/Gibco BRL), conforme recomendações do fabricante.

O inserto e o vetor pET14-b foram então submetidos à reação de ligação realizada pela enzima T4 DNA *Ligase* (Promega), nas condições sugeridas pelo fabricante, por 1h a temperatura ambiente.

O fragmento de interesse foi inserido no vetor de expressão pET14-b após uma seqüência codificante para os seguintes aminoácidos: MGSSHHHHHSSGLVPRGSH. O plasmídeo recombinante, denominado pGERA179-281, foi utilizado para transformar bactérias DH5 $\alpha$  competentes.

Os clones contendo o inserto foram identificados a partir da PCR das colônias (conforme padronizada para amplificação do fragmento de interesse), sendo a confirmação e verificação da ligação correta da seqüência no vetor de expressão confirmada por meio do sequenciamento de DNA (MegaBACE™ 1000 DNA Analysis System, GE Healthcare) utilizando-se o kit *DYEnamic™ ET Dye Terminator* (GE Healthcare).

#### **3.6.4 Transformação de bactérias competentes**

As bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes (APÊNDICE A, p. 120) foram transformadas por choque térmico. Após a adição do plasmídeo recombinante (volume = 1  $\mu$ l) em uma alíquota de 150  $\mu$ l contendo as bactérias competentes em glicerol 20% v/v e CaCl<sub>2</sub> 0,1 M, a mistura foi mantida por 30 minutos em banho de gelo. As bactérias foram então colocadas em banho-maria a 42°C por 2 minutos e a seguir mantidas em banho de gelo por 2 minutos.

Após o procedimento de transformação, foram adicionados 600  $\mu$ l de meio LB (Luria-Bertani) líquido e realizada uma incubação por 1 h a 37°C, para o crescimento das bactérias.

Com o objetivo de selecionar as bactérias transformadas, as bactérias foram cultivadas em meio sólido (LB ágar) contendo ampicilina na concentração de 100 µg/ml, a 37°C por 15 h.

### **3.6.5 Expressão da rGERA179-281**

Com o objetivo de expressar o polipeptídeo rGERA179-281, bactérias *E. coli* Rosetta foram transformadas com o plasmídeo pGERA179-281. Foi realizado um pré-cultivo de 10 ml de meio Luria-Bertani líquido (LB Broth, Sigma) contendo 100 µg/ml de ampicilina e 30 µg/ml de cloranfenicol, a partir de uma colônia isolada da placa de LB ágar contendo bactérias transformadas. O pré-cultivo foi realizado a 37°C, por 15h, em uma incubadora com plataforma de agitação orbital (SHAKER modelo 430, Nova Ética, São Paulo) a 140 rpm.

Foi realizada então uma transferência de aproximadamente 5 ml do pré-cultivo para uma garrafa de cultura contendo 250 ml do mesmo meio. O crescimento bacteriano foi verificado por espectrofotometria até atingir a densidade óptica de 0,6-0,8 no comprimento de onda a 600 nm. Neste momento, foi retirada uma alíquota TO de 50 ml (tempo antes da indução da expressão), para verificação da expressão protéica basal. O cultivo então foi mantido em banho de gelo por 10 min seguido da adição de etanol P. A. a uma concentração final de 2% (v/v).

A cultura em fase logarítmica (D.O. <sub>600nm</sub> = 0,6-0,8) teve a expressão da rGERA-179-281 induzida pela adição de IPTG em uma concentração final de 0,5 mM, sendo o cultivo realizado a 25°C, 140 rpm, por 15h. Uma alíquota de 50ml foi retirada 4 h após a indução com o IPTG (T4).

As alíquotas de 50 ml (TO e T4) foram centrifugadas por 20 min. a 6000 g, na temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado bacteriano suspenso em 500µl de tampão fosfato (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, 10 mM imidazol; pH=8) contendo um coquetel de inibidores de protease (Complete, Mini, Boehringer-Mannheim). A amostra foi então submetida à sonicação (5 ciclos de 20 s).

As amostras foram então centrifugadas a 10000 g por 20 min a 4°C. O sobrenadante e o precipitado foram separados para análise por SDS-PAGE, sendo o precipitado suspenso em 1 ml de tampão fosfato contendo SDS (dodecil sulfato de sódio) em uma concentração final de 2%.

### ***3.6.6 Purificação da rGERA179-281***

Para expressão da rGERA179-281 destinada à purificação, foi realizado um cultivo de 11, nas condições descritas previamente. A proteína foi purificada da fração insolúvel, a partir dos corpos de inclusão, conforme o método descrito na Figura 7 (LUCAST et al., 2001; ESHAGHI et al., 2005; SAUER, 2006\*), por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados.

Primeiramente, a amostra contendo o cultivo (11) foi centrifugada a 6000 g por 25 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (fração insolúvel) foi suspenso em 50 ml em um tampão de lise desnaturante (Tris 10 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, cloreto de guanidina 6M, imidazol 10 mM; pH = 8,0). Em seguida foi realizada uma incubação em

---

\* Disponível em: <[http://openwetware.org/wiki/Sauer:Purification\\_of\\_Histagged\\_proteins/Denaturing\\_prep](http://openwetware.org/wiki/Sauer:Purification_of_Histagged_proteins/Denaturing_prep)>. Acesso em: 02 fev. 2007.

banho-maria a 65°C por 30 min, sendo a amostra homogeneizada periodicamente, para dissolução dos corpos de inclusão. A seguir, a amostra foi sonicada (10 ciclos de 60 s).

O material sonicado foi então centrifugado a 10000 g por 60 min a 4°C, para retirar os restos celulares, e o sobrenadante foi submetido à incubação por 45 min a 4°C com 4ml da resina de sepharose (*Chelating Sepharose Fast Flow*, GE Healthcare), previamente carregada com sulfato de cobre 0,1 M. A resina foi então centrifugada a 500 g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um outro recipiente e submetido à análise por SDS-PAGE 16%.

A seguir, foram realizadas as lavagens da resina e posteriormente a eluição da proteína de interesse, pela adição de imizadol 250 mM ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM; pH = 8,0), conforme observado na Figura 7. Após a adição de cada tampão, foi feita uma incubação por 5 min, sob homogeneização. Para separar a amostra da resina, entre cada etapa de troca e adição dos tampões, foi realizada uma centrifugação a 500 g por 5 min a 4°C.

Durante as etapas do processo, foram separadas alíquotas das lavagens e eluições obtidas, sendo submetidas à análise por SDS-PAGE 16% em condições desnaturantes (SHÄGGER; JAGOW, 1987).

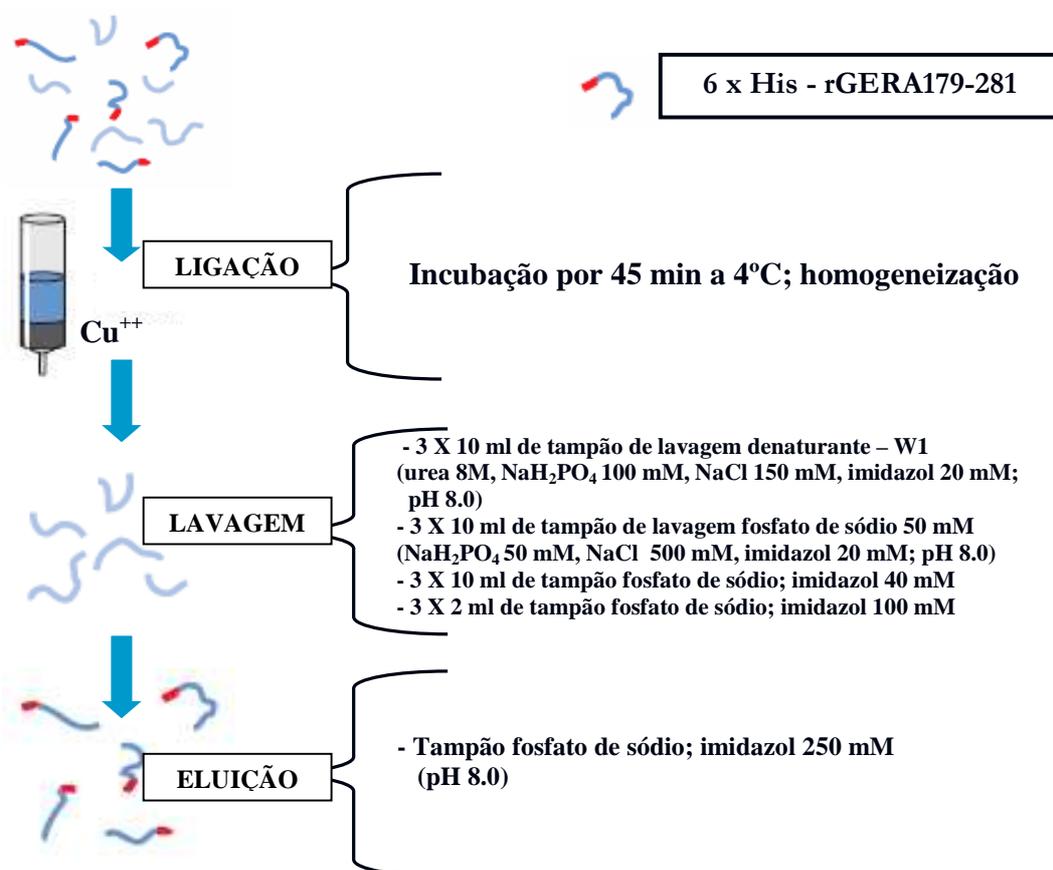


FIGURA 7 – Esquema das etapas de purificação da rGERA179-281 por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados. X = repetições; Em vermelho = representação das seis histidinas adicionadas à região N-terminal da rGERA179-281.

### 3.6.7 Eletroforese em géis de agarose e poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os plasmídeos extraídos de culturas bacterianas e os produtos de PCR foram submetidos a géis de agarose a 0,8% e 1,0%, respectivamente, preparados em tampão Tris-Borato-EDTA 0,5x (TBE: Tris-HCl 0,09M, ácido bórico 0,09M e EDTA 0,002M). Os géis foram corados com brometo de etídio (75  $\mu\text{g/ml}$ ) (Sigma) e fotodocumentados em

transiluminador Macrovue-UV20 (Hoefer) com câmera fotográfica digital (KODAK). Alíquotas de 3 µl de cada amostra foram misturadas a 3 µl de tampão amostra 2x (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol a 25%, ficoll a 15%, p/v em água ultrapurificada) e aplicadas no gel, sendo submetidas a uma voltagem de 100V por 45 min, em tampão de corrida TBE.

A expressão da rGERA179-284, assim como sua purificação, foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970), utilizando o sistema Mini-PROTEAN<sup>®</sup> 3 Cell (Bio-Rad). As amostras foram aplicadas em um gel de empilhamento de 4% de poliacrilamida e gel de resolução de 16% de poliacrilamida e submetidas à eletroforese com corrente elétrica de 20 mA por gel, por aproximadamente 3h. As bandas protéicas foram reveladas incubando-se os géis em solução corante contendo *Coomassie Brilliant Blue R-250* a 0,25% (Bio-Rad), dissolvidos em isopropanol a 50% e ácido acético a 10% v/v em água ultrapura. Uma solução contendo ácido acético a 10% e metanol a 45% v/v em água ultrapura foi utilizada para descorar os géis.

As amostras foram misturadas ao tampão amostra (*Laemmli Sample Buffer*, Bio-Rad) e submetidas a aquecimento a 100°C por 5 min, sendo posteriormente aplicadas no gel.

A massa molecular aparente da proteína de interesse foi estimada utilizando-se padrões de massa molecular conhecidos, na faixa de 6,4 a 198,6 kDa (*Prestained SDS-PAGE Standards - broad range*, Bio-Rad).

A determinação da concentração protéica foi realizada de acordo com o método descrito por Bradford (1976), utilizando-se o *kit Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad). A

concentração protéica foi estimada comparando-se a leitura da absorvância em espectrofotômetro a 595 nm de uma curva padrão de soro albumina bovina – BSA (Sigma) com a leitura das amostras, por análise através da regressão linear da equação da reta.

### **3.6.8 Espectrometria de massa**

Inicialmente uma digestão com tripsina (WESTERMEIER; NAVEN, 2002) foi realizada utilizando-se aproximadamente 5 µg da proteína, extraída da banda no gel de SDS-PAGE 16% correspondente à massa molecular aparente da mesma (14 kDa). A amostra resultante da digestão foi purificada com acetonitrila 60% e ácido trifluoroacético 0,1%. A amostra purificada (1 µl) foi misturada com 1 µl de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/ml) e submetida à análise por espectrometria de massa em um equipamento MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time-of-Flight*).

## **3.7 Ensaio de propriedades imunológicas da rGERA179-281**

### **3.7.1 Immunoblotting**

A amostra purificada foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 16%). Após a separação das bandas protéicas no gel foi realizada a transferência para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences), através do sistema Mini-PROTEAN<sup>®</sup> 3 Cell (BioRad), utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% v/v; pH= 8,3), durante 1h a 100V. Para verificação da transferência,

a membrana foi corada com Ponceau 0,5% (m/v) em ácido acético 0,1% (v/v) para visualização das bandas.

A membrana foi então incubada em uma solução de bloqueio contendo leite desnatado 5% (m/v) em PBS-T (PBS e Tween 20 0,1% v/v; pH= 7,2) por 1h a temperatura ambiente sob agitação leve e constante. Após esse período, a membrana foi lavada três vezes (5 minutos cada lavagem, sob homogeneização constante) com PBS-T contendo leite desnatado a 1% (m/v) e incubada por 1h com a imunoglobulina anti-rábica humana - HRIG (BayRab<sup>®</sup>, Bayer) (1:500) sob agitação leve e constante.

Ao término da incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes (5 min cada lavagem) com PBS-T. Uma segunda incubação foi realizada por 1h a temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-IgG humana conjugado com peroxidase (1:1000) (Sigma). Terminada a incubação, a membrana foi submetida à última etapa de lavagem com PBS-T antes da revelação com 3,3'- diaminobenzidina (DAB) e 0,1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sendo a revelação interrompida por lavagem da membrana com água destilada.

A banda específica correspondente à rGERA179-281 (14 kDa) foi analisada por comparação com marcadores de peso molecular (*Prestained SDS-PAGE Standards - broad range*, BioRad).

### ***3.7.2 Inibição da atividade neutralizante da HRIG***

A imunoglobulina anti-rábica humana – HRIG (BayRab<sup>®</sup>, Bayer) possui um título neutralizante de 150 UI/ml. O título neutralizante da HRIG foi determinado por meio do microteste simplificado de inibição da fluorescência (SFIMT) conforme o protocolo de

Favoretto et al. (1993). Inicialmente foram realizadas diluições seriadas da HRIG em meio DMEM-F12, em um volume final de 100  $\mu$ l. As diluições da HRIG (a partir de 1:400) foram então incubadas por 1h a 37°C com diluições seriadas da rGERA179-281 (concentrações no intervalo de 20  $\mu$ g/ml a 0,32  $\mu$ g/ml), em uma placa de 96 cavidades, conforme a Figura 8.

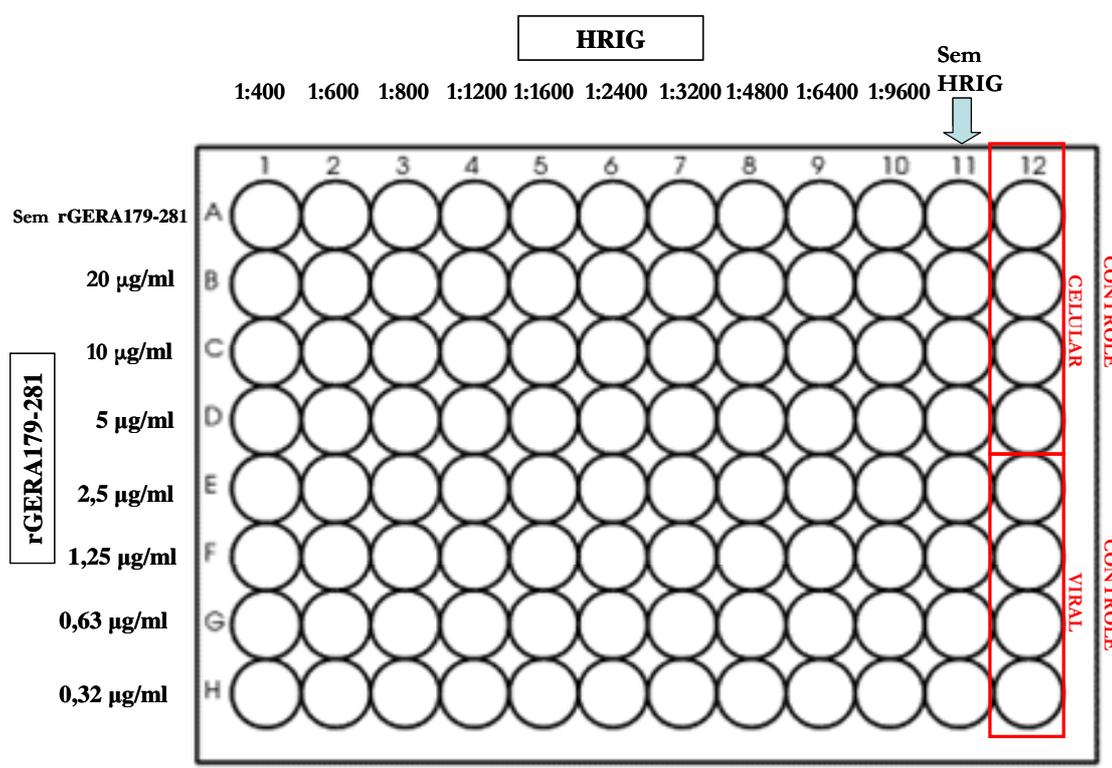


FIGURA 8 – Esquema do ensaio de inibição da atividade neutralizante da HRIG pela rGERA179-281. Colunas da placa (números 1 - 10) = diluições da HRIG; Linhas da placa (letras A - H) = concentrações da rGERA179-281 ( $\mu$ g/ml); Linha 1 = sem rGERA179-281; Coluna 11 = sem HRIG; Coluna 12 = controle celular e controle viral.

Em seguida foi adicionada a todas as cavidades da placa (exceto nos controles) uma quantidade previamente estabelecida de vírus rábico cepa PV suficiente para infectar 90-100% das células (50  $\mu$ l/cavidade) e a placa foi incubada a 37°C por 1h. Após a incubação,

50 µl de células BHK-21, contendo  $5 \times 10^4$  células, foram adicionados e a placa foi incubada por 18-24h a 37°C em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%.

O sobrenadante foi então descartado em hipoclorito 1% e as células aderidas, fixadas por 20 min com paraformaldeído (4% em H<sub>2</sub>O), submetidas à imunofluorescência indireta, conforme descrito no item 3.7.3. O sobrenadante de cultura de hibridomas murinos produzindo anticorpos IgG anti-rábicos\* foi utilizado como anticorpo primário, sendo adicionado 100 µl/cavidade, seguindo-se de incubação por 30 min a 37°C. Conjugado comercial anti-IgG murina-ITCF (Sigma), diluído a 1:200 em PBS contendo 0,02 µg/µl de Azul de Evans, foi utilizado como anticorpo secundário.

Para avaliar a capacidade da proteína recombinante em inibir a atividade neutralizante dos anticorpos presentes na HRIG, o título neutralizante (150 UI/ml) da HRIG foi comparado após a incubação com diferentes concentrações da rGERA179-281. A determinação do título neutralizante foi feita conforme descrito no item 3.7.4.

### ***3.7.3 Determinação do reconhecimento do vírus rábico na forma nativa pelos anticorpos induzidos pela rGERA179-281 por imunofluorescência indireta***

Para determinar se os anticorpos induzidos pela rGERA179-281 reconhecem o vírus rábico nativo, células N2A e BHK-21 foram previamente cultivadas até atingirem uma monocamada celular confluyente. O meio de cultivo foi então removido e as células lavadas duas vezes com PBS estéril, pH 7,2. Após tripsinização, o número de células foi determinado em câmaras citométricas Neubauer (OPTK-Labor) e a concentração foi

---

\* Produzido no Laboratório de Imunologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina.

ajustada para  $5 \times 10^4$  células/100  $\mu$ l. Alíquotas de 100  $\mu$ l desta suspensão celular foram transferidas para câmaras de cultura com 16 cavidades Labtek<sup>®</sup> (Nalgene Nunc International). Foi então adicionada às células uma quantidade previamente estabelecida de vírus rábico, cepa PV (50  $\mu$ l/poço). Após 24h de incubação em atmosfera de CO<sub>2</sub> 5% (v/v), o sobrenadante foi descartado em hipoclorito 1% e as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (100  $\mu$ l/cavidade) por 20 min a temperatura ambiente. O paraformaldeído foi então descartado e as células fixadas submetidas à etapa de lavagem (3 vezes, 5 minutos cada lavagem) utilizando-se PBS, seguindo-se de uma incubação com PBS contendo Triton X-100 a 0,25% (100  $\mu$ l/cavidade) por 20 min, para permeabilização da membrana celular. A seguir, foram adicionados os soros dos camundongos imunizados com a rGERA179-281 diluídos em PBS (volume final 50  $\mu$ l). Após incubação por 1h a 37°C, o sobrenadante foi descartado e uma etapa de lavagem com PBS-T (PBS-Tween 20 0,05% - 200  $\mu$ l/cavidade) foi realizada. O conjugado anti-IgG de camundongo-ITFC (Sigma, 1:200) foi adicionado, seguindo-se nova incubação por 1 h a 37°. Após uma etapa de lavagem com PBS-T 0,05%, a câmara foi seca, montada com glicerina tamponada com tampão carbonato/bicarbonato e os focos fluorescentes foram observados em microscópio de epifluorescência (Olympus BX40).

#### ***3.7.4 Determinação da capacidade neutralizante dos anticorpos induzidos pela rGERA179-281***

O título neutralizante do soro dos camundongos imunizados com a rGERA179-281

foi determinado pelo método de SFIMT (*Simplified Fluorescent Inhibition Microtest*), conforme Favoretto et al. (1993). Primeiramente, foi feita uma diluição seriada do soro obtido dos camundongos (volume final = 100 µl) em uma placa de 96 cavidades. Uma amostra contendo vírus rábico cepa PV suficiente para infectar 90-100% das células (determinada previamente) foi então adicionada (50 µl/cavidade) e a mistura submetida à incubação por 1h a 37°C. Após a incubação, 50 µl de células BHK-21/cavidade ( $5 \times 10^4$  células) foram distribuídas sobre a placa e a mistura então incubada por 18h-24h a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%. Após esse período, foi realizado um ensaio de imunofluorescência indireta (DEAN; ABELSETH; ATANASIU, 1996) conforme descrito no item 3.7.3.

O título obtido em cada soro expressa a maior diluição onde foi observada a inibição da infecção em aproximadamente 50% das células. A capacidade de inibição de infecção é diretamente proporcional à quantidade de anticorpos neutralizantes, ou seja, anticorpos anti-G.

Paralelamente, a imunoglobulina anti-rábica humana - HRIG (BayRab, Bayer), que possui um título neutralizante de 150 UI/ml, foi utilizada como soro padrão. A determinação dos títulos dos soros dos camundongos foi feita por meio da comparação dos resultados das diluições dos soros obtidos no teste com o resultado do soro padrão.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Amplificação do fragmento de interesse a partir do plasmídeo pSG5r.gpT434

O fragmento do gene da proteína G do vírus rábico codificante para os aminoácidos da posição 179 a 281 (sem considerar o peptídeo sinal) foi amplificado por PCR, a partir do plasmídeo pSG5r.gpT434.

A temperatura ideal de anelamento dos iniciadores foi de 50°C. A amplificação da região de interesse revelou um fragmento de aproximadamente 336 pb, condizente com o tamanho esperado (Figura 9, número 2).

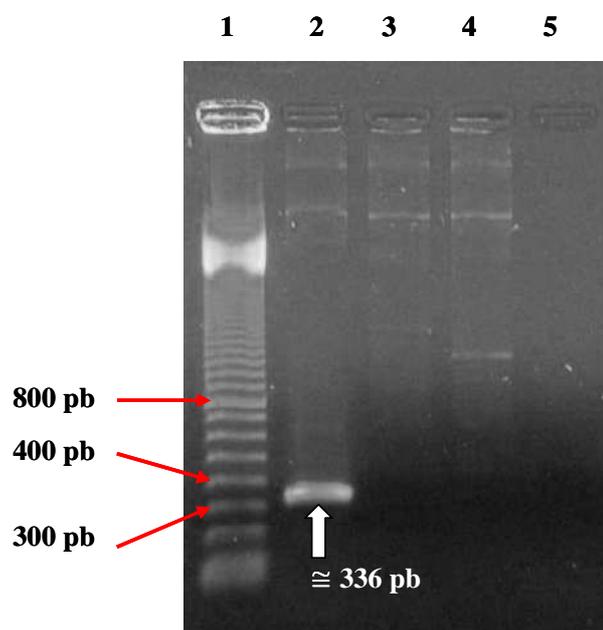


FIGURA 9 – Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, mostrando amplificação do fragmento de interesse (336 pb) pela PCR, a partir do plasmídeo pSG5r.gpT434. 1 = padrão de tamanho molecular (*100 Base-Pair Ladder*, GE Healthcare); 2 = amplificação do inserto; 3 = PCR realizada somente com um dos iniciadores, ERA 179-281F; 4 = PCR realizada somente com o iniciador ERA 179-281R; 5 = controle negativo (sem o plasmídeo pSG5r.gpT434).

Foram observadas no gel de agarose a 1% resultante da PCR para amplificação do inserto, bandas referentes a resquícios do plasmídeo pSG5r.gpT434 (Figura 9). Dessa forma, para isolar somente o fragmento de DNA de interesse amplificado (336pb), foi realizada a extração da banda correspondente ao fragmento a partir de um gel de agarose 1%, utilizando-se o *MinElute Gel Extraction Kit* (QIAGEN). Ao final do processo foram obtidas eluições contendo o inserto, que foram aplicadas em gel de agarose a 1%, para visualização (Figura 10).

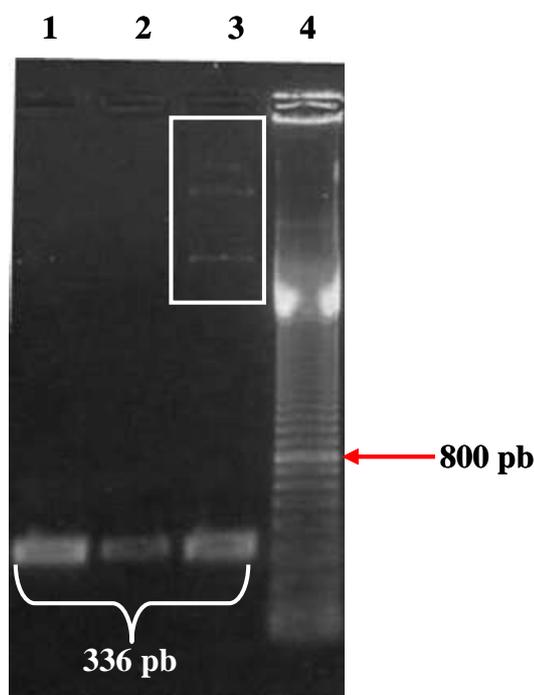


FIGURA 10 – Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, mostrando eluições da purificação do inserto por meio do *MinElute Gel Extraction Kit* (QIAGEN). 1 e 2 = primeira e segunda eluição, respectivamente, obtidas da purificação; 3 = controle positivo (fragmento amplificado por PCR antes da purificação, destacando-se a visualização de contaminação pelo plasmídeo pSG5r.gpT434); 4 = padrão de tamanho molecular (*100 Base-Pair Ladder*, GE Healthcare).

## 4.2 Clonagem, expressão, purificação e caracterização da rGERA179-281

### 4.2.1 Construção do vetor de expressão

O fragmento de DNA obtido (336 pb) e o vetor de expressão pET14-b foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Nde*I, por 15h a 37°C. Após a digestão, foram submetidos à purificação, utilizando o kit *Concert™ Rapid PCR Purification System* (LIFE Technologies/Gibco BRL), conforme recomendações do fabricante. As eluições obtidas do processo de purificação foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8% (Figura 11).

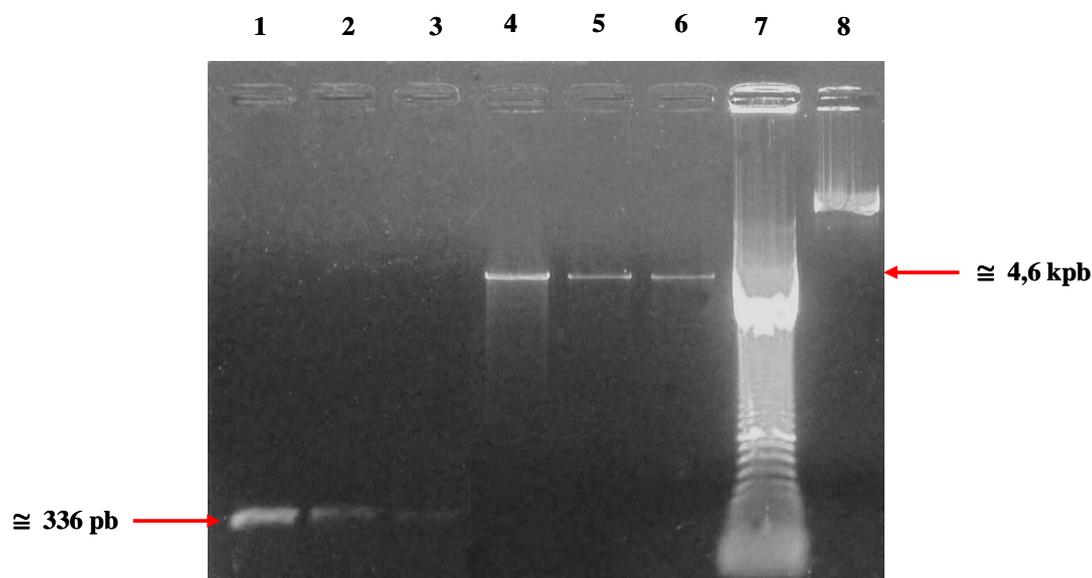


FIGURA 11 – Eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio, mostrando purificação do inserto e do plasmídeo pET14-b, após restrição com as enzimas *Bam*HI e *Nde*I utilizando-se o *Concert™ Rapid PCR Purification System*. 1, 2 e 3 = primeira, segunda e terceira eluições, respectivamente, da purificação do inserto após restrição; 4, 5 e 6 = primeira, segunda e terceira eluições, respectivamente, da purificação do plasmídeo pET14-b após restrição; 7 = padrão de tamanho molecular (*100 Base-Pair Ladder*, GE Healthcare); 8 = plasmídeo pET14-b antes da restrição.

A purificação teve como objetivo retirar contaminantes que pudessem interferir com a reação posterior de ligação do inserto ao plasmídeo. Dessa forma, a primeira eluição obtida da purificação, tanto do inserto, quanto do plasmídeo pET14-b (visualizadas na Figura 11, números 1 e 4, respectivamente), foram selecionadas para reação de ligação, utilizando-se a enzima T4 DNA ligase (Promega), nas condições sugeridas pelo fabricante, por 1h a temperatura ambiente.

Diferentes variações nas quantidades de inserto e plasmídeo foram utilizadas, com o objetivo de aumentar a possibilidade de se obterem clones contendo o inserto, após a transformação (tabela 2). Bactérias *E.coli* DH5 $\alpha$  foram então transformadas com o material resultante das reações de ligação realizadas conforme a tabela 2, obtendo-se 6 placas de Petri diferentes, contendo as colônias de bactérias transformadas.

TABELA 2 – Variações nas quantidades de inserto e plasmídeo (eluições da purificação após restrição) misturados na reação de ligação, para transformação de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

PLACAS	1	2	3	4	5	6*
Inserto	1,5 $\mu$ l	1 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	-
pET14-b	1,5 $\mu$ l	2 $\mu$ l	1 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	2,5 $\mu$ l	2,5 $\mu$ l
Tampão de ligação <sup>#</sup>	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l
T4 DNA Ligase <sup>##</sup>	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O ultra-purificada	-	-	-	-	-	0,5 $\mu$ l

<sup>#</sup> 2X Rapid Ligation Buffer (Promega)

<sup>##</sup> T4 DNA Ligase (Promega)

\* Placa controle não contendo inserto

Na placa controle (placa 6, sem inserto) foram observadas algumas colônias, provavelmente resultantes de contaminantes do plasmídeo pET14-b não digerido, presentes

na amostra utilizada para transformar as bactérias, ou pela auto-ligação do plasmídeo pela T4 DNA ligase. Entretanto, o número de colônias obtidas nas placas 2 e 3 foi bem maior ao da placa controle, sendo realizada a triagem por PCR de 10 colônias selecionadas aleatoriamente nas duas placas, para possível detecção do inserto. O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% (Figura 12).

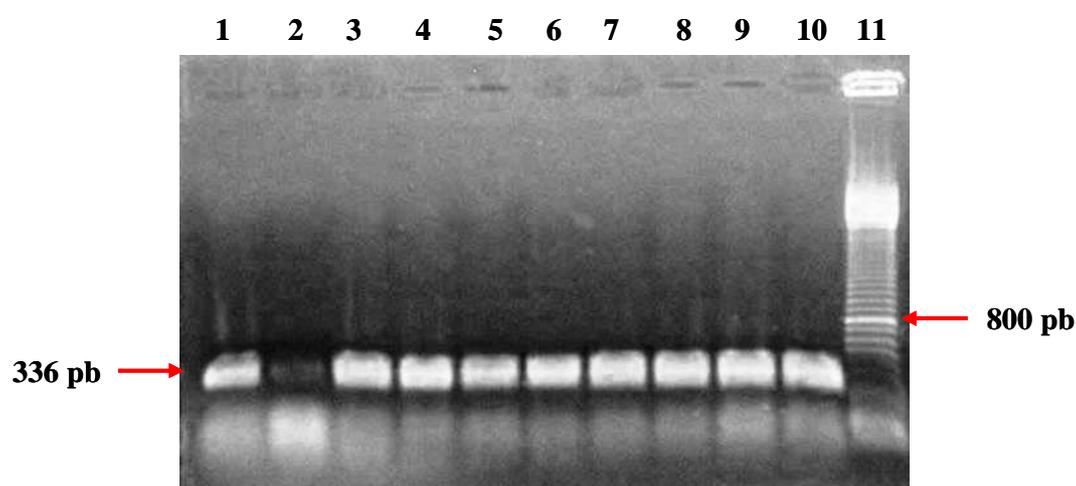


FIGURA 12 – Gel de agarose a 1,0% corado com brometo de etídio, para triagem, por PCR, das colônias resultantes da transformação com o plasmídeo pGERA179-281. 1 a 10 = número de identificação das colônias provenientes das placas 2 e 3; 11 = padrão de tamanho molecular (*100 Base-Pair Ladder*, GE Healthcare).

Das 10 colônias provenientes das placas 2 e 3 verificadas, somente uma (número 2, Figura 12) apresentou resultado de PCR negativo (posteriormente confirmado pela repetição da PCR), não apresentando o inserto. Paralelamente, foram realizadas PCRs a partir de colônias da placa controle e todas as colônias verificadas apresentaram resultado negativo, conforme o esperado.

Foram selecionados aleatoriamente dois clones contendo o inserto (colônias 9 e 10) para propagação e posterior extração e purificação dos plasmídeos recombinantes

utilizando-se o kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). Após a purificação, foi realizada a PCR a partir do produto obtido, sendo o produto amplificado submetido à eletroforese em gel de agarose a 1%, confirmando-se a presença do inserto nos plasmídeos recombinantes 9 e 10 (Figura 13).

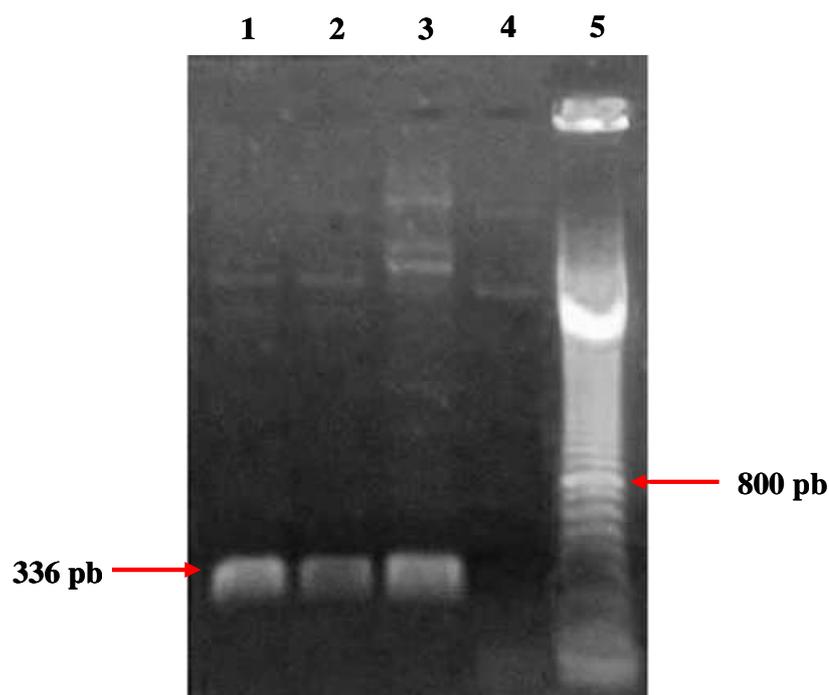


FIGURA 13 – Eletroforese em gel de agarose a 1,0 % corado com brometo de etídio, mostrando os produtos de PCR dos plasmídeos provenientes das colônias 9 e 10 (Fig.12), após purificação. 1 = produto da PCR do plasmídeo 9; 2 = produto da PCR do plasmídeo 10; 3 = fragmento de interesse amplificado (controle positivo); 4 = controle negativo (PCR a partir de uma colônia proveniente da placa 6, sem inserto); 5 = padrão de tamanho molecular (*100 Base-Pair Ladder*, GE Healthcare).

Para confirmação da ligação correta do inserto ao plasmídeo pET-14b, foi realizado o seqüenciamento de DNA dos plasmídeos 9 e 10 (Figura 14A), utilizando-se iniciadores específicos para o plasmídeo pET14-b (*upstream* e *downstream* ao sítio de clonagem; específicos para o promotor T7). A identidade da seqüência de nucleotídeos do fragmento

de DNA inserido no plasmídeo foi confirmada pela comparação com a seqüência correspondente a proteína G do vírus rábico cepa ERA, disponível no GenBank (Acesso nº. JO2293), observando-se uma similaridade de 100% (dados não mostrados). Como os dois plasmídeos obtidos (9 e 10) apresentaram a mesma seqüência de nucleotídeos no fragmento de DNA inserido, o plasmídeo recombinante 9 foi escolhido aleatoriamente para os ensaios de expressão, sendo denominado pGERA179-281.

#### **4.2.2 Expressão da rGERA179-281**

Inicialmente, diferentes linhagens de bactérias *Escherichia coli* competentes, como a BL21(DE3) (Novagen), BL21(DE3) pLysS (Novagen), BL-21 Códon Plus (Stratagene) e Rosetta (Novagen), foram transformadas para os ensaios de indução da expressão da rGERA179-281 em diferentes tempos (4h e 15h) e temperaturas de indução (15°C, 22°C, 30° e 37°C).

Nas linhagens BL21(DE3) (Novagen) e BL21(DE3) pLysS (Novagen) não foram observadas bandas de maior intensidade na região da massa molecular aparente da proteína (13,8 kDa) no gel de poliacrilamida a 16%, após a indução com IPTG (dados não mostrados).

Nas bactérias da linhagem Códon Plus e Rosetta pode-se observar uma banda característica na região de 14 kDa, correspondendo provavelmente a proteína de interesse, sendo que a linhagem de *E. coli* Rosetta apresentou a banda de maior intensidade correspondente a proteína (dados não mostrados). Essas duas linhagens de bactérias competentes são utilizadas para expressão de genes contendo códons raros, presentes em

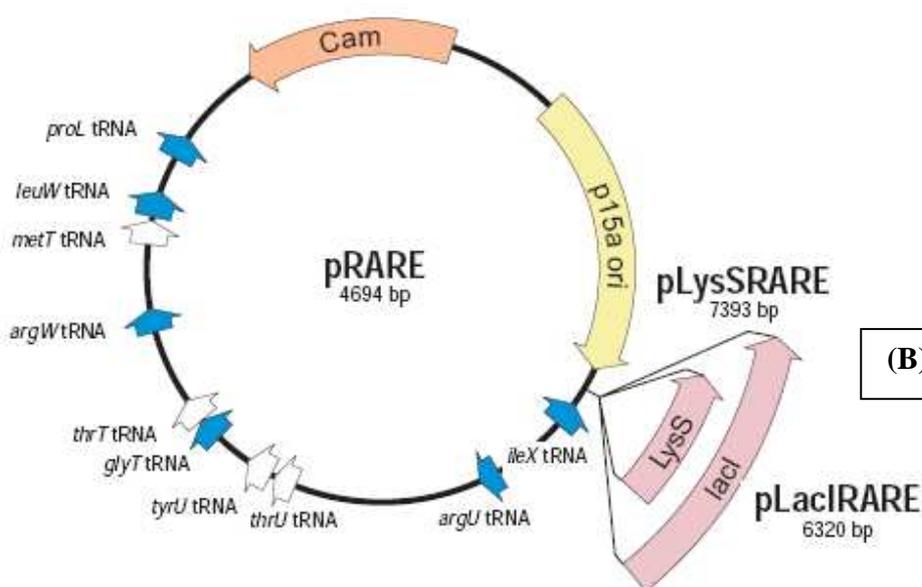
organismos eucarióticos. São códons para determinados aminoácidos, como arginina, glicina, isoleucina, leucina e prolina, cujo RNAt específico, possuindo o respectivo anti-códon, encontra-se ausente ou é raramente utilizado na tradução de proteínas em *E. coli* (KANE, 1995; NAKAMURA et al., 2000; NOVY et al., 2001).

Analisando a seqüência de nucleotídeos codificante para os resíduos 179-281 da proteína G do vírus rábico, cepa ERA, obtida pelo sequenciamento, foram verificados vários códons raros, mostrados na Figura 14.

A linhagem *E. coli* Rosetta possui os RNAts com anti-códons para todos os códons raros presentes na seqüência, enquanto que a BL21 Códon Plus não possui RNAt para o códon GGA, correspondente para o aminoácido glicina (Figura 14). Assim sendo, a linhagem de *E. coli* Rosetta (Novagen) foi selecionada para os ensaios de indução de expressão da rGERA179-281, sendo transformadas com o plasmídeo recombinante pGERA179-281.

ATGCCCGAGAATCCG**GAGACT**AGGGATGTCTTGTGACATTTTTAC  
 CAATAGT**AGAG**GGGAAG**AGAG**CATCCAAAGGGAGTGAGACTTG  
 CGGCTTTGTAGATGAAAGAGGGC**CTATATA**AGTCTTTAAA**GGAG**  
 CATGCAA**ACTCAAGTTATGT****GGAGTTCTAGGACTTAGACTTATG**  
 GAT**GGA**ACATGGGTCGCGATGCAAACATCAAATGAAACCAAAT  
 GGTGCCCT**CCCGATCAGTTGGTGAACCTGCACGACTTTCGCTC**  
 AGACGAAATTGAGCACCTTGTGTAGAGGAGTTGGTC**AGGAAG**  
 AGAGAGTGA

(A)



(B)

FIGURA 14 – (A) = Sequência de nucleotídeos codificante para os resíduos 179-281 da proteína G do vírus rábico cepa ERA presente no plasmídeo recombinante pGERA179-281, determinada por sequenciamento de DNA. Em negrito: códon raros, cuja linhagem BL21 Códon Plus e Rosetta possuem RNAs correspondentes; Em negrito e sublinhados: códon raros para os quais a linhagem Rosetta possui RNAt. (B) = Plasmídeo pRARE presente na *E. coli* Rosetta suprindo RNAs para os códon raros AUA, AGG, AGA, CUA, CCC e GGA.

FONTE – Adaptado de Novy et al. (2001).

O crescimento bacteriano foi verificado por espectrofotometria até atingir a densidade óptica de 0,6-0,8 no comprimento de onda a 600 nm, sendo nesse momento adicionado o IPTG em uma concentração final de 0,5 mM no meio de cultivo.

A indução da expressão na linhagem Rosetta foi testada nas temperaturas de 15°C (dados não mostrados), 30°C e 37°C, separando-se alíquotas da fração solúvel e insolúvel antes da adição do IPTG (T0), e nos tempos 2h (T2), 4h (T4) e 15h (T15) após a indução, para análise por SDS-PAGE 16%. Conforme mostrado na Figura 15, foi observada uma banda referente à massa molecular da proteína, na fração insolúvel, em todas as temperaturas e tempos analisados após a indução da expressão, pela adição do IPTG.

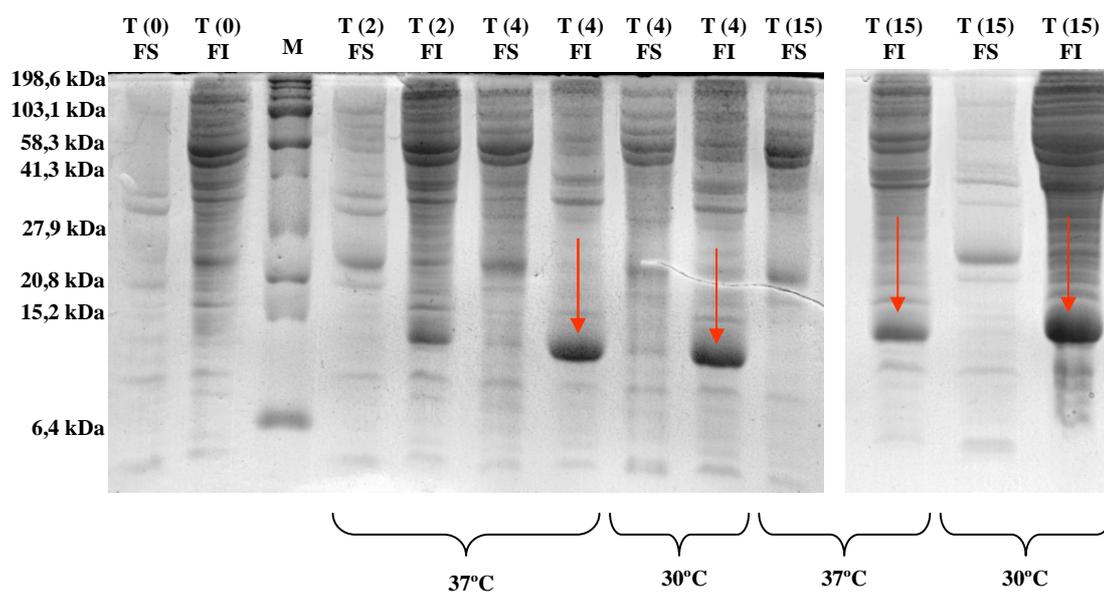


FIGURA 15 – Análise da indução da expressão da rGERA179-281 por SDS-PAGE 16% em diferentes tempos e temperaturas. FS = fração solúvel; FI = fração insolúvel; T(0) = antes da adição do IPTG; T(2), T(4) e T(15) = 2h, 4h e 15h, respectivamente, após indução da expressão pela adição do IPTG. Seta = banda protéica correspondente a massa molecular aparente da rGERA179-281, aproximadamente 13,8 kDa; M = padrão de massa molecular (*Prestained SDS-PAGE Standards - Broad Range*, Biorad).

Na tentativa de se obter a proteína na fração solúvel, um outro protocolo foi testado, baseado no estudo de Thomas & Baneyx (1997), sendo o cultivo mantido em banho de gelo por 10 min seguido da adição de etanol P.A. a uma concentração final de 2% (v/v), antes da adição do IPTG. As alíquotas T(0) e após 15h de indução a 25°C foram analisadas por SDS-PAGE 16%, conforme mostrado na Figura 16.

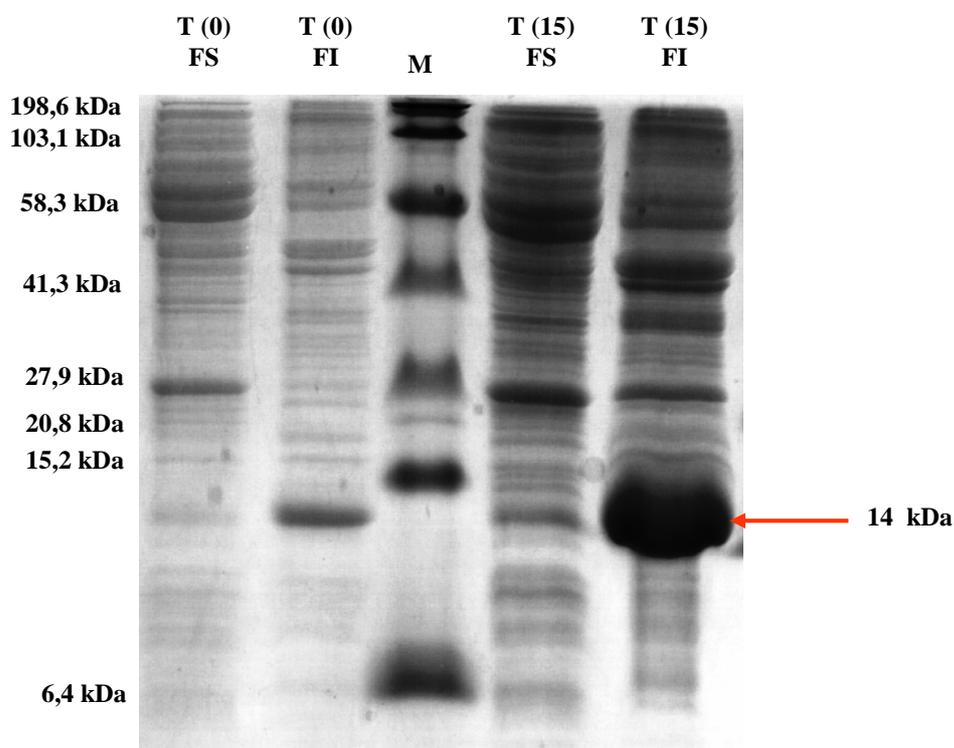


FIGURA 16 – Expressão da rGERA179-281 após 15h de indução com IPTG após adição de etanol a 2% v/v. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 16% em condições desnaturantes. M = padrão de massa molecular (*Prestained SDS-PAGE Standards - Broad Range*, Biorad); FS = fração solúvel; FI = fração insolúvel; T(0) = antes da indução com IPTG; T(15) = 15h após a indução da expressão.

Ao final do processo, foi verificada na fração insolúvel, após 15h de indução, uma banda de forte intensidade na região de 14 kDa (indicada pela seta, Figura 16), condizente a massa molecular aparente da rGERA179-281. Dessa forma, este ensaio de indução foi selecionado para expressão da proteína, sendo feito um cultivo de maior volume (11), para posterior purificação a partir da fração insolúvel.

#### ***4.2.3 Purificação da rGERA179-281***

A purificação da rGERA179-281 foi realizada pelo método de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados. Primeiramente, foram realizadas tentativas de imobilização da fração solúvel com a resina, em condições nativas, não se obtendo sucesso (dados não mostrados).

Devido à presença de grande quantidade da proteína na fração insolúvel, conforme observado na Figura 16, foi decidido purificar a proteína a partir dos corpos de inclusão, em condições desnaturantes.

As primeiras tentativas de purificação foram realizadas em condições desnaturantes, utilizando-se um gradiente de pH, conforme recomendações do fabricante (QIAGEN, 2003\*), sendo as lavagens em pH = 6,3 e as eluições da proteína em pH = 5,9 e 4,5.

Por SDS-PAGE 16% foi verificado a liberação da rGERA179-281 nas etapas de lavagem e a presença de várias bandas referentes às proteínas bacterianas na eluição da proteína de interesse. Além disso, grande parte da proteína permanecia imobilizada na

---

\* QIAGEN. The QIAexpressionist: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, p. 64-90, 2003.

resina, não sendo liberada na etapa de eluição por pH (dados não mostrados). Assim, decidiu-se realizar a eluição por meio de um gradiente de imidazol, que é um competidor da ligação aos íons metálicos e utilizado rotineiramente para eluição em processos de purificação em condições nativas, na tentativa de se liberar a proteína de interesse.

Foram realizadas várias lavagens com tampões contendo imidazol em baixas concentrações (20 mM, 40 mM, 80mM e 100mM). A seguir, a proteína foi eluída com imidazol 250 mM. As alíquotas resultantes de várias etapas do processo de purificação foram submetidas a SDS-PAGE 16% (Figura 17).

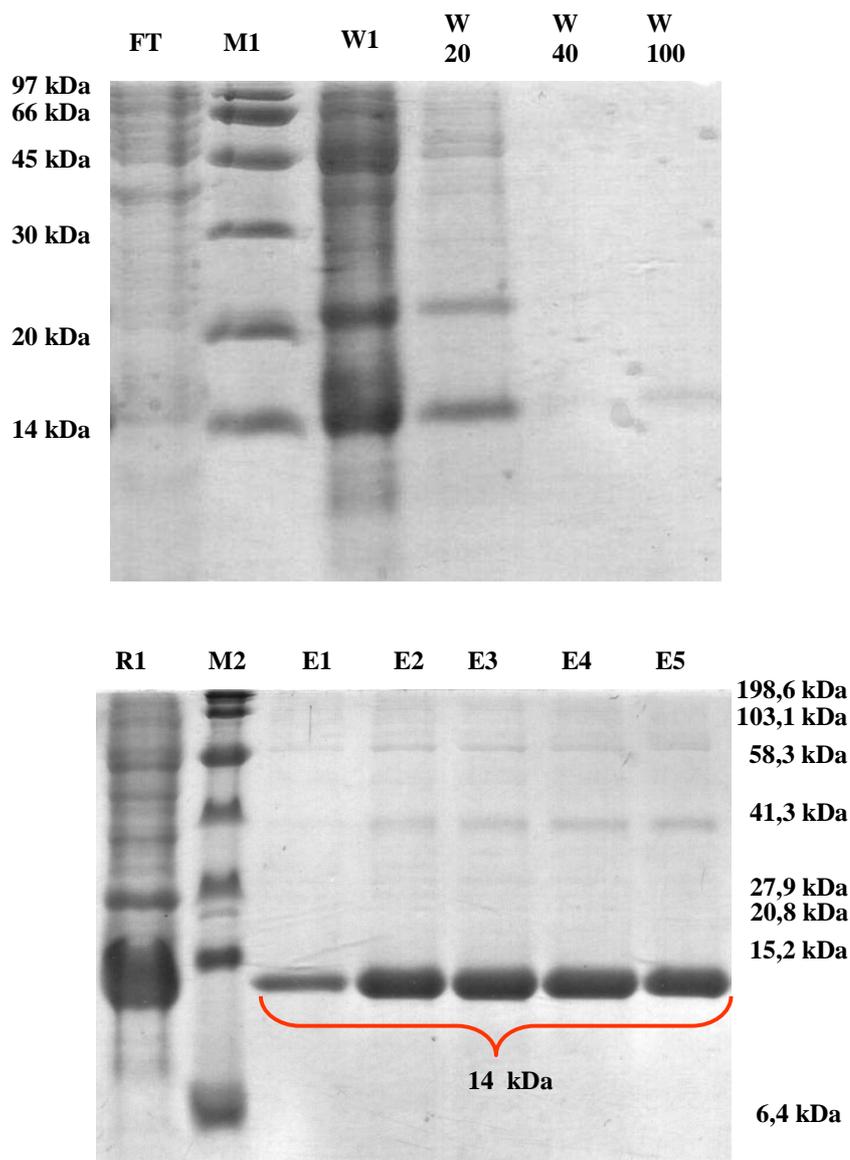


FIGURA 17 – Análise por SDS-PAGE 16% das etapas de purificação da rGERA179-281. FT = fração não aderida à resina; M1 e M2 = padrões de massa molecular (Biorad); W1 = etapa de lavagem com tampão desnaturante (urea 8M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM, NaCl 150 mM, imidazol 20 mM; pH 8.0); W20, W40, W100 = etapa de lavagem com a respectiva concentração (mM) de imidazol; R1 = extrato bacteriano aplicado a resina; E (1 a 5) = eluições da rGERA179-281 com imidazol 250 mM.

O rendimento protéico foi determinado pelo método de Bradford (1976), sendo de aproximadamente 16,2 mg de proteína/l de cultivo celular.

#### ***4.2.4 Caracterização da rGERA179-281 por espectrometria de massa***

A caracterização da proteína purificada foi determinada por espectrometria de massa (MALDI-TOF) da rGERA179-281 digerida por tripsina. A digestão por tripsina resultou em uma série de fragmentos cuja massa molar foi consistente com a estrutura primária da proteína, obtendo-se uma cobertura de 52% da seqüência protéica (Figura 18).

Para analisar a similaridade da seqüência de aminoácidos da rGERA179-281 com diferentes cepas de vírus rábico, foi realizado um alinhamento da seqüência (resíduos 179 a 281) da proteína G do vírus rábico cepa ERA com as principais cepas do vírus utilizadas na produção de vacinas para uso veterinário e humano (PV, HEP-Flury, CVS e PM) (WHO, 2004).

As seqüências utilizadas no alinhamento foram obtidas acessando a base de dados do GenBank\*. Todas as cepas apresentaram uma elevada similaridade com a cepa ERA na região da proteína G analisada. A cepa PV foi a que apresentou maior identidade (=98%), conforme mostrado na Figura 18.

---

\* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>

**N- terminal:** MGSSHHHHHSSGLVPRGSH

<b>Cepa</b>	<b>*****</b>
ERA	MPENPRLGMSCDIFTNSRGKRASKGSETCGFVDERGLYKSLKGACKLKLKCGVLGLRLMDG
PV	MPENPRLGMSCDIFTNSRGKRASKGSETCGFVDERGLYKSLKGACKLKLKCGVLGLRLMDG
HEP-Flury	MPENLRLGTSCDIFTNSRGKRASKGDKTCGFVDERGLYKSLKGACKLKLKCGVLGLRLMDG
CVS	MPENPRPRTPCDIFTNSRGKRASKGSETCGFVDERGLYKSLKGACKLKLKCGVLGLRLMDG
PM	MPENPRPRTPCDIFTNSRGKRASKGNKTCGFVDERGLYKSLKGACKLKLKCGVLGLRLMDG

	*	*****	<b>Identidade (%)</b>
ERA	TWVAMQTSNETKWCPDQLVNLHDFRSDEIEHLVVEELVRKRE		100
PV	TWVAMQTSNETKWCPGQLVNLHDFRSDEIEHLVVEELVKKRE		98
HEP-Flury	TWVAMQTSDETKWCPGQLVNLHDFRSDEIEHLVVEELVKKRE		91
CVS	TWVATQTSDETKWCPDQLVNLHDFRSDEIEHLVVEELVKKRE		88
PM	TWVAMQTSDETKWCPDQLVNLHDFRSDEIEHLVVEELVKKRE		91

FIGURA 18 – Alinhamento da seqüência dos resíduos 179-281 da proteína G do vírus rábico cepa ERA com diferentes cepas do vírus rábico. PV - Pasteur virus (acesso GenBank nº. M13215); HEP-Flury (acesso GenBank nº. AB085828); CVS (acesso GenBank nº. AJ506997); PM – Pitman Moore (acesso GenBank nº. AJ871962). Os resíduos idênticos são mostrados em cinza e o valor da identidade com a cepa ERA (acesso GenBank nº. JO2293) é indicado para cada seqüência alinhada. Os peptídeos identificados pela espectrometria de massa estão sublinhados. Os asteriscos indicam epítomos lineares previamente identificados (DIETZSCHOLD et al., 1990; HEIJDEN et al., 1993; LUO et al., 1997; MARISSSEN et al., 2005).

### 4.3 Ensaios de propriedades imunológicas da rGERA179-281

#### 4.3.1 Immunoblotting

Para avaliar a reatividade da rGERA179-281 com anticorpos induzidos pela vacina anti-rábica em indivíduos imunizados, a preparação comercial de imunoglobulina anti-rábica humana (HRIG – *Human Rabies Immune Globulin* – BayRab<sup>®</sup>, Bayer), foi utilizada como fonte de anticorpo primário no ensaio de *Immunoblotting*.

A padronização das condições ideais (diluição do anticorpo primário e secundário, tempo de incubação, tempo de bloqueio da membrana) foi realizada por meio de *Dot Blot* (dados não mostrados). A diluição ideal do anticorpo primário (HRIG) foi de 1:500 e do secundário (anti-IgG humana conjugada com peroxidase, Sigma) de 1:1000. Os anticorpos foram diluídos em PBS-Tween 0,1% contendo leite desnatado a 1%, este último adicionado em todas as etapas, para evitar ligações inespecíficas.

A HRIG claramente reagiu com a rGERA179-281, sendo observada uma banda com massa molecular aparente de 14 kDa na membrana de nitrocelulose, após revelação com DAB, na presença de peróxido de hidrogênio (Figura 19).

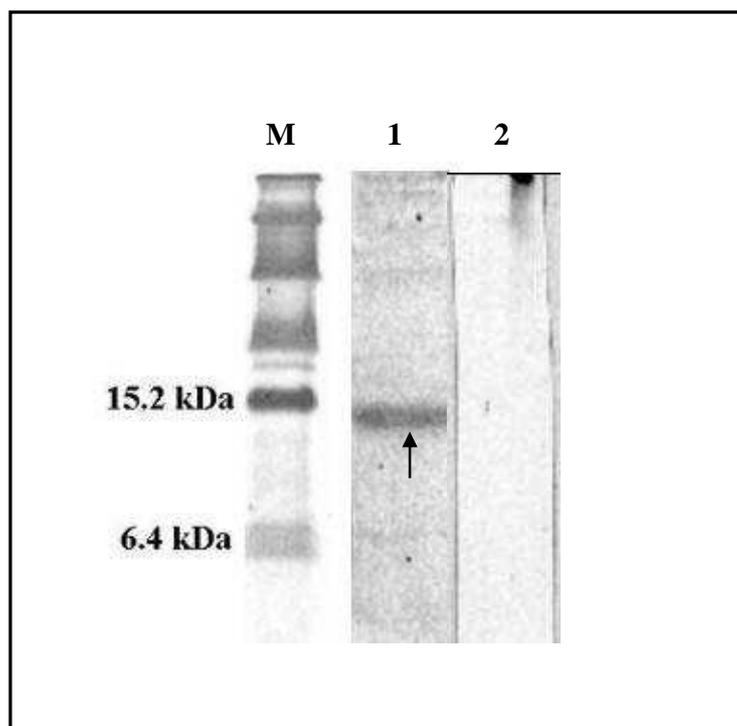


FIGURA 19 – Caracterização da rGERA179-281 por *Immunoblotting*. M = padrão de massa molecular (*Prestained SDS-PAGE Standards - Broad Range*, Biorad); 1 = imunoglobulina anti-rábica humana; 2 = soro controle negativo para raiva. Seta = imunodeteção da rGERA179-281 (13,8 kDa) pela HRIG.

#### 4.3.2 Inibição da atividade neutralizante da HRIG

Uma vez que a HRIG reconheceu a rGERA179-281 por *Immunoblotting*, tornou-se interessante investigar se os anticorpos reagentes com o fragmento recombinante teriam capacidade neutralizante para o vírus rábico.

Para essa determinação, a atividade neutralizante da HRIG foi avaliada na presença de diferentes quantidades de rGERA179-281, em um ensaio de inibição da neutralização. Foi avaliado, dessa forma, a capacidade desta proteína capturar os anticorpos neutralizantes para o vírus rábico, o que acarretaria numa diminuição na atividade neutralizante da HRIG.

Foi observado que a rGERA179-281 foi capaz de reduzir o título neutralizante da HRIG. Essa redução foi observada em todas as concentrações de rGERA179-281 testadas (Figura 20), sendo a maior redução (29%) com 10 µg/ml da proteína ( $p < 0,01$ ). É importante salientar que o título neutralizante da HRIG é 150 UI/ml e que a redução de 29% corresponde a uma redução de 43,5 UI/ml.

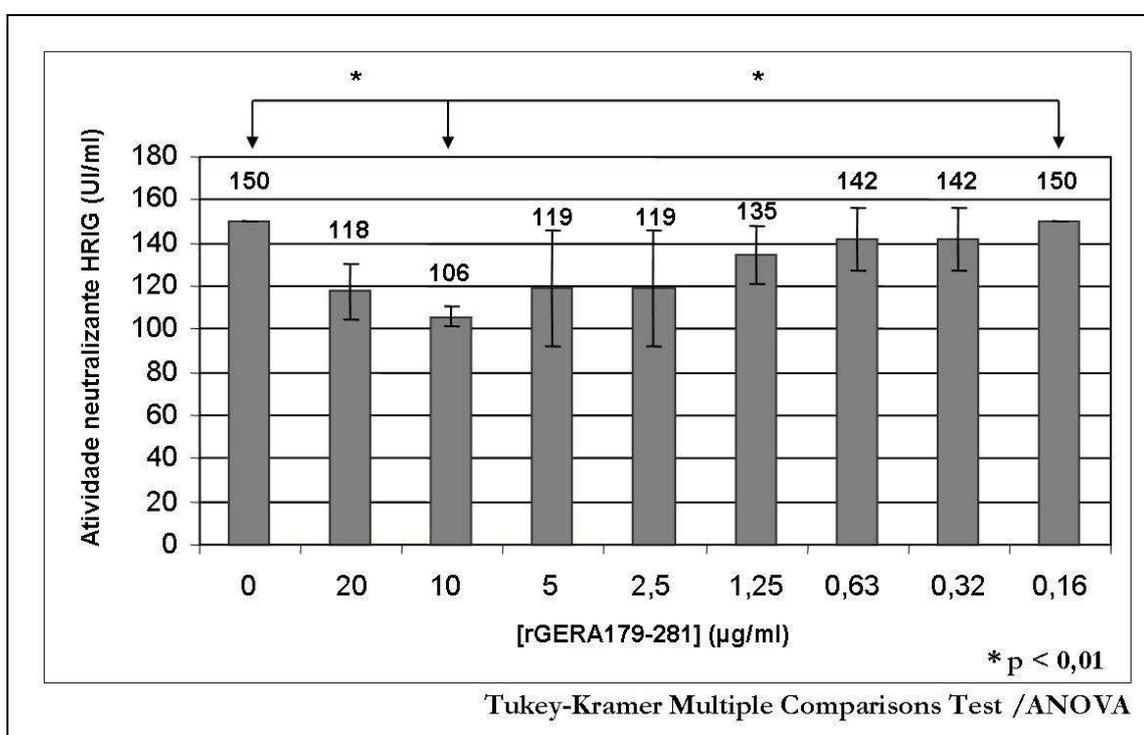


FIGURA 20 – Inibição da atividade neutralizante da HRIG pela rGERA179-281. Os títulos de anticorpos neutralizantes presentes na HRIG foram determinados pelo teste de SFIMT, na presença de diferentes concentrações (µg/ml) de rGERA179-281. Os dados correspondem à média de três experimentos independentes e as barras correspondem ao desvio padrão. Os asteriscos indicam significância estatística ( $* = p < 0,01$ ) pelo teste de Tukey-Kramer (*Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test*, ANOVA).

#### ***4.3.3 Determinação do reconhecimento do vírus rábico na forma nativa pelos anticorpos induzidos pela rGERA179-281 por imunofluorescência indireta***

Uma vez determinada a capacidade da rGERA179-281 em se ligar aos anticorpos presentes na HRIG (Fig. 19) e, sobretudo de se ligar à anticorpos neutralizantes, anti-G (Fig.20), decidiu-se verificar se a imunização de animais com rGERA179-281 tem a capacidade de induzir a formação de anticorpos capazes de se ligar à forma infecciosa do vírus rábico. Assim, camundongos Balb/c foram imunizados (conforme descrito em Materiais e Métodos no item 3.3) com a rGERA179-281, e uma semana após a 4<sup>a</sup> dose, foram coletadas amostras de soro e testadas pela reação de imunofluorescência indireta frente às células N2A e BHK-21 previamente infectadas com o vírus rábico cepa PV.

Conforme mostrado na Figura 21, focos fluorescentes correspondentes a grupos de células N2A infectadas com o vírus rábico foram detectados.

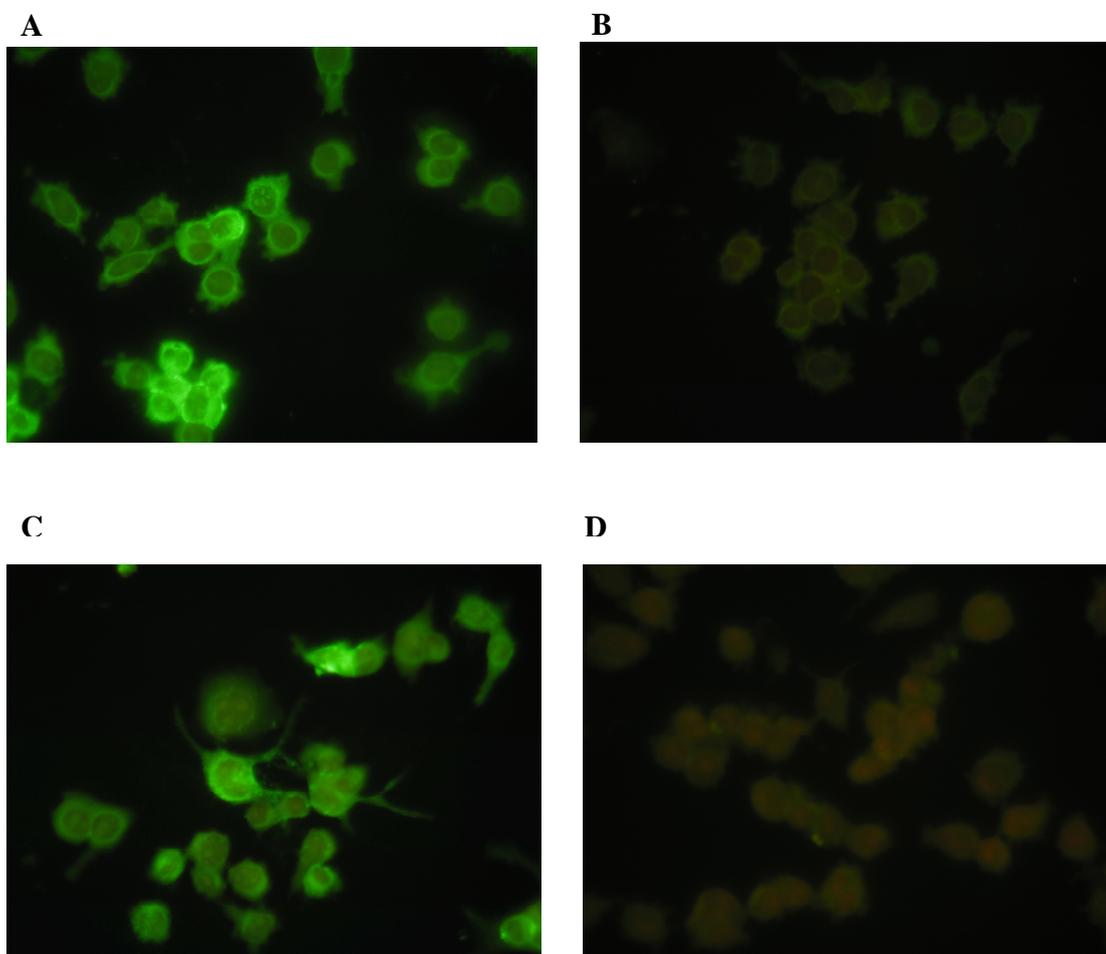


FIGURA 21 – Imunofluorescência indireta em células N2A infectadas com vírus rábico cepa PV. A = soro de camundongo imunizado com a rGERA179-281 (diluição 1:10); B = soro controle negativo (diluição 1:10); C = soro de camundongo imunizado com a rGERA179-281 (diluição 1:40); D = soro controle negativo (diluição 1:40). Células visualizadas em microscópio óptico de imunofluorescência (aumento de 400 X).

O mesmo procedimento foi realizado com células BHK-21 infectadas com o vírus rábico. O soro de camundongos imunizados com a rGERA179-281 reconheceu o vírus rábico na forma nativa, sendo observados focos fluorescentes na reação de

imunofluorescência indireta (Figura 22).

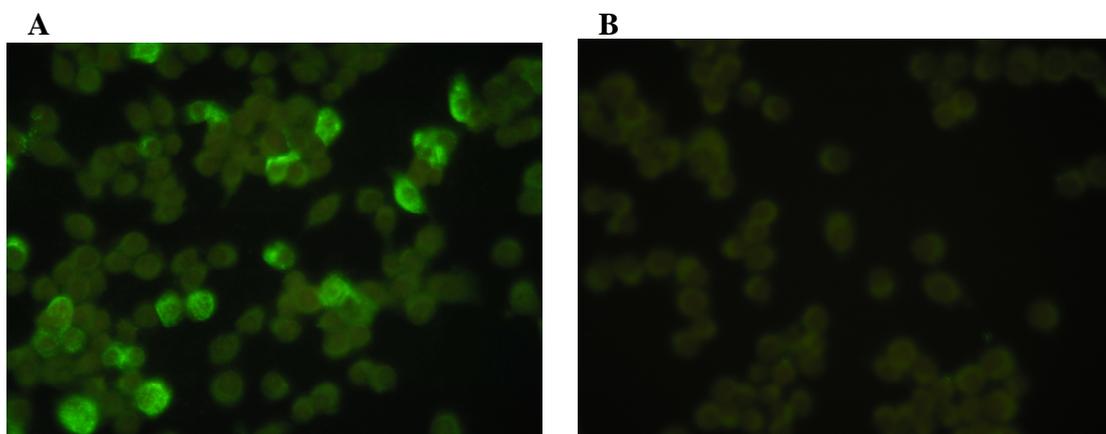


FIGURA 22 – Imunofluorescência indireta em células BHK-21 infectadas com vírus rábico cepa PV. A = soro de camundongo imunizado com a rGERA179-281 (diluição 1: 40); B = soro controle negativo (diluição 1:40). Células visualizadas em microscópio óptico de imunofluorescência (aumento de 400 X).

#### ***4.3.4 Determinação da capacidade neutralizante dos anticorpos induzidos pela rGERA179-281***

Para verificar se os anticorpos anti-rábicos presentes nos soros de camundongos imunizados com rGERA179-281, detectados previamente na reação de imunofluorescência indireta (Figuras 21 e 22), tinham capacidade neutralizante, estes mesmos soros foram analisados pelo método de SFIMT (*Simplified Fluorescent Inhibition Microtest*), conforme Favoretto et al. (1993), em que a capacidade de inibição de infecção celular é diretamente proporcional à quantidade de anticorpos neutralizantes.

A imunoglobulina anti-rábica humana - HRIG, que possui um título neutralizante

de 150 UI/ml, foi utilizada como soro padrão, para determinação dos títulos dos soros dos camundongos.

Os títulos obtidos (identificados pelas letras de A a J) são mostrados na Tabela 3. Os camundongos 1, 2 e 3 foram imunizados com 4 doses da rGERA179-281, administradas pela via i.p. em intervalos semanais. Uma semana após a 4<sup>a</sup> dose, amostras de soro foram coletadas (A, B e C; tabela 3). Em seguida os animais foram desafiados (via *foot-pad*) com o vírus rábico cepa PV, sendo novamente coletadas amostras de soro uma semana após o desafio (D, E e F).

Os camundongos 4 e 5 não foram imunizados com a rGERA179-281, sendo somente desafiados com o vírus rábico. Os camundongos 6 e 7 foram os controles negativos, não sendo imunizados com a rGERA179-281 e nem desafiados com o vírus.

TABELA 3 – Títulos dos soros dos camundongos determinados pela soroneutralização

SORO	ANIMAL IMUNIZADO	COLETA DE SORO	TÍTULO
A	camundongo 1	1 semana após a 4º dose rGERA179-281	0,08 UI/ml
B	camundongo 2	1 semana após a 4º dose rGERA179-281	0,12 UI/ml
C	camundongo 3	1 semana após a 4º dose da rGERA179-281	0,08 UI/ml
D	camundongo 1	1 semana após desafio com vírus rábico PV	> 10 UI/ml
E	camundongo 2	1 semana após desafio com vírus rábico PV	7,5 UI/ml
F	camundongo 3	1 semana após desafio com vírus rábico PV	> 10 UI/ml
G	camundongo 4 não imunizado	1 semana após desafio com vírus rábico PV	> 10 UI/ml
H	camundongo 5 não imunizado	1 semana após desafio com vírus rábico PV	> 10 UI/ml
I	camundongo 6 não imunizado nem desafiado	-	< 0,08 UI/ml
J	camundongo 7 não imunizado nem desafiado	-	< 0,08 UI/ml

Os camundongos imunizados com a rGERA179-281 (soros A, B e C) não apresentaram títulos neutralizantes. Uma semana após o desafio viral observou-se um aumento significativo nos títulos neutralizante (soros D, E e F). Porém, valores elevados de títulos neutralizantes também foram observados nos soros dos camundongos não imunizados com a rGERA179-281, uma semana após a inoculação viral (soros G e H).

Todos os camundongos, com exceção dos controles negativos, foram sacrificados para produção de anticorpos monoclonais anti-proteína G (projeto de mestrado em desenvolvimento no Laboratório de Imunologia Aplicada/UFSC).

Embora o número de animais imunizados tenha sido reduzido, foi interessante observar que os sintomas clínicos após o desafio viral eram nitidamente distintos entre os

animais imunizados com rGERA179-281 e nos animais controles não imunizados. Nos três primeiros, apesar de dois deles apresentaram paralisia nas patas traseiras, houve recuperação e não houve nenhuma morte. Já nos camundongos que foram desafiados com o vírus rábico sem prévia imunização, um morreu e o outro apresentava sintomas clássicos da doença como pelos eriçados e dificuldade séria de locomoção, sendo então sacrificado.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Clonagem, expressão, purificação e caracterização da rGERA179-281

A proteína G do vírus rábico é mediadora da ligação do vírus aos receptores celulares e entrada na célula do hospedeiro, sendo o único antígeno que induz anticorpos neutralizantes contra o vírus rábico (COX et al., 1977; COLL, 1995). Dessa forma, estudos estruturais e imunológicos desta proteína são de extrema importância, contribuindo para o desenvolvimento de diversas aplicações biotecnológicas, como produção de anticorpos monoclonais neutralizantes anti-G, produção de imunoglobulina anti-rábica para terapêutica, desenvolvimento de vacinas de subunidades e kits de diagnóstico.

Diferentes estudos, por meio da tecnologia do DNA-recombinante, possibilitaram a expressão da proteína G de diferentes cepas virais em células de mamíferos, células de inseto, plantas, leveduras e células bacterianas (YELVERTON et al., 1983; PREHAUD et al., 1989; SAKAMOTO et al., 1999; ASHRAF et al., 2005; YOKOMIZO et al., 2007).

A expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* é o método prevalente para obtenção de grandes quantidades de proteínas funcionais utilizadas em pesquisas, na área de biotecnologia e indústria farmacêutica. Embora a expressão de proteínas virais em células bacterianas possa ser considerada de baixo custo, sabe-se que proteínas glicosiladas podem raramente ser expressas em bactérias, devido à ausência de modificações pós-traducionais em *E. coli*, como a glicosilação. Esta limitação pode interferir na estrutura conformacional das proteínas recombinantes, principalmente nos sítios antigênicos

conformacionais.

No entanto, diferentes epítomos lineares foram identificados na região central do ectodomínio da proteína G (BUNSCHOTEN et al., 1989; DIETZSCHOLD et al., 1990; HEIJDEN et al., 1993; NI et al., 1995; LAFAY et al., 1996; LUO et al., 1997; MARISSEN et al., 2005).

Neste estudo foi realizada a expressão de um fragmento (resíduos 179-281) da proteína G do vírus rábico cepa ERA, denominado rGERA179-281, compreendendo uma região contendo epítomos lineares, conforme observado na Figura 18. Essa região contém somente um sítio de glicosilação no aminoácido na posição 247 (TORDO, 1996).

O fragmento de interesse foi amplificado por PCR, utilizando-se iniciadores específicos, a partir do plasmídeo pSG5r.gpT434, inserindo na seqüência amplificada sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI e *Nde*I. A clonagem utilizando duas enzimas de restrição diferentes (clonagem unidirecional) possui a vantagem de diminuir a probabilidade de auto-ligação do vetor de expressão e ligação do inserto em sentido contrário, por resultar em extremidades não-complementares no vetor, após a digestão. Esta estratégia aumenta a eficiência do processo comparada à utilização de uma única enzima.

O fragmento foi subclonado no vetor de expressão pET14-b após uma seqüência codificante para os seguintes resíduos de aminoácidos: MGSSHHHHHHHSSGLVPRGSH (sublinhado = seis histidinas na região N-terminal da proteína a ser expressa antes do sítio da trombina).

A inserção da seqüência correta do fragmento no vetor de expressão foi confirmada por sequenciamento de DNA, garantindo o sucesso da clonagem, obtendo-se o plasmídeo recombinante denominado pGERA179-281.

Quando um RNA mensageiro (RNAm) de um gene heterólogo é expresso em *E. coli*, diferenças no uso de códons desse microorganismo podem impedir a tradução. Isso ocorre devido a demanda por um ou mais RNAs transportadores (RNAt) que podem ser raros ou ausentes na bactéria, podendo ocasionar o término da tradução de forma prematura ou falha na incorporação correta dos aminoácidos durante a tradução (KANE, 1995; KURLAND; GALLANT, 1996).

Foram verificados 14 códons raros (13,5 % do total) na seqüência de nucleotídeos da rGERA179-281 obtida pelo sequenciamento de DNA. A linhagem de *E. coli* Rosetta (Novagen) foi escolhida para expressão da rGERA179-281, pois possui um plasmídeo de resistência ao cloranfenicol (*pRARE*), contendo genes de RNAts para vários códons raros.

Novy et al. (2001) analisaram a expressão de um ativador do plasminogênio tecidual humano mutante, denominado vtPA (358 aminoácidos; massa molecular de 40 kDa) contendo 32 códons raros (8,9 % do total), nas linhagens de *E. coli* BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS e Rosetta. A análise por SDS-PAGE do extrato celular total mostrou que a expressão do vtPA foi baixa, mas detectável em BL21(DE3) e não detectável em BL21(DE3)pLysS. Em contraste, a banda correspondente foi a de maior intensidade visualizada por SDS-PAGE, nas amostras provenientes da linhagem Rosetta.

A expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* pode frequentemente promover a formação de agregados insolúveis da proteína, denominados corpos de inclusão (VALLEJO; RINAS, 2004). Essa formação depende de uma série de fatores, tais como: a natureza intrínseca da proteína recombinante, a taxa de expressão protéica, a concentração celular de intermediários da proteína (enovelamento incompleto), a composição e o pH do

meio de cultivo, a temperatura de crescimento e a localização celular da proteína expressa (HOCKNEY, 1994; MARCO et al., 2005).

Neste estudo, foram testadas diferentes temperaturas de indução da expressão protéica na tentativa de obtenção da proteína na fase solúvel, mas em todas as temperaturas, a banda correspondente à proteína encontrava-se na fase insolúvel na análise por SDS-PAGE.

Um protocolo baseado em Thomas e Baneyx (1997) utilizando o resfriamento do cultivo e adição de etanol antes da indução pelo IPTG foi realizado. Quando a bactéria *E. coli* é sujeita ao estresse, incluindo variações de temperatura, exposição a solventes orgânicos e acúmulo de proteínas heterólogas, a síntese de proteínas de choque térmico (“heat-shock proteins – HSPs”) é aumentada na célula, com o objetivo de reparar danos celulares (NEIDHARDT; VANBOGELEN, 1987). Embora as funções celulares de muitas HSPs não tenham sido ainda definidas, algumas são conhecidas por sua atividade de protease ATP-dependente e chaperonas moleculares (GROSS, 1996). O etanol é um dos mais importantes indutores de HSPs em *E. coli*, podendo exercer um efeito benéfico para o enovelamento de proteínas heterólogas, pelo aumento na concentração de chaperonas moleculares (NEIDHARDT; VANBOGELEN, 1987; THOMAS; BANEYX, 1997).

Embora o etanol possa ser uma ferramenta importante para promover a solubilidade de certas proteínas recombinantes, o solvente pode também promover a agregação do polipeptídeo alvo, possuindo um efeito divergente. Tal efeito sugere que a influência benéfica do etanol depende do mecanismo de enovelamento da proteína heteróloga sob-expressa, devendo ser avaliada caso a caso (THOMAS; BANEYX, 1997).

A utilização do etanol no protocolo de indução da expressão da rGERA179-281 não levou a solubilização da proteína, sendo verificada uma banda de forte intensidade correspondente à proteína na fração insolúvel, na análise por SDS-PAGE (Figura 16). Dessa forma, foi decidido purificar a proteína a partir dos corpos de inclusão.

A presença de seis histidinas (que têm afinidade por íons metálicos) na região N-terminal da proteína possibilitou a utilização da cromatografia de afinidade por íons metálicos ( $\text{Cu}^{+2}$ ) imobilizados, simplificando o processo de purificação. Esse método, em que íons metálicos como  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ , ou  $\text{Ni}^{+2}$  são imobilizados a uma matriz, é utilizado para purificação de uma imensa variedade de proteínas e peptídeos contendo cauda de histidinas (“his-tag”) (SULKOWSKI, 1985).

Os resíduos de histidina tem um pKa de aproximadamente 6,0 e tornam-se protonados se o pH é reduzido (pH 4,5 a 5,3). Dessa forma a proteína pode ser eluída por um gradiente de pH em condições desnaturantes.

Uma outra maneira de eluir a proteína de interesse é pela utilização do imidazol, análogo da histidina, que é um competidor de ligação aos íons metálicos. Quando a concentração de imidazol é aumentada (100 mM - 250 mM), a proteína de interesse se dissocia dos íons metálicos, desligando-se da resina. Dessa forma, a etapa de eluição pode ser realizada utilizando-se um gradiente de concentração de imidazol.

Para solubilização dos corpos de inclusão foi utilizado o cloreto de guanidina 6M, um forte agente desnaturante. A eluição da rGERA179-281 foi realizada utilizando-se um gradiente de imidazol, sendo a proteína eluída em um tampão fosfato de sódio (pH=8) contendo imidazol a 250 mM. Esse método resultou em eluições mais puras da rGERA179-281 (menor número de bandas protéicas inespecíficas), quando comparadas as eluições por

um gradiente de pH.

As proteínas purificadas em condições desnaturantes podem ser usadas diretamente ou, para fins específicos, serem renaturadas e sofrerem o enovelamento novamente, para assumirem suas estruturas conformacionais. O enovelamento e renaturação da proteína purificada podem ser realizados na própria coluna antes da eluição com a proteína ainda imobilizada (HOLZINGER et al., 1996) ou em solução, por diálise (ESHAGHI et al., 2005).

Como a rGERA179-281 é um fragmento da proteína G do vírus rábico, contendo somente uma região da proteína, o enovelamento após a purificação não foi realizado. Além disso, o interesse nessa região era referente aos epítomos lineares, ou seja, não-conformacionais. Porém, no decorrer das etapas do protocolo utilizado para purificação, durante a troca para os tampões de lavagem não contendo uréia, os processos de renaturação e enovelamento possivelmente tenham ocorrido enquanto a proteína ainda estava imobilizada na resina.

A determinação da concentração protéica foi realizada de acordo com o método descrito por Bradford (1976). Foi obtido um bom rendimento protéico ao final do processo de purificação: 16,2 mg/l de cultivo celular. O rendimento obtido na purificação de proteínas ligadas a histidina a partir de corpos de inclusão geralmente é maior quando comparado à purificação em condições nativas. Durante o processo de desnaturação as histidinas são completamente expostas, facilitando a ligação da proteína aos íons metálicos, possibilitando assim uma maior recuperação da proteína de interesse.

A identidade da rGERA179-281 foi determinada por meio da espectrometria de massa. A digestão trípica resultou em uma série de fragmentos cuja massa molar

experimental foi determinada. Vários desses fragmentos foram encontrados na seqüência primária da proteína, obtendo-se uma cobertura de 52% (Figura 18), confirmando a identidade da proteína obtida.

Por meio do alinhamento da seqüência primária de aminoácidos da rGERA179-281 (cepa ERA, acesso nº JO2293, GenBank) com diferentes cepas do vírus rábico, foi observada uma elevada similaridade entre os resíduos 179-281 da proteína G, inclusive na região dos epítomos lineares previamente identificados por Dietzschold et al. (1990), Heijden et al. (1993), Luo et al. (1997) e Marissen et al. (2005). Esse resultado é importante para possível utilização da rGERA179-281 na padronização de testes diagnósticos, sendo que as cepas analisadas foram as principais cepas do vírus rábico utilizadas na produção de vacinas para uso humano e veterinário. Dessa forma, devido à elevada similaridade, é maior a possibilidade de um anticorpo induzido contra uma vacina produzida a partir de outra cepa viral, reconhecer a rGERA179-281.

## 5.2 Ensaio de propriedades imunológicas da rGERA179-281

A capacidade dos anticorpos anti-rábicos totais, induzidos pela vacina anti-rábica em indivíduos imunizados em reconhecer a rGERA179-281 foi avaliada por *immunoblotting*. Para isso, foi utilizada a preparação de imunoglobulina anti-rábica humana – HRIG (*Human Rabies Immune Globulin – BayRab®*, Bayer).

A HRIG é produzida a partir do plasma de doadores humanos imunizados com a vacina anti-rábica, sendo utilizada na profilaxia de pós-exposição ao vírus. Além disso, a HRIG é utilizada como soro padrão na metodologia de SFIMT (FAVORETTO et al., 1993) para determinação do título de anticorpos neutralizantes no soro de animais humanos e não humanos imunizados.

Neste estudo, a HRIG mostrou uma significativa reatividade com a rGERA179-281, conforme demonstrado na Figura 19. Esse resultado sugere que epítomos lineares presentes na proteína G previamente identificados (DIETZSCHOLD et al., 1990; HEIJDEN et al., 1993; LUO et al., 1997; MARISSSEN et al., 2005) e conservados entre diferentes cepas do vírus rábico, são provavelmente também reconhecidos pela HRIG.

Embora não especificado na ficha técnica da HRIG, com qual cepa vacinal os doadores foram imunizados, é razoável presumir que os indivíduos vacinados, cujos soros foram utilizados para preparação da HRIG, tenham sido imunizados com as cepas PM (Pitman Moore) ou PV (Pasteur virus). Estas cepas são as mais empregadas na produção de vacinas para uso humano (NICHOLSON, 1996), enquanto a cepa ERA é utilizada em vários países para produção de vacinas atenuadas para uso veterinário (WHO, 2004). Conforme o esperado, devido ao alto grau de similaridade dessa região (resíduos 179-281)

entre as principais cepas utilizadas na produção de vacinas, o reconhecimento da rGERA179-281 pela HRIG, confirma que epítomos lineares presentes na proteína desnaturada (cepa ERA) são reconhecidos por anticorpos induzidos por outras cepas virais.

Em um estudo para investigar a resposta imune à vacinação anti-rábica em cães e coelhos, Johnson et al. (2002) expressaram em *Escherichia coli* quatro fragmentos da proteína G do vírus rábico cepa PV: resíduos 1-128, 123-227, 222-332 e 327-443. Os animais foram imunizados com a vacina Rabisin (Merial Animal Health), produzida a partir da cepa do vírus rábico inativado Wistar G. S. 57. A resposta dominante dos anticorpos induzidos pela vacina foi verificada por meio de *immunoblotting*, utilizando-se os fragmentos da proteína desnaturados. A resposta foi predominantemente direcionada a sítios não-conformacionais da região entre os resíduos alanina-222 e valina-332 (cepa PV).

Vale ressaltar que no presente estudo a cepa PV foi a que apresentou maior identidade com a cepa ERA (=98%), na análise do alinhamento da seqüência de aminoácidos da rGERA179-281 com outras cepas virais (Figura 17).

Com o objetivo de investigar se os anticorpos que reagiram contra a rGERA179-281 no *immunoblotting* eram capazes de neutralizar o vírus rábico, foi realizado um ensaio de inibição da atividade neutralizante. Conforme mostrado na Figura 19, quando diferentes concentrações da rGERA179-281 foram simultaneamente incubadas com a HRIG, pode-se observar uma redução mensurável da atividade neutralizante. Dessa forma, anticorpos neutralizantes presentes na HRIG foram capturados pela rGERA179-281, levando a diminuição do título neutralizante da HRIG.

A maior queda do título neutralizante (29% = 43,5 UI/ml) foi observada na concentração de 10µg/ml da rGERA179-281, ocorrendo um aumento progressivo no título

neutralizante, conforme a diminuição na concentração da proteína. No estudo de Johnson et al. (2002), também foi realizado um ensaio de competição utilizando-se o soro de coelhos e cães imunizados e o fragmento recombinante entre os aminoácidos 222 e 322 da cepa PV do vírus rábico, expresso em *E. coli*. A redução no título neutralizante do soro de coelho foi de 42,4% e no soro de cão 24%. Essa região expressa por Johnson et al. (2002), assim como a rGERA179-281, compreendem os epítomos lineares previamente identificados por Dietzschold et al. (1990), Heijden et al. (1993), Luo et al. (1997) e Marissen et al. (2005).

Com o objetivo de produzir imunoglobulina anti-rábica em ovos (IgY), galinhas poedeiras foram imunizadas por Motoi et al. (2005) com um fragmento da proteína G do vírus rábico cepa CVS-11, entre os aminoácidos 201 a 300, expressa em *E. coli*. O título neutralizante dos anticorpos induzidos pelo fragmento foi de 9,9 UI/ml. Foi realizado um ensaio de competição da atividade neutralizante, incubando-se os anticorpos purificados com um peptídeo sintético correspondendo a um epítomo linear, identificado por Heijden et al. (1993), entre os aminoácidos 260 a 267 (LHDFRSDE). Após a adição de 10-20 µg/ml do peptídeo LHDFRSDE na reação, foi observada uma diminuição da atividade neutralizante do soro em aproximadamente 80% (MOTOI et al., 2005). Este epítomo linear está presente na seqüência primária da rGERA179-281, conforme destacado na Figura 17.

Como as características de antigenicidade (capacidade de um antígeno ser reconhecido por anticorpos específicos) nem sempre são coincidentes com as características de imunogenicidade (capacidade de um antígeno induzir uma resposta imune completa) (ABBAS; LICHTMAN, 2007), o passo seguinte deste estudo foi verificar se a rGERA179-281 era capaz de induzir anticorpos capazes de reconhecer a forma infecciosa do vírus rábico. Assim, amostras de soro de camundongos imunizados com rGERA179-281 foram

testados por meio da reação de imunofluorescência indireta. Tanto em células N2A como BHK-21 infectadas com o vírus rábico cepa PV pode-se observar antígenos virais fluorescentes, sugerindo que anticorpos anti-rGERA179-281 ligaram-se a proteína G nativa do vírus rábico.

De forma semelhante, os anticorpos produzidos em ovos de galinha por Motoi et al. (2005) contra a região 201-300 da cepa CVS-11 expressa em *E. coli* foram capazes de reconhecer células N2A infectadas com o vírus rábico, por imunofluorescência indireta.

Atualmente, as vacinas anti-rábicas disponíveis para uso humano e veterinário são produzidas a partir de vírus inativado, produzido em cérebro de animais e em cultura de células. A vacina produzida em cultura de células apresenta uma melhor eficácia e segurança comparada à produzida em cérebros de animais infectados. Porém, apresentam um custo elevado para suprir o uso profilático em países em desenvolvimento, além de oferecer riscos biológicos devido ao manuseio de grande quantidade de vírus no processo de produção. Conseqüentemente tem-se procurado intensivamente desenvolver novos tipos de vacina anti-rábica de baixo custo, apresentando eficácia e segurança, evitando a manipulação de material infeccioso (SAKAMOTO et al., 1999; MORIMOTO et al., 2001).

A engenharia genética, por possibilitar a clonagem de genes virais em organismos procarióticos e eucarióticos, representa uma forma promissora de desenvolvimento de novas vacinas anti-rábicas. Devido à propriedade de uma única proteína viral, a proteína G, ser capaz de induzir imunidade protetora em animais, diversos estudos de obtenção da proteína em diferentes sistemas de expressão, para desenvolvimento de uma nova vacina, foram realizados nos últimos anos (YELVERTON et al., 1983; PREHAUD et al., 1989; SAKAMOTO et al., 1999; ASHRAF et al., 2005; YOKOMIZO et al., 2007).

Neste estudo, para avaliar a capacidade de indução de anticorpos neutralizantes pela rGERA179-281, foram determinados os títulos neutralizantes do soro dos camundongos imunizados com a proteína recombinante, pelo método de SFIMT (FAVORETTO et al., 1993). Não foi verificada indução de títulos neutralizantes acima de 0,5 UI/ml, valor recomendado pela OMS como indício de proteção (WHO, 2004).

Em outros estudos, análogos da proteína G obtidos pela expressão da sequência completa de aminoácidos em *E. coli*, também não mostraram a atividade protetora esperada, embora as proteínas obtidas tenham sido reconhecidas pelo anti-soro contra a proteína G do vírus na forma nativa (LATHE et al., 1984; MALEK et al., 1984). Provavelmente isso tenha ocorrido pela ausência de modificação pós-traducional apropriada (glicosilação, por exemplo) em *E. coli* (YELVERTON et al., 1983).

Duas formas análogas glicosiladas da proteína G foram produzidas em leveduras, uma correspondendo a proteína inteira, denominada yGI (66 kDa) e outra sem a porção C-terminal, denominada yGII (56 kDa). A forma yGI reagiu com anticorpo anti-G policlonal, mas não com anticorpo monoclonal anti-G específico para um epítipo conformacional, enquanto a yGII foi normalmente reconhecida pelos dois anticorpos. Quanto as propriedades imunogênicas, yGII induziu imunidade protetora em porcos, enquanto a yGI não apresentou essa propriedade em porcos e camundongos (SAKAMOTO et al, 1999).

Recentemente, porém, baseados na identificação de epítopos lineares na região central do ectodomínio da proteína G, Motoi et al. (2005) expressaram a região compreendida entre os aminoácidos 201 a 300 da cepa CVS-11 em *E. coli*. A imunização de galinhas com este fragmento induziu a formação de anticorpos neutralizantes. Os anticorpos purificados a partir da gema dos ovos conferiram proteção a camundongos,

quando administrados logo após o desafio viral. A cepa CVS-11 apresenta potencial sítio de glicosilação no aminoácido na posição 204.

A rGERA179-281, proveniente da cepa ERA, possui um potencial sítio de glicosilação no aminoácido na posição 247 e seriam necessários estudos específicos para se verificar a importância da glicosilação nessa região para a imunogenicidade deste fragmento recombinante.

Uma observação interessante no decorrer deste estudo foi a diferença de sintomas clínicos observados entre os camundongos imunizados com a rGERA179-281 e os controles negativos após o desafio viral, embora o ensaio tenha envolvido poucos animais e não tenha sido realizado para este fim específico. Os três camundongos imunizados com a rGERA179-281 não morreram após o desafio viral, o que permite vislumbrar a utilização desta proteína recombinante como antígeno vacinal. Ensaio empregando diferentes concentrações, vias de inoculação, número e intervalos entre as doses e adição de adjuvantes, poderiam levar a indução de anticorpos neutralizantes, não observados neste estudo.

Em adição aos anticorpos neutralizantes, considerados os maiores efetores da resposta imune contra a raiva (COX et al., 1977), células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> específicos para antígenos do vírus rábico (DIETZSCHOLD; ERTL, 1991), assim como mecanismos de imunidade inata (HOOPER et al., 1998) tem um papel importante na defesa imunológica contra a raiva, devendo ser levados em consideração em estudos de resposta imunológica.

## 6 CONCLUSÕES

- ✓ O fragmento de DNA correspondente à parte da proteína G entre os aminoácidos 179 e 281 foi amplificado a partir do plasmídeo pSG5r.gpT434;
- ✓ O fragmento amplificado por PCR foi subclonado no vetor de expressão pET-14b;
- ✓ A seqüência foi inserida corretamente no vetor de expressão, sendo confirmada por meio do sequenciamento de DNA;
- ✓ A proteína recombinante, denominada rGERA179-281, foi expressa em *E. coli* cepa Rosetta, sendo visualizada uma banda de forte intensidade na região de 14 kDa na fração insolúvel na análise por SDS-PAGE;
- ✓ A proteína recombinante foi solubilizada a partir dos corpos de inclusão e purificada por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), obtendo-se um rendimento de 16,2 µg/l de cultivo celular;
- ✓ A caracterização da rGERA179-281 foi realizada por espectrometria de massa, obtendo-se uma cobertura de 52% da seqüência protéica, confirmando a identidade da proteína;
- ✓ Os anticorpos anti-rábicos totais presentes na preparação comercial de imunoglobulina humana anti-rábica humana (HRIG) reconheceram a rGERA179-281 por meio de *immunoblotting*;
- ✓ A proteína rGERA179-281 foi reconhecida por anticorpos anti-rábicos neutralizantes presentes no soro de indivíduos imunizados (HRIG), no ensaio de inibição, diminuindo significativamente a atividade neutralizante

da HRIG;

- ✓ Os anticorpos induzidos pela imunização de camundongos com rGERA179-281 reconheceram o vírus rábico na forma nativa, pela reação de imunofluorescência indireta sobre as células infectadas;
- ✓ Os títulos de anticorpos neutralizantes induzidos em camundongos imunizados com rGERA179-281, nas condições deste estudo, não foi maior que 0,5 UI/ml, valor mínimo recomendado para conferir proteção contra o vírus rábico.

## 7 PERSPECTIVAS

- ✓ Investigar se a rGERA179-281 é reconhecida por soros de diferentes espécies de animais, imunizados com diferentes cepas vacinais;
- ✓ Produzir anticorpos monoclonais anti-G;
- ✓ Padronizar *kits* para quantificação de proteína G em lotes de vacinas humanas e veterinárias;
- ✓ Padronizar *kits* (ELISA, aglutinação em látex) para quantificação de anticorpos neutralizantes em soros de animais e seres humanos vacinados;
- ✓ Realizar estudos mais detalhados sobre a imunogenicidade da rGERA179-281, empregando-se diferentes quantidades, vias de inoculação, número e intervalo entre as doses e adição de adjuvantes.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Básica: Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico**, 2ª ed., Elsevier, Rio de Janeiro, 2007.

ASHRAF, S.; SINGH, P. K.; YADAV, D. K.; SHAHNAWAZ, M.; MISHRA, S.; SAWANT, S. V.; TULI, R. High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. **Journal of Biotechnology**, v. 119, p. 1-14, 2005.

ASPDEN, K.; DIJK, A. A. V.; BINGHAM, J.; COX, D.; PASSMORE, J.; WILLIAMSON, A. Immunogenicity of a recombinant lumpy skin disease virus (neethling vaccine strain) expressing the rabies virus glycoprotein in cattle. **Vaccine**, v. 20, p. 2693-2701, 2002.

BARTH, R.; DIDERRICH, G.; WEINMANN, E. NIH test, a problematic method for testing potency of inactivated rabies vaccine. **Vaccine**, v. 6, p. 369-377, 1988.

BENMANSOUR, A.; LEBLOIS, H.; COULON, P.; TUFFEREAU, C.; GAUDIN, Y.; FLAMAND, A.; LAFAY, F. Antigenicity of rabies virus glycoprotein. **Journal of Virology**, v. 65, n.8, p. 4198-4203, 1991.

BLOUGH, H. A.; TIFFANY, J. M.; AASLESTAD, H. G. Lipids of rabies virus in BHK-21 cell membranes. **Journal of Virology**, v. 21, p. 950-955, 1977.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUNSCHOTEN, H.; GORE, M.; CLAASSEN, I. J. T. M.; UYTDEHAAG, F. G. C. M., DIETZSCHOLD, B.; WUNNER, W.H.; OSTERHAUS, A.D.M.E. Characterization of a new virus-neutralizing epitope that denotes a sequential determinant on the rabies virus glycoprotein. **Journal of General Virology**, v. 70, p. 291-298, 1989.

CAPONE, J.; GHOSH, H. P. Association of the nucleocapsid protein N of vesicular stomatitis virus with phospholipids vesicles containing the matrix protein M. **Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 62, p. 153-158, 1984.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Rabies: The rabies virus**, 2003. Disponível em: <[http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies/the\\_virus/virus.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies/the_virus/virus.htm)>. Acesso em: 16 jun. 2006.

CELIS, E.; OU, D.; DIETZSCHOLD, B.; KOPROWSKI, H. Recognition of rabies and rabies-related vírus by T cells derived from human vaccine recipients. **Journal of Virology**, v. 62, n. 9, p. 3128-3134, 1988.

COLL, J.M. The glycoprotein G of rhabdoviruses. **Archives of Virology**, v. 140, p. 827-851, 1995.

COX, J. H.; DIETZSCHOLD, B.; SCHNEIDER, L. G. Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. **Infection and Immunity**, v. 16, n. 3, p. 754-759, 1977.

DAVIES, M. C.; ENGLERT, M. E.; SHARPLESS, G. R.; CABASSO, V. J. The electron microscopy of rabies virus in cultures of chicken embryo tissues. **Virology**, v. 21, p. 642-651, 1963.

DEAN, D.J.; ABELSETH, M.K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory Techniques in Rabies**, 4<sup>a</sup> ed., World Health Organization, Geneva, p. 88-95, 1996.

DELAGNEAU, J. F.; PERRIN, P.; ATANASIU, P. Structure of the rabies virus: spatial relationship of the proteins G, M1, M2 and N. **Ann. Virol. (Inst. Pasteur)**, v. 132, p. 473-93, 1981.

DIETZSCHOLD, B. Oligosaccharides of the Glycoprotein of Rabies Virus. **Journal of Virology**, v. 23, p. 286-293, 1977.

DIETZSCHOLD, B.; ERTL, H. C. New developments in the pre- and post-exposure treatment of rabies. **Critical Reviews in Immunology**, v. 10, p. 427-439, 1991.

DIETZSCHOLD, B.; GORE, M.; MARCHADIER, D.; NIU, H.; BUNSCHOTEN, H.M.; JR., L.O.; WUNNER, W. H.; EARTL, H. C. J.; OSTERHAUS, M. E.; KOPROWSKI, H. Structural and immunological characterization of a linear virus-neutralizing epitope of the rabies virus glycoprotein and its possible use in a synthetic vaccine. **Journal of Virology**, v. 64, n. 8, p. 3804-3809, 1990.

DIETZSCHOLD, B.; WANG, H. RUPPRECHT, C. E.; CELIS, E.; TOLLIS, M.; ERTL, H.; HEBER-KATZ, E.; KOPROWSKI, H. Induction of protective immunity against rabies by immunization with rabies virus nucleoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, p. 9165-9169, 1987.

DIETZSCHOLD, B.; WIKTOR, T. J.; MACFARLAN, R.; VARRICHIO, A. Antigenic structure of rabies virus glycoprotein: ordering and immunological characterization of the large CNBr cleavage fragments. **Journal of Virology**, v. 44, n. 2, p. 595-602, 1982.

DIETZSCHOLD, B.; WUNNER, W. H.; WIKTOR, T. J.; LOPES, A. D.; LAFON, M; SMITH, C. L.; KOPROWSKI, H. Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, p. 70 – 74, 1983.

DIETZSCHOLD, B.; WIKTOR, J.; WUNNER, W. H.; VARRICHIO, A. Chemical and immunological analysis of the rabies soluble glycoprotein. **Virology**, v. 124, p. 330-337, 1983.

ESHAGHI, M.; TAN, W. S.; CHIN, W. K.; YUSOFF, K. Purification of the extra-cellular domain of Nipah virus glycoprotein produced in *Escherichia coli* and possible application in diagnosis. **Journal of Biotechnology**, v. 116, p. 221-226, 2005.

FABER, M.; FABER, M-L.; PAPANERI, A.; BETTE, M.; WEIHE, E.; DIETZSCHOLD, B.; SCHNELL, M. J. A single amino acid change in rabies virus glycoprotein increases virus spread and enhances virus pathogenicity. **Journal of Virology**, v. 79, p. 14141-14148, 2005.

FAVORETTO, S. R.; CARRIERI, M. L.; TINO, M. S.; ZANETTI, C. R.; PEREIRA, O. A. Simplified fluorescence inhibition microtest for the titration of rabies neutralizing antibodies. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, n. 2, p. 171-175, 1993.

FLAMAND, A.; RAUX, H.; GAUDIN, Y.; RUIGROK, R. W. K. Mechanisms of rabies virus neutralization. **Virology**, v. 194, p. 302-313, 1993.

FLI. Friedrich-Loeffler-Institut. Rabies-Bulletin-Europe. Rabies Information System of the WHO Collaboration Centre for Rabies Surveillance and Research, 2006. **Virus Structure**. Disponível em: <[http://www.who-rabies-bulletin.org/About\\_Rabies/Virus\\_Structure.aspx](http://www.who-rabies-bulletin.org/About_Rabies/Virus_Structure.aspx)>. Acesso em: 27 jan. 2007.

FRIES, L. F.; TARTAGLIA, J.; TAYLOR, J.; KAUFFMAN, E. K.; MEIGNIER, B.; PAOLETTI, E.; PLOTKIN, S. Human safety and immunogenicity of a canarypox-rabies glycoprotein recombinant vaccine: an alternative poxvirus vector system. **Vaccine**, v. 14, p. 428-434, 1996.

FU, Z. F. Rabies and rabies research: past, present and future. **Vaccine**, v. 15, suplemento, p. S20-S24, 1997.

GAUDIN, Y. Folding of rabies virus glycoprotein: epitope acquisition and interaction with endoplasmatic reticulum chaperones. **Journal of Virology**, v. 71, n. 5, p. 3742-3750, 1997.

GAUDIN, Y.; MOREIRA, S.; BÉNÉJEAN, J.; BLONDEL, D.; FLAMAND, A.; TUFFEREAU, C. Soluble ectodomain of rabies virus glycoprotein expressed in eukaryotic cells folds in a monomeric conformation that is antigenically distinct from the native state of complete, membrane-anchored glycoprotein. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 1644-1656, 1999.

GAUDIN, Y.; RUIGROK, R. W. H.; TUFFEREAU, C.; KNOSSOW, M.; FLAMAND, A. Rabies virus glycoprotein is a trimer. **Virology**, v. 187, p. 627-632, 1992.

GAUDIN, Y.; TUFFEREAU, C.; BENMANSOUR, A.; FLAMAND, A. Fatty acylation of rabies virus proteins. **Virology**, v. 184, p. 441-444, 1991.

GAUDIN, Y.; TUFFEREAU, C.; DURRER, P.; FLAMAND, A.; RUIGROK, R. W. Biological function of the low-pH, fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein (G): G is transported in a fusion-inactive state-like conformation. **Journal of Virology**, v. 69, p. 5528-5534, 1995.

GENTSCHEV, I; DIETRICH, G; GOEBEL, W. The *E. coli* alphahemolysin secretion system and its use in vaccine development. **Trends Microbiology**, v. 10, p. 39–45, 2002.

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

GREGORY, G; HEYNEKER, H. L. Secretion of correctly processed human growth hormone in *E. coli* and *Pseudomonas*. **US patent 4755465**, 1988.

GROSS, C. A. Function and regulation of the heat shock proteins. In: NEIDHARDT, F. C.; CURTISS, R.; INGRAHEM, J. L.; LIN, E. C. C.; LOW, K. B.; MAGASANIK, B.; REZNIKOFF, W. S.; RILEY, M.; SCHAECHTER, M.; UMBARGER, H. E. ***Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology**, American Society for Microbiology Press, Washington DC, p. 1382-1399, 1996.

HEIJDEN, R. W. J. V; LANGEDIJK, J. P. M.; GROEN, J.; UYTDEHAAG, F. G. C. M.; MELOEN, R. H.; OSTERHAUS, A. D.M. E. Structural and functional studies on a unique linear neutralizing antigenic site (G5) of the rabies virus glycoprotein. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 1539-1545, 1993.

HOCKNEY, R. C. Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. **Trends Biotechnology**, v. 12, p. 456-463, 1994.

HOOPER, D. C.; MORIMOTO, K.; BETTE, M.; WEIHE, E.; KOPROWSKI, H.; DIETZSCHOLD, B. Collaboration of antibody and inflammation in the clearance of rabies virus from the CNS. **Journal of Virology**, v. 72, p. 3711-3719, 1998.

HOLZINGER, A.; PHILLIPS, K. S.; WEAVER, T. E. Single-step purification/solubilization of recombinant proteins: application to surfactant protein B. **BioTechniques**, v. 20, p. 804–808, 1996.

IKONOMOU, L.; SCHNEIDER, Y.-J.; AGATHOS, S. N. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, p.1–20, 2003.

IVEY-HOYLE, M. Recombinant gene expression in cultured *Drosophila melanogaster* cells. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 2, p.704–707, 1991.

ITO, Y.; NISHIZONO, A.; MANNEN, K.; HIRAMATSU, K.; MIFUNE, K. Rabies virus M protein expressed in *Escherichia coli* and its regulatory role in virion-associated transcriptase activity. **Archives of Virology**, v. 141, n. 3-4, p. 671-683, 1996.

JOHNSON, N.; MANSFIELD, K. L.; FOOKS, A. R. Canine vaccine recipients recognize an immunodominant region of the rabies virus glycoprotein. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 2663-2669, 2002.

KANE, J. F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, p. 494-500, 1995.

KAPLAN, H. A.; WELPLY, J. K.; LENNARZ, W. J. Oligosaccharyl transferase: the central enzyme in the pathway of glycoprotein assembly. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 906, p. 161-173, 1987.

KAWAI, A., MORIMOTO, K. Functional aspects of *Lyssavirus* proteins. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 187, p. 27-42, 1994.

KAWAI, A.; TORIUMI, H.; TOCHIKURA, T. S.; TAKAHASHI, T.; HONDA, Y.; MORIMOTO, K. Nucleocapsid formation and/or subsequent conformational change of rabies virus nucleoprotein (N) is a prerequisite step for acquiring the phosphatase-sensitive epitope of monoclonal antibody 5-2-26. **Virology**, v. 263, p. 395-407, 1999.

KING, A. A. Cell culture of rabies virus. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory Techniques in Rabies**, 4<sup>a</sup> ed., World Health Organization, Geneva, p. 114-130, 1996.

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

KORNFELD, R.; KORNFELD, S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. **Annual Review of Biochemistry**, v. 54, p. 631-664, 1985.

KOUZNETZOFF, A.; BUCKLE, M.; TORDO, N. Identification of a region of the rabies virus N protein involved in direct binding to the Viral RNA. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 1005-1013, 1998.

KURLAND, C.; GALLANT, J. Errors of heterologous protein expression. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, p. 489-493, 1996.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAFAY, F.; BENMANSOUR, A.; CHEBLI, K.; FLAMAND, A. Immunodominant epitopes defined by a yeast-expressed library of random fragments of the rabies virus glycoprotein map outside major antigenic sites. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 339-346, 1996.

LAFON, M. P.; PERRIN, P.; VERMISSE, P.; SUREAU, P. Use of a monoclonal antibody for quantitation of a rabies vaccine glycoprotein by enzyme immunoassay. *J. Biol. Stand.*, v. 13, p. 295-301, 1984.

LATHE, R. F.; KIENY, M. P.; SCHMITT, D.; CURTIS, P.; LECOCQ, J. P. M13 bacteriophage vectors for the expression of foreign proteins in *Escherichia coli*: the rabies glycoprotein. **Journal of Molecular and Applied Genetics**, v. 2, p. 331-342, 1984.

LIN CEREGHINO, G. P.; LIN CEREGHINO, J.; ILGEN, C.; CREGG, J. M. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 329-332, 2002.

LIN CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 45-66, 2000.

LUCAST, L. J.; BATEY, R. T.; DOUDNA, J. A. Large-scale purification of a stable form of recombinant tobacco etch virus protease. **BioTechniques**, v. 30, p. 544-554, 2001.

LUND, P. A. Microbial molecular chaperones. **Advances in Microbial Physiology**, v. 44, p. 93–140, 2001.

LUO, T. R.; MINAMOTO, N.; ITO, H.; GOTO, H.; HIRAGA, S.; ITO, N.; SUGIYAMA, M.; KINJO, T. A virus-neutralizing epitope on the glycoprotein of rabies virus that contains Trp251 is a linear epitope. **Virus Research**, v. 51, p. 35-41, 1997.

MACFARLAN, R. I.; DIETZSCHOLD, B.; KOPROWSKI, H. Stimulation of cytotoxic T-lymphocyte responses by rabies virus glycoprotein and identification of an immunodominant domain. **Molecular Immunology**, v. 23, n. 7, p. 733-741, 1986.

MALEK, L. T.; SOOSTMEYER, G.; GARVIN, R. T.; JAMES, E. The rabies glycoprotein gene is expressed in *E. coli* as a denatured polypeptide. In: CHANOCK, R. M.; LERNER, R. A. **Modern Approaches to Vaccines**, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p. 203-208, 1984.

MARCO, A.; VIGH, L.; DIAMANT, S.; GOLOUBINOFF, P. Native folding of aggregation-prone recombinant proteins in *Escherichia coli* by osmolytes, plasmid- or benzyl alcohol-overexpressed molecular chaperones. **Cell Stress & Chaperones**, v. 10, p. 329-339, 2005.

MARISSSEN, W. E.; KRAMER, R. A.; RICE, A.; WELDON, W. C.; NIEZGODA, M.; FABER, M.; SLOOTSTRA, J. W.; MELOEN, R. H.; HORST, M. C.; VISSER, T. J.; JONGENELEN, M.; THIJSSSE, S.; THROSBY, M.; KRUIF, J.; RUPPRECHT, C. E.; DIETZSCHOLD, B.; GOUDSMIT, J.; BAKKER, A. B. H. Novel rabies virus neutralizing epitope recognized by human monoclonal antibody: fine mapping and escape mutant analysis. **Journal of Virology**, v. 79, n. 8, p. 4672-4678, 2005.

MCGARVEY, P. B.; HAMMOND, J.; DIENELT, M. M.; HOOPER, D. C.; FU, Z. F.; DIETZSCHOLD, B.; KOPROWSKI, H.; MICHAELS, F. H. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. **Biotechnology**, v. 13, p. 1484-1487, 1995.

MESLIN, F.X., STÖHR, K. Prospects for immunization against rabies in developing countries. In: DODER, B., MESLIN, F.X., EDS. **Rabies control in Asia**, Elsevier, Paris, p. 15-18, 1997.

MIYOMOTO, K.; MATSUMOTO, S. The nature of the Negri body. **The Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 677-682, 1965.

MORIMOTO, K.; MCGETTIGAN, J. P.; FOLEY, H. D.; HOOPER, D. C.; DIETZSCHOLD, B.; SCHNELL, M. Genetic engineering of live rabies vaccines. **Vaccine**, v. 19, p. 3543-3551, 2001.

MOTOI, Y.; SATO, K.; HATTA, H.; MORIMOTO, K.; INOUE, S.; YAMADA, A. Production of rabies neutralizing antibody in hen`s eggs using a part oh the G protein expressed in *Escherichia coli*. **Vaccine**, v. 23, p. 3026-3032, 2005.

MURPHY, F.A.; FAUCHET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GABRIAL, S.A.; JARVIS, G.P.; MARTELLI, M.A.; SUMMERS, M.D. **Virus Taxonomy**. Sixth Report. Internat. Comitee Taxon. Vir., Springer – Verlagwiee, New York, p. 14-22, 1995.

NAGARAJAN, T.; REDDY, G. S.; SUBRAMANIAN, B. M.; RAJALAKSHMI, S.; THIAGARAJAN, D.; TORDO, N.; JALLET, C.; SRINIVASAN, V. A. A simple immuno-capture ELISA to estimate rabies viral glycoprotein antigen in vaccine manufacture. **Biologicals**, v. 34, p. 21-27, 2006.

NAKAMURA, Y.; GOJOBORI, T.; IKEMURA, T. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 292, 2000.

NEIDHARDT, F. C.; VANBOGELEN, R. A. The heat shock response. In: NEIDHARDT, F. C.; INGRAHAM, J. L.; LOW, K. B.; MAGASANIK, B.; SCHAECTER, M.; UMBARGER, H. E. ***Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology**, American Society for Microbiology Press, Washington DC, p. 1334-1345, 1987.

NI, Y.; TOMINAGA, Y.; HONDA, Y.; MORIMOTO, K.; SAKAMOTO, S.; KAWAI, A. Mapping and characterization of a sequential epitope on the rabies virus glycoprotein which is recognized by a neutralizing monoclonal antibody, RG719. **Microbiology and Immunology**, v. 39, n. 9, p. 693-702, 1995.

NICHOLSON, K. G. Cell-culture vaccines for human use: general considerations. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory Techniques in Rabies**, 4<sup>a</sup> ed., World Health Organization, Geneva, p. 271-279, 1996.

NOVY, R.; DROTT, D.; YAEGER, K.; MIERENDORF, R. Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. **Innovations**, n. 12, p. 1-3, 2001.

OLMOS-SOTO, J; CONTRERAS-FLORES, R. Genetic system to overproduce and secrete proinsulin in *Bacillus subtilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, p. 369–373, 2003.

PERRIN, P.; MORGEAUX, S.; SUREAU, P. In vitro rabies vaccine potency appraisal by ELISA : advantages of the immunocapture method with a neutralizing anti-glycoprotein monoclonal antibody. **Biologicals**, v. 18, p. 321-330, 1990.

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

PIERCE, J. J.; ROBINSON, S. C.; WARD, J. M.; KESHAVARZ-MOORE, E.; DUNNILL, P. A comparison of the process issues in expressing the same recombinant enzyme periplasmatically in *Escherichia coli* and extracellularly in *Streptomyces lividans*. **Journal of Biotechnology**, v. 92, p. 205–215, 2002.

PREHAUD, C.; COULON, P.; LAFAY, F.; THIERS, C.; FLAMAND, A. Antigenic site II of the rabies virus glycoprotein: structure and role in viral virulence. **Journal of Virology**, v. 65, n.1, p. 1-7, 1988.

PREHAUD, C.; TAKEHARA, K.; FLAMAND, A.; BISHOP, D. H. L. Immunogenic and protective properties of rabies virus glycoprotein expressed by baculovirus vectors. **Virology**, v. 173, p. 390-399, 1989.

RAVKOV, E.V.; SMITH, J. S.; NICHOL, S. T. Rabies virus glycoprotein gene contains a long 3' noncoding region which lacks pseudogene properties. **Virology**, v. 206, p. 718-723, 1995.

ROSE, J. K.; DOOLITTLE, R. F.; ANILIONIS, A.; CURTIS, P. J.; WUNNER, W. H. Homology between the glycoproteins of vesicular stomatitis virus and rabies virus. **Journal of Virology**, v. 43, p. 361-364, 1982.

RUPPRECHT, C.E.; HALON, C.A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **Lancet Infectious Disease**, v. 2, p.327-343, 2002.

RUPPRECHT, C. E.; HALON, C. A.; BLANTON, J.; MANANGAN, J.; MORRIL, P.; MURPHY, S.; NIEZGODA, M.; ORCIARI, L. A. Oral vaccination of dogs with recombinant rabies virus vaccines. **Virus Research**, v. 111, p. 101-105, 2005.

SAKAMOTO, S.; IDE, T.; TOKIYOSHI, S.; NAKAO, J.; HAMADA, F.; YAMAMOTO, M.; GROSBY, J. A.; NI, Y.; KAWAI, A. Studies on the structures and antigenic properties of rabies virus glycoprotein analogues produced in yeast cells. **Vaccine**, v. 17, p. 205-218, 1999.

SCHLESINGER, H. R.; WELLS, H. J.; HUMMELER, K. Comparison of the lipids of intracellular and extracellular rabies viruses. **Journal of Virology**, v. 12, p. 1028-1030, 1973.

SCHMIDT, F. R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 363-372, 2004.

SEIF, I.; COULON, P.; ROLLIN, P. E.; FLAMAND, A. Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. **Journal of Virology**, v. 53, n. 3, p. 926-934, 1985.

SHÄGGER, H.; JAGOW, G. V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, p. 368-379, 1987.

SHAKIN-ESHLEMAN, S.H.; REMALEY, A. T.; ESHLEMAN, J. R.; WUNNER, W. H.; SPITALNIK, S. L. N-linked glycosylation of rabies virus glycoprotein: Individual sequons differ in their efficiencies and influence on cell surface expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 10690-10698, 1992.

SMITH, J.S. Molecular Epidemiology. In: JACKSON, A.C.; WUNNER, W.H.. **Rabies**, Academic Press, San Diego, p. 79-112, 2002.

SOKOL, F.; SCHLUMBERGER, H. D.; WIKTOR, T. J.; KOPROWSKI, H.; HUMMELER, K. Biochemical and biophysical studies on the nucleocapsid and on the RNA of rabies virus. **Virology**, v. 38, p. 651-665, 1969.

STEELE, J.H.; FERNANDEZ, P.J. History of Rabies and Global Aspects. In: BAER, G. M. **The Natural History of Rabies**, 2<sup>a</sup> ed., Academic Press, New York, p.1-24, 1991.

SULKOWSKI, E. Purification of proteins by IMAC. **Trends Biotechnology**, v. 3, p. 1-7, 1985.

TAKAYAMA-ITO, M.; INOUE, K.; SHOJI, Y.; INOUE, S.; IJIMA, T.; SAKAI, T.; KURANE, I.; MORIMOTO, K. A highly attenuated rabies virus HEP-Flury strain reverts to virulent by single amino acid substitution to arginine at position 333 in glycoprotein. **Virus Research**, v.119, p. 208–215, 2006.

THOMAS, J. G.; BANEYX, F. Divergent effects of chaperone overexpression and ethanol supplementation on inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 11, p. 289-296, 1997.

TOLLIS, M.; DIETZSCHOLD, B.; VOLIA, C. B.; KOPROWSKI, H. Immunization of monkeys with rabies ribonucleoprotein (RNP) confers protective immunity against rabies. **Vaccine**, v. 9, p. 134-136, 1991.

TORDO, N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory Techniques in Rabies**, 4<sup>a</sup> ed. World Health Organization, Geneva, p. 28-51, 1996.

TORDO, N.; DE HAAN, P.; GOLDBACH, R.; POCH, O. Evolution of negative-stranded RNA genomes. **Seminars in Virology**, v. 3, p. 341-357, 1992.

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A., KEITH, G.; ROUGEON, F. Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene?. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, p. 3914-3918, 1986.

TUFFEREAU, C.; LEBLOIS, H.; BENEJEAN, J.; COULON, P.; LAFAY, F.; FLAMAND, A. Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice. **Virology**, v. 172, p. 206-212, 1989.

VALLEJO, L. F.; RINAS, U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. **Microbial Cell Factories**, v. 3, p. 1-12, 2004.

WALKER, P. J.; KONGSUWAN, K. Deduced structural model for animal rhabdovirus glycoproteins. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 1211-1220, 1999.

WARREL, M. J.; WARREL, D. A. Rabies and other lyssavirus diseases. **The Lancet**, v. 363, p. 959-969, 2004.

WEBSTER, W. A.; CASEY, G. A. Virus isolation in neuroblastome cell culture. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory Techniques in Rabies**, 4<sup>a</sup> ed., World Health Organization, Geneva, p. 96-104, 1996.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. Proteomics in Practice. **A Laboratory Manual of Proteome Analysis**, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.

WILBUR, L. A.; AUBERT, M. F. A. The NIH test for potency. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory Techniques in Rabies**, 4<sup>a</sup> ed., World Health Organization, Geneva, p. 360-368, 1996.

WILKINSON, L. History. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, H. **Rabies**, Academic Press, New York, v.1, p. 1-22, 2002.

WOJCZYK, B.; SHAKIN-ESHLEMAN, S. H.; DOMS, R. W.; XIANG, Z. Q.; ERTL, H. C.; WUNNER, W. H.; SPITALNIK, S. L. Stable secretion of a soluble, oligomeric form of rabies virus glycoprotein: influence of N-glycan processing on secretion. **Biochemistry**, v. 34, p. 2599-2609, 1995.

WOJCZYK, B. S.; TAKAHASHI, N.; LEVY, M. T.; ANDREWS, D. W.; ABRAMS, W. R.; WUNNER, W. H.; SPITALNIK, S. L. N-glycosylation at one rabies virus glycoprotein sequon influences N-glycan processing at a distant sequon on the same molecule, **Glycobiology**, v. 15, p. 655-666, 2005.

WHO. World Health Organization. WHO Technical Report Series 931. WHO Expert Consultation on Rabies: First Report, World Health Organization, Geneva, p. 30-44, 2004.

WHO. World Health Organization, 2006. **Rabies Incidence**. Disponível em: <<http://www.who.int/rabies/en>> Acesso em: 30 maio 2006.

WUNNER, W. H. Rabies virus. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**, Academic Press, San Diego, p. 23-61, 2002.

WUNNER, W. H. The chemical composition and molecular structure of rabies viruses. In: BAER, G. M. **The Natural History of Rabies**, CRC press, Boca Raton, p. 31-67, 1991.

WUNNER, W. H.; DIETZSCHOLD, B.; SMITH, C.L.; LAFON, M.; GOLUB, E. Antigenic variants of CVS rabies virus with altered glycosylation sites. **Virology**, v. 140, n. 1, p. 1-12, 1985.

XIANG, Z. Q.; SPITALNIK, S. L.; CHENG, J.; ERIKSON, J.; WOJCZYK, B.; ERTL, H. C. J. Immune responses to nucleic acid vaccines to rabies virus. **Virology**, v. 209, p. 569-579, 1995.

YAROSH, O. K.; WANDELER, A. I.; GRAHAM, F. L.; CAMPBELL, J. B.; PREVEC, L. Human adenovirus type 5 vectors expressing rabies glycoprotein. **Vaccine**, v. 14, p. 1257-1264, 1996.

YELVERTON, E.; NORTON, S.; OBJESKI, J. F.; GOEDDEL, D. V. Rabies virus glycoprotein analogs: biosynthesis in *Escherichia coli*. **Science**, v. 219, p. 614-619, 1983.

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. **Biotechnology Journal**, v. 2, p. 102-109, 2007.

### APÊNDICE A - Protocolo para obtenção de bactérias competentes

- Todos os procedimentos devem ser realizados em fluxo laminar;
  - O cloreto de cálcio e os recipientes para dividir as alíquotas (ependorf) devem estar frios. Para isso deixar em geladeira por aproximadamente 15h.
- 1) Pegar as bactérias no freezer a - 80°C;
  - 2) Realizar uma semeadura das bactéria por esgotamento em uma placa de Petri contendo o antibiótico apropriado;
  - 3) Colocar a placa na estufa a 37°C por 15 h para crescimento das bactérias;
  - 4) A partir de uma única colônia (isolada) proveniente da placa, fazer um cultivo em 50 ml de meio LB (Luria-Bertani) autoclavado a 37°C, em um *shaker* a 140 rpm;
  - 5) Acompanhar o crescimento bacteriano por meio da densidade óptica (D. O.) a 600 nm;
  - 6) Quando a D. O. a 600 nm atingir 0,2-0,4 passar a amostra para um tubo Falcon;
  - 7) Centrifugar a 3500 rpm por 10 min a 4°C e dispensar o sobrenadante;
  - 8) Adicionar 25 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1M (“que deve estar frio”) e suspender a amostra;
  - 9) Deixar a amostra em banho de gelo por 1h;
  - 10) Suspender a amostra tomando cuidado para não contaminar;
  - 11) Centrifugar a amostra a 3500 rpm por 10 min e dispensar o sobrenadante;
  - 12) Adicionar 5 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1M (“frio”) + glicerol 20% (para isso diluir o glicerol em CaCl<sub>2</sub> 0,1M) e suspender a amostra;
  - 13) Deixar a amostra em banho de gelo por 30 min;
  - 14) Dividir em alíquotas de 150 µl e guardar no freezer a -80°C.