

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Tese

Clonagem e expressão do gene da nucleoproteína
e de um gene sintético da glicoproteína do vírus da
raiva em *Pichia pastoris*

Lorena Leonardo Souza

Pelotas, 2009

LORENA LEONARDO SOUZA

**Clonagem e expressão do gene da nucleoproteína
e de um gene sintético da glicoproteína do vírus da
raiva em *Pichia pastoris***

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de Pelotas,
como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Orientador: Carlos Gil Turnes

Co-orientador: Fábio Pereira Leivas Leite

Pelotas, 2009

Banca examinadora:

Prof. Dr. Paulo Michel Roehe, IPVDF & ICBS-UFRGS

Prof. Dr. Fábio Leivas Leite, Instituto de Biologia – UFPel

Prof. Dr. Silvia Oliveira Hubner, Faculdade Veterinária - UFPel

“Enfrentar cada desafio com inteligência é abrir as portas do progresso”.

“Os outros desconhecem nossos limites. Somos nós que precisamos definir até onde eles podem ir”.

Zibia Gasparetto

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ilco e Vera, pelo amor, carinho e apoio integral demonstrados ao longo da minha vida.

À minha afilhada Helena que me fortalece a cada dia com seu amor.

Aos meus irmãos Tiago e Liliane e a minha cunhada Rafaela por acreditarem em mim e no meu trabalho.

Ao Drinho pelo carinho, paciência e apoio dedicados todos esses anos.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia Luana, Liana, Adalgisa, Andréia, Carina, Alceu e Leandro que foram importantes no desenvolvimento deste trabalho e na construção de um ciclo de amizades.

As minhas amigas Ana Raquel, Patrícia, Renata, Marlete e Tati.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia que contribuíram para meu crescimento pessoal e acadêmico.

Ao Prof. Fábio Leite, pela orientação, compreensão, confiança e amizade durante o decorrer do trabalho.

Ao meu orientador Prof. Carlos Gil Turnês por ter acreditado, incentivado e me ajudado no desenvolvimento deste trabalho.

A todos que de alguma forma tenham colaborado e apoiado a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

SOUZA, Lorena Leonardo. **Clonagem e expressão do gene da nucleoproteína e de um gene sintético da glicoproteína do vírus da raiva em *Pichia pastoris***. 2009. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O vírus da raiva apresenta dois antígenos principais: a nucleoproteína, uma proteína interna conservada antigênica e geneticamente e a glicoproteína, uma proteína externa responsável pela adsorção do vírus à célula hospedeira e pela indução da produção de anticorpos neutralizantes. O desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante iniciou uma nova perspectiva no controle da Raiva, já que vacinas recombinantes não têm patogenicidade residual e são produzidas com as proteínas antigênicas do vírus, sem sua presença. Além disso, as proteínas recombinantes podem ser expressas com a finalidade de serem usadas em diagnóstico. O objetivo deste trabalho foi clonar e expressar a glicoproteína e a nucleoproteína do vírus da raiva utilizando o sistema *Pichia pastoris* e avaliar a antigenicidade e imunogenicidade destas proteínas através do *Dot blotting*, *SDS page*, *Western blotting*, inibição da imunofluorescência e ELISA. A glicoproteína demonstrou ser antigênica ao ser reconhecida por anticorpos anti-rábicos provenientes de animais experimentalmente infectados com o vírus rábico cepa CVS. A nucleoproteína recombinante teve sua expressão confirmada pelas técnicas de *Dot blotting* e *Western blotting* ao ser reconhecida por anticorpos monoclonais anti-histidina. Podemos concluir que a levedura *P. pastoris* é um sistema eficiente para clonagem e expressão da nucleoproteína e glicoproteína do vírus rábico.

Palavras-chave: vírus da raiva, glicoproteína, nucleoproteína, *Pichia pastoris*, proteína recombinante.

ABSTRACT

SOUZA, Lorena Leonardo. **Cloning and expression of the nucleoprotein gene and a synthetic gene of the glycoprotein of rabies virus in *Pichia pastoris***. 2009. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The rabies virus has two major antigens: the nucleoprotein, a conserved internal protein antigenically and genetically and glycoprotein, a protein responsible for the external adsorption of virus to the host cell and induction of neutralizing antibodies. The development of recombinant DNA technology has opened a new perspective on the control of rabies, since recombinant vaccines have residual pathogenicity and are produced with the antigenic proteins of the virus, without their presence. Furthermore, recombinant proteins can be expressed in order to be used in diagnosis. The objective of this study was to review the literature about rabies, cloning and express the nucleoprotein and glycoprotein of rabies virus using the system *Pichia pastoris* and evaluate the antigenicity and the immunogenicity of these proteins by Dot blotting, SDS page, Western blotting and ELISA. Glycoprotein synthetic antigen proved to be recognized by anti-rabies from animals experimentally infected with rabies virus strain CVS. And recombinant nucleoprotein expression was confirmed by the techniques of Dot blotting and Western blotting to be recognized by monoclonal anti-histidine. Thus, we conclude that the cloning and expression of synthetic glycoprotein and cloning and expression nucleoprotein rabies virus by the yeast *P. pastoris* has been effective, which makes these products an alternative for the production of immunobiological.

Keywords: rabies virus, nucleoprotein, glycoprotein, *Pichia pastoris*, recombinant protein.

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOX	- Álcool Oxidase
BCG	- Bacilo Calmette - Guerin
BHK	- Baby Hamster Kidney
BMMY	- Buffered Methanol Complex Médium
CCN	- Cérebro de Camundongo Normal
CVS	- Challenge Virus
DAB	- Diaminobenzidine
ERA	- Evelyn-Rokitniki-Abelseth
GpsintRev	- Primer glicoproteína sintética <i>reverse</i>
GpsintFor	- Primer glicoproteína sintética <i>forward</i>
GpR	- Glicoproteína recombinante
Ig	- Imunoglobulina
µg	- Micrograma
µl	- Microlitro
MAb	- Anticorpo monoclonal
ml	- Mililitro
mg	- Miligrama
Mut ^S	- Utilização Lenta de Metanol
PBS	- Tampão Salina Fosfatada
PBS	- Tampão Salina Fosfata com Tween 20
pH	- Potencial Hidrogeniônico
SAD	- Street Alabama Dufferin
SFV	- Semliki Forest vírus
V-GR	- Vaccinia-Rabies Glycoprotein
YNB	- Yeast Nitrogen Base
YPD	- Yeast Peptona Dextrose

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO GERAL	1
2- HIPÓTESE	5
3- OBJETIVOS	6
Objetivo Geral.....	6
Objetivo Específico.....	6
4- ARTIGO 1	7
Resumo.....	8
Abstract.....	9
Histórico.....	10
Etiologia.....	11
Epizootiologia.....	13
Vacinas anti-rábicas.....	17
Conclusão.....	22
Referência.....	23
5- ARTIGO 2	31
Resumo.....	33
Abstract.....	34
Introdução.....	35
Material e Métodos.....	36
Resultados e Discussão.....	42
Conclusão.....	47
Agradecimentos.....	48
Referências.....	49
Tabelas.....	52
Figuras.....	53
6- ARTIGO 3	56
Resumo.....	58
Abstract.....	59
Introdução.....	60
Material e Métodos.....	61
Resultados e Discussão.....	65
Conclusão.....	66
Referências.....	67
Tabela.....	70
Figuras.....	71
7- Considerações finais	72
8- Conclusões Gerais	73
9- Referências	74

1 INTRODUÇÃO GERAL

A Raiva é uma doença infecciosa que acomete o homem e todos os animais de sangue quente. É uma zoonose transmitida pela inoculação do vírus rábico presente na saliva do animal infectado, principalmente pela mordedura. A Organização Mundial da Saúde, em seu Código Sanitário para Animais Terrestres, lista a raiva na categoria das enfermidades comuns a várias espécies (OMS, 2009). A raiva é um problema de saúde pública mundial e apesar de ser uma doença imunoprevenida pré ou pós-exposição, mais de 70.000 mortes são registradas a cada ano (DIETZSCHOLD et al., 2008; OMS, 2009).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem armazenado dados sobre a raiva humana e animal desde 1959. Atualmente, para coletar, armazenar e processar os dados, a OMS desenvolveu um sistema de informações de mapeamento baseado em um banco de dados *online* (OMS, 2009). A PANAFTOSA mantém um sistema de vigilância epidemiológica para a raiva (SIRVERA) que começou na década de 1970. Estes dados foram importantes para a análise da situação epidemiológica da raiva para definir estratégias de controle (PANAFTOSA, 2009)

Segundo o Ministério da Saúde (2009) a incidência da raiva humana transmitida por cães no Brasil, vem reduzindo no decorrer dos anos, porém os casos devidos a animais silvestres surgem como um novo desafio. Em 2008 foram notificados 2 casos de raiva humana transmitidos por morcegos e um por primata não humano, ocorridos nos estados de Pernambuco, Goiás e Ceará.

Também em 2008, a raiva foi confirmada em 20 morcegos hematófagos, 108 morcegos não hematófagos, 26 canídeos silvestres e três primatas não humanos (Ministério da Saúde, 2009).

Em 2008 foram diagnosticados, no Brasil, 36 caninos e 8 felinos com raiva. Os dados alarmantes ficaram por conta dos casos em equinos e bovinos que chegaram a 116 e 899, respectivamente. Até 2012 o principal objetivo do Ministério da Saúde, em relação à raiva, é zerar estes casos (Ministério da Saúde, 2009).

Existem quatro ciclos epidemiológicos da raiva, com processos de transmissão diferentes. No ciclo da raiva urbana, os cães são o reservatório principal mantendo o vírus na população e transmitindo para felinos e para o homem (DIETZSCHOLD et al., 2008; ZHANG et al., 2009; ZULU et al., 2009). No ciclo da raiva dos herbívoros, que ocorre desde o norte do México até a região central da Argentina, os morcegos hematófagos são a fonte de infecção e transmitem o vírus para bovinos, ovinos, eqüinos e outras espécies domésticas mediante mordedura, sendo também transmissor da doença para espécies domésticas e para o homem (KOBAYASHI et al., 2006; CARNIELI JR et al., 2009). No ciclo silvestre, os carnívoros silvestres (chacal, raposa, lobo, guaxinim, furão) são reservatório e transmissores do vírus (UN et al., 2009; ZHANG et al.; 2009; ZULU et al., 2009). O ciclo aéreo caracteriza-se pela transmissão do vírus entre as diferentes espécies de morcegos hematófagos e não hematófagos (UIEDA et al., 1995; CUNHA et al., 2005; ALBAS et al., 2009). A presença de morcegos não hematófagos contaminados com vírus da raiva em ambiente urbano representa um problema sério especialmente para animais de estimação e para o homem (SES/RS, 2007).

A prevenção da raiva baseia-se na vacinação e no controle de vetores. A historiografia da ciência descreve que a vacina anti-rábica foi a primeira vacina humana produzida em laboratório. O cientista francês Louis Pasteur foi o responsável pelo desenvolvimento da primeira vacina anti-rábica, com vírus atenuado, em um momento em que a raiva tinha um lugar especial na imaginação popular, como uma doença “misteriosa e aterradora” que se desenvolvia em pessoas vítimas de animais raivosos (VERGARA, 2004).

A primeira geração de vacinas anti-rábicas usava tecido nervoso de ovelhas, cabras, coelhos, cérebro de rato, camundongo e coelho lactentes, embrião de pato e galinha como substrato para obter vírus. Porém, as vacinas produzidas em tecido nervoso podiam provocar efeitos neurológicos colaterais graves devido à presença de mielina (PÉREZ et al., 1997). A segunda geração de vacinas compreendia as vacinas produzidas em cultivo celular. Entre elas estão as cultivadas em células de rins de hamster, células renais de feto bovino e células diplóides humanas (PÉREZ et al., 1997).

Com o progresso da ciência, as vacinas anti-rábicas foram sendo modificadas com o objetivo de obter um produto eficaz, seguro e economicamente viável. Entretanto, a disponibilidade de vacinas anti-rábicas com elevado nível de imunogenicidade e inocuidade continuam sendo o objetivo de muitos pesquisadores.

Os avanços registrados nas pesquisas em biologia molecular estabeleceram as bases para a classificação definitiva do vírus da raiva mediante a análise antigênica comparativa (CARNIELI et al., 2008; CARNIELI et al., 2009; UN et al., 2009).

O progresso da tecnologia do DNA recombinante iniciou uma nova era no controle da raiva. As vacinas recombinantes não apresentam poder residual de patogenicidade porque elas contêm como antígenos, somente proteínas específicas do vírus. Várias construções recombinantes foram testadas: vacina de BCG contendo epítomos da nucleoproteína do vírus da raiva (CRUZ et al., 2002), vacinas de DNA (FISCHER et al., 2003; KUMAR et al., 2006), vacinas de RNA (SAXENA et al., 2009), vacinas constituídas de proteínas heterólogas produzidas em sistemas de expressão procarióticos (MOTOI et al., 2005) e eucarióticos (KLEPFER et al., 1993; ASHRAF, et al., 2005; ROJAS-ANAYA et al., 2009) e vírus como vetor de expressão de proteínas (HU et al., 2006; BENMAAMAR et al., 2009).

A *Pichia pastoris* é uma levedura metilotrófica que tem sido utilizada como sistema de expressão para diversos tipos de proteínas exógenas (CHUCK et al., 2009; DUMMER et al., 2009; NIZOLI, 2009). Uma de suas características mais importantes é a habilidade em alcançar altos níveis celulares de expressão, podendo produzir, em grandes quantidades, proteínas de importância na área biotecnológica (CEREGRINO & CREGG, 2000).

No presente trabalho nós descrevemos a clonagem do gene da glicoproteína sintética e nucleoproteína do vírus da raiva em *P. pastoris* e a expressão das mesmas como uma alternativa à produção de antígenos vacinais.

2 HIPÓTESE

Proteínas codificadas pelo gene da nucleoproteína e pelo gene sintético da glicoproteína do vírus da raiva produzidos pelo sistema de expressão *Pichia pastoris* são imunogênicas.

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Clonar e expressar em *Pichia pastoris* os genes que codificam a glicoproteína e nucleoproteína do vírus da Raiva e avaliar a eficiência dos antígenos expressados na indução de uma resposta imune.

Objetivos Específicos:

- Construir uma cepa de *P. pastoris* que expresse a nucleoproteína do vírus da raiva.
- Construir uma cepa de *P. pastoris* que secrete a glicoproteína do vírus da raiva.
- Avaliar a imunogenicidade da nucleoproteína secretada por *P. pastoris*, na indução de uma resposta imune em camundongos.
- Avaliar a imunogenicidade da glicoproteína secretada por *P. pastoris*, na indução de uma resposta imune em camundongos.
- Avaliar a antigenicidade da nucleoproteína e glicoproteína recombinante frente a soros positivos contra raiva.

4 ARTIGO 1

**Epizootiologia da Raiva e alternativas na produção de antígenos
rábicos**

Artigo científico formatado de acordo com as normas da revista

Ciência Rural

Epizootiologia da Raiva e alternativas na produção de antígenos rábicos

Epizootiology of Rabies and alternatives in the production of rabies antigens

Lorena Leonardo Souza ^a; Fábio Leivas Leite ^{a,b}; Carlos Gil-Turnes ^c

^a Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil

^b Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil

^c Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil

- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

RESUMO

A Raiva é uma zoonose transmitida pela inoculação do vírus rábico presente na saliva do animal infectado, que acomete o homem e todos os animais de sangue quente. Neste artigo descrevem-se a distribuição da raiva no mundo, as cadeias de transmissão, seu impacto na economia e as novas alternativas na produção de antígenos rábicos, entre eles de peptídeos sintéticos, de DNA, de RNA, de vetores recombinantes virais, bacterianos e de leveduras, e em plantas.

Palavras-chave: vírus da raiva, vacinas anti-rábicas.

ABSTRACT

Rabies is a zoonotic disease transmitted by the inoculation of the rabies virus present in the saliva of infected animals that affect humans and all warm-blooded animals. This article describes the distribution of rabies in the world, the different chains of transmission, the economic impact of the disease and new alternatives for the production of rabies antigens, such as synthetic peptides, DNA, RNA, recombinant viral, bacteria and yeast vectors, and in plants.

Key words: rabies virus, anti-rabies vaccine

HISTÓRICO

Os primeiros relatos da doença, no homem, ocorreram por volta de 24 a.C. na Mesopotâmia. A partir de 1500 e até a metade do Século 20, ocorreram vários surtos de Raiva em animais e homens pelo mundo, especialmente no continente europeu. Em 1869 foram descritos os sintomas da doença e sugerido que o agente causador da infecção fosse transmitido por animais raivosos (STEELE and FERNADEZ, 1991). Em 1885 foi produzida a primeira vacina e em 1889 realizados os primeiros estudos de soros anti-rábicos (INSTITUTO PASTEUR, 2008). Em 1895, quando os telégrafos anunciaram a descoberta da vacina contra a raiva pelo cientista francês Louis Pasteur, o governo de São Paulo propôs a criação de uma instituição com a denominação de Instituto Pasteur, que deveria se dedicar ao tratamento anti-rábico. A primeira tentativa fracassou. Somente em 7 de novembro de 1903, o Instituto Pasteur se estabeleceu pela ação de um grupo de médicos e filantropos da sociedade paulista. Entre 1906 e 1915, sob a direção do pesquisador italiano Antonio Carini, o Instituto Pasteur transformou-se em uma importante instituição. Antônio Carini desempenhou um papel importante na história do combate à raiva, ao demonstrar, em 1911, em Santa Catarina, que a doença podia ser transmitida pelo morcego hematófago a herbívoros domésticos tais como bovinos e equinos. Também observou que os casos de raiva em bovinos e equinos ocorriam nas duas margens do rio Itajaí, em locais onde a travessia de cães seria impossível. O pesquisador italiano detectou a presença de morcegos hematófagos, na região, e sugeriu que a doença era transmitida por morcegos. Apesar da sua comprovação em laboratório, essa hipótese foi aceita anos mais tarde quando pesquisadores alemães fizeram a mesma constatação (TEIXEIRA et al., 2004).

Apesar de a raiva ser conhecida desde a antiguidade, continua sendo um problema de saúde pública. Organizações internacionais e nacionais em saúde pública

humana e animal, organizações não governamentais, universidades e setor privado organizam, anualmente o “Dia Mundial da Raiva” com o objetivo de conscientizar e fortalecer a prevenção e controle desta enfermidade (www.worldrabiesday.org/2008).

ETIOLOGIA

O vírus da raiva pertence à Ordem *Mononegavirales*, Família *Rhabdoviridae*, Gênero *Lyssavirus*. O gênero *Lyssavirus* inclui os vírus da Raiva, *Lagos bat*, *Mokola*, *Duvenhage*, *European bat 1 e 2* e *Australian bat* (CDC, 2008). O virion apresenta uma morfologia de bala, com uma extremidade arredondada e outra plana. Tem comprimento médio de 180 nm e 70nm de diâmetro (HUMMELER et al, 1967; VERNON et al., 1972). O genoma está disposto em formato de mola e está composto por cinco genes, os quais codificam uma nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína da matriz (M), glicoproteína (G) e RNA polimerase (CDC, 2008). O genoma está envolto pela nucleoproteína formando um nucleocapsídeo helicoidal. O nucleocapsídeo, a fosfoproteína, a proteína da matriz e a RNA polimerase são circundados por um envelope derivado das membranas celulares. Neste envelope estão inseridas, aproximadamente, 400 unidades de glicoproteínas triméricas projetadas para a parte externa do virion. O genoma viral consiste de RNA fita simples, não segmentado com polaridade negativa (3'-5'), o que o impossibilita de ser traduzido diretamente em proteínas. O primeiro evento após a entrada na célula é a transcrição dos seus genes produzindo cinco mRNA monocistrônicos, seguido da síntese do seu genoma complementar fita positiva (5'-3') (PRESCOTT et al., 1996; TORDO et al., 1996).

A glicoproteína é uma proteína sintetizada no retículo endoplasmático rugoso, na forma de um trímero, e logo após, transportada para o aparelho de Golgi onde é

processada e exportada à superfície da célula com uma conformação madura de 65 kDa (CDC, 2008; ROSS et al., 2008). A glicoproteína tem papel importante na infectividade, patogenicidade e neurotropismo e é reconhecida como um fator responsável pela infecção (JOHNSON et al., 2002; DIETZSCHOLD et al., 2008; ROSS et al., 2008). Embora diversos receptores celulares para a proteína tenham sido sugeridos, nenhum foi conclusivamente identificado. A p75^{NTR} é um receptor de neurônio que parece ter um papel importante na infecção (LANGEVIN et al., 2002). Estudos recentes, porém, revelaram que outros receptores são requeridos para infecção *in vivo* e *in vitro*, entre eles estão o receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR), a molécula de adesão celular neuronal (nCAM), além de receptores celulares como gangliosídeos (WARRELL et al., 2004; TUFFEREAU et al., 2007). A glicoproteína está composta por, aproximadamente, 524 aminoácidos, formando os 19 primeiros um peptídeo sinal que é clivado quando a proteína entra no retículo endoplasmático. As porções restantes consistem de um domínio citoplasmático, um domínio transmembrana e um ectodomínio exposto como um trímero na superfície viral (JOHNSON et al., 2002; BASSI et al., 2008).

O gene da nucleoproteína do vírus rábico é o mais conservado dos cinco genes estruturais e tem sido usado frequentemente para classificar os isolados em genótipos (SCHAEFER et al., 2005; CDC, 2008) e como alternativa na produção de antígenos recombinantes com a finalidade de diagnóstico (HE et al., 2006). O gene está composto por 1353 nucleotídeos que codificam 450 aminoácidos. A nucleoproteína é indutora de resposta de células T auxiliares e de células B (KOSER et al., 2004). Além disso, tem papel importante na regulação da transcrição e replicação do RNA viral (WU et al., 2002).

EPIZOOTIOLOGIA

A raiva é uma doença distribuída amplamente pelo mundo, estando presente em todos os continentes com exceção da Antártica e de países como Austrália, Japão, Inglaterra, Irlanda e países escandinavos. Aproximadamente 70.000 pessoas morrem todo ano vítimas do vírus da raiva, no mundo, sendo que 95% destes casos concentram-se na África e Ásia. Um grande número de espécies mamíferas está envolvido na manutenção e transmissão da raiva (OMS, 2009). A raiva tem quatro ciclos epidemiológicos com processos de transmissão diferentes. No ciclo da raiva urbana o cão é o reservatório principal, mantendo o vírus na população e transmitindo-a a felinos e o homem (DIETZSCHOLD et al., 2008; ZHANG et al., 2009; ZULU et al., 2009). No ciclo da raiva dos herbívoros, que ocorre desde o norte do México até a região central da Argentina, onde o morcego hematófago é a fonte de infecção, transmitindo o vírus a bovinos, ovinos, eqüinos, outras espécies domésticas e o homem, mediante mordedura (KOBAYASHI et al., 2006; CARNIELI JR et al., 2009). No ciclo silvestre, os carnívoros silvestres (chacal, raposa, lobo, guaxinim, furão) são reservatório e transmissores do vírus para o homem e outras espécies animais (UN et al., 2009; ZHANG et al.2009; ZULU et al., 2009). O ciclo aéreo caracteriza-se pela transmissão do vírus entre as diferentes espécies de morcegos (UIEDA et al., 1995; CUNHA et al., 2005; ALBAS et al., 2009). Na maioria dos países existe uma espécie animal responsável pela manutenção da raiva na natureza.

Em certos países, no entanto, existem diferentes ciclos com diferentes reservatórios para o vírus da raiva. Além disso, quando a incidência da raiva canina diminui drasticamente é comum diagnosticar-se a raiva em animais silvestres (OMS, 2009). Na África do Sul, o vírus da raiva foi isolado do chacal do dorso preto (*Canis mesomelas*) e de cães (*canis familiaris*). O estudo indicou que os chacais são capazes de

manter o vírus no ciclo de infecção dos cães (ZULU et al., 2009). Os casos de raiva humana, na China, estão associados aos cães e ao furão. Um estudo epidemiológico retrospectivo da raiva em chineses, mostrou o furão como principal transmissor do vírus e constatou sua presença constante em áreas residenciais e no interior de algumas casas (ZHANGA et al., 2009). Na Turquia, o vírus da raiva é enzoótico em muitas áreas, tendo os cães como principal reservatório, pelo que o homem está em risco permanente (UN et al., 2009).

Em países desenvolvidos a raiva persiste, sobretudo, em animais silvestres (OMS, 2009). Na Europa, a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) é o reservatório predominante do vírus. Na França, o custo acumulado para controlar a doença em raposas (entre 1986 e 1995), incluindo a vacinação oral, foi estimado em US\$ 261 milhões (WHO, 2004). Na América do Norte, a taxa de raiva humana declinou substancialmente principalmente devido ao controle da doença em cães e gatos. No entanto, a raiva em animais silvestres tem sido responsável por alguns casos de raiva humana principalmente pela proximidade com os animais silvestres (HAIDER, 2008). Nos Estados Unidos as despesas anuais para prevenção da raiva são da ordem de US\$ 300 milhões e diversos estados procuram controlar a raiva silvestre para diminuir os tratamentos pós-exposição de pessoas que tenham contato com esses animais (WHO, 2004). Entre 1989 e 2004, mais de 13 milhões de iscas contendo a cepa vaccinal ERA de vírus rábico atenuado (ERA-BHK₂₁), foram distribuídos na província de Ontário, Canadá, com o objetivo de imunizar raposas pela via oral. O vírus ERA, no entanto, apresentou patogenicidade residual em alguns animais silvestres após a vacinação via oral. Os casos foram confirmados pelo isolamento e análise molecular do vírus nestes animais, comprovando-se que os animais afetados haviam se alimentado com iscas contendo a vacina ERA (FEHLNER-GARDINER et al., 2008).

Na América Latina o orçamento destinado ao controle da raiva, excluindo o Brasil, foi de US\$ 22 milhões em 2001. O Brasil avaliou o próprio orçamento em US\$ 28 milhões em 2004. Este orçamento incluiu os custos com vacinas para humanos e para cães, imunoglobulinas, laboratórios de diagnóstico, equipes de médicos e veterinários, treinamento das equipes e campanhas de vacinação (WHO 2004). Em 2004, pela primeira vez, o número de casos de raiva humana transmitida por animais silvestres na América latina superou o número de casos transmitidos por cães, sendo a raiva desmodina responsável pela morte de 55 pessoas em 2005. Presença do morcego hematófago e do vírus da raiva e ausência de programas de controle, são alguns dos fatores relacionados aos surtos. Os surtos ocorreram preferencialmente em pequenas áreas rurais, de desmatamento e áreas de extração de ouro (SCHNEIDER et al., 2009).

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2008), a maioria dos casos de Raiva registrados no Brasil está concentrada nas regiões Norte e Nordeste tendo como principais reservatórios os cães domésticos, os canídeos silvestres e morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*). Em 2007, foram diagnosticados 1027 casos de raiva em herbívoros relacionados diretamente com a presença do morcego hematófago. Todos os anos a raiva é diagnosticada em canídeos silvestres no Nordeste do Brasil e coincidentemente ou não é nessa região que cresce o número de casos em caninos domésticos. Análise filogenética de amostras provenientes de cães domésticos e silvestres dessa região, revelou que há uma infecção cruzada entre os dois grupos, ainda que há dificuldade em definir qual seria o verdadeiro reservatório (CARNIELI et al., 2009). Entre 1986 e 2008, registraram-se 760 casos de raiva humana no Brasil. A análise da série histórica demonstra uma grande redução dos casos transmitidos por cães. Em 2008 foram notificados três casos de raiva humana, cujas transmissões foram, dois por morcegos e um por primata não humano, ocorridos nos estados de

Pernambuco, Goiás e Ceará, respectivamente. Houve, também, uma redução da raiva canina, passando de 83 em 2007 para 36 em 2008, concentrados na região Nordeste, seguida da Norte e Centro-oeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

No entanto, a raiva silvestre no Brasil surge como um problema de saúde pública. O desmatamento, que resulta na destruição e fragmentação do habitat de muitas espécies silvestres, é a principal causa da aproximação de animais silvestres e morcegos hematófagos às zonas urbanas e periurbanas, o que, conseqüentemente aumenta o contato entre esses animais e o homem (CARNIELI JR et al., 2009). O sequenciamento da região codificadora do gene da nucleoproteína dos isolados de cães domésticos e de canídeos silvestres da região Norte e Nordeste do Brasil, identificou dois grupos: um relacionado aos canídeos domésticos e outro relacionado aos canídeos silvestres. A análise filogenética da sequência de dados sugere que o guaraxaim (*Cerdocyon thous*) é o principal reservatório do vírus na região Nordeste (CARNIELI et al., 2008). Já na região Sul e em alguns estados da Região Sudeste a raiva humana, transmitida pelo cão, está controlada. No entanto, em Janeiro de 2007, a Secretaria Estadual da Saúde do Rio Grande do Sul, via Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS), informou a morte de uma cadela de 3 anos por Raiva em Tapes, cidade distante 103 km de Porto Alegre, cuja fonte de infecção seria um morcego infectado (SES/RS, 2007). Recentemente a Secretaria da Agricultura, Pecuária, Pesca e Agronegócio (SEAPPA) do Rio Grande do Sul confirmou focos de Raiva bovina na região do Vale do Rio Pardo, Vale do Taquari e Pelotas (SEAPPA, 2008). Apesar do vírus da raiva ser antígenicamente homogêneo existem diferenças entre os isolados das diferentes espécies. Esta diferença permite classificar os isolados em variantes e conseqüentemente traçar o ciclo epidemiológico da raiva por região (SATO et al., 2004; SCHAEFER et al., 2005; TEIXEIRA et al.,

2005; KOBAYASHI et al., 2007; CARNIELI et al., 2008; KOBAYASHI, et al. 2008; MOTA, 2008; CARNIELI et al., 2009).

VACINAS ANTI-RÁBICAS

Apesar de não ter-se desenvolvido tratamento eficaz para a Raiva ela é uma doença que pode ser prevenida por vacinação. A primeira vacina anti-rábica usada no homem foi desenvolvida por Louis Pasteur (1885), uma vacina elaborada a partir de material encefálico e medula, obtidos após inoculação intra-cerebral de vírus fixo em coelhos. Os coelhos eram sacrificados para a retirada da medula espinhal para secar a temperatura ambiente, de tal forma que eram mantidas medulas com 14, 13, 12 dias, até chegar a um dia de dessecação. Quando ocorria um caso de mordedura por animal suspeito, o paciente era vacinado inicialmente com a vacina de 14 dias, no dia seguinte com a de 13 dias e assim sucessivamente até chegar ao dia dois. Este foi o primeiro tipo de vacina viva atenuada utilizada para a prevenção da raiva (OMS, 2009). FERMI (1906) elaborou uma vacina com vírus fixo multiplicado em cérebro de coelho e inativado por fenol durante 24h a 22°C. David Semple (1911) produziu uma vacina anti-rábica inativada a partir de uma suspensão de tecido nervoso de coelho tratada com fenol a 37°C por 24 horas e mantida por 30 dias a temperatura ambiente. Posteriormente, esta vacina foi produzida em tecido nervoso de ovinos e caprinos para obter maior rendimento. A inativação do vírus rábico com fenol por Semple, e posteriormente com radiação ultravioleta ou betapropiolactona (BPL), aumentou a segurança da vacina, mas a dose necessária para obtenção de uma resposta adequada aumentou a possibilidade de acidentes alérgicos pela presença da mielina e outras proteínas do tecido nervoso das ovelhas (SEMPLE, 1919).

A vacina Avianizada Fleury Lep (*Low egg passage*) de baixa passagem foi produzida por inoculação do vírus (amostra Fleury) primeiramente em pintos, por via intracerebral, sendo atenuada por 136 passagens e posteriormente inoculada em embrião de pinto (40 a 50 passagens). Protegia os cães por até três anos, porém o protocolo preconizado em alguns países previa que na primeira vacinação seriam necessárias três aplicações no primeiro ano e posteriormente reforço a cada três anos. Foi desaconselhada devido à ocorrência com alguma frequência de acidentes vacinais em cães (BUNN, 1988). A vacina Avianizada Fleury Hep (*High egg passage*) de alta passagem, seguiu o mesmo princípio da LEP, porém utilizando até 178 e em alguns casos de 227 a 230 passagens em embrião de pinto. O vírus Fleury mais atenuado era replicado em ovos embrionados, em células renais de cão ou em fibroblastos de embrião de pinto (BUNN, 1988). Uma vacina produzida em embrião de patos com vírus fixo inativado com betapropiolactona, e liofilizada, desenvolvida por Perck et al. (1953), é utilizada na prevenção da raiva humana porque produz menos reações sistêmicas que as vacinas dos tipos Semple e Fermi. É atualmente produzida na Suíça.

Em 1960, Paul Fenje descreveu a adaptação da cepa “*Street Alabama Dufferin*” (SAD) em cultivo celular de células de rim de hamster. Vírus SAD, originalmente isolado de cão raivoso no Alabama, sofreu numerosas passagens em cérebro de rato sendo então considerado vírus fixo (FENJE, 1960). Por outro lado, ABELSETH (1964) adaptou vírus a cultivo celular previamente replicado em embriões de galinhas e rim suíno. Esta cepa foi denominada cepa ERA (Evelyn-Rokitniki-Abelseth), sendo uma das vacinas anti-rábicas mais consagradas, na prática de campo. O vírus ERA, no entanto, manifesta algum tipo de patogenicidade residual em carnívoros, o que foi observado por ocasião da ocorrência de casos de raiva pós-vacinação entre 1989 e 2004, em Ontário, Canadá. Os casos foram atribuídos a infecções pós-vacinais por vacina

ERA e indicaram que todos os animais com raiva haviam se alimentado com iscas contendo a vacina ERA (FEHLNER-GARDINER et al., 2008).

As vacinas anti-rábicas a base de tecido nervoso, cérebro e medula de coelho utilizado, desde o trabalho pioneiro de Pasteur, podem produzir reações adversas. Quando foi descoberto que as substâncias responsáveis pela encefalomielite alérgica não estavam presentes em ratos e camundongos lactentes, Fuenzalida e Palácios, em 1954, elaboraram uma vacina de encéfalo de camundongos lactentes inoculados com vírus fixo, inativada por radiação ultravioleta para uso em cães. Em 1965, SVET-MOLDAVSKIJ et al. usaram o rato lactente com a mesma finalidade. Ainda em 1965, o Instituto de Pesquisas Biológicas do Rio Grande do Sul iniciou a fabricação de uma vacina tipo Fuenzalida, porém, com algumas modificações, entre elas a inativação com betapropiolactona (DA SILVA et al., 1967). A vacina Fuenzalida-Palácios, desenvolvida no Chile em 1950 e aperfeiçoada nos anos seguintes, é utilizada rotineiramente nos programas de saúde pública no Brasil, produzida pelo Instituto Butantan, em São Paulo, e pelo Instituto Tecnológico do Paraná-TECPAR. Atualmente o Instituto Butantan descontinuou a produção da vacina Fuenzalida-Palácios e iniciou a produção da vacina utilizando vírus replicado em células Vero, livre de soro bovino fetal, para reduzir o risco de transmissão de zoonoses e prions (INSTITUTO BUTANTAN, 2008). No Brasil, vacinas produzidas em cultura celular ou em embrião de pato estão disponíveis na rede pública de saúde e em centros de imunobiológicos especiais, para pacientes imunodeprimidos e para os que apresentam eventos adversos graves à vacina Fuenzalida-Palácios (www.vacinas.org.br).

O desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante iniciou uma nova perspectiva no controle da Raiva, já que vacinas recombinantes não têm patogenicidade residual e são produzidas com as proteínas antigênicas do vírus, sem sua presença

(OMS, 2008). A glicoproteína é uma escolha promissora para o desenvolvimento de vacinas de subunidades que possam ser usadas para imunização contra a raiva humana e animal. A nova tecnologia na produção de vacinas inclui vacinas de peptídeos sintéticos, vacinas de DNA (FISCHER et al., 2003), vacinas de RNA, vacinas de vetores recombinantes virais como adenovírus (HU et al., 2006; KNOWLES et al., 2009), vírus vaccinia (ROSSATE et al., 2009) e vírus Semliki Forest (BENMAAMAR et al., 2009), vacinas de vetores recombinantes bacterianos, *E. coli* (Motoi et al., 2005) e BCG (CRUZ et al., 2002), vacinas de vetores recombinantes em leveduras (KLEPFER et al., 1993) e vacinas em plantas (ASHRAF et al., 2005; ROJAS-ANAYA et al., 2009).

Os adenovírus são vírus DNA usados, frequentemente, como vetores para transferir material genético para outras células. O adenovírus canino tipo 2 e o adenovírus humano tipo 5 foram usados como vetores de expressão da glicoproteína do vírus rábico para prevenção da raiva, via oral, em animais silvestres. Estes recombinantes demonstraram ser estáveis nos testes *in vitro* e *in vivo* (HU et al., 2006; KNOWLES et al., 2009). A primeira vacina anti-rábica recombinante licenciada para uso em animais silvestres utilizou o vírus da vaccinia (poxvirus) como vetor de expressão (OMS, 2008). A Vaccinia-Rabies Glycoprotein ou V-GR é uma vacina que utiliza o vírus da Vaccinia (poxvirus) como vetor e o gene da glicoproteína da cepa do vírus rábico ERA integrado ao genoma do vírus. É hoje a vacina recombinante produzida em larga escala (KIENY et al., 1984; HANLON et al., 1998; CLIQUET et al., 2008;; JACOBS et al., 2009). Esta vacina, administrada via oral, demonstrou uma boa eficácia na imunização de animais silvestres no Leste europeu e nos Estados Unidos (BLANTON et al., 2007; CLIQUET et al., 2008).

A glicoproteína de vírus rábico inserida no vírus Semliki Forest (SFV) demonstrou ser estável na sua estrutura e função. Um SFV carreando o gene da

glicoproteína do vírus da raiva (SFV-RVGP) foi construído e a expressão avaliada em cultivo de células. A glicoproteína (RVGP) foi expressa em células BHK infectadas com SFV-RVGP e o mRNA do RVGP foi detectado em altos níveis após 24 a 48 horas de infecção. Essa expressão foi considerada uma opção segura para produção de RVGP em cultivo de células (BENMAAMAR et al., 2009). Avaliou-se também a resposta imune e proteção de camundongos vacinados com uma vacina de RNA contendo o gene da glicoproteína do vírus rábico. A vacina de RNA auto-replicante gerou uma resposta celular e humoral (IgG) e conferiu proteção (SAXENA et al., 2009).

Entre outros sistemas de expressão testados, as plantas tem sido, também, consideradas uma alternativa segura e eficaz para produção de proteínas heterólogas. A glicoproteína de vírus rábico produzida em tabaco e cenouras induziu uma resposta imune protetora em camundongos desafiados com vírus da raiva (ASHARAF et al., 2005; ROJAS-ANAYA et al., 2009). As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* são uma alternativa adequada para a produção de várias proteínas, por apresentarem fácil manipulação genética, crescimento rápido como os procariotos e principalmente por possuir capacidade para gerar as modificações pós-tradução (CEREGRINO et al., 1999). A glicoproteína do vírus rábico, sintetizada pela levedura *S. cerevisiae*, conservou muitas características semelhantes à glicoproteína nativa e protegeu cobaias frente ao desafio com vírus letal pela via intramuscular, mas não protegeu camundongos ao desafio intracerebral (KLEPFER et al., 1993). *Mycobacterium bovis* cepa BCG foi também utilizado para expressar vários antígenos heterólogos (CRUZ et al., 2002).

Trabalhos realizados em nosso laboratório utilizando *P. pastoris* para expressão de um gene sintético da glicoproteína do vírus da raiva (Patente nº WO2004039400) apresentaram resultados interessantes. A proteína expressa reagiu imunologicamente

com anticorpos anti-rábicos policlonais obtido de animais inoculados com a cepa CVS de vírus rábico fornecido pelo IPVDF (Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Fepagro-Saúde Animal, RS, Brasil. No entanto, os anticorpos produzidos a partir da imunização de camundongos com a proteína recombinante não foram capazes de neutralizar o vírus da raiva. Esta técnica está em desenvolvimento e é promissora para o desenvolvimento de vacinas seguras, sem os riscos que muitas vezes há no desenvolvimento de uma vacina que utiliza agentes infecciosos letais como é o caso do vírus da raiva, aumentando a biossegurança. Embora diferentes vacinas anti-rábicas tenham sido desenvolvidas, poucas tem sido licenciadas para uso, principalmente devido à baixa eficácia em animais (HU et al., 2006).

CONCLUSÃO

A situação da raiva no mundo sugere que é necessário controlar a doença preferencialmente nos animais silvestres. Para atingir esse objetivo, procura-se desenvolver vacinas seguras, eficazes e de fácil aplicação. As vacinas de subunidades são fortes candidatas, já que são inócuas e não apresentam patogenicidade residual por serem produzidas apenas com proteínas antigênicas do vírus.

REFERÊNCIAS

ABELSETH, M.K. An attenuated rabies vaccine for domestic animals produced in tissue culture. **The Canadian Veterinary Journal**, v.5, n.11, p. 279-286, 1964.

ALBAS, A. et al. Perfil antigênico do vírus da raiva isolado de diferentes espécies de morcegos não hematófagos da Região de Presidente Prudente, Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 1, p. 15-17, 2009.

ASHRAF, S. et al. 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.

BASSI, E. J. et al. Expression, purification and immunodetection of a recombinant fragment (residues 179-281) of the G protein from rabies virus ERA strain. **Protein Expression and Purification**, v.1, p. 1-6, 2008.

BENMAAMAR, R. et al. High-level expression of rabies virus glycoprotein with the RNA-based Semliki Forest Virus expression vector. **Journal of Biotechnology**, v. 139, p. 283-290, 2009.

BUNN, T.O. Vaccines and vaccination of domestic animals. In: Campbell, J.B.; Charlton, K.M. Rabies. Boston: Campbell and Charlton, 1988. Cap.14, p. 324-327.

BLANTON, J.D. et al. Oral vaccination of raccoons (*Procyon lotor*) with genetically modified rabies virus vaccines. **Vaccine**, v.25, n.42, p. 7296-7300, 2007.

CARNIELI JR, P. et al. Characterization of Rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. **Virus Research**, v.131, p. 33-46, 2008.

CARNIELI JR, P. et al. Genetic characterization of Rabies virus isolated from cattle between 1997 and 2002 in an epizootic area in the state of São Paulo, Brazil. **Virus Research**, v.144, n.1-2, p. 215-224, 2009.

CDC - Center for Disease Control and Prevention, USA. **The Rabies virus**. Acessado em 09/09/2008. Online. Disponível em: <http://www.cdc.gov/rabies>.

CEREGHINO, L. J.; CREGG, J. M. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v.10, p.422-429, 1999.

CLIQUET, F. et al. Efficacy and bait acceptance of vaccinia vectored rabies in captive foxes (*Vulpes vulpes*), raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) and dogs (*Canis familiaris*). **Vaccine**, v.26, n.36, p.4627-4638, 2008.

Cruz, F.W. et al. Expression of the B-cell and T-cell epitopes of the rabies virus nucleoprotein in *Mycobacterium bovis* BCG and induction of a humoral response in mice. **Vaccine**, v.20, p.731-736, (2002).

CUNHA, E.M.S. et al. Isolamento do vírus da raiva em *Artibeus fimbriatus* no Estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 4, 2005.

DA SILVA, N.N. et al. Vacina anti-rábica tipo Fuenzalida Modificada. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, p. 223-226, 1967.

DIETZSCHOLD, B. et al. Concepts in the pathogenesis of rabies. **Future Virology**, v.3, n.5, p. 481-490, 2008. doi: 10.2217/17460794.3.5.481.

FEHLNER-GARDINER, C. et al. ERA vaccine-derived cases of rabies in wildlife and domestic animals in Ontario, Canada, 1989-2004. **Journal Wildlife Diseases**, v.44, n.1, p. 71-85, 2008.

FISCHER, L.; MINKE, J.; DUFAY, N.; BAUDU, P.; AUDONNET, J-C. Rabies DNA vaccine in the horse: strategies to improve serological response. *Vaccine*, v.21, p. 4593-4596, 2003.

HAIDER, S. Rabies: old disease, new challenges. **Canadian Medical Association Journal**, v. 178, n°5, 2008.

HANLON, C.A. et al. North American field release of a Vaccinia-Rabies Glycoprotein Recombinant Virus. **Journal Wildlife Diseases**, v.34, n.2, p.228-239, 1998.

HE, Y. et al. Expression of the nucleoprotein gene of rabies virus for use as diagnostic reagent. **Journal of Virology Methods**, v.138, p. 147-151, 2006.

HU, R. et al. Prevention of rabies virus infection in dogs by a recombinant canine adenovirus types-2 encoding the rabies virus glycoprotein. **Microbes and Infection**, v.1, p.1-8, 2006.

HUMMELER, K.; KOPROWSKI, H.; WIKTOR, T.J.. Structure and development of rabies virus in tissue culture. **Journal Virology**, v.1, p.152, 1967.

INSTITUTO BUTANTAN. **Vacinas anti-rábicas**. Acessado em 15/09/2008. On-line. Disponível em: <http://www.butantan.gov.br>.

INSTITUTO PASTEUR DE SÃO PAULO. **Evolução Histórica da Raiva**. Acessado em 07/10/2008. On-line. Disponível em: www.pasteur.saude.sp.gov.br.

LANGEVIN, C.; JAARO, H.; BRESSANELLI, S.; TUFFEREAU, C. Rabies vírus glycoprotein is a trimeric ligand for the N-terminal Cysteine-rich domain of the mammalian p75 neurotrophin receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, v.277, n.40, 2002.

JACOBS, B.L. et al. Vaccinia virus vaccines: past, present and future. **Antiviral Research**, v.84, n.1, p.1-13, 2009.

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

KIENY, M.P. et al. Expression of rabies glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. **Nature**, v. 312, p. 163-166, 1984.

KLEPFER, S.R. et al. Characterization of rabies glycoprotein expressed in yeast. **Archives of Virology**, v.128, n.3-4, p. 269-286, 1993.

KNOWLES, M.K. et al. In vitro and in vivo genetic stability studies of a human adenovirus type 5 recombinant rabies glycoprotein vaccine (ONRAB). **Vaccine**, v.27, n.1, p. 2662-2668, 2009.

KOSER, M. L et al. Rabies virus nucleoprotein as a carrier for foreign antigens. **Proceedings of the National Academy of Sciences, U S A**, v. 101, n.25, p. 9405–9410, 2004.

KOBAYASHI, Y. et al. Geographical Distribution of Vampire Bat-related Cattle Rabies in Brazil. **Journal Veterinary Medical Science**, v.68, n.10, p. 1097-1100, 2006.

KOBAYASHI, Y. et al. Genetic analyses of phosphoprotein and matrix protein of rabies viruses isolated in Brazil. **Journal Veterinary Medicine Sciences**, v.69, n.11, p. 1145-1154, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008. **Raiva Humana. Distribuição de casos confirmados por Unidade Federativa. Brasil 1980-2005**. Acessado em 05/10/2008. On-line. Disponível em: <http://www.portal.saude.gov.br>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relatório da Reunião para Coordenadores Estaduais do Programa da Raiva**. 2009. Acessado em 09/07/2009. On-line. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/relatorio_reuniao_coordenadoresraiva.pdf.

MOTA, C.S. Estudos biológicos, imunológico e genético de amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos no Estado do Rio de Janeiro – Sudeste, Brasil. 2008. 84f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, Universidade de São Paulo.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL SAÚDE. **Rabies. Recombinant vaccine for oral immunization of wildlife**. Acessado em 23/09/2008. On-line. Disponível em: <http://www.who.int>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL SAÚDE. **Rabies: A neglected zoonotic disease**. Acessado em 08/07/2009. On-line. Disponível em: <http://www.who.int/rabies/en/>.

PRESCOT, L.M.; HARLEY, J.P.; KLEIN, D.A. Microbiology. 3 ed. Boston: Wm. C. Brown Publishers; 1996.

ROSS A. B. et al. Glicoproteína del virus rábico: Estructura, inmunogenicidad y rol en la patogenia. **Revista Chilena de Insectología**, v.25, p.14-18, 2008.

ROJAS-ANAYA, E. et al. Expression of rabies virus G protein in carrots (*Daucus carota*). **Transgenic Research**, 2009. doi: 10.1007/s11248-009-9278-8.

ROSSATE, R.C. et al. Aerial distribution of ONRAB® baits a tactic to control rabies in raccoons and striped skunks in Ontario, Canada. **Journal of Wildlife Diseases**, v.45, n.2, p.363-379, 2009.

SATO, G. et al. Genetic and Phylogenetic Analysis of glycoprotein of Rabies Virus Isolated from Several species in Brazil. **Journal of Veterinary Medicine Science**, p. 747-753, 2004.

SAXENA, S. et al. Induction of immune responses and protection in mice against rabies using a self-replicating RNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein. **Veterinary Microbiology**, v. 136, p. 36-44, 2009.

SCHAEFER, R. et al. Studies on antigenic and genomic properties of Brazilian rabies virus isolates. **Veterinary Microbiology** p.1-9, 2005.

SCHNEIDER, M.C. et al. Rabies transmitted by vampire bats to humans: Na emerging zoonotic disease in Latin America? **Revista Panamericana de Saúde Pública**, v. 25, n. 3, p. 260-269, 2009.

SES/RS – Secretaria Estadual da Saúde. **31/01/2007 - SES detecta caso de raiva em Tapes**. Acessado em 08/10/2008. On-line. Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br>,

SEAPPA/RS - Secretaria da Agricultura, Pecuária, Pesca e Agronegócio do Rio Grande do Sul. **Diagnóstico de Raiva**. Acessado em 30/08/2008. On-line. Disponível em: <http://www.saa.rs.gov.br>.

STELLE, J. H.; FERNANDEZ, P.J. History of rabies and global aspect. In: Baer GM, ed. The natural history of rabies. 2 ed

TEIXEIRA, L.A. et al. **Instituto Pasteur de São Paulo: Cem anos de combate à Raiva**. História, Ciência, Saúde – Manguinhos, v.11, n.3, p.751-766, 2004.

TEIXEIRA, T. F. et al. Estudo antigênico de amostras do vírus da raiva isolados no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Scientia Veterinariae**, v.3, p.271-275, 2005.

TORDO, N. Characteristic and molecular biology of rabies virus. In: Meslin, F-X, Kaplan, Meslin MM, Koprowsky, H, ed. Laboratory techniques in rabies. 4 ed. Geneva: World Health Organization, 1996. Cap. 3, p. 28-51.

TUFFEREAU, C. et al. The rabies virus glycoprotein receptor p75^{NTR} is not essential for rabies virus infection. **Journal of Virology**, v.81, n. 24, p. 13622-13630, 2007.

UIEDA, W. et al. Raiva em morcegos insetívoros (*Molossidae*) do Sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.29, n.5, p. 393- 397, 1995.

UN, H. et al. Genetic analysis of four human rabies cases reported in Turkey between 2002 and 2006. **Clinical Microbiology and Infection**, p. 1-6, 2009.

VERNON, S.K., NEURATH, A.R., RUBIN, B.A.; Electron microscopic studies on the structure of rabies virus. **Journal Ultrastruct Res**, v.41, p.29, 1972.

YUSIBOV, V. et al. Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. **Vaccine**, v.20, p.3155-3164, 2002.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Expert Consultation on Rabies: first report. 2004. 153f. Geneva, Switzerland.

WU, X. et al. Both viral transcription and replication are reduced when the rabies virus nucleoprotein is not phosphorylated. **Journal of Virology**, v.6, p. 4153-4161, 2002.

ZHANG, S. et al. Rabies ferret-badgers southeastern China. **Emerging Infection Diseases**, v.15, n.6, p.946-949, 2009.

ZULU, G. C. et al. Molecular epidemiologic of rabies: Focus on domestic dogs (*Canis familiaris*) e Black-black jackals (*Canis mesomelas*) from northern South Africa. **Virus Research**, 140, p. 71-78, 2009.

5 ARTIGO 2

CLONAGEM E EXPRESSÃO DE UM GENE SINTÉTICO DA GLICOPROTEÍNA DO VÍRUS DA RAIVA EM *Pichia pastoris*

Artigo científico formatado de acordo com as normas da revista *Brazilian
Journal of Microbiology*

CLONAGEM E EXPRESSÃO DE UM GENE SINTÉTICO DA GLICOPROTEÍNA
DO VÍRUS DA RAIVA EM *Pichia pastoris*

Lorena Leonardo Souza^a, Alceu Gonçalves^a, Luana Alves Dummer^a, Andréa Ramos
Rocha^a, Carlos Gil Turnes^c, Fábio Pereira Leivas Leite^{a,b}

^a Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil

^b Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade
Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil

^c Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade
Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil

* Corresponding author: Phone: +55 53 3227-2770; fax: +55 53 3275-7353. E-mail
address: fabio_leite@ufpel.tche.br (F. P. L. Leite). Universidade Federal de Pelotas, CP
354, CEP, 96010-900, Pelotas, RS, Brazil.

RESUMO

A glicoproteína do vírus da raiva é responsável pela adsorção do vírus à membrana da célula alvo e possui papel importante na infectividade e patogenicidade. É o principal antígeno para o desenvolvimento de uma vacina recombinante, uma vez que induz uma resposta imune protetora e persistente. Um gene sintético da glicoproteína do vírus da raiva foi clonado no vetor pPICZ B de *Pichia pastoris* para permitir a secreção da glicoproteína no meio de cultivo. Após a indução com metanol, uma proteína de aproximadamente 65 kDa foi expressa e reconhecida por anticorpos monoclonais anti-histidina e anticorpos anti-rábicos policlonais. A clonagem e expressão da glicoproteína foram confirmadas pelas técnicas de Nested PCR, SDS-page e *Dot blot*. A proteína demonstrou ser antigênica ao ser reconhecida por anticorpos anti-rábicos proveniente de animais experimentalmente infectados com o vírus rábico cepa CVS. O uso da glicoproteína do vírus rábico é uma escolha plausível para o desenvolvimento de vacinas de subunidades que podem ser usadas para imunização contra a raiva humana e animal, ainda que novos estudos sejam necessários para conhecer as características imunogênicas dessa proteína.

Palavras-chaves: vírus da raiva, vacina recombinante, *Pichia pastoris*, glicoproteína.

ABSTRACT

Rabies an infectious disease that affects human and all warm blooded-animals, is a zoonoses transmitted by inoculation of the rabies virus present in the saliva of an infected animal manly by biting. The glycoprotein of rabies virus responsible for the adherence of virus to target cell membrane plays an important role in infective and pathogenicity. It is the principal antigen for the development of a recombinant vaccine, since it induces a protective immune response and persistent. A synthetic gene of the glycoprotein of rabies virus was cloned into vector pPICZ B of *Pichia pastoris* to promote the secretion of the glycoprotein to the medium. After induction with methanol a protein of approximately 65 KDa was expressed and recognized by monoclonal anti-histidine polyclonal antibody and anti-rabies antibodies. Cloning and expression of the glycoprotein were confirmed by nested PCR, SDS-page and Dot blotting. The antigenic protein was recognized by sera obtained from animals experimentally infected with the CVS strain of rabies virus. The use of glycoprotein of rabies virus is a suitable choice for the development of a subunit vaccine to be used for immunization against human and animal rabies, although further studies are needed to know the characteristics of immunogenic protein.

Key Words: Rabies virus, recombinant vaccine; *Pichia pastoris*, glycoprotein

INTRODUÇÃO

A glicoproteína do vírus rábico é uma proteína exposta e inserida no envelope lipídico do vírus (20), sintetizada no retículo endoplasmático rugoso, na forma de um trímero, e posteriormente transportada para o aparelho de Golgi onde é processada e exportada à superfície da célula com uma conformação madura de 65 kDa (3). A glicoproteína é responsável pela adsorção do vírus à membrana da célula alvo e pela fusão entre a membrana celular e o vírus durante a endocitose (11, 14). Possui papel importante na infectividade e patogenicidade e é responsável pela indução da imunidade protetora (9,20). A glicoproteína é composta por aproximadamente 524 aminoácidos. Os primeiros 19 a 24 aminoácidos formam um peptídeo sinal, seguido de um ectodomínio de 439 aminoácidos, uma região transmembrana de 20 aminoácidos e um endodomínio (citoplasmático) de 44 aminoácidos (15, 20). Através de anticorpos monoclonais classificam os locais antigênicos em conformacionais e lineares. Os dois principais locais antigênicos são *site II*, formados por duas regiões entre os aminoácidos 34-42 e 198-200 respectivamente, e *site III* localizado entre os aminoácidos 330 e 338 (15, 20). Por ser a principal responsável pela indução de anticorpos neutralizantes, a glicoproteína do vírus rábico foi expressa em sistemas alternativos como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (12), em plantas como a *Nicotiana tabacum* (1) e *Daucus carota* (18) e em vírus como o adenovirus (8, 13, 21) e o Semliki Forest virus (2).

Pichia pastoris é uma levedura metilotrófica que é utilizada como sistema de expressão para diversas proteínas exógenas (4, 7, 16). As proteínas exógenas, produzidas por ela, são facilmente isoladas pelo fato de que a *P. pastoris* secreta baixas quantidades de proteínas endógenas. Sua crescente utilização pode ser atribuída por requerer técnicas simples para sua manipulação genética, capacidade de produzir altas concentrações de proteínas de importância biotecnológica, intracelularmente ou

secretadas e à capacidade de realizar algumas modificações pós-tradução próprias dos eucariotos, como a glicosilação (5).

A construção de genes sintéticos é hoje uma forma de aperfeiçoar a expressão heteróloga de proteínas recombinantes. Asharaf e colaboradores (1) projetaram um gene sintético para codificar a glicoproteína do vírus da raiva cepa ERA e alcançar altos níveis de expressão em plantas. No presente trabalho descrevemos a clonagem de um gene sintético da glicoproteína do vírus da raiva em *P. pastoris* e sua expressão como uma alternativa à produção de antígenos vacinais.

MATERIAL E MÉTODOS

Amplificação do gene que codifica a glicoproteína sintética do vírus da raiva e construção de um vetor de expressão.

Para estabelecer um método rápido, seguro e econômico para clonagem e expressão da glicoproteína do vírus rábico, foram utilizados, como molde, um gene sintético da glicoproteína do vírus rábico (Patente nº: WO2004039400). Para amplificação do gene foram desenhados *primers* contendo sítios para enzimas de restrição *KpnI* e *EcoRI*, a fim de direcionar a clonagem no vetor pPICZ B (Invitrogen). Para desenhá-los utilizou-se o programa VectorNTI 8.0 (Informax Inc.). Na Tabela 1 estão dispostos os *primers* desenhados com seus respectivos sítios para enzimas de restrição, destacados.

A amplificação do gene da glicoproteína foi realizada em uma reação de 25 µl contendo 0,75 µl de DNTP (0,3 mM cada), 2,5 µl de 1x tampão, 1 µl de DNA, 1 µl de cada *primer* (10 pmol.µL⁻¹), 5 unidades de *Pfx* e 18,55 µl de água. As amostras

foram submetidas ao seguinte ciclo: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos que incluíram desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 68°C por 30 segundos e extensão 68°C por um minuto, finalizando com extensão final a 68°C por 5 minutos, mantendo a reação a 4°C. O produto de PCR obtido foi purificado com GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, WI, USA). O produto de PCR e o vetor de expressão pPICZ B (Invitrogen) foram digeridos com as enzimas de restrição *Kpn I* e *EcoRI* e posteriormente ligados com T4 DNA ligase. O produto obtido da ligação (pPicz B/gP) foi transformado em *E. coli* cepa Top10F (Invitrogen™) por eletroporação. As células transformadas foram selecionadas em placas com meio LB (1% triptona, 0,5% NaCl, 0,5% extrato de levedura, 1,5% ágar) e Zeocina (25 µg/ml). Os clones recombinantes foram submetidos a um *screening* rápido (10).

Transformação, seleção de *Pichia pastoris* e indução da expressão da proteína heteróloga

O pPICZ B/gP foi propagado em *E. coli*, extraído e purificado por Kit GFX Micro Plasmid Prep e linearizado com a enzima de restrição *PmeI* (New England Biolabs). *P. pastoris* cepa KM71H fenótipo Mut^S foi cultivada em YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona e 2% D-glicose) por 18h em agitador orbital a 28°C e 250 rpm. As células competentes foram preparadas de acordo com o manual da Invitrogen (*EasySelect™ Pichia Expression* - Cat.K1740-01). *P. pastoris* foi transformada por eletroporação com 10 µg de vetor linearizado. Para análise dos clones, colônias isoladas foram repicadas em 10 ml de YPD (Yeast Peptone Dextrose) líquido e incubadas a 28°C durante a noite sob agitação constante. No dia seguinte os cultivos foram centrifugados e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspenso em 5 ml de BMMY - Buffered

Methanol-Complex Médium (1% extrato de levedura; 2% peptona; 1,34% YNB; 4×10^{-5} % biotina; 0,5% metanol; 100 mM tampão fosfato pH 6,0) e incubadas a 28C sob agitaao constante, para que as células recombinantes iniciassem a expressão de proteínas. Durante seis dias, a cada 24 horas, coletaram-se 80 μ l de sobrenadante e adicionaram-se 100 μ l de metanol. As amostras foram analisadas por *SDS Page* e *Dot blotting*, para confirmar a expressão da glicoproteína. As colônias recombinantes que apresentaram os melhores níveis de expressão de proteínas foram selecionadas para expressão em maior escala.

PCR de colônia e Nested PCR de *P. pastoris* recombinante

Para confirmar o gene da glicoproteína sintética recombinado ao genoma da *P. pastoris* foi feito um PCR da colônia de *P. pastoris* e Nested PCR usando primers AOX5' e AOX3' e *primers* para a glicoproteína sintética (Tabela 2), respectivamente.

Purificaao de proteína

Sulfato de amônio foi adicionado à fraao solúvel do extrato celular em pequenas porões ajustando a saturaao em 30, 50 e 80% para determinar a melhor condiao para precipitaao. Após agitaao por 24 horas a 4C, a amostra foi centrifugada a 12.000 g por 15 minutos e o precipitado ressuspendido em PBS pH 7,4. As amostras foram dialisadas com o mesmo tampão por 24 horas e após, concentradas no aucar. A proteína precipitada foi analisada em gel de SDS Page a 10%. A concentraao da glicoproteína foi determinada usando como padrão de comparaao uma curva de Albumina Sérica Bovina (BSA) em gel de poliacrilamida a 10%.

Dot Blotting

Para determinar a expressão da glicoproteína foi realizado *Dot Blotting* utilizando anticorpo monoclonal (MAb) anti-6xHIS conjugado a peroxidase (Sigma) e soro anti-rábico policlonal obtido de animais inoculados com a cepa CVS de vírus rábico. Para isso, ao fim da indução da expressão da proteína em *P. pastoris*, foram aplicados 5 µl dos sobrenadantes de cada clone, inclusive do controle negativo (*P. pastoris* KM71H não transformada), diretamente em membrana de nitrocelulose (*Hybond C*, Amersham Biosciences). A membrana foi bloqueada com PBS-T 1X contendo 5% de leite em pó desnatado, sob agitação constante durante 1 hora. Posteriormente, a membrana foi lavada com PBS-T 1X e colocada em uma solução 1:10.000 de Mab anti-histidina conjugado à peroxidase ou anticorpo anti-rábico 1:20, por uma hora a temperatura ambiente sob agitação. A membrana foi lavada três vezes sob agitação a temperatura ambiente por 3 minutos. A seguir foi adicionado anticorpo anti-camundongo conjugado a peroxidase (Dako Co., California, USA) na concentração de 1:1000 sob agitação por uma hora a temperatura ambiente. O *Dot Blotting* foi revelado com a solução DAB (0,6 mg diaminobenzidine, 0,03% de sulfato de níquel, 50 mM de Tris-HCl pH 8,0). No Dot Blotting com anticorpo monoclonal (MAb) anti-histidina utilizou-se como controle positivo uma proteína de 30kDa cedida pelo Laboratório de Bacteriologia do Cenbiot/UFPEL .

SDS-PAGE

O gel de poliacrilamida foi preparado na concentração de 10%. As amostras de proteínas foram adicionadas ao tampão de amostra desnaturante contendo SDS, fervidas por 10 minutos e aplicadas no gel no volume de 10 µl. Em seguida, o gel foi submetido

à eletroforese a 120 V em tampão de corrida Tris-glicina contendo SDS. No final da eletroforese, o gel foi corado com *Coomassie Blue* R-250 (Sigma-Aldrich) por 20 minutos e descorado com solução descorante até que as bandas de proteína ficaram nítidas.

Caracterização antigênica da glicoproteína recombinante (GpR)

Para determinar a antigenicidade da GpR inocularam-se quatro camundongos *Mus musculus* linhagem BALB/c/UFPEL, com 4-6 semanas de idade, por via intraperitoneal com 50 µg de proteína adjuvantada com hidróxido de alumínio a 10%. Os animais receberam três doses com intervalos de sete dias. Coletou-se sangue do plexo ocular, nos dias 0, 7, 14, 28 e 42 para posterior caracterização antigênica.

ELISA

Placas de poliestireno (Cral®, Brasil) foram sensibilizadas com a glicoproteína recombinante diluída em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 durante a noite em refrigeração, na concentração final de 8 µg por cavidade. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T (tampão salina fosfatada pH 7,6 com Tween 20 a 0,05 %). Os soros dos camundongos vacinados com a glicoproteína recombinante foram diluídos 1:25, 1:50 e 1:100 em PBS-T. Para cada amostra foram realizadas três repetições. Cinquenta microlitros de cada diluição foram adicionados à placa. Após incubação por 1h 30 min a 37°C, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T. Soro anti-imunoglobulina G de camundongo conjugado com peroxidase (Dako Co., California, USA) foi adicionado às amostras e incubado por 1h 30 min a 37°C. A reação foi revelada por Orto Fenil

Diamina (2 mg em 1,16 ml de tampão fosfato, 1,32 ml de tampão citrato, 2,52 ml de água, à qual foram adicionados 6 µl de água oxigenada de 30 vol. A leitura da densidade ótica foi feita a 450 nm em leitor de ELISA (Dynatech MR 700, Alemanha) 15 min após adicionar o revelador.

Inibição da Imunofluorescência

Para a realização da técnica de Inibição da Imunofluorescência as amostras de soro foram diluídas 1:2 e 1:20. Lâminas de vidro foram preparadas com impressão de cérebro de camundongo positivo para raiva (Cepa CVS) e fixadas com acetona gelada por 20 min. Os soros testes foram aplicados sob as lâminas e logo após, mantidos em banho-maria por 30 min. A seguir as lâminas foram lavadas com PBS e água. Gotas de soro conjugado a Isotiocianato de Fluoresceína adsorvido a uma suspensão de cérebro de camundongo normal (CCN) ou a uma suspensão de cérebro de camundongo infectado com vírus rábico (CVS) foram colocadas sob os campos demarcados e incubados a 37°C por 30 min. Uma nova lavagem com PBS e água foi feita e após a secagem das lâminas gotas de glicerina tamponada foram dispostas sobre cada campo. As lâminas foram cobertas com lamínulas para leitura em microscópio para imunofluorescência.

RESULTADOS e DISCUSSÃO

Amplificação do gene por PCR e clonagem em pPICZ B

O gene sintético da glicoproteína do vírus da raiva, fornecido pelo Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, foi amplificado pela técnica de PCR a partir de um vetor de Herpesvírus bovino tipo-5 construído estrategicamente para expressar um gene sintético da glicoproteína do vírus rábico (Patente nº: WO2004039400). O gene sintético está composto por um ectodomínio, um domínio de transmembrana e um domínio citoplasmático, estando ausente apenas o peptídeo sinal. O alinhamento da sequência da glicoproteína sintética, feito no Blast (NCBI), comparando à sequências do gene da glicoproteína do vírus da raiva, previamente caracterizados e depositados no GenBank, revelou até 98% de domínios conservados. O anelamento do primer *forward* ocorreu entre os pares de bases 59 e 76 e o do primer *reverse* ocorreu entre os pares de base 1555 e 1572 amplificando um fragmentos de aproximadamente 1600 pb (Figura 1). A clonagem da glicoproteína sintética em *E. coli* usando o vetor pPICZ B resultou em diversas colônias resistentes à zeocina. Vinte colônias foram analisadas por *screening* rápido (10) resultando em 6 clones recombinantes. Um dos clones foi propagado em LB líquido contendo 25 µg.mL⁻¹ de zeocina e cultivado em agitador orbital a 37°C durante a noite. Após propagação dos clones, os plasmídeos recombinantes (pPICZ B/gP) foram extraídos com GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (GE Healthcare) e purificados. *P. pastoris* cepa KM71H foi transformada com pPICZ B/gP e as colônias recombinantes selecionadas para expressão em balão de vidro.

Expressão da glicoproteína sintética

P. pastoris recombinante foi cultivada em balões de vidro para confirmar a expressão da glicoproteína. A expressão das proteínas não foi tóxica para as leveduras (12) e o pico de expressão pôde ser detectado 72 horas após o início da indução com metanol. A presença da glicoproteína no sobrenadante foi confirmada por *SDS-page* (Figura 2) e *Dot blotting* (Figuras 3 e 4). A glicoproteína sintética apresentou características semelhantes à sua homóloga viral: foi expressa com peso molecular próximo a 65 kDa (3) e foi reconhecida por anticorpos policlonais anti-rábicos. Esta semelhança também foi descrita na expressão da glicoproteína em *S. cerevisiae* (12), em plantas como a *Nicotiana tabacum* (1) e *Daucus carota* (19) e em vírus como o adenovirus (8, 15, 21) e o Semliki Forest virus (2).

A análise em *SDS-page* da GpR expressa por *P. pastoris* revelou uma considerável variação no nível de expressão, com algumas amostras revelando alta expressão e outras baixa expressão (Figura 2). A proteína foi obtida em diferentes concentrações nos vários cultivos feitos em balão usando sempre a mesma cepa recombinante. Dummer et al (7) descreveram, em seu trabalho, que nem todas as amostras secretavam a mesma quantidade de proteína e sugeriu que isto poderia ocorrer devido a múltiplas cópias de integração no vetor ou devido a alguma interferência no procedimento. As bandas de diferentes tamanhos, observadas também no *SDS-page*, sugerem que a GpR poderia ter formado dímeros, que poderiam ter ocorrido diferentes níveis de glicosilação ou que talvez tenha ocorrido uma degradação da região C-terminal da proteína recombinante (7).

As amostras 3 e 5 analisadas no *SDS-page* (Figura 2) foram testadas por *Dot blotting* e reagiram positivamente com os anticorpos policlonais anti-rábicos (Figura 3) e monoclonais anti-histidina (Figura 4). A proteína demonstrou ser antigênica ao ser

reconhecida por anticorpos anti-rábicos proveniente de animais experimentalmente infectados com vírus da raiva cepa CVS. A capacidade da *P. pastoris* em expressar a glicoproteína sintética do vírus da raiva com características antigênicas sugere que a expressão do antígeno rábico em *P. pastoris* é uma alternativa viável para a produção do imunógeno. A maioria das pesquisas tem focado nesse antígeno viral porque ele tem um papel importante na imunidade. Este fato se torna mais relevante considerando que o sistema *P. pastoris* exclui a necessidade de trabalhar com o vírus nativo, diminuindo o risco durante a produção de vacinas.

Nested PCR da colônia de *P. pastoris*

P. pastoris recombinante foi confirmada por Nested PCR (Figura 5). As amostras quando submetidas à reação de PCR, baseada em uma sequência do gene que codifica a glicoproteína sintética do vírus da raiva não foram capazes de amplificar o fragmento de 1598 pb. Quando estas amostras foram submetidas à Nested PCR foi detectado o gene da glicoproteína sintética, onde foi observado um fragmento de aproximadamente 1600 pb, que corresponde ao gene sintético da glicoproteína da raiva (Figura 5). A utilização do Nested PCR aumentou a especificidade e a eficiência da reação e foi definitivo para confirmarmos a recombinação do gene sintético ao genoma da *P. pastoris*.

Purificação e quantificação da glicoproteína sintética

A estratégia escolhida para purificação da glicoproteína recombinante foi a precipitação com sulfato de amônio. Os melhores resultados foram observados quando a precipitação foi feita utilizando o sulfato na concentração de 80%. Após a precipitação

com sulfato de amônio foi feita a dessalinização por diálise e concentração em açúcar. As amostras foram observadas em gel de poliacrilamida a 10%. A proteína foi secretada em diferentes concentrações nos diferentes cultivos. Observou-se que as colônias recombinantes selecionadas para a expressão em balão, não mantinham um padrão de produção. Este fato, também foi observado na expressão da glicoproteína D do herpesvirus bovino tipo 5 (7) e na produção da glicoproteína do coronavírus (5) pela *P. pastoris* cepa KM7H1.

O rendimento máximo obtido durante a expressão da glicoproteína sintética do vírus da raiva foi de 100 mg/L, enquanto o rendimento máximo da rEMA (16), da glicoproteína D do herpesvirus bovino tipo 5 (7) e da glicoproteína do coronavírus (4) por *P. pastoris* cepa KM7H1 foi, respectivamente, 389 mg/L, 190 mg/L e 46 mg/L. Podemos observar com este resultado que não existe expressão de proteína heterólogas dentro de uma média e que os artigos sobre expressão em *P. pastoris* reportam diferentes concentrações de proteínas expressas em meio líquido (4,7,16).

Caracterização antigênica da GpR

A glicoproteína do vírus rábico é o antígeno de superfície capaz de induzir a formação de anticorpos e de reagir com eles. A GpR reagiu com anticorpos anti-rábicos (Figura 3) e anti-histidina (Figura 4) no *Dot blotting*. No ELISA, a GpR foi reconhecida por anticorpos presentes no soro de camundongos inoculados com a glicoproteína recombinante. A soroconversão (Figura 6), induzida pelas três doses de GpR inoculadas nos camundongos, chegou a 10 vezes no 28^o dia do experimento. Foram testadas diferentes diluições dos soros para otimizar as reações. Observou-se um melhor resultado, quanto a soroconversão, quando foi utilizada a diluição 1:25. A GpR,

produzida neste trabalho, demonstrou ser antigênica ao ser reconhecida por anticorpos e imunogênica ao gerar anticorpos.

No teste da Inibição da Imunofluorescência utilizando soros de camundongos vacinados com GpR, não houve inibição da imunofluorescência, demonstrando que os anticorpos anti-GpR não foram capazes de neutralizar o vírus rábico CVS. Com base na prova de Inibição da Imunofluorescência podemos sugerir que a glicoproteína sintética, produzida neste estudo, não seria capaz de proteger animais desafiados com CVS, o que também foi descrito com a glicoproteína expressa em *S. cerevisiae*, que não protegeu camundongos desafiados por via intra-cerebral (12). A expressão de proteínas heterólogas em leveduras tem sido muito utilizada devido a uma série de vantagens que este sistema apresenta em relação a outros (5). No entanto a expressão da glicoproteína por leveduras pode estar induzindo uma alteração na conformação da glicoproteína, o que afeta diretamente a indução de uma resposta imune protetora frente ao vírus da raiva. Já a glicoproteína expressa por plantas como o *Nicotiana tabacum*(1) e a *Daucus carota* (19) induziram uma imunidade protetora contra o desafio intra-cerebral em camundongos. Os resultados obtidos a partir da glicoproteína gerada por adenovírus como vetor de expressão, permitiu o registro de uma vacina oral para controlar a raiva em animais silvestres (13, 21).

A glicoproteína do vírus da raiva é uma proteína trimérica, transmembrana que media o reconhecimento do receptor viral. A conformação da glicoproteína pode ser alterada pela inserção de peptídeos O-glicosilados, pela ausência do domínio transmembrana e pela exposição ao pH 5,8 (11, 14,18). A alteração da conformação tem como consequência direta o não reconhecimento por anticorpos monoclonais (11, 14, 18). Em um estudo realizado para estudar a importância da região transmembrana observou-se que a melhor resposta imune foi obtida quando o domínio transmembrana

estava presente na construção, o que confirmou a importância dela na conformação da glicoproteína e geração de uma resposta imune efetiva (18). Em nosso trabalho, apesar de não ter sido realizado um estudo detalhado da conformação da GpR, podemos sugerir que a proteína expressa pela levedura *P. pastoris* sofreu alterações em sua conformação. Há possibilidade de ter ocorrido alterações de pH, já que a antigenicidade da glicoproteína exposta na superfície da célula pode ser perdida quando as células são expostas a um pH 5,8 (11). Além disso, pode ter havido inserção de peptídeos O-glicosilados entre o ectodomínio e o domínio transmembrana o que poderia induzir uma alteração na conformação da glicoproteína (14). Sendo assim, podemos justificar que os anticorpos produzidos a partir da GpR não puderam reconhecer a glicoproteína nativa do vírus da raiva devido a modificações de epítopos importantes da glicoproteína recombinante. Vacinas de DNA construídas com este mesmo gene não protegeram camundongos desafiados com o vírus da raiva (Dados não publicados).

Embora haja excelentes trabalhos e excelentes resultados descrevendo diversos sistemas de expressão para a glicoproteína do vírus rábico, há necessidade de se continuar os estudos para um melhor conhecimento da estrutura e função deste antígeno. As pesquisas nesse campo são um pré-requisito para o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz.

Conclusão

Podemos concluir que a clonagem e expressão da glicoproteína sintética, pela levedura metilotrófica *P. pastoris*, foi efetiva, o que permitiu a produção de uma proteína antigênica.

Agradecimentos

Ao Prof. Paulo Roehle e a Helena Beatriz Batista, do Departamento de Virologia da FEPAGRO - Saúde Animal - IPVDF & ICBS-UFRGS, Porto Alegre, RS, a Prof.^a Ana Claudia Franco, do ICBS-UFRGS, Porto Alegre, RS, ao Dr Franz Rijsewijk e ao Dr Sylvio Alfredo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Asharaf, S.; Sinng, P. K.; Yadav, D. K.; Tuli, R. (2005). High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. *J. Biotec.*, 119, 1-14.
- 2- Benmaamar, R.; Astray, R. M.; Wagner, R.; Pereira, C. A. (2009). High-level expression of rabies virus glycoprotein with the RNA-based Semliki Forest Virus expression vector. *J. Biotec.*, 139, 283-290.
- 3- Center for Disease Control and Prevention, USA. 2008. The Rabies virus. Disponível em: [http://: www.cdc.gov/rabies](http://www.cdc.gov/rabies). Acessado em 09/09/2008.
- 4- Chuck, C.P.; Wong, C.H.; Chow, L.M.C.; Fung, K.P.; Waye, M.M.Y.; Tsui, S.K.W. (2009). Expression of SARS – coronavirus spike glycoprotein in *Pichia pastoris*. *Virus Genes*, 38(1), 1-9.
- 5- Cereguino, L. J.; Cregg, J. M. (2000). Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr opinion in Biotech*, 10, 422-429.
- 6- Dietzschold, B; Jianwei, L.; Faber, M., Schnell, M. (2008). Concepts in the pathogenesis of rabies. *Future Virology*, 3(5), 481-490.
- 7- Dummer, L.A.; Conceição, F.R.; Nizoli, L.Q.; Moraes, C.M.; Rocha, A.R.; Souza, L. L.; Roos, T.; Vidor, T.; Leite, F.P.L. (2009). Cloning and expression of a truncated form envelope glycoprotein D of bovine herpesvirus type 5 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Virol. Meth*, 161, 84-90.

8- Hu, R.; Zhang, S.; Fooks, A. R.; Yuan, H.; Liu, Y.; Li, H.; Tu, C.; Xia, X.; Xiao, Y. (2006). Prevention of rabies virus infection in dogs by a recombinant canine adenovirus type-2 encoding the rabies glycoprotein. *Microbes and Infection*, 1, 1-8.

9- Johnson, N.; Mansfield, K. L.; Fooks, A. R. 2002. Canine vaccine recipients recognize an immunodominant region of the rabies virus glycoprotein. *J. Gen. Virol.*, 83, 2663-2669.

10 - Jouglard, S.D.; Medeiros, M.A.; Vaz, E.K.; Bastos R.G.; Da Cunha C.W.; Armoa G.R.G.; Dellagostin O.A. (2002). An ultra-rapid and inexpensive plasmid preparation method for screening recombinant colonies. *ASMJ*, 71, 234, 2002.

11- Kankanamge, P.J.; Irie, T.; Mannen, K.; Tochikura, T.S.; Kawai, A. (2003). Mapping of the low pH-sensitive conformational epitope of rabies glycoprotein recognized by a monoclonal antibody # 1-30-44. *Microbiol. Immunol.* 47(7), 507-519.

12- Klepfer, S.R.; Debouck, C.; Uffelman, J.; Jacobs, P.; Jones, E.V. 1993. Characterization of rabies glycoprotein expressed in yeast. *Ach of Virol.*, 128(3-4), 269-286.

13- Knowles, M.K.; Roberts, D.; Craig, S.; Sheen, M.; Nadin-avis, S.A.; Wandeler, A.I. (2009). In vitro and in vivo genetic stability studies of a human adenovirus type 5 recombinant rabies glycoprotein vaccine (ONRAB). *Vaccine*, 27(1), 2662-2668.

14- Maillard, A. P.; Gaudin, Y. (2002). Rabies virus glycoprotein can fold two alternative, antigenically distinct conformations depending on membrane-anchor type. *J Gen Virol.* 83, 1465-1476.

- 15- Mansfield, K.L.; Johnson, N.; Fooks, A.R. (2004). Identification of a conserved linear epitope at the N terminus of the rabies virus glycoprotein. *J Gen Virol*, 85, 3279-3283.
- 16- Nizoli, L.Q. (2009). Expressão heteróloga e utilização da proteína recombinante EMA-1 de *Theileria equi* como imunobiológico. Pelotas, RS, Brasil, 67p. (Tese – Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. UFPEL).
- 17- Organização Mundial da Saúde. 2009. Rabies: A neglected zoonotic disease. Disponível em: <http://www.who.int/rabies/en/>, acessado em 08/07/2009.
- 18- Rath, A.; Choudhury, S.; Batra, D.; Kapre, S.V.; Rupprecht, C. E.; Gupta, S.K. (2005). DNA vaccine for rabies: Relevance of trans-membrane domain of the glycoprotein in generation an antibody response. *Virus Research*, doi: 101016/j.virusres.2005.05.002.
- 19- Rojas - Anaya, E. Loza-Rubio, E.; Oliveira-Flores, M. T.; Gomes-Lim, M. (2009). Expression of rabies virus G protein in carrots (*Daucus carota*). *Transgenic Research*, doi: 10.1007/s11248-009-9278-8.
- 20- Ross, A. B.; Favi, M. C.; Vásquez, A. V. (2008). Glicoproteína del vírus rábico: Estructura, inmunogenicidad y rol en la patogenia. *Rev. Chil. Infect*, 25, 14-18.
- 21- Rossate, R.C.; Donovan, D.; Davies, J.C.; Allan, M.; Bachmann, P.; Stevenson, P.; Sobey, K.; Brown, L.; Silver, A.; Bennet, K.; Buchanan, T.; Bruce, L.; Lwson, K. (2009). Aerial distribution of ONRAB® baits a tactic to control rabies in raccoons and striped skunks in Ontario, Canada. *J. Wildlife Dis.*, 45(2), 363-379.

TABELAS

Tabela 1. Seqüência dos *primers* utilizados nas ampliações de PCR, Nested PCR e das enzimas de restrição utilizadas na clonagem.

Iniciadores	Seqüência de Nucleotídeos	Enzima
GpsintFor	5' - CG GAATTC AATTCCCCATCTACACAA - 3'	<i>EcoRI</i>
GpsintRev	5' - GGGTACC AGGCGGGCATCGCCTTC - 3'	<i>KpnI</i>

Tabela 2. Seqüência dos *primers* utilizados nas ampliações de PCR, Nested PCR.

	Seqüência de Nucleotídeos
GpsintFor	5' - CG GAATTC AATTCCCCATCTACACAA - 3'
GpsintRev	5' - GGGTACC AGGCGGGCATCGCCTTC - 3'
5' <i>AOXI</i>	5' - <i>AOXI</i> - GACTGGTTCCAATTGACAAGC -3'
3' <i>AOXI</i>	3' - <i>AOXI</i> ' - GCAAATGGCATTCTGACATCC- 5'

FIGURAS

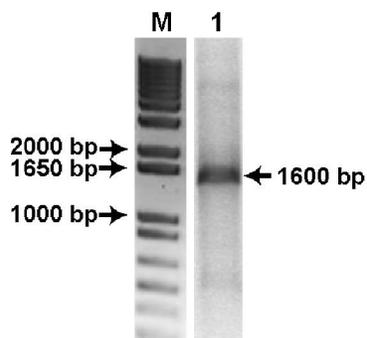


FIGURA 1: Produto da amplificação do gene sintético da glicoproteína do vírus da raiva. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Linha M- marcador Ladder Plus; Linha 1- amplificação do gene Gp.

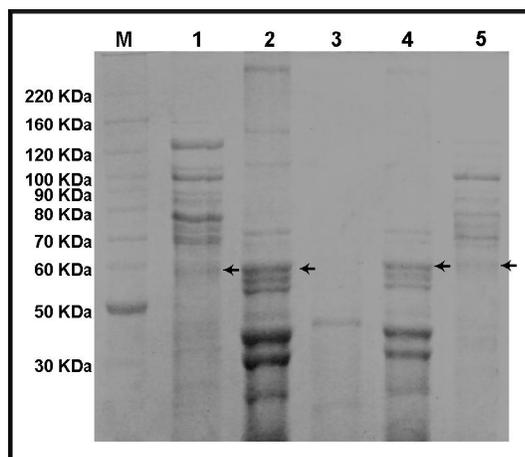


FIGURA 2: SDS-page. Análise de cinco amostras de glicoproteína do vírus rábico expresso nas mesmas condições de cultivo de *P. pastoris*. Linha M: Marcador de peso molecular (BenchMark9™ Protein Ladder, Invitrogen); Linhas 1, 2, 3, 4 e 5, amostras de glicoproteína do vírus da raiva (60 kDa).

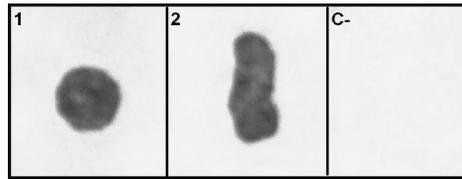


FIGURA 3: *Dot Blotting* para detecção da glicoproteína com soro anti-rábico policlonal (IPV). Amostras 1 e 2, de glicoproteína do vírus da raiva, expressas pela levedura *P. pastoris*. (C-) controle negativo.



FIGURA 4: Dot Blotting para detecção da glicoproteína do vírus da raiva com anticorpos monoclonais anti-histidina. Controle positivo (C+). Amostras 1, 2 e 3 da glicoproteína do vírus da raiva expressas pela levedura *P. pastoris*.

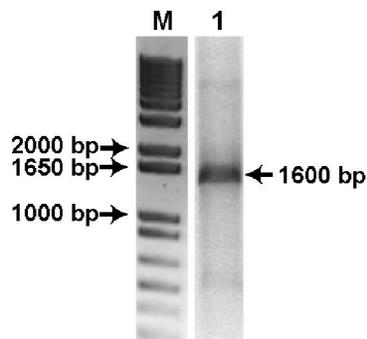


FIGURA 5: Nested PCR. Eletroforese em gel de agarose 0,8% demonstrando os produtos da PCR, onde: Linha M, marcador Ladder Plus; Linha 1: Nested PCR gene GP sintética .

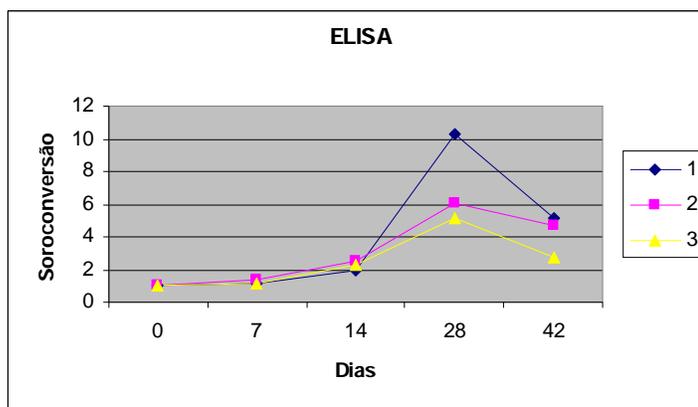


Figura 6: ELISA. Gráfico da soroconversão de camundongos imunizados com a GpR. 1- diluição 1:25; 2- diluição 1:50; 3- diluição 1:100. Dias 0, 7 e 14: vacinação dos camundongos. Dias 0, 7, 14, 28 e 42: coleta de sangue.

6 ARTIGO 3

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DA NUCLEOPROTEÍNA DO VÍRUS DA
RAIVA EM *Pichia pastoris***

**Artigo científico formatado de acordo com as normas da revista *Protein
Expression and Purification***

CLONAGEM E EXPRESSÃO DA NUCLEOPROTEÍNA DO VÍRUS DA

RAIVA EM *Pichia pastoris*

Lorena Leonardo Souza^a, Alceu Gonçalves^a, Luana Alves Dummer^a, Carlos Gil

Turnes^c, Fábio Pereira Leivas Leite^{a,b}

^a Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil

^b Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil

^c Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil

* Corresponding author: Phone: +55 53 3227-2770; fax: +55 53 3275-7353. E-mail address: fabio_leite@ufpel.tche.br (F. P. L. Leite). Universidade Federal de Pelotas, CP

354, CEP, 96010-900, Pelotas, RS, Brazil.

RESUMO

O gene da nucleoproteína do vírus rábico é o mais conservado dos cinco genes estruturais e tem sido usado frequentemente para classificar os isolados dentro de genótipo e como alternativa na produção de antígenos recombinantes com a finalidade de diagnóstico. O presente trabalho descreve a clonagem e expressão da nucleoproteína do vírus rábico utilizando como sistema de expressão a levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. O gene da nucleoproteína do vírus rábico foi amplificado do plasmídeo pUC18N e clonado no vetor pPICZ B de *Pichia pastoris* para permitir a expressão da nucleoproteína recombinante no meio de cultivo. Após indução com metanol, uma proteína de aproximadamente 60 kDa foi expressa e reconhecida por anticorpos monoclonais anti-histidina, sendo a clonagem e expressão da nucleoproteína recombinante confirmadas pelas técnicas de *Dot blotting e Western blotting*.

Palavras-chaves: nucleoproteína, vírus da raiva, *Pichia pastoris*.

ABSTRACT

The nucleoprotein gene of rabies virus is the best preserved of the five structural genes and has been often used to classify the isolates into genotype and an alternative in the production of recombinant antigens for the purpose of diagnosis. Based on these facts the present study describes the cloning and expression of the nucleoprotein of rabies virus using as expression system in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. The nucleoprotein gene of rabies virus was amplified from plasmid pUC18N and cloned into vector pPICZ B *Pichia pastoris* to allow the expression of recombinant nucleoprotein in the culture medium. After induction with methanol, a protein of approximately 60 kDa was expressed and recognized by monoclonal anti-histidine, and the cloning and expression of recombinant nucleoprotein confirmed by techniques *Dot blotting* and *Western blotting*.

Keys-words: nucleoprotein, rabies virus, *Pichia pastoris*

INTRODUÇÃO

O vírus da raiva pertence à Ordem *Mononegavirales*, Família *Rhabdoviridae*, Gênero *Lyssavirus*. O genoma viral consiste de RNA fita simples, não segmentado com polaridade negativa (3'-5') e está composto por cinco genes, os quais codificam uma nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína da matriz (M), glicoproteína (G) e RNA polimerase (3). A nucleoproteína é o principal componente do RNA viral e tem papel importante na regulação da transcrição e replicação do RNA viral (14), além de induzir uma resposta de células T auxiliares e de células B (9).

O gene da nucleoproteína (450 aminoácidos e 58-62 kDa) é o mais conservado, antigenicamente e geneticamente, dos cinco genes estruturais e tem sido usado frequentemente para classificar os isolados dentro de genótipos (13). É também utilizado para identificar geneticamente os vírus que circulam entre as populações de animais domésticos e silvestres (2, 11). Estruturas antigênicas da nucleoproteína foram investigadas por ensaios de ligação competitiva usando painéis de anticorpos monoclonais (Mabs) e identificaram pelo menos 4 sítios antigênicos (6). Com a possibilidade de utilizar a nucleoproteína em imunoenaios e caracterização genotípica do vírus rábico, há interesse de expressá-la como proteína recombinante. Com a possibilidade de ser utilizada em imunoenaios e caracterização de genotípica do vírus rábico, há interesse de expressá-la como proteína recombinante (7). Diferentes sistemas de expressão gênica foram empregados para estudar as proteínas recombinantes. Entre eles podemos citar as bactérias (4, 7), as leveduras (5, 10, 12) e as plantas (1). Kucinskaite et al (10) caracterizaram antigenicamente a nucleoproteína do vírus da raiva, cepa CVS (Challenge Virus Standard), expressa pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A nucleoproteína expressa em tomate (*Solanum lycopersicum*) foi caracterizada antigenicamente e imunologicamente em camundongos (1). No presente

trabalho nós descrevemos a clonagem e expressão da nucleoproteína do vírus da raiva pela levedura metilotrófica *Pichia pastoris*

MATERIAL E MÉTODOS

Clonagem do gene que codifica a nucleoproteína do vírus da raiva

O gene da nucleoproteína do vírus rábico foi clonado do plasmídeo pUC18N, construído a partir da amplificação da cepa Pasteur (4). Para amplificação do gene da nucleoproteína foram desenhados *primers* para o gene da nucleoproteína do vírus rábico cepa ERA contendo sítios para enzimas de restrição *KpnI* e *XbaI*, a fim de direcionar a clonagem no vetor pPICZ B (Invitrogen). Para desenhá-los utilizou-se o programa VectorNTI 8.0 (Informax Inc.). Na Tabela 1 estão dispostos os *primers* desenhados com seus respectivos sítios para enzimas de restrição.

A amplificação do gene da nucleoproteína foi realizada em uma reação de 25 µl contendo 0,5 µl de dNTP, 2,5 µl 10 x tampão, 0,75µl de Cloreto de Magnésio (1,5 mM), 2 µl de DNA, 1 µL de cada primer (10 pmol.µL⁻¹), 0,2 µl (2 unidades) de *Taq* polimerase e 17,05 µl de água. A reação foi realizada em termociclador onde as amostras foram submetidas ao seguinte ciclo: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos que incluíram desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento a 55°C por 30 seg e extensão a 72°C por um min, finalizando com extensão final a 72°C por 5 min, sendo a reação mantida a 4°C. As amplificações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% e posteriormente purificados com o GFX PCR DNA and GEL BAND Purification Kit (GE Healthcare, USA). O produto de PCR e o vetor de

expressão pPicz B (Invitrogen) foram digeridos com as enzimas de restrição *Kpn I* e *XbaI* e ligados com T4 DNA ligase. O produto obtido da ligação (pPicz B/Np) foi transformado em *E. coli* cepa Top10F (Invitrogen™) por eletroporação. As células transformadas foram selecionadas em placas com meio LB (1% triptona, 0,5% NaCl, 0,5% extrato de levedura, 1,5% ágar) e Zeocina (25 µg/ml). Os clones recombinantes foram selecionados por *screening* rápido (8).

Transformação, seleção de *Pichia pastoris* e indução da expressão da proteína heteróloga

O pPICZ B/Np foi propagado em *E. coli* extraído e purificado por Kit GFX Micro Plasmid Prep Kit e linearizado com a enzima de restrição *PmeI* (New England Biolabs). A *P. pastoris* cepa KM71H fenótipo Mut^S foi cultivada em YPD (1% yeast extract, 2% peptone and 2% D-glucose) por 18h em shaker orbital a 28°C e agitação a 250 rpm. As células competentes foram preparadas de acordo com o manual da Invitrogen (*EasySelect*™ *Pichia Expression* - Cat.K1740-01). A *P. pastoris* foi transformada por eletroporação (25µF, 200 , 2kV) com 10 µg de vetor linearizado. Para análise dos clones, colônias isoladas foram repicadas em 10 ml de YPD (Yeast Peptone Dextrose) líquido e incubadas a 28°C, durante a noite, sob agitação constante. Posteriormente, os cultivos foram centrifugados e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuscitado em 5 ml de BMMY (Buffered Methanol-Complex Medium) e incubadas a 28°C sob agitação constante. Durante seis dias, a cada 24 horas, coletou-se 80µl de sobrenadante e adicionou-se 100 µl de metanol. As amostras foram analisadas por *Dot blotting* e *Western blotting* para confirmar a expressão da nucleoproteína. As

colônias recombinantes que apresentaram os melhores níveis de expressão de proteínas foram selecionadas para expressão em maior escala.

Purificação de proteína

Sulfato de amônio foi adicionado à fração solúvel do extrato celular em pequenas porções ajustando a saturação em 30, 50 e 80% para determinar a melhor condição para precipitação. Após agitação por 24 horas a 4°C, a amostra foi centrifugada a 12.000 g por 15 minutos e o precipitado ressuspendido em PBS pH 7,4. As amostras foram dialisadas com o mesmo tampão por 24 horas e após, concentradas no açúcar. A concentração da nucleoproteína foi determinada por BCATM Protein Assay Kit (Pierce Chemical Company).

Dot Blotting

Para determinar a expressão da nucleoproteína foi realizado *Dot Blotting* utilizando anticorpo monoclonal (MAb) anti-histidina conjugado à peroxidase (Sigma). Ao final da indução da expressão da proteína em *P. pastoris*, os sobrenadantes de cada clone, inclusive do controle negativo (*P. pastoris* KM71H não transformada), foram aplicados diretamente em membrana de nitrocelulose (*Hybond C*, Amersham Biosciences). A membrana foi bloqueada com PBS-T 1X contendo 5% de leite em pó desnatado, sob agitação constante durante 1 hora. Posteriormente, a membrana foi lavada com PBS-T 1X e colocada em uma solução 1:10.000 de anticorpo primário anti-histidina, por uma hora a temperatura ambiente sob agitação. A membrana foi lavada três vezes sob agitação a temperatura ambiente por 3 minutos. A seguir foi adicionado

anticorpo anti-camundongo conjugado a peroxidase (Dako Co. California, USA) na concentração de 1:1000 por uma hora a temperatura ambiente e sob agitação. O *Dot Blotting* foi revelado com a solução DAB (0,6 mg diaminobenzidine, 0,03% de sulfato de níquel, 50 mM de Tris-HCl pH 8,0). No Dot blotting com anticorpo monoclonal (MAb) anti-histidina utilizou-se como controle positivo uma proteína expressa em nosso laboratório contendo cauda de histidina.

Western blotting

As amostras de nucleoproteína foram separadas em gel de poliacrilamida 10% e transferidas para membrana de nitrocelulose (*Hybond C*, Amersham Biosciences). A membrana foi bloqueada com PBS 1X contendo 5% de leite em pó desnatado, sob agitação constante durante 1 hora. Posteriormente, a membrana foi colocada em uma solução com anticorpo primário anti-histidina (1:10.000). A membrana foi lavada três vezes sob agitação a temperatura ambiente por 3 minutos. A seguir foi adicionado anticorpo anti-camundongo conjugado a peroxidase (Dako Co., California, USA) na concentração de 1:1000 por uma hora a temperatura ambiente e sob agitação. O Western blotting foi revelado com DAB (0,6 mg diaminobenzidine, 0,03% de sulfato de níquel, 50 mM de Tris-HCl pH 8,0) para verificar a presença da proteína.

Caracterização imuogênica da nucleoproteína recombinante (NpR)

Para caracterizar a imunogenicidade da NpR a proteína foi inoculada em camundongos fêmeas *Mus musculus* linhagem BALB/c/UFPe1, com 4-6 semanas de idade. Foram inoculados quatro animais com a proteína N recombinante (25ug) adicionada de hidróxido de alumínio como adjuvante (10% do volume). Foram realizadas três inoculações por via subcutânea, com intervalos de quatorze dias. O grupo

controle recebeu somente hidróxido de alumínio. O sangue dos animais imunizados foi coletado por punção do plexo venoso retro-ocular nos dias antecedentes às inoculações das proteínas recombinantes e o soro processado e congelado para análises posteriores.

RESULTADOS e DISCUSSÃO

Amplificação do gene por PCR e clonagem em pPICZ B

O gene da nucleoproteína do vírus da raiva foi amplificado pela técnica de PCR a pUC18N, construído da amplificação da cepa Pasteur (4). Fragmentos próximos a 1400 pb foram obtidos na reação de PCR. A clonagem da nucleoproteína em *E. coli* usando o vetor pPICZ B resultou em diversas colônias resistentes à zeocina. Vinte colônias foram analisadas por *screening* rápido (8) resultando em 6 clones recombinantes. Um dos clones foi propagado em LB líquido contendo 25 µg.mL⁻¹ de zeocina e cultivados em agitador orbital a 37°C durante a noite. Após propagação dos clones, os plasmídeos recombinantes (pPICZ B/Np) foram extraídos com GFXTM Micro Plasmid Prep Kit (GE Healthcare) e purificados. *P. pastoris* cepa KM71H foi transformada com pPICZ B/Np e as colônias recombinantes selecionadas para expressão em balão de vidro.

Expressão, purificação e quantificação da nucleoproteína

A presença da nucleoproteína, no sobrenadante, foi confirmada por *Dot blotting* (Figura 1) e *Western blotting* (Figura 2). *P. pastoris* recombinante, expressando a

nucleoproteína, foi cultivada em balões de vidro para confirmar a expressão. A síntese da nucleoproteína não foi tóxica para as células leveduriformes e pôde ser detectada por *Dot blotting* (Figura 1) a partir das primeiras 48 h de indução com metanol. A glicoproteína do Herpesvírus bovino-5 foi expressa pela *P. pastoris* nas mesmas condições de cultivo sendo detectados, a partir das primeiras 48 h de indução com expressão máxima obtida cinco dias após o início da indução com metanol (5).

A estratégia escolhida para purificação da nucleoproteína recombinante foi a precipitação com sulfato de amônio. Obteve-se melhor resultado quando a proteína foi precipitada com sulfato de amônio a 80% de saturação.

O rendimento máximo obtido durante a expressão da nucleoproteína do vírus da raiva foi de 85 mg/L. Esse valor encontra-se próximo ao rendimento da glicoproteína sintética do vírus da raiva (100 mg/L) produzido em nosso laboratório (dados não publicados), mas encontra-se fora da faixa de concentração de outras proteína produzidas, também, em nosso laboratório (190-389 mg/L) (5, 12).

O Western blotting mostrou uma nucleoproteína recombinante com características semelhantes ao seu homólogo viral. A análise da proteína revelou uma única banda com tamanho entre 55 – 60 kDa (Figura 2) que foi reconhecida por anticorpos monoclonais anti-histidina. O peso molecular da nucleoproteína recombinante expressa pela levedura *P. pastoris* foi consistente com o peso molecular reportado pela expressão em *S. cerevisiae* (10), em *E. coli* (7) e em tomates (1).

CONCLUSÃO

Podemos concluir que a levedura *P. pastoris* pode ser utilizada para a clonagem e expressão da nucleoproteína do vírus da raiva.

REFERÊNCIAS

- 1- Arango, I. P.; Rubio, E. L.; Rojas-Anaya, E.; Flores, T.O.; de la Vara, L.G.; Lim, M. A. G. Expression of the rabies virus nucleoprotein in plants at high-levels and evaluation of immune responses in mice. *Plant Cell Rep*, v.27, p. 677-685.
- 2- Carnieli JR, P.; Fahl, W. D.; Castilho, J.G.; Oliveira, R.N.; Macedo, C.I.; Durymanova, E.; Jorge, R.S.P.; Morato, R.G.; Spíndola, R.O.; Machado, L.M.; Sá, J.E.U.; Carrieri, M.L.; Kotait, I. Characterization of Rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. *Virus Res*, v.131, p. 33-46, 2008.
- 3- CDC - Center for Disease Control and Prevention, USA. The Rabies virus. Acessado em 09/09/2008. Online. Disponível em: <http://www.cdc.gov/rabies>.
- 4- Cruz, F.W.; McBride, A.J.A.; Conceição, F.R.; Dale, J.W.; McFadden, J.; Dellagostin, O.A. Expression of the B-cell and T-cell epitopes of the rabies virus nucleoprotein in *Mycobacterium bovis* BCG and induction of an humoral response in mice. *Vaccine*, 20 (2002) 731-736.
- 5- Dummer, L.A.; Conceição, F.R.; Nizoli, L.Q.; Moraes, C.M.; Rocha, A.R.; Souza, L. L.; Roos, T.; Vidor, T.; Leite, F.P.L. (2009). Cloning and expression of a truncated form envelope glycoprotein D of bovine herpesvirus type 5 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Virol. Meth*, 161, 84-90.
- 6- Goto, H.; Minamoto, N.; Ito, H.; Sujiyama, M.; Kinjo, T.; Kawai A. Mapping of epitopes and structural analysis of antigenic sites in the nucleoprotein of rabies virus. *J of Gen. Virol.*, v.81, p. 119-127, 2000.

7- He, Y.; Gao, D.; Zhang, M. Expression of the nucleoprotein gene of rabies virus for use as diagnostic reagent. *J. Virol. Meth*, v.138, p. 147-151, 2006.

8- Jouglard, S.D.; Medeiros, M.A.; Vaz, E.K.; Bastos R.G.; Da Cunha C.W.; Armoa G.R.G.; Dellagostin O.A. (2002). An Ultra-Rapid and Inexpensive Plasmid Preparation Method for Screening Recombinant Colonies. *ASMT*, 71,234, 2002.

9- Koser, M. L.; McGettigan, J.P.; Smith, M.E.; Koprowski, H.; Dietzschold, B.; Schnell, M. J. Rabies virus nucleoprotein as a carrier for foreign antigens. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 101, n.25, p. 9405–9410, 2004.

10- Kucinskaite, I.; Juozapaittis, M.; Serva, A.; Johnson, N.; Miller, T.; Ulrich, R.G. Antigenic characterization of yeast-expressed lyssavirus nucleoproteins. *Virus Genes*, v.35, p.521-529, 2007.

11- Mota, C.S. Estudos biológicos, imunológico e genético de amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos no Estado do Rio de Janeiro – Sudeste, Brasil. 2008. 84f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, Universidade de São Paulo.

12- Nizoli, L.Q. (2009). Expressão heteróloga e utilização da proteína recombinante EMA-1 de *Theileria equi* como imunobiológico. Pelotas, RS, Brasil, 67p. (Tese – Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. UFPEL).

13- Schaefer, R.; Batista, H. B. R.; Franco, A. C.; Rijsewijk, F. A. M.; Roehe, P.M. Studies on antigenic and genomic properties of Brazilian rabies virus isolates. *Vet Microb*. p.1-9, 2005.

14- Wu, X.; Gong, X.; Foley, H.D.; Schnell, M. J.; Fu, Z. F. Both viral transcription and replication are reduced when the rabies virus nucleoprotein is not phosphorylated. *J Virol.*, v.6, p. 4153-4161, 2002.

TABELA

Tabela 2. Sequência dos *primers* utilizados nas ampliações de PCR, Nested PCR e das enzimas de restrição utilizadas na clonagem.

Iniciadores	Sequência de Nucleotídeos	Enzima
NFor	5' - GGGGTACCTGGATGCCGACAAGATT -3'	<i>KpnI</i>
NRev	5' - GCTCTAGAGAGTCACTCGAATATGTC -3'	<i>XbaI</i>

FIGURAS



Figura 1: *Dot Blotting* para análise da expressão da nucleoproteína. Amostras do sobrenadante coletados a cada 24 h de indução com metanol até o 7º dia de indução. A nucleoproteína foi reconhecida por Mab anti-histidina. Controle positivo (C+): proteína de 30kDa (Laboratório de Bacteriologia/Cenbiot). Controle negativo (C-): KM71H não recombinante.

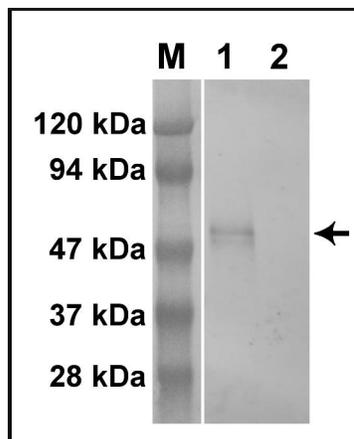


Figura 2: Western blotting. Análise da nucleoproteína recombinante reconhecida por Mab anti-histidina. Linha M: BioPione Low Range Pre-Stained Protein Marker. Linha 1: nucleoproteína recombinante purificada. Linha 2: Controle negativo (C-): KM71H não recombinante.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A glicoproteína do vírus da raiva é um potente antígeno inserido no envelope viral, responsável pela indução da resposta imune contra uma infecção. O desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante iniciou uma nova perspectiva no controle da Raiva, já que vacinas recombinantes não têm patogenicidade residual e são produzidas com proteínas antigênicas do vírus, sem sua presença. A glicoproteína é um antígeno que pode ser produzido para compor vacinas e para o desenvolvimento de testes imunológicos. Em nosso estudo, a *P. pastoris* foi efetiva na clonagem e expressão da glicoproteína do vírus da raiva. No entanto, os anticorpos produzidos a partir da imunização de camundongos com a proteína recombinante não foram capazes de neutralizar o vírus da raiva. Novos estudos sobre a conformação, antigenicidade e imunogenicidade da proteína expressa pela *P. pastoris* devem ser realizados para que possamos alcançar o objetivo principal que é a produção de uma vacina segura e eficaz sem os riscos que, muitas vezes, há no desenvolvimento de uma vacina que utiliza agentes infecciosos letais como é o caso do vírus da raiva, aumentando a biossegurança. A clonagem e expressão da nucleoproteína do vírus da raiva foram realizadas com o objetivo de se obter uma proteína semelhante à proteína nativa para ser utilizada como ferramenta de triagem para testes sorológicos. Para isto novos testes serão necessários para confirmar esta possibilidade. Apesar de ser uma proteína interna, sabe-se a importância dela no reconhecimento de cepas.

8 CONCLUSÕES GERAIS

- a levedura *P. pastoris* é capaz de expressar a nucleoproteína do vírus da raiva
- a levedura *P. pastoris* é capaz de expressar a glicoproteína do vírus da raiva;
- a glicoproteína expressa pela *P. pastoris* induziu uma resposta imune em camundongos;
- a glicoproteína expressa pela *P. pastoris* reage com soros anti-rábicos.

7 REFERÊNCIAS

ABELSETH, M.K. An attenuated rabies vaccine for domestic animals produced in tissue culture. **The Canadian Veterinary Journal**, v.5, n.11, p. 279-286, 1964.

ALBAS, A.; SOUZA, E. A. N.; LOURENÇO, R. A.; FAVORETTO, S.R.; SODRÉ, M. M. Perfil antigênico do vírus da raiva isolado de diferentes espécies de morcegos não hematófagos da Região de Presidente Prudente, Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 1, p. 15-17, 2009.

ASHRAF, S.; SINGH, P. K.; YADAV, D. K.; 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.

BASSI, E. J.; VERNAL, J.; ZANLUCA, C.; TERENCEZI, H.; ZANETTI, C.R. Expression, purification and immunodetection of a recombinant fragment (residues 179-281) of the G protein from rabies virus ERA strain. **Protein Expression and Purification**, v.1, p. 1-6, 2008.

BENMAAMAR, R.; ASTRAY, R. M.; WAGNER, R.; PEREIRA, C. A. High-level expression of rabies virus glycoprotein with the RNA-based Semliki Forest Virus expression vector. **Journal of Biotechnology**, v. 139, p. 283-290, 2009.

BUNN, T.O. Vaccines and vaccination of domestic animals. In: Campbell, J.B.; Charlton, K.M. Rabies. Boston: Campbell and Charlton, 1988. Cap.14, p. 324-327.

BLANTON, J.D. et al. Oral vaccination of raccoons (*Procyon lotor*) with genetically modified rabies virus vaccines. **Vaccine**, v.25, n.42, p. 7296-7300, 2007.

CARNIELI JR, P.; FAHL, W. D.; CASTILHO, J.G.; OLIVEIRA, R.N.; MACEDO, C.I.; DURYMANOVA, E.; JORGE, R.S.P.; MORATO, R.G.; SPÍNDOLA, R.O.; MACHADO, L.M.; SÁ, J.E.U.; CARRIERI, M.L.; KOTAIT, I. Characterization of Rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. **Virus Research**, v.131, p. 33-46, 2008.

CARNIELI JR, P.; CASTILHO, J.G.; de OLIVEIRA FAHL, W.; VERAS, N.M. Genetic characterization of Rabies virus isolated from cattle between 1997 and 2002 in an epizootic area in the state of São Paulo, Brazil. **Virus Research**, v.144, n.1-2, p. 215-224, 2009.

CDC - Center for Disease Control and Prevention, USA. The Rabies virus. Acessado em 09/09/2008. Online. Disponível em: <http://www.cdc.gov/rabies>.

CEREGHINO, L. J.; CREGG, J. M. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v.10, p.422-429, 1999.

CHUCK, C.P.; WONG, C.H.; CHOW, L.M.C.; FUNG, K.P.; WAYE, M.M.Y.; TSUI, S.K.W. Expression of SARS – coronavirus spike glycoprotein in *Pichia pastoris*. **Virus Genes**, v.38, n.1, p. 1-9, 2009.

CLIQUET, F.; BARRAT, J.; GUIOT, A.L.; CAEL, N.; BOUTRAND, S.; MAKI, J.; SCHUMAKER, C.L. Efficacy and bait acceptance of vaccinia vectored rabies in

captive foxes (*Vulpes vulpes*), raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) and dogs (*Canis familiaris*). **Vaccine**, v.26, n.36, p.4627-4638, 2008.

CRUZ, F.W. ; MCBRIDE, A.J.A.; CONCEIÇÃO, F.R.; DALE, J.W.; MCFADDEN, J.; DELLAGOSTIN, O.A. Expression of the B-cell and T-cell epitopes of the rabies virus nucleoprotein in *Mycobacterium bovis* BCG and induction of a humoral response in mice. **Vaccine**, v.20, p.731-736, 2002.

CUNHA, E.M.S; LARA, M. C.; NASSAR, A. F. C.; SODRÉ, M. M.; AMARAL, L. F. V. Isolamento do vírus da raiva em *Artibeus fimbriatus* no Estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 4, 2005.

DIETZSCHOLD, B.; JIANWEI, L.; FABER, M., SCHNELL, M. Concepts in the pathogenesis of rabies. **Future Virology**, v.3, n.5, p. 481-490, 2008. doi: 10.2217/17460794.3.5.481.

DUMMER, L.A.; CONCEIÇÃO, F.R.; NIZOLI, L.Q.; MORAES, C.M.; ROCHA, A.R.; SOUZA, L. L.; ROOS, T.; VIDOR, T.; LEITE, F.P.L. Cloning and expression of a truncated form envelope glycoprotein D of bovine herpesvirus type 5 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Journal of Virology Methods**, v.161, p.84-90, 2009

FEHLNER-GARDINER, C. et al. ERA vaccine-derived cases of rabies in wildlife and domestic animals in Ontario, Canada, 1989-2004. **Journal of Wildlife Diseases**, v.44, n.1, p. 71-85, 2008.

HAIDER, S. Rabies: old disease, new challenges. **Canadian Medical Association Journal**, v. 178, nº5, 2008.

HANLON, C.A. et al. North American field release of a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus. **Journal of Wildlife Diseases**, v.34, n.2, p.228-239, 1998.

HE, Y.; GAO, D.; ZHANG, M. Expression of the nucleoprotein gene of rabies virus for use as diagnostic reagent. **Journal of Virology Methods**, v.138, p. 147-151, 2006.

HU, R.; ZHANG, S.; FOOKS, A. R.; YUAN, H.; LIU, Y.; LI, H.; TU, C.; XIA, X.; XIAO, Y. Prevention of rabies virus infection in dogs by a recombinant canine adenovirus type-2 encoding the rabies virus glycoprotein. **Microbes and Infection**, v.1, p.1-8, 2006.

INSTITUTO BUTANTAN. Vacinas anti-rábicas. Acessado em 15/09/2008. On-line. Disponível em: <http://www.butantan.gov.br>.

INSTITUTO PASTEUR DE SÃO PAULO. Evolução Histórica da Raiva. Acessado em 07/10/2008. On-line. Disponível em: www.pasteur.saude.sp.gov.br.

JACOBS, B.L. Vaccinia virus vaccines: past, present and future. **Antiviral Research**, v.84, n.1, p.1-13, 2009.

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

JOUGLARD, S.D.; MEDEIROS, M.A.; VAZ, E.K.; BASTOS R.G.; DA CUNHA C.W.; ARMOA G.R.G.; DELLAGOSTIN O.A. An ultra-rapid and inexpensive

plasmid preparation method for screening recombinant colonies. **Abstract American Society for Microbiology**, 71, 234, 2002.

KANKANAMGE, P.J.; IRIE, T.; MANNEN, K.; TOCHIKURA, T.S.; KAWAI, A. Mapping of the low pH-sensitive conformational epitope of rabies glycoprotein recognized by a monoclonal antibody # 1-30-44. **Microbiology Immunology**, v.47, n.7, p. 507-519, 2003.

KIENY, M.P. Expression of rabies glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. **Nature**, v. 312, p. 163-166, 1984.

KLEPFER, S.R.; DEBOUCK, C.; UFFELMAN, J.; JACOBS, P.; JONES, E.V. Characterization of rabies glycoprotein expressed in yeast. **Archives of Virology**, v.128, n.3-4, 269-286, 1993.

KNOWLES, M.K.; ROBERTS, D.; CRAIG, S.; SHEEN, M.; NADIN-AVIS, S.A.; WANDELER, A.I. In vitro and in vivo genetic stability studies of a human adenovirus type 5 recombinant rabies glycoprotein vaccine (ONRAB). **Vaccine**, 27(1), 2662-2668, 2009.

KOSER, M. L.; MCGETTIGAN, J.P.; SMITH, M.E.; KOPROWSKI, H.; DIETZSCHOLD, B.; SCHNELL, M. J. Rabies virus nucleoprotein as a carrier for foreign antigens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n.25, p. 9405–9410, 2004.

KOBAYASHI, Y.; OGAWA, A.; SATO, G.; SATO, T.; ITOU, T.; SAMARA, S.I.; CARVALHO, A.A.B.; NOCITI, D.P.; ITO, F.; SAKAI, T. Geographical Distribution of Vampire Bat-related Cattle Rabies in Brazil. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.68, n.10, p. 1097-1100, 2006.

KOBAYASHI, Y.; OKUDA, H.; NAKAMURA, K.; SATO, G.; ITOU, T.; CARVALHO, A.; SILVA, M. V.; MOTA, C.S.; ITO, F.H.; SAKA, T. Genetic analyses of phosphoprotein and matrix protein of rabies viruses isolated in Brazil. **Journal Veterinary Medicine Sciences**, v.69, n.11, p. 1145-1154, 2007.

MAILLARD, A. P.; GAUDIN, Y. Rabies virus glycoprotein can fold two alternative, antigenically distinct conformations depending on membrane-anchor type. **Journal of General Virology**, v.83, p.1465-1476, 2002

MANSFIELD, K.L.; JOHNSON, N.; FOOKS, A.R. Identification of a conserved linear epitope at the N terminus of the rabies virus glycoprotein. **Journal of General Virology**, v.85, 3279-3283, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008. Raiva Humana. Distribuição de casos confirmados por Unidade Federativa. Brasil 1980-2005. Acessado em 05/10/2008. On-line. Disponível em: [http://: www.portal.saude.gov.br](http://www.portal.saude.gov.br).

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relatório da Reunião para Coordenadores Estaduais do Programa da Raiva. 2009. Acessado em 09/07/2009. On-line. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/relatorio_reuniao_coordenadoresraiva.pdf.

MOTA, C.S. Estudos biológicos, imunológico e genético de amostras do vírus da raiva isoladas de morcegos no Estado do Rio de Janeiro – Sudeste, Brasil. 2008. 84f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, Universidade de São Paulo.

NIZOLI, L.Q. (2009). Expressão heteróloga e utilização da proteína recombinante EMA-1 de *Theileria equi* como imunobiológico. Pelotas, RS, Brasil, 67p. (Tese – Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. UFPEL).

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Rabies: A neglected zoonotic disease. Acessado em 08/07/2009. On-line. Disponível em: <http://www.who.int/rabies>

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL SAÚDE. Rabies. Recombinant vaccine for oral immunization of wildlife. Acessado em 23/09/2008. On-line. Disponível em: <http://www.who.int>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL SAÚDE. Rabies: A neglected zoonotic disease. Acessado em 08/07/2009. On-line. Disponível em: <http://www.who.int/rabies/en/>.

RATH, A.; CHOUDHURY, S.; BATRA, D.; KAPRE, S.V.; RUPPRECHT, C. E.; GUPTA, S.K. DNA vaccine for rabies: Relevance of trans-membrane domain of the glycoprotein in generation an antibody response. **Virus Research**, 2005. doi: 101016/j.virusres.2005.05.002.

ROJAS - ANAYA, E. LOZA-RUBIO, E.; OLIVEIRA-FLORES, M. T.; GOMES-LIM, M. Expression of rabies virus G protein in carrots (*Daucus carota*). **Transgenic Research**, 2009. doi: 10.1007/s11248-009-9278-8.

ROSS, A. B.; FAVI, M. C.; VÁSQUEZ, A. V. Glicoproteína del vírus rábico: Estructura, inmunogenicidad y rol en la patogenia. **Revista Chilena Infectologia**, v.25, p.14-18. 2008.

ROSSATE, R.C.; DONOVAN, D.; DAVIES, J.C.; ALLAN, M.; BACHMANN, P.; STEVENSON, P.; SOBEY, K.; BROWN, L.; SILVER, A.; BENNET, K.; BUCHANAN, T.; BRUCE, L.; LWSON, K. Aerial distribution of ONRAB® baits a tactic to control rabies in raccoons and striped skunks in Ontario, Canada. **Journal of Wildlife Diseases**, v.45, n.2, 363-379, 2009.

SATO, G.; ITOU, T.; SHOJI, Y.; MIURA, Y.; MIKAMI, T.; MIKAKO, I.; KURANE, I. Genetic and Phylogenetic Analysis of glycoprotein of Rabies Virus Isolated from Several species in Brazil. **Journal of Veterinary Medicine Science**, p. 747-753, 2004.

SAXENA, S.; SONWANE, A. A.; DAHIYA, S. S.; PATEL, C. L.; SAINI, M.; RAI, A.; GUPTA, P. K. Induction of immune responses and protection in mice against rabies using a self-replicating RNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein. **Veterinary Microbiology**, v. 136, p. 36-44, 2009.

SCHAEFER, R.; BATISTA, H. B. R.; FRANCO, A. C.; RIJSEWIJK, F. A. M.; ROEHE, P.M. Studies on antigenic and genomic properies of Brazilian rabies virus isolates. **Veterinary Microbiology** p.1-9, 2005.

SCHNEIDER, M.C.; ROMIJN, P.C.; UIEDA, W.; TAMAYO, H.; SILVA, D.F.; BEOTTO, A.; SILVA, J.B.; LEANES, L.F. Rabies transmited by vampire bats to humans: Na emerging zoonotic disease in Latin American? **Revista Panamerica de Saúde Pública**, v. 25, n. 3, p. 260-269, 2009.

SES/RS – Secretaria Estadual da Saúde. 31/01/2007 - SES detecta caso de raiva em Tapes. Acessado em 08/10/2008. On-line. Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br>,

SEAPPA/RS - Secretaria da Agricultura, Pecuária, Pesca e Agronegócio do Rio Grande do Sul. Diagnóstico de Raiva. Acessado em 30/08/2008. On-line. Disponível em: <http://www.saa.rs.gov.br>.

DA SILVA, N.N. Vacina anti-rábica tipo Fuenzalida Modificada. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, p. 223-226, 1967.

TEIXEIRA, T. F.; BATISTA, H. B. C. R.; SCHMIT, E.; ROEHE, P.M. Estudo antigênico de amostras do vírus da raiva isolados no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.3, p.271-275, 2005.

TEIXEIRA, L.A.; SANDOVAL, M.R.C.; TAKAOKA, N.Y. Instituto Pasteur de São Paulo: Cem anos de combate à Raiva. História, Ciência, Saúde – Manguinhos, v.11, n.3, p.751-766, 2004.

TUFFEREAU, C.; SCHMIDT, K.; LANGEVIN, C.; LAFAY, F.; DECHANT, G.; KOLTZENBURG, M. The rabies virus glycoprotein receptor p75^{NTR} is not essential for rabies virus infection. **Journal of Virology**, v.81, n. 24, p. 13622-13630, 2007.

UIEDA, W.; HARMANI, N. M.S.; SILVA, M. M. S. Raiva em morcegos insetívoros (Molossidae) do Sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.29, n.5, p. 393- 397, 1995.

UN, H.; JOHNSON, N.; VOS, A.; MULLER, T.; FOOKS, A. R.; AYLAN, O. Genetic analysis of four human rabies cases reported in Turkey between 2002 and 2006. **Clinical Microbiology and Infection**, p. 1-6, 2009.

YUSIBOV, V. Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. **Vaccine**, v.20, p.3155-3164, 2002.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Expert Consultation on Rabies: first report. 2004. 153f. Geneva, Switzerland.

WU, X.; GONG, X.; FOLEY, H. D.; SCHNELL, M. J.; FU, Z. F. Both viral transcription and replication are reduced when the rabies virus nucleoprotein is not phosphorylated. **Journal of Virology**, v.6, p. 4153-4161, 2002.

ZHANG, S.; TANG, Q.; WU, X.; LIU, Y.; ZHANG, F.; RUPPRECHT, C.E.; HU, R. Rabies ferret-baggers southeastern China. **Emerging Infection Diseases**, v.15, n.6, p.946-949, 2009.

ZULU, G. C.; SABETA, C. T.; NEL, L. H. Molecular epidemiologic of rabies: Focus on domestic dogs (*Canis familiaris*) e Black-backed jackals (*Canis mesomelas*) from northern South Africa. **Virus Research**, 140, p. 71-78, 2009.