

RENATO MANCINI ASTRAY

Expressão da glicoproteína recombinante do vírus rábico em sistemas *Drosophila melanogaster* (S2) e Semliki Forest Virus (SFV) = L'expression de la glycoprotéine du virus de la rage dans les systèmes *Drosophila melanogaster* (S2) et Semliki Forest Virus (SFV)

Tese em co-tutela apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo

2009

RENATO MANCINI ASTRAY

Expressão da glicoproteína recombinante do vírus rábico em sistemas *Drosophila melanogaster* (S2) e Semliki Forest Virus (SFV) = L'expression de la glycoprotéine du virus de la rage dans les systèmes *Drosophila melanogaster* (S2) et Semliki Forest Virus (SFV)

Tese em co-tutela apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

**Orientadores: Carlos Augusto Pereira
Franc Pattus**

Co-orientador: Renaud Wagner

São Paulo

2009

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

© reprodução total

Astray, Renato Mancini.

Expressão da glicoproteína recombinante do vírus rábico em sistemas *Drosophila melanogaster* (S2) e Semliki Forest Virus (SFV) / Renato Mancini Astray. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Carlos Augusto Pereira
Franc Pattus.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Expressão recombinante em células eucarióticas.

Versão do título para o inglês: Rabies virus glycoprotein expression in *Drosophila melanogaster* (S2) and Semliki Forest Virus (SFV) systems.

Descritores: 1. Células S2 2. Glicoproteína do vírus rábico 3. Semliki Forest Virus 4. qRT-PCR 5. ELISA 6. RVGPmRNA I. Pereira, Carlos Augusto II. Pattus, Franc III. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia IV. Título.

ICB/SBIB0123/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Renato Mancini Astray.

Título da Tese: Expressão da glicoproteína recombinante do vírus rábico em sistemas *Drosophila melanogaster* (S2) e Semliki Forest Virus (SFV).

Orientador(a): Carlos Augusto Pereira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN


Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da imunogenicidade de glicoproteína da raiva", protocolo nº 433/07, sob a responsabilidade de Carlos Augusto Pereira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 12/03/2008.

Vigência do Projeto: 01/2008 – 12/2009	Nº de animais/espécie 80 / camundongo
---	--

São Paulo, 17 de março de 2008.


P/ Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:


Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

**Dedico esta tese à Cha, amada e amiga,
aos seus passos e ao seu sorriso.**

AGRADECIMENTOS/REMERCIEMENTS/AGRADECIMIENTOS

A Carlos Augusto Pereira por toda a confiança depositada em meu trabalho, por todas as oportunidades que me proporcionou e pela transmissão de muito conhecimento sem desperdiçar uma palavra.

A Renaud Wagner pour toute la connaissance acquise au Département de Récepteurs et Protéines Membranaires de l'Institut Gilbert Laustriat et pour l'aide avec mes séjours à Strasbourg.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan e do grupo temático-TACnet de pesquisa. Aos que estão lá e aos que passaram. Com cada um aprende-se alguma coisa. O tesouro é guardado àqueles que entendem o valor do ser coletivo.

Aux collègues du Département de Récepteurs et Protéines Membranaires de l'Institut Gilbert Laustriat, vous avez étés vraiment patients avec moi et les mots franc-brésiliens.

Aos meus pais José Luis e Lenita, meu irmão Rodrigo, minha irmã Valéria, meu tio Nino, minha avó Yolanda, minha linda Marah... e viva a família brasileira!

A mi abuela, mis tíos y tías de Galicia que tanto quiero, ¡y viva la familia española!

Aos meus amigos, um exército de amigos, na selva, no prado, na legião estrangeira.

Aos pesquisadores do laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, pela grande ajuda e empréstimo de equipamentos, sem os quais não haveria esta tese.

Ao Instituto Butantan e à FAPESP (06-50338-4 e 02/09482-3) pela infraestrutura e pelo financiamento da pesquisa.

Aos Funcionários do Instituto Butantan que sorriem e não se furtam a dizer bom dia.

A l'École Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg de l'Université de Strasbourg et au CNRS (06BRA0006) pour le financement de la recherche et des séjours à Strasbourg.

Aos funcionários e professores do Programa de pós-graduação Interunidades em Biotecnologia.

MUITO OBRIGADO/MERCI BEAUCOUP/MUCHAS GRACIAS

“É um grande esforço para o pobre obter o que lhe falta, e também um grande trabalho para o rico conservar o que lhe sobra”.
(Che Guevara)

“Cada dia a natureza produz o suficiente para nossa carência. Se cada um tomasse o que lhe fosse necessário, não haveria pobreza no mundo e ninguém morreria de fome”.
(Mahatma Gandhi)

RESUMO*

Astray RM. Expressão da glicoproteína recombinante do vírus rábico em sistemas *Drosophila melanogaster* (S2) e Semliki Forest Virus (SFV) [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.*

A glicoproteína do vírus rábico (RVGP) é reconhecidamente o antígeno capaz de induzir a formação de anticorpos neutralizantes e a resposta imune protetora contra a infecção pelo vírus rábico, além de ter participação central na infecção viral por sua ligação com o receptor na membrana das células alvo. Para apresentar sua correta conformação antigênica e função biológica, a RVGP deve estar oligomerizada (trímero) e ser submetida a modificações pós-traducionais. Portanto, a expressão da RVGP recombinante em células de eucariotos superiores é importante para a obtenção de um antígeno com as características adequadas. Estudamos nesta tese as cinéticas de expressão da RVGP e de seu RNA mensageiro (*RVGPmRNA*) em dois sistemas distintos de expressão recombinante: células S2 de *Drosophila melanogaster* estavelmente transfectadas (rS2) e células BHK-21 infectadas com o Semliki Forest Virus (SFV) capaz de produzir o *RVGPmRNA* (SFV-RVGP). Para isso, fizemos um trabalho de padronização do tratamento de amostras de cultivos celulares, adequando-as a um ELISA para dosagem da RVGP e estabelecemos e padronizamos um método de RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) para a dosagem do *RVGPmRNA*. Nas células rS2, mostramos que a quantidade do *RVGPmRNA*, regulado por um promotor constitutivo (actina), apresentou um pico de concentração quando o cultivo saiu da fase exponencial de crescimento, coincidindo com a maior concentração de RVGP/célula. Quando a expressão do *RVGPmRNA* foi regulada por um promotor indutível (metalotioneína), sua quantidade foi máxima em 48 h após a indução com CuSO_4 e a produção da RVGP atingiu valores em torno de $1,2 \mu\text{g}/10^7$ células. Em algumas situações verificamos que a quantidade da RVGP celular aumentou quando a velocidade de crescimento celular foi diminuída, sem alteração nos níveis do *RVGPmRNA*. Na expressão em células BHK-21 infectadas com SFV-RVGP observamos uma correspondência direta entre a razão de infecção (ROI) utilizada e as quantidades de *RVGPmRNA*, RVGP e % de células fluorescentes para a RVGP. Devido à rápida ocorrência de efeito citopático nos cultivos infectados, verificamos que a utilização de ROIs mais elevadas é a melhor condição de trabalho para alcançar maior produtividade de RVGP. Também verificamos que o SFV-RVGP foi capaz de infectar e levar à expressão da RVGP em células

BHK-21 e HuH7, mas não em células HEK-293 e VERO. Para os cálculos das ROI utilizadas, desenvolvemos um novo método de titulação de partículas SFV por qRT-PCR, aplicável a outras construções de SFV recombinante. Utilizamos a RVGP expressa pelos sistemas rS2 e SFV-RVGP em ensaios *in vivo* preliminares para estudar as características imunogênicas das RVGP. As preparações de RVGP utilizadas em ensaios preliminares para a imunização de camundongos foram capazes de induzir a formação de anticorpos neutralizantes e de conferir um bom grau de proteção ao teste de desafio intracerebral com vírus rábico.

Palavras-chave: Células S2. Glicoproteína do vírus rábico. Semliki Forest Vírus. qRT-PCR. ELISA. *RVGPmRNA*

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

