

**FLÁVIA FERREIRA BARBOSA**

**Expressão do ectodomínio da glicoproteína do vírus da raiva em células de inseto (*Drosophila melanogaster* Schneider 2)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

**Área de concentração: Biotecnologia**

**Orientadora: Dr<sup>a</sup> Soraia Attie Calil Jorge**

**Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).**

SÃO PAULO

## RESUMO

BARBOSA, F. F. **Expressão do ectodomínio da glicoproteína do vírus da raiva em células de inseto (*Drosophila melanogaster* Schneider 2)** 2018. 78f. Dissertação – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A raiva é uma doença tropical negligenciada (DTN) que acomete humanos, mamíferos silvestres e domésticos, cuja taxa de mortalidade mundial atinge aproximadamente 60.000 mortes humanas ao ano, o que a caracteriza como um sério problema de saúde pública, representando um grande impacto em populações mais vulneráveis, devido, principalmente, a fácil propagação de seu agente. O genoma do Lissavírus da raiva (RABV) codifica uma molécula glicoproteica, a RVGP (do inglês *Rabies Lissavirus Glycoprotein*), cuja porção exposta na superfície da membrana do vírus (chamada ectodomínio) é capaz de aderir a célula hospedeira e, como consequência deste processo, induzir a formação de anticorpos neutralizantes. Um controle efetivo frente a esta DTN pode ser alcançado quando abordagens em saúde pública são trabalhadas desenvolvendo, por exemplo, vacinas preventivas. Apesar do investimento, o controle da doença não tem sido o suficiente para conter sua distribuição. Desta forma, este projeto teve por objetivo otimizar a produção da molécula RVGP a partir do uso de sua porção antigênica, o ectodomínio, obtendo assim uma proteína heteróloga secretada. Para isso, foi utilizado um sistema de expressão de proteínas recombinantes baseado em células de inseto (*Drosophila melanogaster* Schneider 2 - S2), capaz de sintetizar de forma indutível esta molécula com possibilidade de desempenhar sua função biológica, contendo os epítomos antigênicos do lissavírus da raiva. A linhagem celular obtida através de transfecção com o agente Lipofectamine® 2000 foi denominada S2MTBip\_RVGP-ecto e expressa o ectodomínio da glicoproteína do vírus da raiva de forma secretada em diferentes condições de indução e tempos de coleta. A proteína foi detectada por análises de *Dot blotting*, *Western blotting* e quantificada por ELISA. Os resultados mostram a presença de uma banda correspondente a massa molecular de aproximadamente 51 kDa, presentes no sobrenadante das culturas, reconhecida por anticorpos monoclonais (C75 e D1) e soro. A subclonagem da população inicial de S2MTBip\_RVGP-ecto permitiram a seleção de uma subpopulação recombinante (S2MTBip\_RVGP-ectoG5), capaz de produzir mais rRVGP-ecto, sugerindo que os valores obtidos da proteína recombinante ainda podem ser melhorados.

**Palavras-chave:** Ectodomínio, Glicoproteína, Lissavírus da Raiva, Células S2.

## ABSTRACT

BARBOSA, F. F. **Expression of rabies virus glycoprotein ectodomain in insect cells (*Drosophila melanogaster* Schneider 2)** 2018.78p. Dissertation (Masters thesis in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Rabies is a neglected tropical disease (NTD) that affects humans, wild and domestic mammals, whose mortality rate reaches approximately 60,000 human deaths each year. The rabies characterizes it as a serious public health problem, representing a major impact on vulnerable populations, mainly due to the easy spread of its agent. The Rabies Lissavirus genome (RABV) encodes a glycoprotein molecule, the RVGP (Rabies Lissavirus Glycoprotein), whose portion exposed on the surface of the virus membrane (called ectodomain) is able to adhere to the host cell and as a consequence of this process, induce the formation of neutralizing antibodies. Effective control of this NTD can be achieved when public health approaches are assured by developing, for example, preventive vaccines. Despite the investment, the control of the disease has not been enough to contain its distribution. Thus, this project aimed to optimize the production of the RVGP molecule from the use of its antigenic portion, the ectodomain, obtaining a heterologous protein of soluble character. For this, we used a recombinant protein expression system based on insect cells (*Drosophila melanogaster* Schneider 2 - S2), able to synthesize this molecule with the possibility of performing its biological function, containing the antigenic epitopes of rabies lissavirus. The cell population obtained by transfection with the agent Lipofectamine® 2000 was named S2MTBip\_RVGP-ecto and express the ectodomain of the rabies virus glycoprotein in soluble form under different induction conditions and sampling times. Protein was detected by Dot blotting, Western blotting and quantified by ELISA. The results revealed the presence of a molecular weight band of approximately 51 kDa, recognized by monoclonal antibodies (C75 and D1) in culture supernatant. The subpopulation selection increased the rRVGP-ecto expression in relation to the population, suggesting the possibility of optimization of the production.

**Key words:** Ectodomain, Glycoprotein, Rabies Lissavirus, S2 cells.

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) são um grupo de doenças endêmicas, cuja prevalência se dá em regiões tropicais devido a fácil disseminação e propagação de seus agentes. Essas doenças representam sérios problemas de saúde pública, com grande impacto em populações mundiais mais vulneráveis, atingindo principalmente países da África, Ásia e América Latina (NORRIS *et al.*, 2012).

A raiva é considerada uma DTN antiga que desperta o interesse da sociedade devido à severidade de seus sintomas e sua fatalidade. Apesar de todo conhecimento acumulado e todos os avanços em torno da tentativa de contenção da doença, muito ainda precisa ser feito, visto que o contágio pelo lissavírus da raiva (RABV) atinge desde mamíferos silvestres e domésticos até humanos (60.000 mortes humanas/ano no mundo) (FAO, 2018; WALLACE *et al.*, 2017; GENZ *et al.*, 2012; ERTL, 2009).

Embora as vacinas clássicas contra a raiva sejam eficientes ainda existe o interesse em se desenvolver novas tecnologias para obtenção de vacinas mais imunogênicas, aperfeiçoando o processo de produção e visando o desenvolvimento tecnológico com justificativa em fatores como biossegurança e eficiência vacinal (ZHU *et al.*, 2015; SAKAMOTO *et al.*, 1999).

Um controle efetivo frente a esta DTN pode ser alcançado quando abordagens em saúde pública são trabalhadas desenvolvendo, por exemplo, vacinas preventivas, opções de tratamento mais acessíveis ou até mesmo teste diagnósticos mais rápidos. O investimento científico e financeiro não tem sido suficiente para conter a distribuição da doença, o que destaca a necessidade de obtenção de novos produtos biotecnológicos mais seguros e de menor custo capaz suprir as demandas de países com maior taxa de mortalidade pela doença.

O lissavírus da raiva possui genoma que codifica cinco proteínas e dentre elas, a glicoproteína RVGP. Essa proteína é capaz de mediar a adesão do vírus à célula hospedeira e induzir resposta por anticorpos neutralizantes. Acredita-se que a porção da RVGP associada ao desenvolvimento dessas atividades seja o ectodomínio (região exposta na superfície da membrana viral) por conta da presença de epítomos antigênicos e também imunogênicos, quando a molécula é expressa na conformação correta (ASTRAY; JORGE; PEREIRA, 2017). Diferentes propostas de proteínas recombinantes envolvendo a glicoproteína da raiva, RVGP, já foram estudadas, na tentativa de desenvolver vacinas de subunidades (KORAKA *et al.*, 2014; WUNNER *et al.*, 1983), produzir partículas semelhante a vírus- VLPs (FONTANA *et al.*, 2014), promover a atenuação do vírus através de modificações providas de recombinação gênica (LI *et al.*, 2015; DIETZSCHOLD; SCHNELL, 2002) ou construir quimeras utilizando

a proteína RVGP como antígeno (AMANN *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2013). A concepção de uma RVGP secretada também já foi alvo de estudos, sendo estas obtidas a partir de diversos tipos de sistemas de expressão como leveduras (QIAN *et al.*, 2013), células de mamífero (GAUDIN *et al.*, 1999) e de inseto (SISSOËFF *et al.*, 2005).

A equipe do Laboratório de Imunologia Viral tem estudado a expressão da RVGP em diferentes sistemas, como células de insetos e mamíferos. Por ser uma proteína de membrana, há grande dificuldade técnica em solubilizá-la e purificá-la, impedindo estudos mais aprofundados de imunogenicidade. Assim, nossa proposta neste trabalho foi otimizar a produção da molécula RVGP utilizando apenas a porção do ectodomínio, gerando uma proteína heteróloga secretada para o meio de cultura, para que projetos posteriores de caracterização, purificação e imunização possam ser realizados e facilitados. Para tal, utilizou-se um sistema de expressão de proteínas recombinantes baseado em células de inseto (*Drosophila melanogaster* Schneider 2 - S2), sintetizando tal molécula com capacidade de desempenhar sua função biológica, devido à presença dos epítomos antigênicos. O desenvolvimento de uma RVGP heteróloga secretada poderá contribuir para o avanço esperado nos processos de produção de vacinas, uma vez que contará com o uso de material recombinante em sistemas de expressão mais simples e baratos em escala industrial, reduzindo os custos de purificação e evitando os riscos biológicos da manipulação do RABV na produção da vacina.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso trabalho permitiu expressar a glicoproteína do lissavírus da raiva de maneira recombinante e secretada para o meio de cultura a partir de clonagens envolvendo o gene correspondente ao ectodomínio da RVGP e um vetor passível de transfecção em células de *Drosophila melanogaster* Schneider 2 - pMT/Bip/V5His-C (Invitrogen™), cujo sinal de secreção viabiliza o envio de rRVGP-ecto para o meio de cultura. A proteína produzida apresenta aproximadamente 51 kDa, e a indução de sua produção pode ser realizada com diferentes concentrações de CuSO<sub>4</sub> com coletas viáveis a partir de 48 horas p.i., gerando de 2,5 a 4 µg/ml de proteína por cultivo em pequena escala. A caracterização desta molécula quanto à glicosilação, aspectos antigênicos e imunogênicos, e o processo de purificação ainda precisam ser estudados.

## REFERÊNCIAS

- AAGAARD-HANSEN, J.; CHAIGNAT, C.L. Neglected tropical diseases: equity and social determinants. Equity, social determinants and public health programmes (World Health Organization), cap. 8, p.135-157, 2010.
- ABDULHAQQ, S. A.; WEINER, D. B. DNA vaccines: developing new strategies to enhance immune responses. **Immunol Res**, V: 42, p.219–232, 2008.
- ALBERTINI, A.A.; RUIGROK R.W.; BLONDEL, W. Rabies virus transcription and replication. **Adv virus Res**, v. 79, p. 1-22, 2011.
- ALTMANN, F. Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. **Glycoconjugates Journal**, V.16, p. 109-123, 1999.
- AMANN *et al.* A new rabies vaccine based on a recombinant ORF virus (parapoxvirus) expressing the rabies virus glycoprotein **Journal of Virology**, Feb; V 87(3):1618-30, 2013
- ASHRAF S. *et al.* High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. **J Biotechnol** V.119, n. 1, p.1–14, 2005.
- ASTRAY, R. M., *et al.* Analytical approach for the for the extraction os recombinant membrane viral glycoprotein for stably transfected *Drosophila melanogaster* cells. **Biotechnology Journal**, v. 3, p. 98-103, 2008.
- ASTRAY, R. M., JORGE, S. A. C., PEREIRA, C.A. Rabies vaccine development by expression of recombinant viral glycoprotein **Arch Virol** 162:323–332, 2017.
- BABBONI, S. D.; MODOLO, J. R. Raiva: origem, importância e aspectos históricos. UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde, v. 13, n. ESP, 2011.
- BASTIDA-GONZÁLE, F. *et al.*, Predicted 3D Model of the Rabies Virus Glycoprotein Trimer, **BioMed Research International**, 2016.
- BATISTA, H. B. C. R.; FRANCO A. C.; ROEHE, P. M. Raiva: uma breve revisão. **Acta Scientiae Veterinariae**, V. 35, n. 2, p. 125 – 144, 2007.
- 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, n.4, P. 283-290, 2009.
- BENMANSOUR A. *et al.* Antigenicity of rabies virus glycoprotein. **Journal of Virology**, Aug;V. 65(8):p.4198-203, 1991.
- CHEN *et al.*, A Novel Rabies Vaccine Based on a Recombinant Parainfluenza Virus 5 Expressing Rabies Virus Glycoprotein **Journal of Virology**, 2013 Mar;87(6):2986-93 2013.
- COSTA, W.A., *et al.* **Manual Técnico do Instituto Pasteur: Profilaxia da Raiva Humana**. 2 Ed., São Paulo, Instituto Pasteur, 2000.



DIETZGEN, R. G. The family Rhabdoviridae: mono- and bipartite negative-sense RNA viruses with diverse genome organization and common evolutionary origins. **Virus Reaserch: Review**, V. 227, p. 158–170, 2017.

DIETZSCHOLD, B. Structural and Immunological Characterization of a Linear Virus-Neutralizing Epitope of the Rabies Virus Glycoprotein and Its Possible Use in a Synthetic Vaccine. **Journal of Virology**, p. 3804-3809, Aug 1990.

DIETZSCHOLD, B.; SCHNELL, M. J. New approaches to the development of live attenuated rabies vaccines, **Hybrid Hybridomics.**, Apr;21(2):129-34, 2002.

ERTL, H. C. J. Novel Vaccines to Human Rabies. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 3, n. 9, p. e515, 2009.

FEHLNER-GARDINER, C *et al.*, Comparing ONRAB® and RABORAL V-RG® oral rabies vaccines field performance in raccoons and striped skunks, New Brunswick, Canada and Maine, USA. **Journal of Wildlife Diseases**, V. 48, n. 1, p. 157-167, 2012.

FONTANA, D. *et al.* Rabies virus-like particles expressed in HEK293 cells. **Vaccine**, Mai, 19;32(24):2799-804, 2014.

FOOD AND ORGANIZATION OF UNITED NATIONS (FAO) - A neglected zoonotic disease: dog-mediated rabies eliminating human deaths by 2030 (março, 2018).

FOOKS, A. R. *et al.* Rabies. **Nat. Rev. Dis. Primers** 3, 17091 (2017).

FRAZATTI-GALLINA, N. M. *et al.* Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. **Vaccine**, V. 23, n. 4, p. 511–517, 2004.

GALESI, A.L., *et al.* Growth of recombinant *Drosophila melanogaster* Schneider 2 cells producing rabies virus glycoprotein in bioreactor employing serum-free medium. **Cytotechnology**, v. 57(1), p. 73-81, 2008.

GAUDIN, Y. *et al.* Rabies Virus Glycoprotein Is a Trimer. **Virology**, v. 187, p. 627-632, 1992.

GAUDIN, Y. *et al.* Soluble ectodomain of rabies virus glycoprotein expressed in eukaryotic cells folds in a monomeric conformation that is antigenically distinct from the native state of the complete, membrane-anchored glycoprotein. **The Journal of General Virology**, v. 80 (Pt 7), p. 1647–1656, 1999.

GEBREYES W. A. *et al.* The Global One Health Paradigm: Challenges and Opportunities for Tackling Infectious Diseases at the Human, Animal, and Environment Interface in Low-Resource Settings. **PLoS Negl Trop Dis** V.8, Artigo. 11, e3257, 2014.

GENZ, B. *et al.* Chimeric rabies viruses for trans-species comparison of lyssavirus glycoprotein ectodomain functions in virus replication and pathogenesis. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, v. 125, Issue 06/05, p. 211-227, 2012.

GUPTA, P. K. *et al.* Immunogenic and antigenic properties of recombinant soluble glycoprotein of rabies virus. **Veterinary Microbiology**, v. 108, n. 3-4, p. 207–14, 2005.

HAMPSON K. *et al.* Estimating the Global Burden of Endemic Canine Rabies. **PLoS Negl Trop Dis**, V.9, N. 4, Abr, 2015.

JACKSON, A. C. Human Rabies: a 2016 Update. **Curr Infect Dis Rep**, p.18- 38, 2016.

JONGH, W. A., SALGUEIRO, S., DYRING, C. The use of *Drosophila* S2 cells in R&D and bioprocessing. **Pharm. Bioprocess**, V. 1, N. 2, p. 197-213, 2013.

KAW *et al.* Itravitam diagnosis of rabies from saliva by nested RT-PCR and Real Time PCR. **Bras. J. Vet. Pathol**, V.5, n.2, p.70-73, 2012

KESSELS, J.A. *et al.* Pre-exposure rabies prophylaxis: a systematic review. **Bull World Health Organ**, V. 95, p.210–219C, 2017.

KING, A. M. Q. *et al.* Virus Taxonomy: **Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. [s.l.] Elsevier, p.1326, 2012.

KIRKPATRICK, R. B. *et al.* Heavy Chain Dimers as Well as Complete Antibodies Are Efficiently Formed and Secreted from *Drosophila* via a BiP-mediated Pathway, **J. Biol. Chem.** V. 270, n.34, p.19800-19805, 1995.

KIRKPATRICK, R. B., SHATZMAN, A. **Drosophila S2 system for heterologous gene expression**. In Fernandez, J. M., Hoffler, J. P. Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression. 1 ed. California: Invitrogen Corporation, p.289-330, 1999.

KORAKA, P. *et al.* A recombinant rabies vaccine expressing the trimeric form of the glycoprotein confers enhanced immunogenicity and protection in outbred mice, **Vaccine**, Aug 6;32(36):4644-50, 2014.

KUZMINA NA, KUZMIN IV, ELLISON JA, RUPPRECHT CE Conservation of Binding Epitopes for Monoclonal Antibodies on the Rabies Virus Glycoprotein. **Journal Antivirals and Antiretrovirals**, 5: 037-043, 2013.

LEMOS *et al.*, Rabies virus glycoprotein expression in *Drosophila* S2 cells. I: Design of expression/selection vectors, subpopulations selection and influence of sodium butyrate and culture medium on protein expression. **Journal of Biotechnology**, V. 143, p. 103–110, 2009.

LI, Z. *et al.*, 2015 A recombinant canine distemper virus expressing a modified rabies virus glycoprotein induces immune responses in mice. **Virus Genes** V. 50 (3), p. 434-441. 2015.

LIU, X., *et al.* Study rabies virus-like particles comprised of G and M proteins induced protective immune responses in BALB/c mice. **Journal of Applied Virology**, V.14, n.2, 2015.

MAINGUY, J. *et al.* Oral rabies vaccination in raccoons: comparison of ONRAB® an RABORAL V-RG® vaccine-bait field performance in Québec, Canada and Vermont, USA. **Journal of Wildlife Diseases**, V. 49, n.1, p. 190-193, 2013.

MCGARVEY P. B. *et al.* Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. **Biotechnology**, V.13, n.13, p.1484–1487, 1995.

- MORAES A. M. *et al.* *Drosophila melanogaster* S2 cells for expression of heterologous genes: From gene cloning to bioprocess development. **Biotechnol Adv** V.30, n.3, p.613–628, 2012.
- MORATO, F.; IKUTA, C. Y.; ITO, F. H. Raiva: uma doença antiga, mas ainda atual. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 9, n. 3, p. 20–29, 2011.
- MORGEAUX, S. *et al.* Replacement of *in vivo* human rabies vaccine potency testing by *in vitro* glycoprotein quantification using ELISA – Results of an international collaborative study, **Vaccine**, Feb 7;35(6):966-971, 2017.
- MORIMOTO, K.; KAWAI, A.; MIFUNE, K. Comparison of rabies virus g proteins produced by cDNA-transfected animal cells that display either inducible or constitutive expression of the gene. **Journal of general virology**, v. 73, p. 335-345, 1992.
- NAGARAJAN, T. *et al.*, A simple immuno-capture ELISA to estimate rabies viral glycoprotein antigen in vaccine manufacture. **Biologicals**, V. 34, p. 21-27, 2006.
- NETO, A. M. S.; RODRIGUES, A. R.; CARVALHO, K. C. N. DE. Caracterização da raiva humana no Brasil no período de 2001 - 2011. **Revista Educação em Saúde**, v. 1, n. 1, 24 2014.
- NORRIS, J. *et al.* Social and Economic Impact Review on Neglected Tropical Diseases. **Global Network Neglected Tropical Diseases**, November 2012.
- OSINUBI, M. O. V., *et al.* Enhancing comparative rabies DNA vaccine effectiveness through glycoprotein gene modifications. **Vaccine**, V.27, p. 7214-7218, 2009.
- PAGNY, S. Signals and mechanisms for protein retention in the endoplasmic reticulum. **J. Exp. Bot.** V. 50, p. 157–164, 1999.
- PÉREZ, O., PAOLAZZI, C. C. Production methods for rabies vaccine. **Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology**, V. 18, p. 340-347, 1997.
- PREHAUD C. *et al.* Immunogenic and protective properties of rabies virus glycoprotein expressed by baculovirus vectors. **Virology**, V. 173, n. 2, p. 390–399, 1989.
- QIAN, W. *et al.* Secretion of Truncated Recombinant Rabies Virus Glycoprotein with Preserved Antigenic Properties Using a Co-Expression System in *Hansenula polymorpha*, **Journal of Microbiology** Vol. 51, No. 2, pp. 234–240, 2013.
- RAMYA, R., *et al.* Expression and solubilization of insect cell based rabies virus glycoprotein and assessment of its immunogenicity and protective and efficacy in mice. **Clin Vaccine Immunol.** Aug, 3, 2011.
- RATH, A. *et al.* DNA vaccine for rabies: Relevance of the trans-membrane of the glycoprotein in generating an antibody response, **Virus Research**, V. 113, p. 143–152, 2005.
- RUPPRECHT C, KUZMIN I, MESLIN F. Lyssaviruses and rabies: current conundrums, concerns, contradictions and controversies [version 1; referees: 2 approved] **F1000Research**, 6(**F1000 Faculty Rev**):184, 2017

SAKAMOTO, S., *et al.* Studies on the structures and antigenic proprieties of rabies virus glycoprotein analogue produced in yeast cells. **Vaccine**, V. 17, p. 205-218, 1999.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS N. G. *et al.* Impact of recombinant Drosophila S2 cell population enrichment on expression of rabies virus glycoprotein, **Cytotechnology**, V.68, n.6, p. 2605-2611, 2016.

SANTOS, A. S. *et al.* Rabies virus glycoprotein expression in Drosophila S2 cells: Influence of re-selection on protein expression **Biotechnology. Journal**. V.4, p. 1578–1581, 2009.

SCHNELL, M. J., *et al.* The cell biology of virus: Using stealth to reach the brain. **Nature Review Microbiology**, V.8, n.1, p.51-61, 2010.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO (SVS/MS). Casos de Raiva Animal por Região Administrativa e Unidades Federadas no ano de 2017. Brasil, 2018 (Atualizado em 04.04.2018). Disponível em <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/abril/30/Tabela-6.pdf>>. Acesso em 27.07.2018.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO (SVS/MS) – Análise da situação epidemiológica da Raiva no Brasil, no período de 2011 a 2016\* Disponível em <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/maio/27/Informe-epidemiol--gico-raiva.pdf>> Acesso em : 21 jun 2017.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO (SVS/MS) – Mapa da Raiva no Brasil. Disponível em <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/15/MAPAS%20ATUALIZADOS%20RAIVA%202017%20Atualizado%20-%2015-05-17.pdf>> Acesso em 21 jun 2017.

SHAKIN-ESHLEMAN, S.H. *et al.* N-Linked Glycosylation of Rabies Virus Glycoprotein. **The journal of biological chemistry**, Vol. 267, N. 15, pp. 10690 - 10698, 1992

SINGH, R. *et al.* Rabies – epidemiology, pathogenesis, public health concerns and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**, V. 37, n.1, p. 212-251, 2017.

SISSOËFF, L. *et al.* Stable trimerization of recombinant rabies virus glycoprotein ectodomain is required for interaction with the p75NTR receptor. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 2543–2552, 2005.

SOUZA, A; MADHUSUDAN, S. N. Survival from rabies encephalitis – Review Article. **Journal of the Neurological Sciences**, V. 339, p. 8-14, 2014.

SRINIVASAN, A. Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients. **N Engl J Med**. V. 352, N. 11, p. 1103–11, mar. 2005.

STONER-DUNCAN, B.; STREICKER, D. G.; TEDESCHI, C. M. Vampire Bats and Rabies: Toward an Ecological Solution to a Public Health Problem. **PLOS Negl. Trop Dis**, V. 8, n. 6, e2867, 2014.

SWIECH K. *et al.* Bioreactor culture of recombinant *Drosophila melanogaster* S2 cells: characterization of metabolic features related to cell growth and production of the rabies virus glycoprotein. **Cytotechnology**, V.57, n.1 p.61–66, 2008.

TORDO, N., *et al.* Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among de L (polymerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA viruses. **Virology**, V. 165, n. 2, p. 565-576, 1988.

TORDO, N., *et al.* Walking along the rabies genome: Is the large G-L intergenic region a remnant gene? **Proc Natl Acad Sci USA**, v.83, p. 3914-3918, 1986.

VENTINI, D. C. *et al.* Recombinant rabies virus glycoprotein synthesis in bioreactor by transfected *Drosophila melanogaster* S2 cells carrying a constitutive or an inducible promoter, **Journal of Biotechnology**, V. 146, n.4, p. 169-72, 2010.

WALLACE, R. M. *et al.* Elimination of Dog-Mediated Human Rabies Deaths by 2030: Needs Assessment and Alternatives for Progress Based on Dog Vaccination. **Front Vet Sci**. V. 4, Artigo 9, 2017.

WHITT, M.A *et al.* Membrane fusion activity, oligomerization, and assembly of the rabies virus glycoprotein. **Virology**, 185, 681–688, 1991.

WOJCZYK, B. Stable secretion of a soluble, oligomeric form of rabies virus glycoprotein: influence of N-glycan processing on secretion. **Biochemistry**, V.34, p. 2599–2609, 1995.

WOJCZYK, B.S. *et al.* N-glycosylation at one rabies virus glycoprotein sequon influences N-glycan processing at a distant sequon on the same molecule. **Glycobiology**, V. 15, n. 6, p. 655-666, jun., 2005.

WOJCZYK, B.S. *et al.* The role of site-specific N-glycosylation in secretion of soluble forms of rabies virus glycoprotein. **Glycobiology** vol. 8 no. 2 pp. 121–130, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Expert consultation on rabies. Second Edition, (2013) Disponível em <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85346/1/9789240690943\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85346/1/9789240690943_eng.pdf?ua=1)> Acesso em: 06 de jan. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases (2015). Disponível em:<[https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=mV00DgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR9&dq=World+Health+Organization+\(WHO\).+Neglected+Tropical+Diseases&ots=dirvW-T-mX&sig=DpJV6JxuHHfA2QOTUHOScPcAPZ0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=mV00DgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR9&dq=World+Health+Organization+(WHO).+Neglected+Tropical+Diseases&ots=dirvW-T-mX&sig=DpJV6JxuHHfA2QOTUHOScPcAPZ0#v=onepage&q&f=false)>. Acesso em: 12 de abr. 2017.

World Health Organization (WHO). Rabies is a zoonotic viral disease which infects domestic and wild animals. Disponível em: <<http://www.who.int/immunization/diseases/rabies/en/>>. Acesso em: 04 de jan. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Zero by 30: The global strategic plan to end human deaths from dog-mediated rabies by 2030. Disponível em <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272756/9789241513838-eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 27.07.2018

WUNNER, W. H. *et al.* Rabies Subunit Vaccines **J Gen Virol**, Aug;64 (Pt 8):1649-56, 1983.

YOKOMIZO, A. Y. *et al.* Rabies virus glycoprotein expression in Drosophila S2 cells. I. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line. **Biotechnology Journal**, v. 2, p. 102-109, 2007.

ZHU, S. *et al.* Reverse genetics of rabies virus: new strategies to attenuate virus virulence for vaccine development. **Journal of Neurovirology**, v. 21, p. 335–345, 2015.

ZITZMANN, J. *et al.* **Process Optimization for Recombinant Protein Expression in Insect Cells**. New Insights into Cell Culture Technology, INTEC, p. 43-97, 2017.