



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO



CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

VINICIUS DA SILVA NARESSE

CULTIVO E OBTENÇÃO DE VLP DE VÍRUS CHIKUNGUNYA

SÃO PAULO

2018

VINICIUS DA SILVA NARESSE

CULTIVO E OBTENÇÃO DE VLP DE VÍRUS CHIKUNGUNYA

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biomédicas, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas, Ênfase em Biotecnologia em Saúde.

Orientador: Dr. Renato Mancini Astray

São Paulo

2018

Aos meus pais, Gilberto e Maria Zenilda e minha irmã por todo amor e apoio
incondicional!

AGRADECIMENTOS

A todos os meus familiares, especialmente minha irmã que apesar da distância constante sempre estiveram me ajudando.

A cada um da família Turma 1, por mostrar que apesar de poucos nós podemos construir muitas coisas.

Agradeço a família CB, a qual vejo crescer e ocupar um lugar de destaque a cada ano que passa me enchendo cada vez mais de orgulho.

A todos os amigos do LIV, que entre muitas risadas ajudaram na minha evolução pessoal e profissional.

Ao Renato, por possuir uma dedicação e paciência em ensinar que conheci em poucos.

Aos amigos, que apesar das distâncias e da minha ausência sempre me apoiaram e incentivaram.

Agradeço também a todos os funcionários e professores da FMRP que através do seu conhecimento de mundo e experiências de vida me possibilitaram chegar onde estou hoje.

Ao Instituto Butantan por possibilitar a oportunidade de frequentar um ambiente de referência na área de biotecnologia voltada para a saúde.

Agradeço a CNPq pelo auxílio financeiro deste projeto para a iniciação científica.

RESUMO

O vírus Chikungunya (CHIKV, Togaviridae, Alphavirus) se espalhou pelos trópicos e causou surtos em vários países da África, Ásia, Europa e América. A transmissão para humanos é promovida por mosquitos do gênero *Aedes* ssp, particularmente *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, duas espécies abundantes em nosso país. A patogênese causada na infecção pelo CHIKV manifesta-se primeiro como um estágio agudo de inflamação articular grave e doença febril, a qual pode evoluir para um estágio crônico de artrite. Diante deste cenário, percebe-se a necessidade da realização de estudos sobre estratégias de controle e prevenção da infecção pelo CHIKV, uma vez que não existem vacinas ou terapia antiviral específica contra este arbovírus. A principal abordagem deste trabalho comprehende a expressão das proteínas imunogênicas do CHIKV e sua apresentação como partículas semelhantes a vírus (VLP) usando o sistema de células S2 de *Drosophila melanogaster*. Uma população de células S2 recombinantes (S2CHIKV-Hy) foi estabelecida anteriormente, demonstrando habilidade de expressar as proteínas de CHIKV na forma de VLP. Este trabalho se concentrou na avaliação de parâmetros cinéticos das células S2 adaptadas a diferentes meios de cultura e na análise da produção das proteínas de CHIKV. As células foram adaptadas aos meios de cultura IPL-41 modificado ou Schneider, pelo aumento semanal de uma fração de 10 % do meio de cultura final, sendo adicionada ao meio de cultura SF900III, no qual as células estavam crescendo originalmente. Após finalizada a adaptação, 2×10^6 células/mL S2CHIKV-Hy foram inoculadas em 20 mL de SF900 III, IPL-41 ou Schneider e crescidas a 28°C. A cinética de crescimento celular foi monitorada diariamente pela análise do crescimento e expressão das proteínas de Chikungunya nas células e sobrenadantes. A expressão das proteínas do CHIKV foi analisada por Western blot, imunofluorescência e citometria de fluxo. Inicialmente as cinéticas de crescimento revelaram que as células cresceram de maneira similar nos meios utilizados para adaptação e no meio original, embora com maior quantidade de células final neste último. A maior quantidade de proteína expressa foi encontrada em diferentes partes da cinética de crescimento, dependendo do meio utilizado. Embora as quantidades de proteínas expressas não tenham sido avaliadas quantitativamente, uma comparação relativa mostrou que as células cultivadas em IPL-41 e Schneider foram capazes de expressar mais proteínas de CHIKV por célula que em SF900III.

Palavras chave: células S2, Chikungunya, Alphavirus, VLP

ABSTRACT

The Chikungunya virus (CHIKV, Togaviridae, Alphavirus) has spread through the tropics and caused outbreaks in several countries in Africa, Asia, Europe and America. The transmission to humans is promoted by mosquitoes of the genus *Aedes* ssp, particularly *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*, which are abundantly found in urban areas. The pathogenesis caused by CHIKV infection manifests firstly as an acute stage of severe joint inflammation and febrile disease, which may evolve to a chronic stage of arthritis. It is clear the need to carry out studies on strategies for the control and prevention of CHIKV infection, once there are no vaccines or specific antiviral therapy against this arbovirus. The main approach of this work comprises the expression of the immunogenic proteins of CHIKV and their presentation as virus-like particles (VLP) using the S2 *Drosophila melanogaster* cell system. A recombinant S2 cell population (S2CHIKV-Hy) was previously established and showed the ability to express CHIKV proteins in the form of VLP. This work concentrated in the evaluation of kinetic parameters of recombinant S2 cells adapted to different culture media and in the analysis of the expression of CHIKV proteins. The cells were adapted to both supplemented IPL-41 and Schneider culture media, by weekly increasing a 10 % fraction of the final culture medium to the original SF900 III medium, until cells finally adapted to 100 % of final culture medium. After complete adaptation, 2×10^6 S2CHIKV-Hy cells were inoculated in 20 mL of SF900-III, IPL-41 or Schneider medium at 28°C and a cell growth kinetic was monitored daily by analyzing cell growth and expression of Chikungunya's proteins in the cells and in the supernatant (VLP). Expression of CHIKV proteins was analyzed by Western blot, Immunofluorescence and flow cytometry. In the first moment, cell growth kinetics revealed a satisfactory result, with similar behaviors of S2 grown in SF900III, the original medium, and in media used for adaptation of S2CHIKV-Hy cells. The higher protein expression was found in different parts of the cell growth kinetics, depending on the medium used. Although the amounts of protein were not evaluated quantitatively, a relative comparison showed that cells cultivated in IPL-41 and Schneider expressed more CHIKV proteins/cell than in SF900III.

Keywords: S2 cells, Chikungunya, Alphavirus, VLP

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina Sérica Bovina
CHIKV	Vírus Chikungunya
CuSO₄	Sulfato de cobre
DENV	Vírus da Dengue
DMSO	Dimetilsulfóxido
EEEV	Vírus da Encefalite Equina Oriental
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
MAYV	Vírus Mayaro
ORF	<i>Open Read Frames</i>
OROV	Vírus Oropouche
PBS	Solução Tampão de Salina Fosfatada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
S2	Célula de <i>Drosophila melanogaster</i> (Schneider S2)
SFB	Soro Fetal Bovino
VEEV	Vírus da Encefalite Equina Venezuelana
VLP	<i>Virus like particle</i>
WHO	Organização Mundial de Saúde
WNV	<i>Virus West Nile</i>
YFV	Vírus da Febre Amarela
ZIKV	Vírus Zika

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico dos arbovírus.....	16
Figura 2. Representação esquemática da organização genômica dos <i>Alphavirus</i>	17
Figura 3. Representação esquemática do ciclo de replicação dos <i>Alphavirus</i>	18
Figura 4. Esquema representativo da estrutura dos <i>Alphavirus</i>	19
Figura 5. Tipos de vacinas.....	24
Figura 6. Esquema representativo do método de produção de VLP	36
Figura 7. Diagrama representativo da adaptação aos novos meios de cultura.....	42
Figura 8. Cinética de crescimento em meio SF900III.....	43
Figura 9. Cinética de crescimento em meio IPL-41 modificado.....	43
Figura 10. Cinética de crescimento em meio Schneider + 10% SFB.....	44
Figura 11. Expressão de proteínas estruturais CHIKV no sobrenadante.....	45
Figura 12. Cinética de crescimento celular.....	46
Figura 13. Imunofluorescência para avaliação da expressão de proteína viral.....	48
Figura 14. Expressão de proteínas estruturais de CHIKV em lisado celular.....	49
Figura 15. Gráfico da intensidade de sinal relativa no Dot Blotting.....	50
Figura 16. <i>Dot blotting</i> para verificar ligação cruzada.....	65
Figura 17. Gráfico de absorbância das diluições.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Plataformas de produção de VLP e suas vantagens e desvantagens.....	26
Tabela 2. Características dos anticorpos utilizados no IFI.....	37
Tabela 3. Composição dos géis utilizados para SDS-PAGE e <i>Western blotting</i>	38
Tabela 4. Características dos anticorpos utilizados no (FACS).....	40
Tabela 5. Análise de expressão de proteínas de CHIKV em células S2CHIKV-Hy por citometria de fluxo.....	47
Tabela 6. Características dos anticorpos utilizados na ELISA.....	67

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. Arbovírus.....	15
2.2. Genoma, estrutura e replicação dos <i>Alphavirus</i>.....	16
2.3 Vírus Chikungunya.....	19
2.3.1. Sintomas de infecção por CHIKV.....	21
2.3.2. Diagnóstico de CHIKV.....	22
2.3.3. Tratamento de CHIKV.....	22
2.4. Vacinas vírais.....	23
2.4.1. Tipos de VLP.....	25
2.4.2 Métodos de produção de VLP.....	25
2.4.2.1. Plantas.....	27
2.4.2.2. Bactérias e leveduras.....	27
2.4.2.3. Células de mamíferos.....	27
2.4.2.4. Células de insetos.....	28
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. Objetivo geral.....	31
3.2. Objetivos específicos.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1. Meios de Cultura.....	32
4.1.1. SF900III.....	32
4.1.2. IPL-41.....	32
4.1.3. Schneider.....	32
4.2. Linhagem Celular (<i>Drosophila melanogaster</i> Schneider 2).....	32
4.3. Adaptação aos Meios de Cultura.....	33
4.4. Criopreservação e manutenção do banco de células.....	34
4.4.1. Congelamento.....	34
4.4.2. Descongelamento.....	34
4.5. Determinação da concentração e viabilidade celular.....	34
4.6. Determinação da curva de crescimento celular nos diferentes meios de cultura.....	35
4.7. Produção de VLP.....	35

4.8. Análise de expressão e obtenção de VLP.....	37
4.8.1. Imunofluorescência indireta (IFI).....	37
4.8.2. Western blot.....	37
4.8.3. Dot Blot.....	39
4.8.4. Citometria de fluxo (FACS).....	39
5. RESULTADOS.....	41
5.1. Adaptação das células S2CHIKV-Hy aos meios de cultura IPL-41 e Schneider...	41
5.2. Cinética preliminar de crescimento celular e expressão de VLP.....	42
5.3. Cinética de crescimento celular e expressão de VLP.....	45
5.4. Expressão de proteínas CHIKV e VLP.....	46
6. DISCUSSÃO.....	51
7. CONCLUSÃO.....	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
9. APÊNDICE.....	65

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem sido observado o aparecimento de arboviroses em diferentes partes do mundo, principalmente nos trópicos dos continentes africano, asiático e americano. A intensa dispersão desses patógenos se intensificou devido à ampliação dos sistemas de transportes globais e alterações ecológicas promovidas pelo homem, sendo essas alterações responsáveis também pelo aumento da quantidade do vetor, pela criação de novos reservatórios e ciclo da doença.

O vírus Chikungunya (CHIKV), do gênero *Alphavirus* da família Togaviridae, é um vírus de RNA transmitido para humanos através da picada do mosquito *Aedes* ssp. (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*) e possui taxa de letalidade próxima de 1:1000. Os mosquitos Ae. aegypti e Ae. albopictus são duas espécies invasoras, cosmopolitas e presentes em todo o território brasileiro, isso faz com que a disseminação das arboviroses, incluindo a febre Chikungunya, seja potencializada em território nacional (Figueiredo e Figueiredo, 2014).

Se comparada com a dengue, a epidemiologia da febre Chikungunya apresenta características que amplificam a sua disseminação e aumentam a possibilidade de epidemias. Entre elas estão um menor tempo de incubação intrínseca, maior período de viremia e menor período de incubação extrínseca (Figueiredo e Figueiredo, 2014). Em números, só no último triênio foram mais de 500 mil casos prováveis de febre Chikungunya relatados no Brasil, elevando assim a atenção dos órgãos públicos de saúde do país.

A patologia da infecção, por desenvolver sintomas semelhantes aos de outras arboviroses, faz com que a doença seja facilmente confundida com a dengue, sendo anteriormente descrita como “uma variante clínica da dengue clássica”. Contudo, um sintoma comum a febre Chikungunya é a artralgia inflamatória nas articulações mais próximas à picada do mosquito, sendo que alguns indivíduos desenvolvem artrite semelhante à artrite reumatoide. A gravidade da artrite causada pela febre Chikungunya chama à atenção visto que metade dos casos tem evoluído para a forma crônica da doença (Runowska et al., 2018).

No momento não há tratamento antiviral específico para a infecção por CHIKV, portanto as estratégias terapêuticas são voltadas aos sintomas da doença. Com isso,

os pacientes são mantidos em repouso enquanto drogas anti-inflamatórias não-esteroidais e analgésicos são administrados, os quais podem aliviar a dor e a febre do paciente.

Tendo em vista esse cenário, é fundamental que sejam propostas alternativas para o combate a esse vírus emergente. Neste trabalho buscamos a expressão recombinante das proteínas estruturais e imunogênicas desse *Alphavirus*, de maneira a possibilitar futuros estudos da utilização dessas preparações para fins de imunização ou diagnóstico.

A abordagem planejada pelo laboratório de Imunologia Viral envolve a obtenção das proteínas imunogênicas do CHIKV, visando sua apresentação como partículas semelhantes a vírus (VLP), consideradas uma das formas mais promissoras para a imunização contra *Alphavirus*. As VLP são compostas basicamente por algumas ou mesmo todas as proteínas estruturais que compõem o vírus, porém sem o material genético. Dessa forma, as VLP desencadeiam uma alta resposta imunológica, porém sem a possibilidade de se replicarem ou de causar infecção patogênica.

O uso de VLP em vacinação é uma abordagem relativamente nova. Isso é melhor representado quando pesquisamos o termo “vlp vaccine” na plataforma PubMed, onde em 2007 foram encontrados apenas 7 artigos relacionados enquanto que em 2016 foram mais de 30 artigos. Em outra consulta sobre “vlp” e “vacinas”, no site *clinicaltrials.gov*, foi possível encontrar 129 estudos associados aos termos. Alguns desses estudos se encontram em fases iniciais enquanto outros já estão concluídos, sendo que grande parte deles são associados a vacinas contra Influenza, Papilomavírus e Norovírus. No mesmo site estão cadastrados 15 ensaios relacionados a vacinas de CHIKV, entre as fases I e III.

A abordagem utilizada para a obtenção das VLP envolveu a utilização de células de inseto *Drosophila melanogaster* S2, amplamente estudadas pelo nosso grupo de pesquisa (Moraes et al., 2012). Essa estratégia é inicialmente atrativa, pois além de permitir a expressão estável das proteínas recombinantes, envolve um sistema de inseto em que não deve haver modificações importantes nas características estruturais das proteínas, dado que em seu ciclo zoonótico o vírus realiza passagem em insetos da ordem *Diptera* das células S2. Dessa forma espera-

se que as proteínas produzidas pelas células de inseto tenham as características de modificações pós-traducionais e imunogenicidade desejadas.

Inicialmente a linhagem de células S2CHIKV-Hy, que expressa VLP do vírus Chikungunya, estava sendo cultivada em meio SF900 III, que foi originalmente desenvolvido para o cultivo de células de Lepdopteros, mais especificamente células Sf9 e Sf21. O cultivo de células no meio SF900 III do Laboratório de Imunologia Viral iniciou-se em 2003, quando se buscava desenvolver meios de cultura sem soro para o cultivo de células S2. Inicialmente não havia método padronizado para a quantificação da expressão recombinante, então o desenvolvimento do sistema foi realizado principalmente com base no crescimento celular, assumindo que a expressão fosse associada positivamente ao crescimento. Assim, o meio SF900 foi escolhido por promover altas concentrações celulares em altas velocidades de crescimento.

Utilizando um dos meios desenvolvidos pelo grupo de pesquisa (Batista et al., 2011), as células S2-HBsAg (Jorge et al., 2008) foram capazes de crescer a quantidades semelhantes ao crescimento observado em SF900 e, em uma das configurações, expressando glicoproteína do vírus da Hepatite B, apresentou melhor produtividade. Isso era um indicativo de que a expressão poderia ser melhorada em outro meio diferente do SF900 III, uma vez que as células utilizadas neste trabalho (S2CHIKV-Hy) são semelhantes as S2-HBsAg, pois ambas expressam proteínas na forma de VLP.

Dessa forma, este trabalho teve como foco avaliar a utilização de diferentes meios de cultura para a expressão das proteínas de CHIKV. Para isso foram realizados procedimentos de adaptação celular e estudos cinéticos da expressão recombinante. Os resultados apontam que de fato o meio SF900 III apresenta limitações à expressão das proteínas de interesse, podendo ser substituído no futuro por um dos outros dois meios testados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Arbovírus

O termo arbovírus origina-se da expressão inglesa *arthropod-borne virus*, os quais são vírus transmitidos ao homem exclusivamente pela picada de um vetor artrópode. Os arbovírus constituem o maior grupo conhecido de vírus, sendo em torno de 545 espécies registradas no *International Catalogue of Arboviruses including certain other viruses of vertebrates* (ICTV, 2017).

Nos últimos anos tem se observado um aparecimento, ou mesmo um reaparecimento, de arboviroses em diferentes partes do mundo. A principal questão é que atualmente o surgimento e a dispersão dos arbovírus se intensificaram, sendo ampliadas devido ao crescimento de sistemas de transportes globais, adaptação dos artrópodes à crescente urbanização, por fatores ambientais causados pela ação humana e alteração da dinâmica da população de hospedeiros e vetores (Gould et al., 2017; Donalisio et al., 2017).

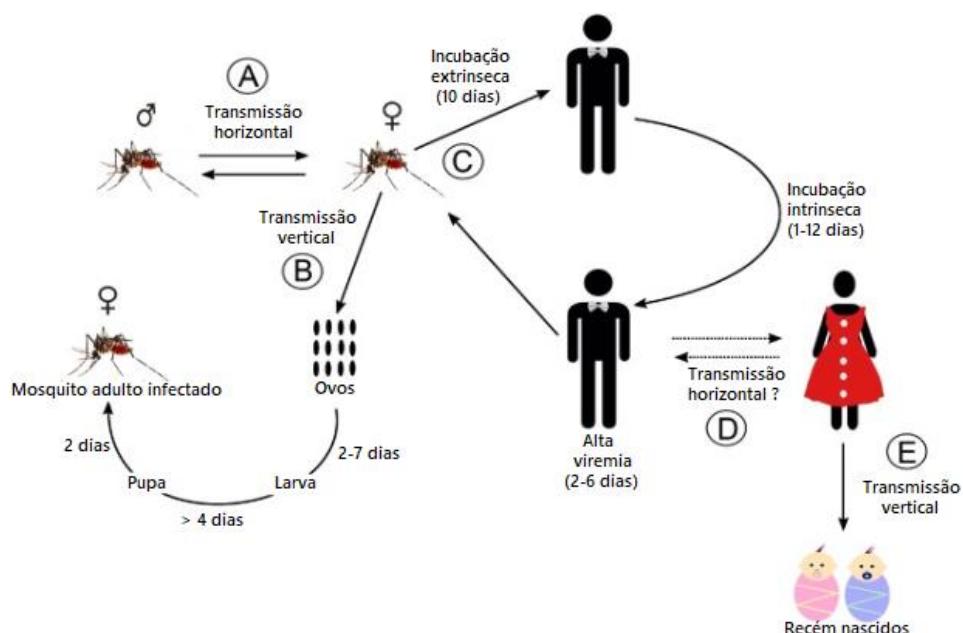
Essas mudanças ecológicas produzidas pelo homem podem ainda aumentar a prevalência do vetor, criar novos reservatórios ou mesmo induzir os arbovírus a se adaptarem a outros ciclos de manutenção. Além disso, o fato dos arbovírus serem capazes de se disseminarem por várias regiões do globo eleva ainda mais seu potencial de causar uma pandemia, embora cada vírus tenha suas próprias variáveis que colaboram para sua epidemiologia (Morens et al., 2004; Figueiredo, 2007).

Os arbovírus são mantidos na natureza em ciclos complexos envolvendo vetores artrópodes hematófagos, principalmente mosquitos e carapatos. O ciclo se fecha pela infecção de novos artrópodes que se alimentam de animais com viremia. A transmissão vertical, através da via transovariana, e a transmissão venérea também podem ocorrer (Figura 1) (Figueiredo, 2007; Vasconcelos et al., 2009; Bandeira et al., 2016). Os vírus mais importantes para a saúde humana são aqueles transmitidos principalmente por mosquitos dos gêneros Culex e Aedes (Weaver & Reisen, 2010).

Os arbovírus que causam doenças em humanos e outros animais de sangue quente são membros de cinco famílias virais: Bunyaviridae, Flaviviridae, Reoviridae, Rhabdoviridae e Togaviridae. Dentro dessas famílias, estudos apontam que existam

cerca de 150 espécies de arbovírus capazes de provocar doença em humanos, sendo responsáveis por significativos problemas de saúde pública (Mayer et al., 2016).

Figura 1. Ciclo biológico dos arbovírus



(Adaptado de Silva JVJ et al., 2018)

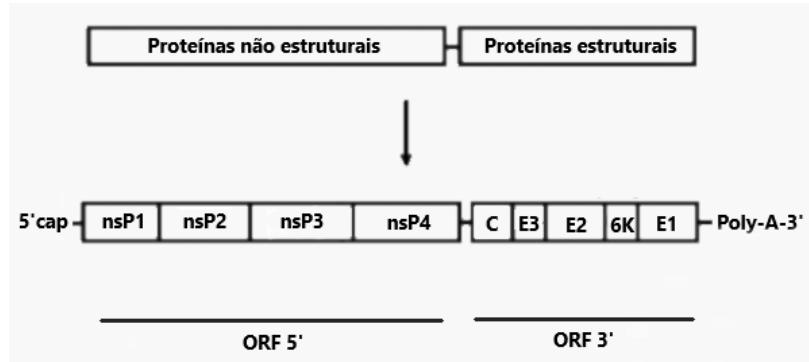
Em sua maioria esses vírus não causam doenças, contudo em alguns casos pode ocorrer uma doença branda que apresenta febre, dor de cabeça e mal-estar. Alguns arbovírus podem causar uma doença mais severa à um indivíduo ou mesmo a uma população como um todo. Dentre os vírus mais conhecidos estão incluídos *Dengue virus* (DENV), *Yellow Fever virus* (YFV), *Japanese encephalitis virus* (JEV), *Zika virus* (ZIKV), *West Nile virus* (WNV), *Oropouche virus* (OROV), *Chikungunya virus* (CHIKV), *Mayaro virus* (MAYV), e *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV) (Vasconcelos e Calisher, 2016; Napoleão-Pego et al., 2014).

2.2. Genoma, estrutura e replicação dos *Alphavirus*

Os *Alphavirus*, como CHIKV e MAYV, possuem genoma composto por RNA positivo de fita simples e tamanho aproximado de 11,7 kb que funciona como RNA

mensageiro, além disso, essa família de vírus possui aproximadamente 70 nm de diâmetro, são envelopadas e seu nucleocapsídeo é icosaédrico (J H Strauss e E G Strauss, 1994; King et al., 2011). O genoma viral é dividido em duas ORFs (*Open Read Frames*) separadas por uma região intergênica (Figura 2). A região ORF 5' corresponde a dois terços do genoma e é responsável pela codificação das proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) necessárias para a transcrição e replicação viral. A segunda ORF localizada na porção 3', correspondente a um terço do genoma viral, codifica as proteínas estruturais C (capsídeo), E3, E2, E1 e 6K, sob o controle de um promotor subgenômico denominado 26S (Jose J et al., 2009; Mota et al., 2015).

Figura 2. Representação esquemática da organização genômica dos *Alphavirus*

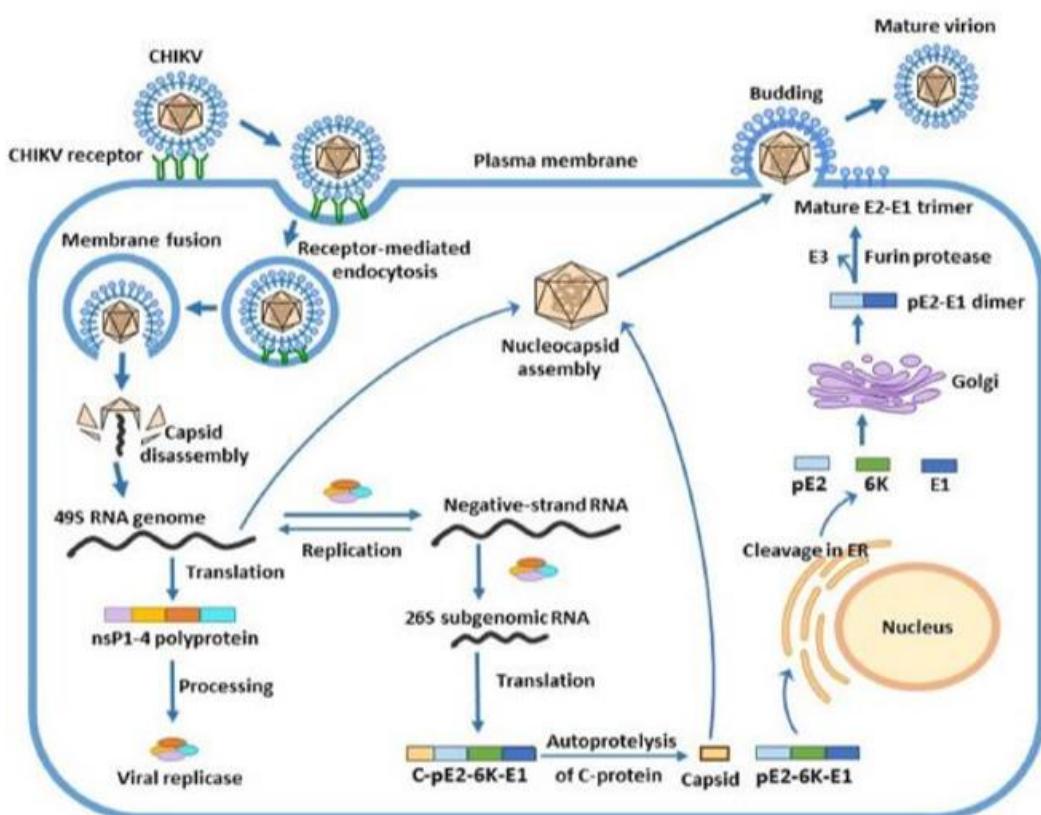


Na replicação viral (Figura 3), o vírus entra na célula alvo por endocitose mediada por clatrina, onde a proteína E2 interage com receptores específicos na superfície celular. Dentro do endossomo, o baixo pH desencadeia uma mudança conformacional do envelope viral. Devido a essa mudança conformacional, a proteína E1 é exposta e desencadeia a fusão do envelope viral com a membrana endossômica. Com esta fusão o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma, desmontado e o RNA livre é traduzido na 5' ORF produzindo uma poliproteína que se cliva em nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4 (Mota et al., 2015).

Após o processamento, as proteínas não estruturais formam um complexo, a replicase viral, que catalisa a síntese de uma fita de RNA intermediária negativa. Este RNA é então usado como molde para a síntese tanto do mRNA viral quanto do mRNA subgenômico 26S. O mRNA subgenômico 26S é traduzido para produzir a

poliproteína estrutural (C-pE2-6K-E1), a qual é processada por autoclavagem pela atividade serino-protease presente na proteína C, levando a sua liberação no citoplasma. As outras proteínas são direcionadas ao retículo endoplasmático, onde sofrem modificações pós-traducionais. A proteína pE2 é clivada no Golgi e forma então as glicoproteínas E2 e E3. As glicoproteínas E1 e E2 se associam formando um heterodímero que é então transportado para a membrana plasmática da célula hospedeira. No momento do brotamento, esse heterodímero é incorporado à superfície viral na forma de espículas triméricas (R. AbdeInabi et al., 2015).

Figura 3. Representação esquemática do ciclo de replicação dos *Alphavirus*

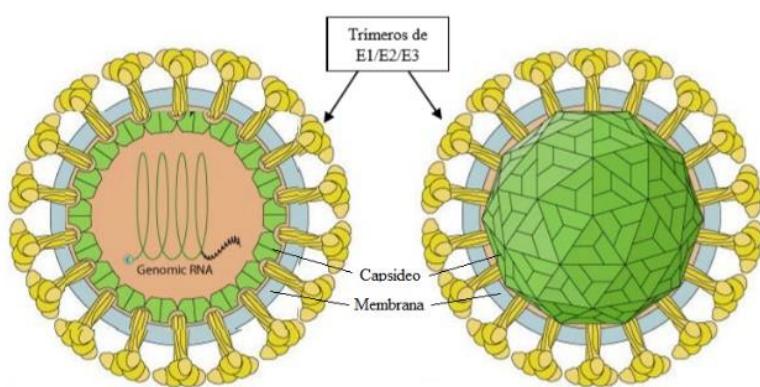


(R. AbdeInabi et al., 2015)

Ao final do processo de replicação o vírus é envelopado por uma bi-camada lipídica derivada da célula e contendo espículas triméricas heterodiméricas constituídas de E1, E2 e eventualmente E3 (Figura 4). Em destaque, a proteína E3

tem função de direcionar as proteínas estruturais ao retículo endoplasmático após a sua síntese nos ribossomos, para que estas sejam processadas adequadamente e adquiram a conformação adequada. Outra proteína, a 6K, a qual está associada a formação e brotamento viral e associada a permeabilidade da membrana. (José J et al., 2009)

Figura 4. Esquema representativo da estrutura dos *Alphavirus*



2.3 Vírus Chikungunya

O vírus Chikungunya (CHIKV), primeiramente isolado na Tanzânia em 1952-1953, é um vírus de RNA pertencente ao gênero *Alphavirus* da família Togaviridae e é transmitido para humanos através da picada do mosquito *Aedes* ssp. (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*), possuindo taxa de letalidade de 1:1000 (Powers e Logue, 2007). Como diversos *Alphavirus* transmitidos por mosquitos, o CHIKV causa em humanos febre, artralgia e erupções discretas. O nome Chikungunya deriva de uma palavra do idioma originário da Tanzânia que é entendida como “aqueles que se dobram”, em alusão a aparência encurvada de pacientes que sofrem de artralgia intensa (Lumsden, 1955; Robinson, 1955). A artralgia pode persistir por meses ou alguns anos podendo progredir para artrite crônica. Os sintomas da doença ocorrem tipicamente em 72 a 97% dos infectados (Thiberville et al., 2013).

A patologia da infecção, por desenvolver sintomas semelhantes aos de outras arboviroses, faz com que a doença seja facilmente confundida com a dengue, sendo anteriormente descrita como “uma variante clínica da dengue clássica diferindo na

ausência de dor de cabeça, pressão do globo ocular e dores nos movimentos oculares" (Ross, 1956).

São conhecidos 3 genótipos virais do CHIKV: Oeste Africano, Leste Central Sul Africano e Asiático. Na África, o vírus é mantido no ciclo silvestre envolvendo primatas e mosquitos silvestres do gênero *Aedes* ssp. Nas regiões rurais, os surtos humanos tendem a ser baixos e dependentes de condições ambientais que possibilitam o crescimento da população de mosquitos silvestres. O ciclo de transmissão silvestre não foi identificado na Ásia, mas é provável que ocorra devido à atividade humana em zonas de mata (Petersen e Powers, 2016).

Embora os genótipos de CHIKV possa ter variações, as cepas são genicamente relacionadas, sendo possível que o desenvolvimento de uma vacina funcione contra as 3 cepas existentes (Harrison et al., 1967). Um estudo realizado com voluntários de fase clínica 1, para vacina de VLP de CHIKV, revelou que a vacinação com uma única cepa de CHIKV pode gerar anticorpos contra todos os genótipos, confirmado que vacina baseada em uma cepa seja efetiva contra as outras cepas (Goo et al., 2016).

Na última década o CHIKV reemergiu causando uma série de grandes surtos. Iniciando na costa do Quênia em 2004, o vírus começou a se espalhar para as ilhas do oceano Índico, Índia e sudeste da Ásia, com mais de 6 milhões de casos prováveis (Sergon et al., 2008; Powers, 2009; Thiberville et al., 2013). Em 2005 um surto de CHIKV foi relatado nas Ilhas Comoros, resultando na infecção de aproximadamente 215 mil pessoas (Sergon et al., 2007). Da primavera de 2004 até o verão de 2006 ocorreu um número estimado em 500 mil casos.

As preocupações com o CHIKV aumentaram depois de 2007, quando o vírus foi encontrado no norte da Itália, tendo sido introduzido por um viajante infectado na Índia. Em setembro de 2010, um caso autóctone da doença também foi relatado no sudeste da França. No mesmo ano, o CHIKV causou doenças na Índia, Indonésia, Mianmar, Tailândia, Ilhas Maldivas e foi reintegrado na Ilha da Reunion. Casos importados foram identificados no ano de 2010 em Taiwan, França, Estados Unidos e Brasil, trazidos por viajantes, respectivamente, da Indonésia, Ilha Reunion, Índia e do sudeste asiático. A transmissão do CHIKV foi reportada pela primeira vez nas Américas em 2013. Indivíduos virêmicos com CHIKV foram encontrados no Caribe, nos Estados Unidos e na Guiana Francesa (Leparc-Goffart et al., 2014).

Segundo o Boletim Epidemiológico 16, volume 49, publicado em abril de 2018 pelo Ministério da Saúde, nos anos de 2016 e 2017 foram registrados, respectivamente, 277.882 e 185.854 casos prováveis de febre Chikungunya. Em 2018, até a Semana Epidemiológica 34 (31/12/2017 a 25/08/2018), foram registrados 72.117 casos prováveis de febre Chikungunya no país, com uma incidência de 34,7 casos/100 mil hab., destes, 50.356 (69,8%) foram confirmados e outros 17.910 casos suspeitos foram descartados. Ainda em 2018, a região Sudeste apresentou o maior número de casos prováveis de febre de Chikungunya (59,5%) em relação ao total do país. Em seguida aparecem as regiões Centro-Oeste (18,8%), Nordeste (13,4%), Norte (7,9%) e Sul (0,3%). Quanto aos óbitos, até a Semana Epidemiológica 34/2018, foram confirmados laboratorialmente 22 óbitos por Chikungunya e existem ainda 51 óbitos em investigação. No mesmo período de 2017, foram confirmados 186 óbitos e existiam 30 óbitos em investigação.

Ao se comparar com a dengue, a epidemiologia da Chikungunya apresenta características que amplificam a disseminação da doença e aumenta a possibilidade de epidemias. Entre elas estão a maior proporção de casos sintomáticos (> 90%), menor tempo de incubação intrínseca (2 a 7 dias), maior período de viremia (2 dias antes e 10 dias após a febre) e menor período de incubação extrínseca (no mosquito). Existe, ainda, o risco de estabelecimento de um ciclo endêmico do Chikungunya-macaco-mosquito no Brasil, dificultando a erradicação da doença no país (Figueiredo e Figueiredo, 2014).

2.3.1. Sintomas de infecção por CHIKV

A maioria dos pacientes apresentam a doença de forma sintomática após o período de incubação de dez dias após a picada do mosquito. Contudo, aproximadamente 10% dos pacientes não apresentam sinais clínicos da infecção (Thiberville et al., 2013).

A viremia persiste por até 5 dias após o início dos sintomas, incluindo febre (92% dos casos) tipicamente associada a artralgia (87%), dor nas costas (67%) e dor de cabeça (62%). A febre ocorre com um início súbito, podendo atingir 40°C, com calafrios e durabilidade tipicamente de 24 a 48 horas. Os tornozelos, punhos e

pequenas articulações das mãos são os locais mais afetados. Após um período de aparente remissão de sintomas, febre, artrite e erupção cutânea podem reaparecer (Simon et al., 2011). Um estudo que analisou a artralgia induzida pelo CHIKV demonstrou cura completa em 87,9% dos casos, enquanto 3,7% apresentaram dor episódica e rigidez articular, 2,8% apresentaram rigidez persistente sem dor e 5,6% tiveram movimento articular doloroso persistente (Kennedy, 1980).

O sintoma persistente mais comum é a artralgia inflamatória nas mesmas articulações afetadas durante os estágios agudos, sendo que alguns indivíduos desenvolvem artrite semelhante à artrite reumatoide ou artrite psoriática (Roosenhoff et al., 2016). Casos mais graves ocorrem frequentemente em recém-nascidos e pacientes acima de 65 anos de idade. Além disso, há relatos de transmissão de CHIKV da mãe para o bebê com alta taxa de morbidade (Morrison, 2014).

2.3.2. Diagnóstico de CHIKV

O diagnóstico de infecção por CHIKV baseia-se no isolamento viral, na detecção do RNA viral e na sorologia. As técnicas empregadas devem fornecer uma melhor conduta ao paciente, assim como a detecção e o controle de surtos. Métodos moleculares de diagnóstico do CHIKV, como o PCR em tempo real (RT-PCR) ganham importância crescente por fornecer um diagnóstico rápido e sensível em estágios iniciais da viremia. O RT-PCR vem sendo empregado com o uso de *primers* específicos para *Alphavirus* ou *primers* específicos para as regiões dos genes nsP1, nsP2 e E1 (Zuchi et al., 2014; Sam et al., 2015)

A resposta às infecções por CHIKV pode ser detectada no soro por ELISA, IFI, ensaio de hemaglutinação e ensaio de neutralização. O teste ELISA é uma técnica rápida e sensível para detecção de anticorpos específicos e pode distinguir entre IgG e IgM. A IgM é tipicamente detectada 3 dias após o desaparecimento dos sintomas e pode persistir por até 3 meses. A IgG para ambos os vírus surge após o aparecimento dos anticorpos IgM e persiste por anos (Grivard et al., 2007; Reddy et al., 2012).

2.3.3. Tratamento de CHIKV

Não existem medicamentos específicos para o tratamento de infecções causadas por CHIKV, portanto as estratégias terapêuticas são voltadas aos sintomas

da doença (OMS, 2008; Kaur e Chu, 2013). Nesse contexto, os pacientes são mantidos em repouso e submetidos a tratamento com analgésicos e drogas anti-inflamatórias não-esteroidais, as quais podem aliviar a dor e a febre (WHO, 2008). Em casos agudos de Chikungunya, a administração de anti-inflamatórios não-esteroidais juntamente com baixas doses de corticosteroides tem mostrado uma redução da dor e melhora na qualidade de vida (Padmakumar et al., 2009).

A imunização passiva pode ser uma terapia preventiva apropriada bem como uma opção para as manifestações causadas pela infecção de CHIKV, uma vez que não existe terapias alternativas disponíveis. Em modelo animal de camundongo foi administrada IgG purificada de plasma de um doador CHIKV+ em processo de recuperação da saúde, demonstrando alta atividade neutralizante, assim um poder terapêutico e ação profilática anti-CHIKV. Portanto, a imunização passiva poderia ser usada para o tratamento da febre Chikungunya e para a prevenção em pacientes com grave risco de manifestar a doença, bem como adultos em condições subjacentes (Tharmarajah et al., 2017).

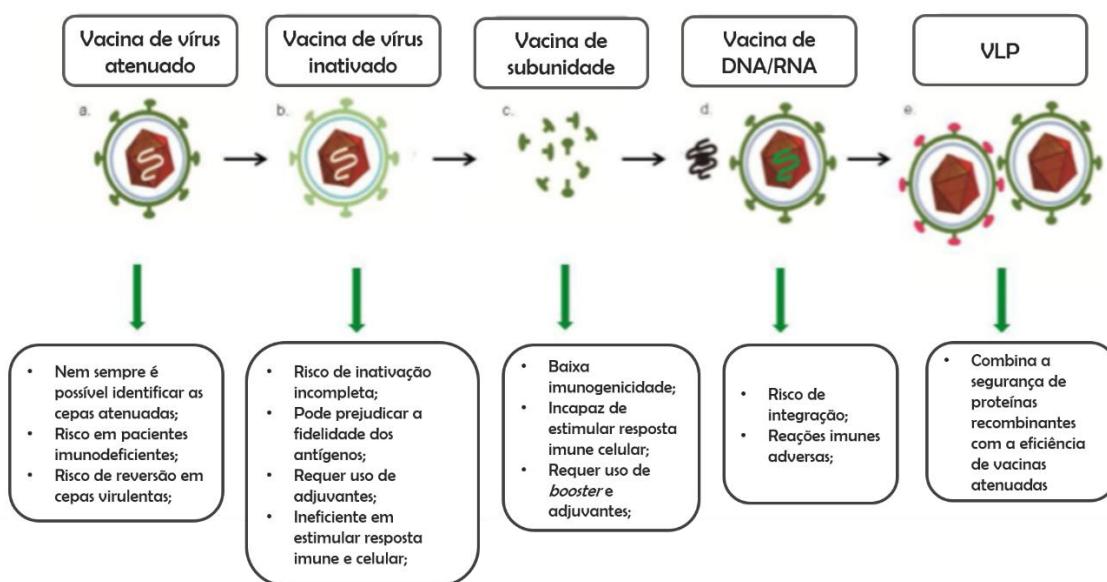
2.4. Vacinas virais

A grande maioria das vacinas preventivas para vírus consiste em um vírion atenuado ou inativado que é administrado ao indivíduo, sendo capaz de gerar uma resposta imune protetora. Esses tipos de vacinas são altamente efetivos e algumas não requerem a administração de uma segunda dose. Entretanto, especificamente as vacinas atenuadas apresentam riscos operacionais de produção ou administração, uma vez que o vírus pode reverter em sua forma patogênica (Makela, 2000). As vacinas de nova geração apresentam uma maior segurança por não utilizar o vírion completo em sua formação, entre elas pode-se utilizar as vacinas de subunidades proteicas, vacinas de DNA/RNA ou as *virus-like particles* (VLP). As vacinas de subunidades são compostas por proteínas virais recombinantes ou proteínas purificadas do vírus selvagem que agem como antígenos. A vacinação com DNA consiste em uma técnica direta de administração de um plasmídeo de DNA que codifica uma proteína antigênica, essas proteínas são apresentadas por receptores celulares e subsequentemente são capazes de gerar uma resposta imune (Makela, 2000; Fuenmayor et al., 2017).

A evolução das vacinas requer o uso de ferramentas interdisciplinares que conduzem à produção de novas alternativas mais eficientes e seguras. Uma nova abordagem conta com tecnologias recombinantes para entregar uma vacina ou então DNA recombinante que resultará em uma ou mais proteínas recombinantes. Assim, podem resultar em partículas recombinantes como uma VLP. Essas novas vacinas recombinantes têm apresentado um mercado com potencial de inovação no desenvolvimento de vacinas biotecnológicas (Fernandes et al., 2013).

As VLP consistem em uma nanoestrutura artificial que se assemelha às estruturas virais. Elas são compostas basicamente por algumas, ou mesmo todas as proteínas estruturais que compõem o vírus, contudo o material genético se encontra ausente, evitando qualquer possibilidade de mutação reversiva ou infecção. Apesar de não serem capazes de se replicarem ou mesmo causar infecção patogênica, as VLP desencadeiam uma alta resposta imunológica humoral e celular devido às suas estruturas repetitivas. Por essas vantagens, o interesse na tecnologia de VLP tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (Mäkelä, 2000; Fuenmayor et al., 2017).

Figura 5. Tipos de vacinas



Fuenmayor et al., 2017

2.4.1. Tipos de VLP

As VLP são compostas por uma ou mais proteínas estruturais capazes de se auto-formar quando expressas de forma recombinante. As proteínas podem ser organizadas em camadas simples, duplas ou triplas, como no caso do papiloma vírus humano (HPV) onde as VLP são formadas por uma única proteína estrutural. Já as VLP mais complexas possuem várias proteínas estruturais, por exemplo, temos as da família *Reoviridae*, as quais são formadas por 2 a 4 proteínas diferentes dispostas em várias camadas (Lua et al., 2014). Diversas vacinas baseadas em VLP já estão disponíveis comercialmente, como exemplo temos vacinas contra HPV, Cervarix®, Gardasil® e Gardasil9®, para Hepatite B temos a Sci-B-Vac™, e recentemente a primeira vacina licenciada para a malária, a Mosquirix™ (Mohsen et al., 2017).

Recentemente foi desenvolvido um novo tipo de VLP, nomeada como VLP quimérica. Sua estrutura é composta por proteínas de um vírus enquanto que as proteínas do envelope são derivadas de um segundo vírus. Como exemplo temos o desenvolvimento da VLP quimérica do circovírus suíno tipo 2 com o epítopo B do vírus da Síndrome Respiratória e Reprodutiva dos Suínos GP5. A forma de VLP quimérica possibilita o uso de VLP como sistema de entrega, em virtude de que as proteínas de cápside específicas para entrega à célula alvo tendo uma nova aplicação na administração de medicamentos, terapia genética e tratamento de câncer (Fuenmayor et al., 2017).

2.4.2 Métodos de produção de VLP

A escolha de um sistema de expressão para a produção de VLP deve ser levada em consideração a capacidade desse sistema em realizar o dobramento e modificações pós-traducionais adequados para o produto que se pretende fabricar (Lua et al., 2014). Para esse fim, diversos sistemas de expressão possuem vantagens e desvantagens (Tabela 1).

Tabela 1. Plataformas de produção de VLP e suas vantagens e desvantagens

Plataforma de produção	Vantagens	Desvantagens
Plantas	<ul style="list-style-type: none"> • Fácil expressão • Possibilidade de escalonamento • Não possui contaminação derivada de vírus humano 	<ul style="list-style-type: none"> • Baixo nível de expressão • Baixa estabilidade
<i>E. coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Fácil expressão • Possibilidade de escalonamento • Baixo custo 	<ul style="list-style-type: none"> • Presença de endotoxinas • Não faz glicosilação
Levedura	<ul style="list-style-type: none"> • Fácil expressão • Possibilidade de escalonamento • Baixo custo 	<ul style="list-style-type: none"> • Não apropriado para glicosilação de proteínas (ex: alta modificação de manose) • Risco de formação e <i>folding</i> incorreto
Células de mamíferos	<ul style="list-style-type: none"> • Produção semelhante ao hospedeiro natural • Realiza formação correta de VLP 	<ul style="list-style-type: none"> • Baixa produtividade • Alto custo
Células de insetos	<ul style="list-style-type: none"> • Pode produzir grandes quantidades de VLP formada corretamente em alta densidade celular • Possibilidade de escalonamento • Baixo risco de cultivo de patógenos quando comparado a células de mamíferos • Componentes do hospedeiro podem atuar como adjuvantes vacinais 	<ul style="list-style-type: none"> • Limitado para modificações tradicionais de alta manose • Difícil a remoção de baculovírus

Fuenmayor et al., 2017

2.4.2.1. Plantas

As plantas podem produzir compostos terapêuticos em diversas formas, sendo também usadas para a produção de VLP. Como exemplo, temos a produção de VLP de HPV 16 e influenza. A *Agrobacterium tumefaciens* é comumente utilizada para infecção e transformação dessas células, de forma que um gene específico de interesse é introduzido no genoma do hospedeiro (D'Aoust, 2010; Van Zyl e Hitzeroth, 2016).

2.4.2.2. Bactérias e leveduras

Bactérias e leveduras representam um sistema de fácil escalonamento e uma produção de bom custo-efetivo. Bactérias são mais utilizadas como sistema de expressão de VLP não envelopadas formadas com uma ou duas proteínas estruturais. A sua principal vantagem está relacionada ao alto rendimento de proteína de interesse, porém não são capazes de realizar modificações pós-traducionais (MPT) complexas, que são de extrema importância para a imunogenicidade das VLP (Tan et al., 2004). Diversas VLP produzidas em leveduras obtiveram a aprovação de agências reguladoras, como as VLP de papiloma vírus mesmo não apresentando o mesmo perfil de MPT como de humanos (Saraswat et al. 2016).

2.4.2.3. Células de mamíferos

Vários tipos de células de mamíferos estão disponíveis para a produção de VLP. Ao ser comparado com outros sistemas essas células apresentam um menor rendimento de produção de proteínas, entretanto possuem a capacidade de formar mais proteínas complexas e realizar MPT. Por essa razão, células de mamíferos são utilizadas na produção de VLP envelopadas, mais complexas, compostas por múltiplas proteínas estruturais. Uma das células mais utilizadas é a células CHO (*Chinese Hamster Ovary*), que apresenta a vantagem de não ser uma célula derivada de humano, tendo assim baixo risco de contaminação por vírus humano. Esta célula já foi utilizada na produção de VLP de hantavírus que foi capaz de induzir uma resposta imune em camundongos (Li et al., 2010). Outras células utilizadas com a

finalidade de produzir VLP são HEK293 e células derivadas de fluido amniótico (Lua et al., 2014).

2.4.2.4. Células de insetos

Células de insetos são ferramentas promissoras para a expressão de proteínas complexas, fornecendo um ambiente eucariótico propício para a realização das modificações pós-traducionais necessárias para a atividade biológica da proteína. Vários são os exemplos da aplicação desse sistema para a produção de biofármacos para uso veterinário, como Porcilis®, Bayovac e Vibragem, entretanto a produção comercial para uso humano ainda é recente.

Os sistemas de expressão baseados em células de insetos possuem numerosas vantagens frente a outros sistemas de expressão de proteínas recombinantes. Entre as vantagens temos o fato de em geral não possuírem agentes externos que possam infectar e replicar em células de mamíferos. Entretanto, esse sistema apresenta um baixo histórico de regulamentação quando comparados a outros sistemas de expressão, sendo essa uma das razões do seu curto histórico comercial.

A expressão baseada em células de insetos pode ser dividida em dois diferentes modos de expressão, a expressão lítica e a expressão por linhagens estáveis. Na expressão lítica, com o uso do sistema de Baculovírus, as células são derivadas de mariposa (*Spodoptera frugiperda*: Sf9 e Sf21 e *Trochioplusiani*: Hi-5). Entre as vantagens desse sistema de expressão, existe o fato de que os Baculovírus são inofensivos aos humanos e permitem um acesso relativamente rápido para a atividade biológica da proteína. Entretanto, desvantagens como proteólização da proteína, padrão de glicosilação heterogêneo e dificuldade de reproduzibilidade e coerência nos ciclos de produção caracterizam suas principais dificuldades para uma produção industrial.

Na expressão estável e expressão não-lítica, o vetor é estável e se integra ao cromossomo da célula de inseto. A proteína recombinante então é expressa de forma que não ocorra a lise celular. As células mais comuns para esse sistema são a Sf9, Sf21, Hi-5 e *D. melanogaster* como a S2. A maior desvantagem em relação ao sistema

de Baculovírus é a necessidade de se estabelecer uma linhagem estável de expressão, o que demanda tempo (John e Salgueiro, 2013).

O sistema de expressão baseado em células S2 foi desenvolvido no começo da década de 70 por Imogene Schneider e vem sendo usado na pesquisa há mais de 40 anos. As células de *Drosophila melanogaster* S2 são células derivadas de uma cultura primária de embriões em estágio tardio de desenvolvimento. São relativamente pequenas (8-10 µm), de fácil cultivo, rápido crescimento em meio livre de soro e podem ser cultivadas em monocamadas ou em suspensão. Essas células podem alcançar densidades de aproximadamente 70 milhões de células por mL, maior magnitude quando comparadas a outras células de insetos e mamíferos em batelada (Dyring, 2011).

Os sistemas de expressão em células de Drosófilas, utilizando eficientes promotores gênicos e elevado número de cópias de plasmídeos por célula transfetada, tem obtido sucesso em relação as demais estratégias, produzindo um elevado nível de expressão de proteínas heterólogas (Mccarroll e King, 1997). Os promotores mais utilizados para a expressão em células S2 são os promotores da actina e da metalotioneína.

O promotor da actina de drosófila é constitutivo, o que equivale a dizer que seu funcionamento está ligado ao funcionamento fisiológico normal das células, sendo regulado por mecanismos de regulação gênica da própria célula e de seu próprio promotor. O promotor da metalotioneína é um promotor forte, que é induzido pela exposição das células a um meio contendo metais pesados (Chung e Keller, 1990).

Normalmente, a obtenção de linhagens estáveis é feita pela co-transfecção dos vetores contendo o gene da proteína de interesse e um vetor auxiliar, que codifica para um gene de resistência. Os vetores de resistência mais utilizados são os que carregam o gene da resistência à higromicina ou à penicilina. Nessas condições é possível estabelecer uma população de células transfetadas e produtoras em apenas três semanas (Iwaki et al., 2003; Iwaki e Castellino, 2008). O emprego das células S2 no desenvolvimento de vacinas foi relatado para expressão de proteínas virais como Vírus da Dengue (DENV), Vírus Oeste do Nilo e Glicoproteína do Lyssavirus da raiva (RVGP).

No caso da RVGP, o Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan e seus colaboradores possuem diversas publicações nessa área. A expressão da glicoproteína utilizando a plataforma de células S2 atinge a concentração de 705 µg/mL, sendo a síntese de RVGP melhorada pelo desempenho do vetor para seleção e expressão, seleção das subpopulações celulares, exposição da cromatina e emprego de formulações de meios de cultura. A RGVP expressa foi utilizada para imunização de camundongos e apresentou proteção contra o Lyssavius da raiva no teste experimental de desafio (Ventini et al., 2010; Moraes et al., 2012; Astray et al., 2013; Santos et al., 2016).

Um exemplo da vantagem em utilizar essa plataforma foi descrito para a produção de HIV-1 VLP em células S2, mostrando que o rendimento foi maior do que com o sistema de células de mamíferos e leveduras. A expressão de proteínas do HIV-1 pelo sistema de baculovírus também apresentou uma alta quantidade de VLP, no entanto, há o desafio deste sistema em separar as VLP dos baculovírus recombinantes. Neste caso, o sistema de S2 é uma alternativa atraente para a produção de HIV-1 VLP (Yang et al., 2012).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O principal objetivo desse trabalho consistiu em avaliar parâmetros cinéticos de células S2 recombinantes (S2CHIKV-Hy) e analisar a produtividade de VLP em diferentes meios de cultura.

3.2. Objetivos específicos

- Adaptar células S2 recombinantes, originalmente cultivadas em meio de cultura SF900 III (ThermoScientific), a diferentes meios de cultura: IPL-41 modificado (Batista et al., 2011) e Schneider.
- Estudar a cinética de crescimento e a expressão das proteínas de Chikungunya em Células adaptadas a cada meio de cultura.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Meios de Cultura

4.1.1. SF900III + CD Lipid

O meio de cultura SF900III® (Thermo) é o meio padrão utilizado para células S2 no Laboratório de Imunologia Viral. Possui formulação fechada, porém as quantidades de aminoácidos e glicose são bem conhecidas devido às diversas análises de metabolismo já realizadas pelo grupo. Também foi adicionado CD-Lipid (Life Technologies) na diluição 1:100 ao meio.

4.1.2. IPL-41 modificado

O meio de cultura IPL-41 (Thermo) modificado (Batista et al., 2011) é quimicamente definido, sem soro fetal bovino (SFB) e livre de proteínas de origem animal. Em sua composição são adicionados 10 g/L glicose (Synth Laboratórios), 6 g/L yeastolate ultrafiltrate (Life Technologies), 1% chemically defined lipid (Life Technologies), 2 g/L lactose (Sigma), 5 g/L glutamina (Sigma) e 0.1% m/v Pluronic F-68 (Sigma).

4.1.3. Schneider + 10% SFB

O meio Schneider (LCG) com 1,8 g/L de L-Glutamina e 2 g/L de D+ Glicose trata-se do meio de referência para o cultivo de células S2. Este meio requer suplementação com 10 % de SFB.

4.2. Linhagem Celular (*Drosophila melanogaster* Schneider 2)

Foi utilizada a linhagem de células recombinantes de *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (células S2), denominada S2CHIKV-Hy inicialmente cultivada em meio SF900III® (Puglia, 2018). Essa linhagem foi obtida pela transfecção de vetor contendo os genes das proteínas estruturais do CHIKV, com expressão indutível por metais (promotor methionineína). Além disso, possuem resistência à higromicina. Sua manutenção foi realizada em meio de cultura SF900III com adição de CDLipid

(*Chemically Defined Lipid Concentrate* – ThermoFisher), IPL-41 modificado (após adaptação) e Schneider (após adaptação), todos à temperatura de 28 °C (\pm 2 °C), sendo sub cultivadas (repicadas) em intervalos de 4 a 6 dias. As células S2, por serem células semiaderentes, possuem a capacidade de serem cultivadas de forma estática, mas também podem ser cultivadas em suspensão.

As culturas estáticas foram realizadas em frascos T de 25 cm² e 75 cm² de superfície, com volume de trabalho de 5 mL e 10 mL respectivamente. As culturas em suspensão foram realizadas em frascos de Duran (Schott-shakers) de 100 ml com volume de trabalho de 20 ml, concentração celular inicial de 2×10^6 células/ml e agitação orbital a 100 rpm em incubadora (New Brunswick).

Antes de se iniciar um experimento, toda vez que foi feita a mudança das células de um cultivo estático para um cultivo em suspensão, uma etapa de adaptação foi realizada. Essa etapa consiste na diluição de 25% do inóculo de um frasco T 25 cm² com aproximadamente 90% de confluência em 15 mL de meio de cultura fresco e transferidos para frasco tipo Schott de 100 mL. Após 48 horas mantidas em agitação as células estão adaptadas para iniciar um novo experimento sob agitação.

4.3. Adaptação aos Meios de Cultura

A partir das células S2CHIKV-Hy recebidas do banco de origem do Laboratório de Imunologia Viral, foram obtidas células adaptadas ao meio de cultura desejado. Primeiramente, foram cultivadas células em meios compostos por 50% do meio a ser adaptado e 50% do meio SF900III. Essa composição de meio de cultura foi mantida durante uma semana. Não havendo alterações visíveis de crescimento, as porcentagens de meio IPL-41 modificado e Schneider dos cultivos foram aumentadas. As porcentagens de meio IPL-41 e Schneider ao longo da adaptação foram: 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% e finalmente 100%. Quando a adaptação já havia sido finalizada, foi aplicado um recurso de seleção populacional, pela inserção de higromicina (600 µg/ml).

4.4. Criopreservação e manutenção do banco de células

4.4.1. Congelamento

O banco de trabalho foi estabelecido em frascos T 75 cm² após a adaptação das células aos novos meios. Para isso, as células em fase exponencial foram centrifugadas por 5 minutos a 3000 rpm e ressuspendidas em meio de congelamento contendo 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO), 40% de soro fetal bovino (SFB) e 50% de meio. Com uma concentração de 1×10^7 células/mL as alíquotas foram distribuídas em 1 mL por criotubo. Os criotubos foram transferidos para o container de congelamento (Mr. Frosty™ Freezing Container – ThermoFisher) e armazenados a -80°C. Após 24h, os criotubos foram transferidos para o nitrogênio líquido para a preservação das células.

4.4.2. Descongelamento

Um criotubo do banco de células foi descongelado à temperatura ambiente e as células foram transferidas para um frasco T 25 cm² contendo 4 ml de meio de cultura. Após 24h ocorreu a adesão celular ao frasco de cultivo e o meio de cultura foi totalmente trocado e adicionado meio de cultura fresco, assim é retirado o DMSO presente no meio de congelamento. Em seguida as células foram mantidas a 28°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).

4.5. Determinação da concentração e viabilidade celular

A concentração celular em um dado cultivo foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer, utilizando microscópio invertido, sendo realizadas contagens diárias em duplicata. Foi utilizado o corante azul de Trypan (0,2%) com o intuito de excluir as células inviáveis da contagem celular. O azul de Trypan só penetra nas células com a membrana celular comprometida, deixando-as azuladas. Assim, essas células revelaram um aumento de permeabilidade característico da perda de viabilidade.

A viabilidade celular foi determinada pela razão entre o número de células viáveis e o número de células totais no meio (células viáveis e inviáveis), multiplicados

por 100. A concentração celular foi determinada após a correção dos cálculos de diluição e a multiplicação por 10^4 , obtendo assim o número de células por mililitro de suspensão.

4.6. Determinação da curva de crescimento celular nos diferentes meios de cultura

Após adaptação das células S2CHIKV-Hy aos novos meios de cultura foram estudadas cinéticas de crescimento onde as células S2CHIKV-Hy foram analisadas em triplicatas em cada um dos três meios de cultura e as células S2WT foram analisadas em duplicata no meio SF900III. Os 11 Schott-shakers de 100 ml com volume de trabalho de 20 ml foram inoculados com 2×10^6 células/ml e submetidos à agitação orbital a 100 rpm, a 28 °C em incubadora (New Brunswick). Em 24h após inóculo, as células foram induzidas com 1 mM de CuSO₄. A contagem celular foi realizada a cada 24 horas, durante 144 horas, obtendo assim, dados diários da concentração celular, X. Define-se $X_{\text{máx}}$ como concentração máxima no período analisado.

Para o cálculo da velocidade de crescimento celular, μ_x , foram obtidas regressões lineares a partir da plotagem dos dados de L_nX x Tempo (h). Selecionando apenas parte dos dados em que foi observado comportamento linear, μ_x é dado pelo coeficiente angular da reta aproximada, ou seja, a velocidade de crescimento calculada refere-se apenas ao período em que as células crescem exponencialmente. O parâmetro μ_m é dado pela média aritmética dos dados coletados de μ_x .

A taxa específica de crescimento (μ) é determinada pelo balanço de massa de células em um cultivo em batelada com a equação

$$\frac{dXv}{dt} = \mu t$$

Onde dXv/dt é uma variação de células, μ a taxa específica de crescimento celular e Xv a concentração de células. Por meio da integração do balanço descrito, temos a equação:

$$\ln(Xv) = \mu t$$

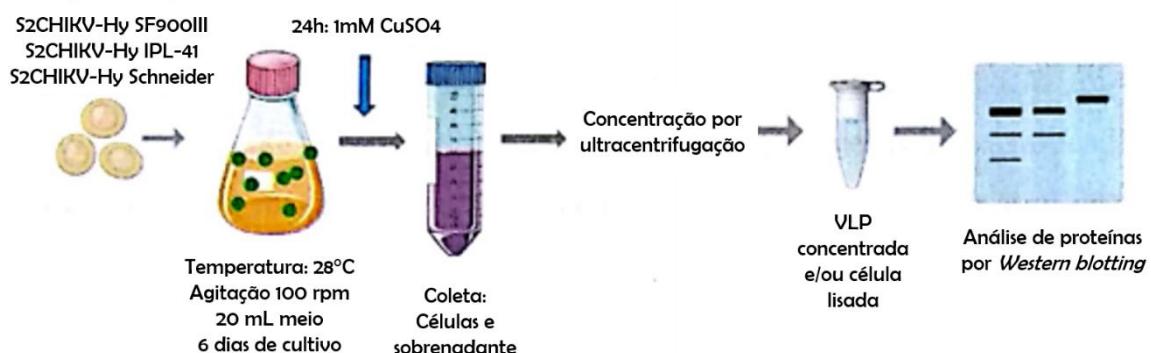
Plotando os dados do logaritmo neperiano de X_v contra o tempo, temos uma curva de crescimento celular ($\ln(X_v) = f(t)$) que ao se linearizar, representa uma reta durante a fase exponencial de crescimento. A taxa específica máxima de crescimento (μ_{\max}) foi obtida através da derivação dessa reta para a obtenção do coeficiente angular correspondente a μ_{\max} .

4.7. Produção de VLP

Para a produção de VLP de CHIKV, células S2CHIKV-Hy foram inoculadas na concentração 2×10^6 células/mL e cultivadas por 6 dias a 28°C em frasco tipo Schott contendo 20 mL de meio de cultura, sob agitação de 100 rpm. As células foram induzidas após 24 horas por adição de 1 mM de CuSO₄, e a análise de expressão de proteína foi feita após 96 horas e 120 horas de indução por Western blotting (Figura 6). A análise em 120 horas foi feita em um primeiro momento enquanto a de 96 horas foi analisada nos outros ensaios.

Para análise, foram retiradas amostras de cada cultivo e o sobrenadante coletado por ultracentrifugação e armazenado a -20°C até o momento do ensaio.

Figura 6. Esquema representativo do método de produção de VLP



4.8. Análise de expressão e obtenção de VLPs

4.8.1. Imunofluorescência indireta (IFI)

Em intervalos de 24h após indução, foram coletadas amostras contendo 5×10^5 células. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, por 3 minutos a 4°C sendo ressuspendidas e aplicadas 1×10^5 células por poço (10µl) para a fixação em metanol/acetona 1:1. Após a fixação, as lâminas com os poços foram lavadas três vezes com PBS 1X e posteriormente foram aplicados 10 µL de anticorpo primário anti-CHIKV (tabela 2) e encubado por 1 hora em estufa à temperatura de 37°C. O processo de lavagem foi repetido e aplicados 10 µL por poço de anticorpo secundário anti-mouse IgG conjugado a FITC na diluição de 1:250 juntamente com uma solução Azul de Evans (1:2000) encubados por 1 hora no escuro à temperatura ambiente. Ao final desse período foram adicionados 10 µl de SlowFade-Gold antifade reagent e as amostras analisadas em microscópio de fluorescência Olympus BX21 em objetiva de 40x, sendo descontado o background do negativo quando da análise do positivo. As imagens foram adquiridas por meio do aplicativo CellSens (Olympus).

Tabela 2. Características dos anticorpos utilizados no IFI

Anticorpo	Descrição	Diluição
Anticorpo Policlonal Anti-CHIKV	(ATCC®) <i>Hyperimmune ascitic fluid (mouse)</i> Reference reagent – produzido em camundongo.	1:250
Anticorpo IgG-FITC	FITC-Goat anti-mouse Invitrogen®	1:250

4.8.2. Western blotting

Foram montados dois géis de poliacrilamida (Tabela 3), para a realização simultânea de dois processos de *Western Blot*, sendo um para a utilização de anticorpo policlonal anti-CHIKV e monoclonal anti-CHIKV. No processo destinado a

análise com anticorpo policlonal foram utilizados 25 µL do sobrenadante juntamente com 5 µL de Loading Buffer 6x com β-mercaptoretanol e a reação foi incubada a 100°C por 5 minutos. No outro processo, destinado a análise com anticorpo monoclonal, foram usados 25 µL do sobrenadante juntamente com 5 µL Loading Buffer 6x. Após esse procedimento cada amostra foi aplicada em seu respectivo gel. A corrida do gel foi realizada a 0,6 Ampere por 2 horas.

Após a corrida, o gel para *Western blotting* foi colocado em um aparato específico para realizar a transferência úmida para a membrana de nitrocelulose Amersham Hybond – ECL (GE Healthcare), a 100 Ampere por 1 hora. Sendo posteriormente, a membrana transferida para a solução de bloqueio (leite em pó desnatado 5% em PBS 1x), e incubada por 1 hora com agitação. A membrana para *Western blotting* foi então lavada 2x por 10 minutos com PBS 1x. Logo após, foi adicionado o anticorpo primário, diluído 1:1000 em 20 mL de BSA 1%, sendo incubado *overnight* a 4°C. Após esse período, três novos procedimentos de lavagem com PBS 1x foram realizados, e em seguida adicionou-se o anticorpo secundário, diluído 1:2000 em 20 mL de BSA 1%, sendo novamente incubado por 1 hora sob agitação. O mesmo procedimento de lavagem já descrito foi realizado novamente. A membrana foi revelada com o reagente ECL Select, da empresa GE HealthCare, no fotodocumentador Uvitec Cambridge, com análise no aplicativo Alliance (Uvitec Cambridge).

Tabela 3. Composição dos géis utilizados para SDS-PAGE e *Western blotting*

Reagentes	Gel de Separação (mL)	Gel de Empilhamento (mL)
Acrilamida/Bis 37/ 1–40%	1,5	0,312
Tris-HCl 1,5 M - pH 8,8	-	0,35
Tris-HCl 0,5 M - pH 8,8	0,35	-
H ₂ O Milli Q	2,1	1,85
SDS 20%	0,025	0,0125

4.8.3. Dot Blotting

As amostras de células foram submetidas a um processo de lise, adicionando-se 100 µL de tampão RIPA, com posterior homogeneização por vortex, incubação por 15 minutos no gelo e centrifugação em 4°C por 15 minutos a 8000 g. Posteriormente foi utilizado 50 µL do sobrenadante para aplicar na membrana de nitrocelulose Amersham Hybond – ECL (GE Healthcare). Para as amostras de vírus, aplicação de 10 µL diretamente na membrana de nitrocelulose. Após 20 minutos de secagem, a membrana foi então incubada em solução de bloqueio (leite em pó desnatado 3% em PBS 1x) por 1 hora. A membrana foi então lavada 3x por 10 min com PBS + Tween 20 (0,05%), e posteriormente foi adicionado o anticorpo primário, diluído 1:1000 em 3 ml de BSA 1%, sendo encubado *overnight* a 4°C. Após esse período, três novos procedimentos de lavagem foram realizados e, em seguida, adicionou-se o anticorpo secundário, diluído 1:2000 em 3 ml de BSA 1%, sendo novamente incubado por 1 hora sob agitação. O mesmo procedimento de lavagem já descrito foi realizado novamente. A membrana foi revelada com o reagente ECL Select, da empresa GE HealthCare, no fotodocumentador Uvitec Cambridge, com análise no aplicativo Alliance (Uvitec Cambridge).

4.8.4. Citometria de fluxo (FACS)

Em intervalos de 24 horas após a indução por CuSO₄ foram coletadas amostras contendo 5x10⁶ células. As células foram centrifugadas a 3000 rpm, por 3 minutos a 4°C sendo ressuspensas em solução com 2% de formaldeído e fixadas por 15 minutos em temperatura ambiente. A permeabilização das células ocorreu com adição lenta de metanol 100%, sendo encubadas por 30 minutos no gelo e guardadas em freezer -20°C.

Ao descongelar as células, foi realizada centrifugação a 3000 rpm, por 4 minutos a 4°C para a retirada do metanol. Posteriormente as células foram ressuspensas com PBS 1x e novamente centrifugadas. Após o descarte do sobrenadante, os precipitados celulares foram incubados com 50 µL de anticorpo primário (descrição tabela 4) por 1 hora a temperatura de 4°C. Após ligação de anticorpo primário as células foram centrifugadas e ressuspensas em 50 µL do

anticorpo secundário e incubadas a 4°C por 1 hora. Novamente as células foram centrifugadas e ressuspensas em solução de PBS 1x e armazenadas ao abrigo de luz. A análise da proporção de células fluorescentes e da mediana de fluorescência foram realizadas no aparelho FACSCanto (Becton Dickinson), a partir da contagem de 10.000 eventos para cada amostra. O anticorpo conjugado ao FITC é detectado pelo filtro de 530 nm (FL1) sendo capaz de detectar a proteína marcada pela fluorescência.

Tabela 4. Características dos anticorpos utilizados no (FACS)

Anticorpo	Descrição	Diluição
Anticorpo Policlonal Anti-CHIKV	(ATCC®) Hyperimmune ascitic fluid (mouse) Reference reagent – produzido em camundongo.	1:250
Anticorpo IgG-FITC	FITC-Goat anti-mouse Invitrogen®	1:250

5. RESULTADOS

5.1. Adaptação das células S2CHIKV-Hy aos meios de cultura IPL-41 e Schneider

Foi realizada a adaptação gradual das células S2CHIKV-Hy, inicialmente cultivadas em SF9000 III, aos meios de cultura IPL-41 modificado e Schneider. O processo de adaptação pode ser melhor visualizado com o diagrama abaixo (Figura 7), de modo que cada nível representa uma semana. Na passagem com 60% de meio de cultura Schneider foi observada uma dificuldade na adaptação, sendo necessária a repetição da etapa por mais uma semana. Contudo, não apresentando um crescimento e adaptação ao novo meio, as células foram submetidas ao acréscimo de 5% de SFB, assim o meio de cultura passou de 5% para 10% de SFB em sua composição. Após esta modificação, as adaptações ocorreram normalmente. É importante ressaltar que a partir do momento que a porcentagem de adaptação atingiu 100% de meio novo, parte da cultura celular foi congelada para constituição de um banco de trabalho.

A partir de um determinado momento, foi observada modificação morfológica e de aderência das células devido à mudança do meio de cultura. As células S2 apresentam formato esférico, contudo no meio Schneider foram encontradas células mais dispersas, semelhantes a pequenos cristais. Comparando as culturas em meio 100% SF900III, 100% IPL-41 e 100% Schneider percebemos que nos dois primeiros a aderência aos frascos T eram semelhantes, enquanto que no meio Schneider a aderência ao frasco T era menor.

Figura 7. Diagrama representativo da adaptação aos novos meios de cultura



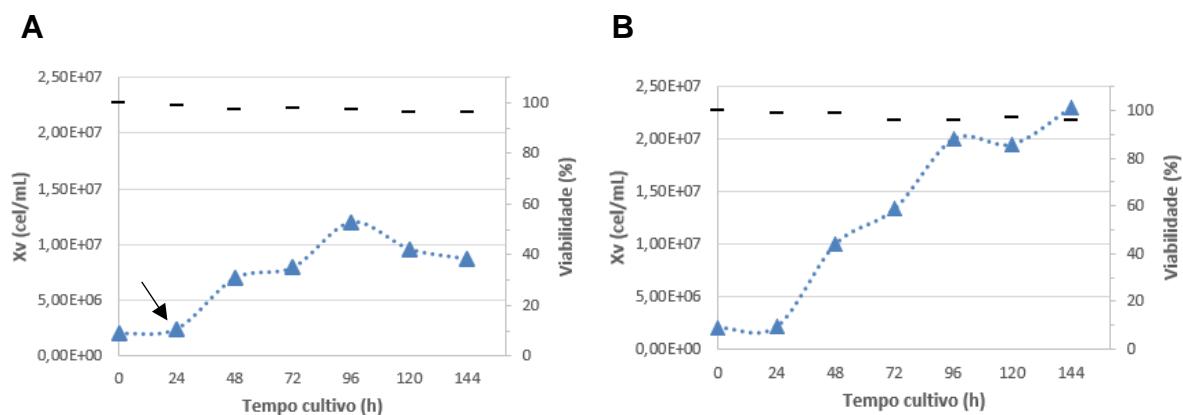
5.2. Cinética preliminar de crescimento celular e expressão de VLP

Para a determinação da melhor concentração celular inicial para os estudos, foram inoculados 1×10^6 células/mL, $1,5 \times 10^6$ células/mL ou 2×10^6 células/mL. Destes, apenas o último foi capaz de gerar cultivos com crescimento adequado, enquanto os outros dois não produziram crescimento celular. Determinada a concentração do inóculo, foi realizada uma cinética de crescimento de células S2CHIKV-Hy induzidas e não induzidas com CuSO₄ (Figuras 8, 9, 10) nos meios SF900III, IPL-41 e Schneider para comparação do meio mais eficiente para o crescimento dessas células transfectadas.

O crescimento celular da linhagem S2CHIKV-Hy apresentado nos três meios analisados foi semelhante ao crescimento de outras células S2 transfectadas e já caracterizadas no laboratório. Tipicamente a concentração celular pode atingir de 1 a 2×10^6 células/mL (Ventini et al., 2010).

Entre os tempos de 24 horas e 48 horas após inóculo, as células apresentaram crescimento discreto compatível com as características de fase lag (Galesi et al., 2008). Nas culturas induzidas, a fase exponencial de crescimento perdurou por um dia nos meios SF900III e IPL-41, enquanto que no cultivo com o meio de cultura Schneider esse comportamento foi observado durante 48 horas. A velocidade de crescimento celular obteve um menor valor no meio Schneider, com $0,0221\text{ h}^{-1}$, enquanto que nos meios SF900III e IPL-41 o crescimento se mostrou próximo entre os dois, sendo respectivamente, $0,0437\text{ h}^{-1}$ e $0,0406\text{ h}^{-1}$.

Figura 8. Cinética de crescimento em meio SF900III



Gráficos representativos da cinética de células S2CHIKV-Hy em meio de cultura SF900III, incubadas a 28 °C a 100 rpm. Concentração celular X_v (triângulos); Viabilidade celular (traços); Indução da expressão em 24 horas de cultivo pela adição de 1 mM de CuSO₄ (seta); (A) Células induzidas; (B) Células não induzidas.

Figura 9. Cinética de crescimento em meio IPL-41

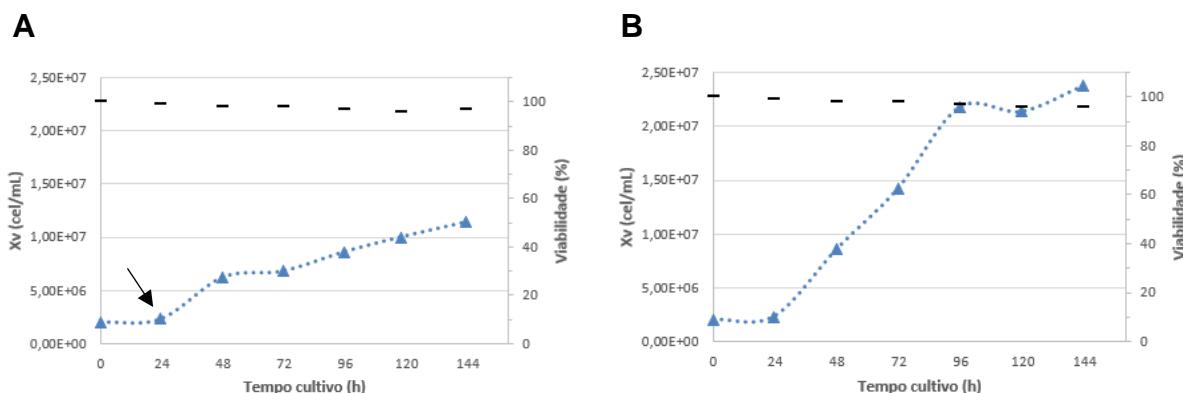


Gráfico representativo da cinética de crescimento de células S2CHIKV-Hy em meio de cultura IPL-41, incubadas a 28 °C a 100 rpm. Concentração celular Xv (triângulos); Viabilidade celular (traços); Indução da expressão em 24 horas de cultivo pela adição de 1 mM de CuSO₄ (seta); (A) Células induzidas; (B) Células não induzidas.

Figura 10. Cinética de crescimento em meio Schneider

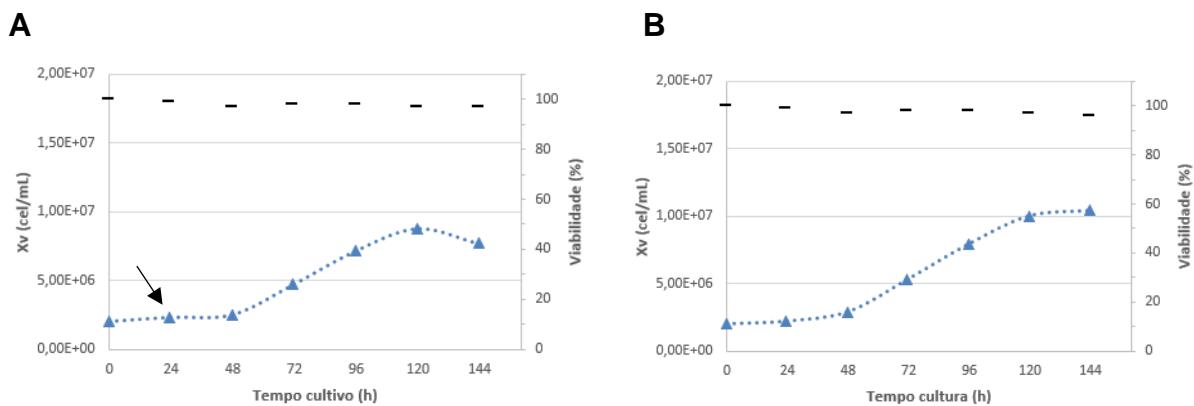
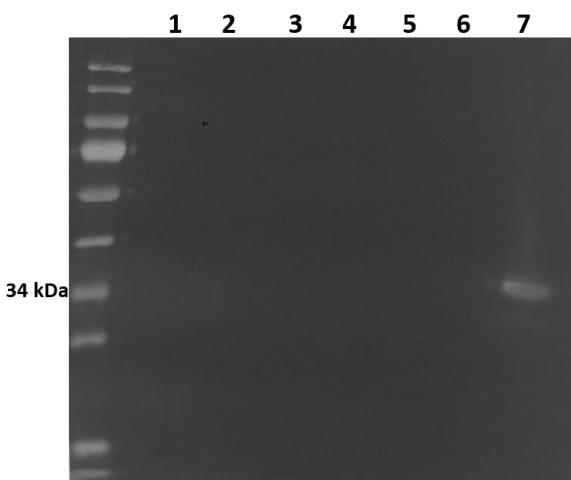


Gráfico representativo da cinética de crescimento de células S2CHIKV-Hy em meio de cultura, incubadas a 28 °C a 100 rpm. Concentração celular Xv (triângulos); Viabilidade celular (traços); Indução da expressão em 24 horas de cultivo pela adição de 1 mM de CuSO₄ (seta); (A) Células induzidas; (B) Células não induzidas.

Em todos os casos, a concentração celular foi maior nas culturas não induzidas e suas velocidades de crescimento médio também se mantiveram elevadas se comparadas aos ensaios com células induzidas.

Outro fator observado foi a expressão de VLP nas culturas celulares (Figura 11). Amostras de sobrenadante, coletadas no período 144 horas pós inóculo, foram submetidas ao processo de concentração por ultracentrifugação e posteriormente usadas em *Western Blotting*, o qual revelou a ausência de proteínas estruturais relacionadas a CHIKV.

Figura 11. Expressão de proteínas estruturais CHIKV no sobrenadante



Western Blotting para a avaliação da presença de proteínas estruturais de CHIKV no sobrenadante concentrado a partir do tempo de cultivo 144 horas. (1) SF900III não induzido; (2) SF900III induzido; (3) IPL-41 modificado não induzido; (4) IPL-41 modificado induzido; (5) Schneider 10% SFB não induzido; (6) Schneider 10% SFB induzido; (7) Controle positivo. A marcação foi realizada com anticorpo policlonal anti-CHIKV (ATCC).

5.3. Cinética de crescimento celular

Todas as culturas de células S2 recombinantes e selvagem foram induzidas em 24 horas de cultivo com 1 mM CuSO₄ para produção de VLP. Entre as quatro culturas celulares analisadas, a maior taxa máxima de crescimento foi observada em S2CHIKV-Hy SF900III (μ_{max} de 0.0275 h⁻¹) enquanto que nas culturas Wt SF900III e S2CHIKV-Hy Schneider apresentaram taxas, respectivamente, 0.0234 h⁻¹ e 0.0182 h⁻¹ (Figura 12). A cultura S2CHIKV-Hy IPL-41 não demonstrando uma fase exponencial nítida seu μ_{max} não foi considerado.

Mesmo após repiques consecutivos antes do início do ensaio, foi constatado uma curva de crescimento celular diferente do habitual no ensaio envolvendo S2CHIKV-Hy IPL-41, onde apresentou uma taxa de crescimento celular médio abaixo das demais culturas (μ_{medio} de 0.0098 h⁻¹).

Figura 12. Cinética de crescimento celular

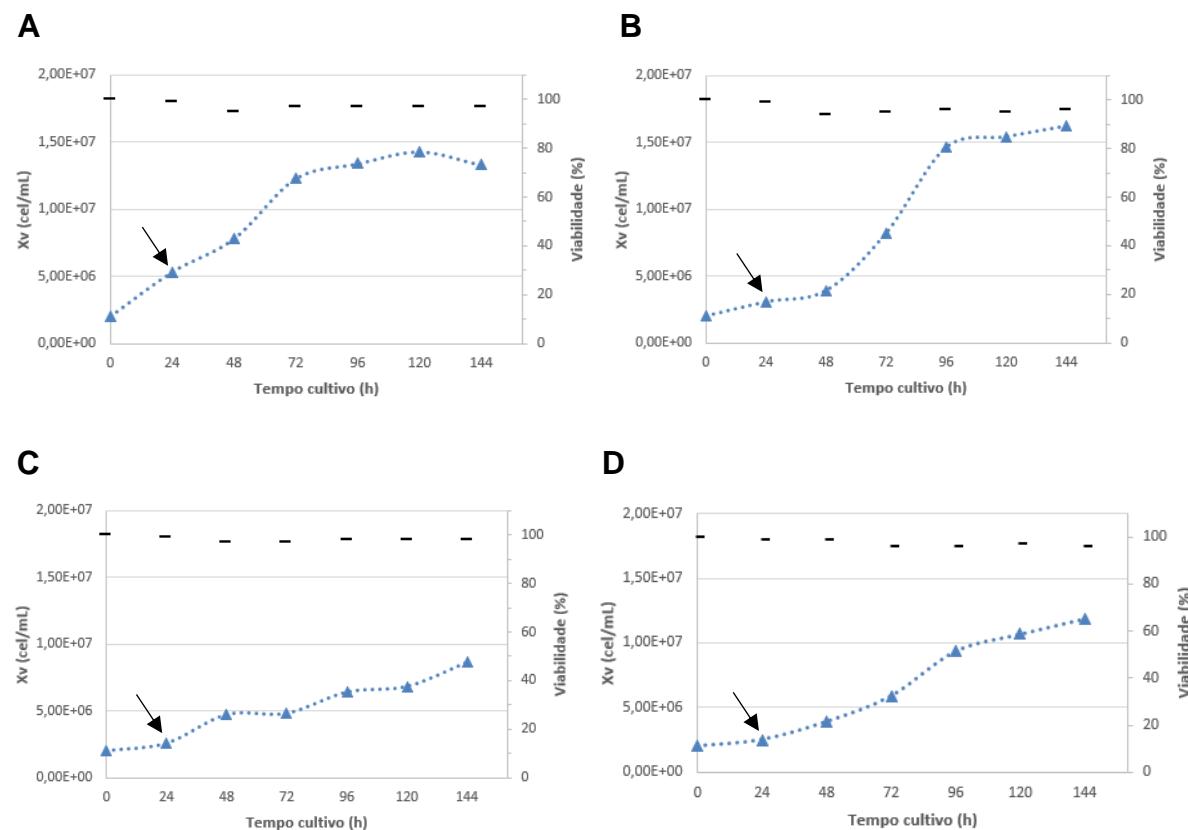


Gráfico representativo da cinética de células S2 Wt e S2CHIKV-Hy incubadas a 28 °C a 100 rpm. Concentração celular X_v (triângulos); Viabilidade celular (traços); Indução da expressão em 24 horas de cultivo pela adição de 1 mM de CuSO₄ (seta); (A) Wt em meio SF900III; (B) S2CHIKV-Hy em meio SF900III; (C) S2CHIKV-Hy em meio IPL-41; (D) S2CHIKV-Hy em meio Schneider.

5.4. Expressão de proteínas CHIKV e VLP

Para avaliar quantitativamente a porcentagem de células que expressam as proteínas estruturais de CHIKV foi realizado um ensaio por citometria de fluxo (FACS), assim foi possível identificar a necessidade de uma maior seleção das células S2CHIKV-Hy nas culturas (Tabela 5). O resultado do ensaio revelou uma taxa maior que 95% de células expressando proteínas de CHIKV, assim uma nova aplicação de higromicina para seleção populacional não foi necessária.

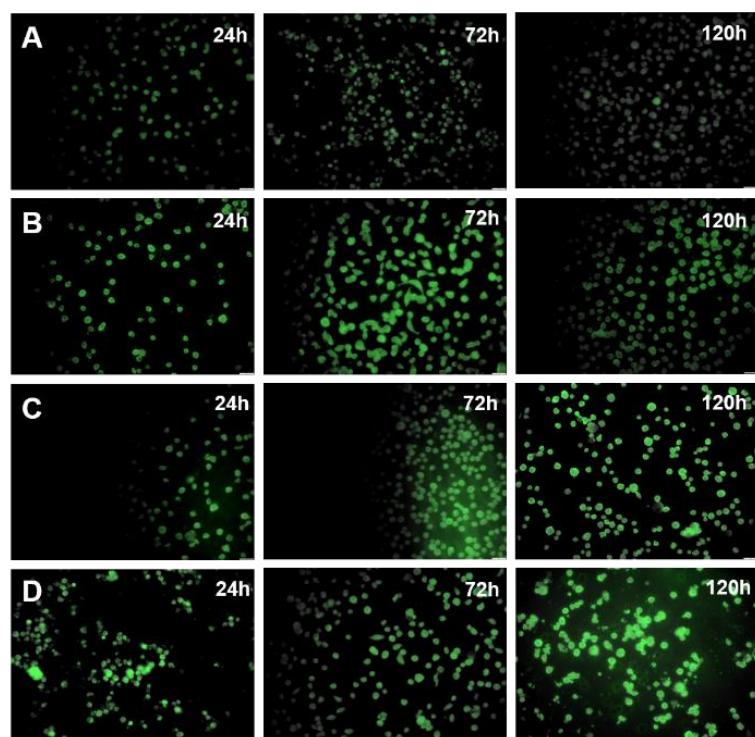
Tabela 5. Análise de expressão de proteínas de CHIKV em células S2CHIKV-Hy por citometria de fluxo

Meio	Tempo de Cultivo pós indução	Porcentagem de Células Fluorescentes	Mediana de Fluorescência (FITC)
SF900III	24h	99,2	10,8
SF900III	48h	99	35,5
SF900III	72h	99,4	39,6
SF900III	96h	99,1	25,5
SF900III	120h	98,9	16,8
IPL-41	24h	99,7	35,4
IPL-41	48h	99,5	19,7
IPL-41	72h	99	16,4
IPL-41	96h	99,3	11,2
IPL-41	120h	98,6	10,8
Schneider	24h	98,9	14,2
Schneider	48h	98,7	15,1
Schneider	72h	97,5	11,8
Schneider	96h	97,3	14,7
Schneider	120h	97,1	12,7

Com as amostras coletadas diariamente foi realizado ensaio de Imunofluorescência Indireta (IFI) com a finalidade de avaliar por imagem a intensidade da expressão de proteínas virais pelas células (Figura 13). Em todos os meios a fluorescência em 24 horas apresentou a mesma intensidade, sendo que ao final da cinética, em 120 horas, a diferença de intensidade entre os meios analisados se torna

mais evidente. Nesta última amostragem (A 120h, B 120h, C 120h e D 120h) uma fluorescência de pequena intensidade foi evidenciada nas células S2 wt (selvagens). No entanto essa fluorescência é nitidamente distinta da encontrada nas células recombinantes marcadas. Entre as células S2CHIKV-Hy, o meio SF900III se mostrou com a menor fluorescência, seguido pelo meio IPL-41, o qual apresentou melhor resultado. Entre todos os cultivos, as células S2CHIKV-Hy em meio Schneider apresentaram uma maior marcação se comparada a todos os outros meios e tempos de coleta.

Figura 13. Imunofluorescência para avaliação da expressão de proteína viral

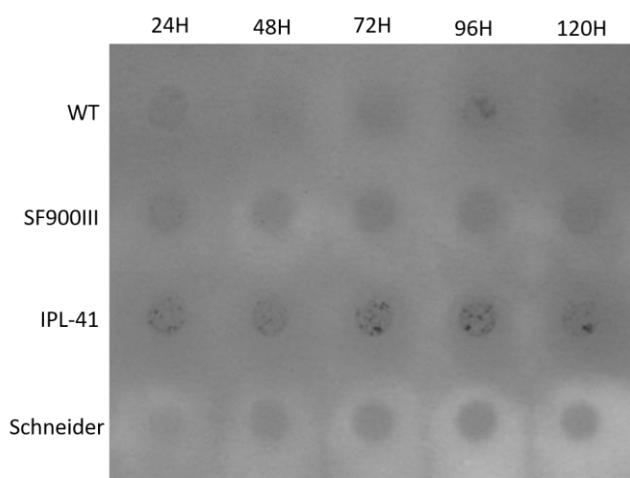


O teste de IFI foi realizado em diferentes tempos de cultivo com anticorpo policlonal anti-CHIK (ATCC) seguido de anticorpo anti-camundongo conjugado com FITC. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência (Olympus, BX21). Aumento 40X. (A) S2 WT em meio SF900III; (B) S2CHIKV-Hy em meio SF900III; (C) S2CHIKV-Hy em meio IPL-41; (D) S2CHIKV-Hy em meio Schneider.

Uma quantidade de células predefinida (1×10^6 células) foi amostrada a partir de cada cultura e os lisados celulares foram analisados por Dot Blotting. A intensidade

da marcação foi determinada com o auxílio do programa ImageJ, e os resultados comparados. À maior intensidade entre todas as amostras foi atribuído o valor de 100, que foi utilizado para a normalização das demais (Figuras 14 e 15). Sendo a amostra de Schneider 96h observada como de maior intensidade todas as outras são relativas a essa. As células S2CHIKV-Hy em meio SF900III apresentam um pico de incidência em 72 horas, com 45,78 da intensidade máxima, decrescendo gradativamente após esse ponto. O meio IPL-41 mostrou inicialmente uma intensidade maior que os outros meios atingindo um pico em 96 horas com 73,55 na escala determinada para o experimento, apresentando uma queda brusca em 120 horas. O meio Schneider apresentou as maiores intensidades a partir de 72 horas e mantendo, a partir desse ponto, ampla vantagem se comparado aos outros meios. Seu pico, assim como o meio IPL-41 ocorre em 96 horas, porém diferentemente das outras amostras a queda de intensidade ocorreu de forma menos acentuada.

Figura 14. Expressão de proteínas estruturais de CHIKV em lisado celular



Dot Blotting de lisado de células wt em meio SF900III e S2CHIKV-Hy em meio de cultura SF900III, IPL-41 e Schneider. Tempos de amostras a cada 24 horas após indução por 1mM de CuSO₄.

Figura 15. Gráfico da intensidade de sinal relativa no Dot Blotting

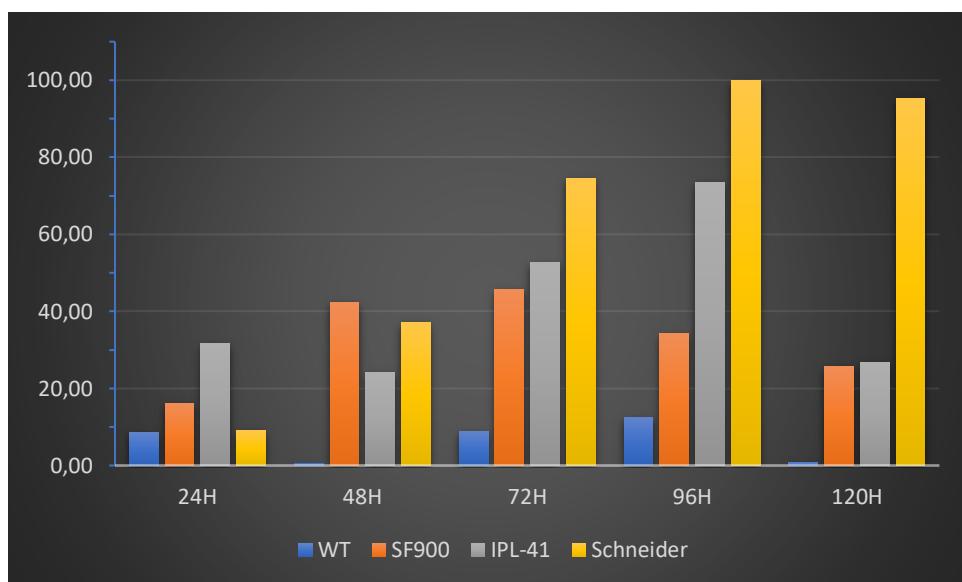


Gráfico com a intensidade de sinal relativa a amostra Schneider 96H no Dot Blotting. Uso do programa ImageJ. Tempos de cultivo pós indução por CuSO₄. (Azul) Células wt em meio SF900III; (Laranja) S2CHIKV-Hy em meio SF900III; (Cinza) S2CHIKV-Hy em meio IPL-41 modificado; (Amarelo) S2CHIKV-Hy em meio Schneider +10% SFB. Tempo de cultivo referente ao período pós indução.

Os dados quando analisados em conjunto com as cinéticas indicam que a expressão das proteínas recombinantes está ocorrendo em todos os meios de cultura enquanto as células estão em crescimento, ainda que lento. No momento em que as células deixam de crescer, a proteína começa a cair. Isso está mais claro nos resultados de dot blotting, mas pode ser visto também nos resultados de FACs. De fato, a pequena queda de intensidade na leitura do dot blotting para o meio Schneider em 120 h, pode não ser significativa, uma vez que o ensaio de fluorescência apresenta uma expressão constante, em consequência de um crescimento lento, mas igualmente constante durante toda a cinética.

6. DISCUSSÃO

As células de *Drosophila melanogaster* S2 aparecem como uma alternativa valiosa a linhagens celulares de mamífero ou outros sistemas de células de inseto infectadas por vírus. Esse sistema baseado na expressão recombinante a partir da transfecção de um plasmídeo, constitui uma ferramenta celular com grande potencial para a produção de proteínas de membrana em várias aplicações. Desses aplicações incluímos perfis farmacológicos, kits diagnósticos, análises estruturais e geração de vacinas. (Brillet et al., 2010).

O Laboratório de Imunologia Viral faz uso desse sistema de expressão baseado em células S2 há mais de uma década. Os primeiros trabalhos publicados do grupo envolvendo esse sistema foram para avaliar a expressão de glicoproteína do vírus da raiva e caracterizar o crescimento e metabolismo das células. (Yokomizo et al., 2007; Swiech et al., 2008). Devido aos resultados anteriores do grupo, esse sistema foi selecionado para a expressão de proteínas estruturais de arbovírus.

A abordagem de utilização de VLP como candidato vacinal, se deve ao fato de existir uma combinação da eficácia das vacinas inativadas com a segurança das vacinas de subunidades. As VLP possuem a mesma morfologia do vírus, devido à expressão das proteínas estruturais, porém sem a presença do ácido nucleico, sendo incapazes de causar a doença. Outro fator que caracteriza a vantagem de se utilizar VLP é o nível de segurança. As VLP podem ser produzidas em condições normais de laboratório, diferentemente das vacinas com vírus inativado que necessitam de laboratórios com níveis de segurança mais elevados.

O risco de contaminação em meios de cultura com soro animal dificulta a segurança e a padronização dos cultivos, tornando o soro um suplemento não desejável. Isso torna o uso de meios livres de soro e meios quimicamente definidos uma alternativa a esse tipo de suplementação para cultivo de células. Desta forma, a escolha dos meios SF900III e IPL-41 modificado foi pautada na necessidade de se encontrar alternativas livres de soro fetal (Puglia, 2018; Batista et al., 2011). Em contrapartida, o meio Schneider apesar de apresentar suplementação de SFB, foi escolhido por ser um meio específico para células S2.

Tendo em vista essas particularidades em relação aos meios de cultura, a adaptação das células a IPL-41 modificado foi realizada sem dificuldades, corroborando a adequação desse meio a células S2 recombinantes (Batista et al., 2011). Por outro lado, mesmo sendo um meio específico para células de inseto, a cultura em Schneider mostrou dificuldades de adaptação em meio contendo 5 % de SFB, visto que as células obtiveram menor crescimento e sofreram alterações em sua morfologia. O fornecimento insuficiente de lipídios pode ter ocasionado essa dificuldade (Rodrigues et al., 2012), que foi superada quando ao meio foram adicionados 10 % de SFB.

Como as células S2CHIKV-Hy utilizam o promotor indutível da metalotioneína, existe a necessidade da adição de um metal pesado à cultura celular, para que as células realizem a produção da proteína heteróloga. Nas culturas induzidas com 1 mM de CuSO₄, padrão já estabelecido pelo laboratório em células S2CHIKV-Hy (Puglia, 2018), as células atingiram uma concentração celular máxima ($X_{v\max}$) menor do que nas culturas não induzidas. Esse crescimento menor pode ser associado a toxicidade do indutor ou mesmo das proteínas de CHIKV, além disso um menor crescimento pode ser consequência de um metabolismo voltado não só para a síntese de proteínas e enzimas necessárias à multiplicação celular como também para a síntese das proteínas estruturais de CHIKV.

Os dados do *Western blotting* (Figura 11), revelam que não foi possível detectar as proteínas estruturais do CHIKV no sobrenadante na cultura celular sem a devida concentração do material. Era esperado um padrão de bandas semelhantes a estudos sobre expressão de CHIKV VLP (C, E3, E2, 6k, E1) por outros sistemas de expressão (Noronate et al., 2014). Para esse experimento, a coleta do sobrenadante se deu no tempo de cultivo 144 horas (120 horas após a indução (hpi) com CuSO₄). Esse período pode ser considerado tardio para a coleta de VLP, uma vez que as proteínas podem não ser tão estáveis quanto o desejado e sofrerem algum tipo de degradação. Também podemos considerar que a linhagem das células analisadas poderia não estar expressando corretamente as proteínas estruturais de CHIKV ou mesmo uma concentração baixa das VLP, inviabilizando a sua detecção no ensaio. Devido a esse resultado, foi considerado avaliar a expressão de proteínas virais e o comportamento das células a cada 24 horas pós indução.

Em uma segunda cinética (Figura 12) é notado que a concentração máxima de células corresponde a um número maior do que o encontrado no primeiro ensaio, para os meios SF900 e Schneider. Isso pode ser associado ao fato das células terem sido cultivadas por um período maior antes da inoculação nos frascos para a realização do experimento, e assim estarem mais adaptadas ao meio. O oposto ocorreu com células S2CHIKV-Hy no meio IPL-41 modificado (Figura 12C). Esta variação de comportamento pode ser associada à ação epigenética presente nas células S2 (Lyko et al., 2006) alterando assim a adaptação alcançada pela cultura original.

Para analisar a expressão das proteínas de CHIKV, foram realizados imunoensaios, como *Dot Blotting*, IFI e citometria de fluxo. Em todos esses experimentos, foi utilizado um anticorpo policlonal anti-CHIKV (ATCC), oriundo de camundongos. Experimentos de citometria de fluxo foram realizados com as células S2CHIKV-Hy cultivadas nos diferentes meios de cultura. O intuito deste ensaio foi verificar a porcentagem da população de células positivas para a expressão de proteínas virais. Os resultados mostraram populações com mais de 95% de células positivas para a expressão das proteínas de CHIKV. Isso levou à conclusão de que novas etapas de seleção ou adaptação não eram necessárias.

Para confirmar os dados de citometria de fluxo, foi utilizada a técnica de imunofluorescência indireta (IFI). O ensaio, tal qual a marcação realizada para a citometria, evidencia a presença de proteínas de CHIKV nas membranas de células S2CHIKV-Hy, porém, devido à permeabilização realizada com metanol, proteínas no ambiente intracelular também poderiam ser reconhecidas. Apesar dessa técnica não ser quantitativa, ela é válida para comparações entre diferentes condições variáveis de cultivo, uma vez que as amostragens e procedimentos de marcação sejam realizados de maneira padronizada. Como as diferenças de fluorescência não foram muito grandes, é possível verificar uma correspondência entre os resultados de FACs e IFI apenas nas células SF900 III. Esse resultado mostrou que embora a marcação por IFI seja capaz de mostrar a grande proporção de células expressando a proteína, a facilidade com que a medição da intensidade relativa de fluorescência (mediana) dada pela análise de FACs, torna essa técnica muito mais útil na definição de melhores condições de cultivo para a expressão recombinante.

Finalmente, a expressão das proteínas estruturais foi avaliada pela técnica de *dot blotting* (Figura 14). Todas as amostras foram inseridas partindo-se de uma mesma quantidade de células, portanto a quantidade relativa de proteínas de CHIKV é diretamente comparável. Dessa forma, pode-se afirmar que a amostra SF900III / 96 hpi apresenta apenas 35% da intensidade de marcação alcançada para a mesma quantidade de células cultivadas em meio Schneider, no mesmo tempo (considerado 100 % para fins de comparação). Isso pode ser consequência de duas situações: a menor expressão das proteínas de CHIKV em SF900III em consequência de um crescimento celular mais acelerado (Swiech, 2008; Rossi, 2012), ou o esgotamento de algum nutriente fundamental para a produção das proteínas.

No primeiro caso, sabe-se que células com elevadas taxas de crescimento podem apresentar um metabolismo mais voltado à síntese de proteínas necessárias à multiplicação celular. Como o objetivo é expressar uma proteína recombinante complexa, com modificações pós-traducionais essenciais, o tempo de maturação pode ser importante para a sua quantidade e qualidade finais. Por outro lado, uma evidência clara para a tese do esgotamento de nutriente, se dá quando as células continuam a crescer, porém diminuem a expressão da proteína. É o que sugerem os resultados encontrados para a expressão em IPL-41.

A análise de *Dot blotting* nesse caso foi fundamental para a diferenciação dos melhores tempos de produção das proteínas de CHIKV. Embora todos os cultivos apresentassem quantidades de células expressando as proteínas, acima de 95 % da população, em praticamente todos os tempos após a indução, ficou evidente que a quantidade de proteína expressa variou diferencialmente, segundo o meio de cultura utilizado. Assim, para SF900III, a maior quantidade de proteína expressa / célula se deu em 72 hpi, enquanto para IP-41 e Schneider, isso ocorreu em 96 hpi (Figura 15).

Em resumo, este trabalho avaliou a utilização de meios alternativos ao SF900III para a cultura de S2CHIKV-Hy. Os resultados demonstraram que o meio Schneider com suplementação de 10% de SFB apresentou a maior quantidade de proteína de CHIKV expressa por célula, indicando ao mesmo tempo que a suplementação lipídica pode ser importante para a expressão dessas proteínas e que a taxa de crescimento reduzida também pode favorecer a expressão. Estudos prévios de nosso grupo de trabalho demonstram que as proteínas estruturais de CHIKV expressas no sistema de

células S2 se associam em estruturas de VLP (Puglia, 2018), assim, espera-se que o aumento da expressão das proteínas virais nas células se correlacione com o aumento da quantidade de VLP no sobrenadante.

Contudo, para análises mais precisas do processo produtivo, é fundamental o desenvolvimento de um método analítico quantitativo. Para esse fim, foi parte das atividades deste trabalho o desenvolvimento de um teste de ELISA que ainda está em andamento. Quando finalizado, o teste de ELISA baseado em sensibilização com anticorpos policlonais de coelho anti-CHIKV, captura das VLP ou vírus padrão, e revelação com anticorpos policlonais de camundongo anti-CHIKV + anti-anticorpos-HRP, poderá correlacionar as quantidades de proteína de CHIKV produzidas pelas células S2 com amostras de vírus purificadas.

7. CONCLUSÃO

- As células S2CHIKV-Hy foram capazes de se adaptar aos meios IPL-41 modificado e Schneider + 10 % SFB e continuarem expressando proteínas de CHIKV.
- O meio Schneider, apesar de ser específico para células de inseto, apresentou maior dificuldade na adaptação.
- O crescimento celular foi melhor no meio SF900III.
- Em todos os meios de cultura utilizados as células apresentaram populações com mais de 95 % de células expressando as proteínas de CHIKV.
- A expressão específica relativa de proteínas estruturais de CHIKV se mostrou maior em partes distintas da cinética de crescimento celular, dependendo do meio utilizado.
- A maior expressão específica foi encontrada nas células cultivadas em meio Schneider + 10 % SFB, 96 h após a indução.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNABI R.; NEYTS, J.; DELANG L. "Towards antivirals against chikungunya virus". *Antiviral Reserch*, v. 121, p. 59-68. Sep 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26119058>>.

AKAHATA, W. et al. "A VLP Vaccine for Epidemic Chikungunya Virus Protects Non-Human Primates against Infection." *Nature medicine*. v. 16, n. 3, p. 334-8, Mar 2010. ISSN 1546-170X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2834826/>>.

ASTRAY, R. M. et al. "Kinect studies of recombinant rabies virus glycoprotein (RVGP) cDNA transcription and mRNA translation in *Drosophila melanogaster* S2 cell population". *Cytotechnology*, v. 65, n. 5, p. 829-38, Oct 2013. ISSN 0920-9096. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23340966>>.

BATISTA, F. R. et al. "Behavior of wild-type and transfected S2 cells cultured in two different media". *Appl Biochem Biotechnol*, n. 163, p. 1–13. 2011. ISSN 0273-2289. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21161610>>.

BRILLET, K.; PEREIRA, C. A.; WAGNER, R. "Expression of membrane proteins in *Drosophila melanogaster* S2 cells: production and analysis of a EGFP-fused G protein-coupled receptor as a model. *Methods Mol Biol*, v. 601, p. 119-33, 2010. ISSN 1940-6029. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20099143>>.

CHUNG, Y. T.; KELLER, E. B. "Regulatory elements mediating transcription from the *Drosophila melanogaster* actin 5C proximal promoter." *Mol Cell Biol*, v. 10, n. 1, p. 206-16, Jan 1990. ISSN 0036-4665. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2104658>>.

CUNHA, R. V. D.; TRINTA, K. S. "Chikungunya Virus: Clinical Aspects and Treatment - A Review." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 8, n. 112, p. 523–531. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28767976>>.

DEZURE, A. D. et al. "Whole-Inactivated and Virus-Like Particle Vaccine Strategies for Chikungunya Virus." *The Journal of Infectious Diseases*. v. 214. Suppl 5, p. S497–S499. (Dec 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27920180>>.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. "Chikungunya in Brazil: an emerging challenge." *Ver Bras Epidemiol*, v. 18, n. 1, p. 283-5, 2015 Jan-Mar 2015. ISSN 1980-5497. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25651028>>.

DOS SANTOS, A. S. et al. "Rabies vírus glycoprotein expression. In *Drosophila S2* cells: influence of reselection on protein expression." *Biotechnol J*, v. 4, n. 11, p. 1578-81, Nov 2009. ISSN 1860-7314. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19824020>>.

DYRING C. "Optimising the *Drosophila S2* Expression System for Production of Therapeutic Vaccines". *BioProcess J*, v. 10, n. 2, p. 28-35. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.12665/J102.Dyring>>.

EDELMAN, R. et al. "Phase II safety and immunogenicity study of live chikungunya virus vaccine TSI-GSD-218. *Am J Trop Med Hyg*, v. 62, n.6, p. 681-5, Jun 2000. ISSN 0002-9637. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11304054>>.

ERASMUS, J. H. et al. "A Chikungunya Fever Vaccine Utilizing an Insect-Specific Virus Platform." *Nature medicine*, v. 23, n. 2, p. 192–199. Oct 2017. ISSN 1526-170X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27991917>>

FERNANDES, F. et al. "Insect cells as a production platform of complex virus-like particle". *Nat Med*, v. 12, n. 2, p. 225-36, Feb 2013. ISSN 1744-8395. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23414412>>.

FIGUEIREDO, L. T. "Emergent arboviruses in Brazil". *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v. 40, n. 2, p. 224-229, Apr. 2007. ISSN 0037-8682. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17568894>>.

FIGUEIREDO, M. L.; FIGUEIREDO, L. T. "Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro". Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba, v. 47, n. 6, p. 677-683, Dec. 2014. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25626645> >.

FUENMAYOR, J.; GÒDIA, F.; CERVERA, L. "Production of virus-like particles for vaccines." N Biotechnol, v. 39, n. Pt B, p. 174-180, Oct 2017. ISSN 1876-4347. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28778817> >.

GOO, L. et al. "A Virus-Like Particle Vaccine Elicits Broad Neutralizing Antibody Responses in Humans to All Chikungunya Virus Genotypes." The Journal of Infectious Diseases. Sep 2016. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27655868> >.

GRIVARD, P. et al. "Molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection". Pathol Biol, v. 55, n. 10, p. 490-494. Dec 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17920211> >.

HANDLER, M. Z. et al. "Chikungunya fever: an emerging viral infection threatening North America and Europe". Int J Dermatol. Sep 2016. ISSN 1365-4632. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27667734> >.

IWAKI, T.; CASTELLINO. F. J. "A Single Plasmid Transfection That Offers a Significant Advantage Associated with Puromycin Selection in Drosophila Schneider S2 Cells Expressing Heterologous Proteins." Cytotechnology v. 57 n.1 p. 45–49. May 2008. ISSN 0902-9069. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19003171> >.

IWAKI, T. et al "Rapid selection of Drosophila S2 cells with the puromycin resistance gene". Biotechniques, v.35, n.3, p. 482-484, Sep 2003. ISSN 0736-6205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14513552> >.

JOHN, W. A.; SALGUEIRO, S. "The use of Drosophila S2 in R&D and bioprocessing". Pharmaceutical Bioprocessing. I: 197-213 p. 2013.

JORGE, S. A. et al. "Expression of the hepatitis B virus surface antigen in Drosophila S2 cells". Cytotechnology, v. 57, p. 51–59. Jun 2008. ISSN 09209069. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19003172>>

JOSE, J.; SNYDER J. E.; KUHN R. J. "A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly". Future Microbiology. v. 4, p. 4:837-856. Set 2009. ISSN 1746-0921 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19722838>>.

KENNEDY, A. C. et al. "Chikungunya viral arthropathy: a clinical description". J Rheumatol, v. 7, n. 2, p. 231-236. Mar 1980. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7373626>>.

KRUTIKOV, M.; MANSON, J. "Chikungunya Virus Infection: An Update on Joint Manifestations and Management". Rambam Maimonides Medical Journal. v. 7 n. 4, Oct 2016. ISSN 2076-9172. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27824550>>.

LEPARC-GOFFART, I. et al. "Chikungunya in the Americas". Lancet, v. 383, n. 9916, p. 514, Feb 2014. ISSN 1474-547X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24506907>>.

LUA, L. H. et al. "Bioengineering virus-like particle as vaccines". Biotechnol Bioeng v. 111, n. 3, p. 425-40, Mar 2014. ISSN 1097-0290. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24347238>>.

LYKO, F. et al. "Epigenetic regulation in Drosophila". Curr Top Microbiol Immunol, v. 3, n. 10, p. 23-44. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16909905>>.

MÄKELÄ, P. H. "Vaccines, coming of age after 200 years". FEMS Microbiol Rev, n. 24, p. 9-20. Jan 2000. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10640596> >

MCCARROLL, L.; KING, L. A. "Stable insect cell cultures for recombinant protein production". Curr Opin Biotechnol, v. 8, n. 5, p. 590-594, Oct 1997. ISSN 0958-1669. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9353223> >.

METZ, S. W. et al. "Chikungunya virus-like particles are more immunogenic in a lethal AG129 mouse model compared to glycoprotein E1 or E2 subunits". Vaccine, v. 31, n. 51, p. 6092-6, Dec 2013. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27233282> >.

METZ, S. W.; PIJLMAN, G. P. "Production of Chikungunya Virus-Like Particles and Subunits Vaccines in Insect Cells." Methods Mol Biol, v. 1426, p. 297-309, 2016. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7533909> >.

MOHSEN, M. O. et al. "Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines". Semin Immunol. v. 34, p. 123-132, Dec 2017. ISSN 1096-3618. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28887001> >.

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. 613-28, May 2012. ISSN 1873-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22079894> >.

MORRISON, T. E. "Reemergence of chikungunya virus". J Virol. v. 88, n. 20, p. 11644-7, Oct 2014. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25078691> >.

MOTA, M. et al. "Mosquito-transmitted viruses - the great Brazilian challenge. Braz. J. Microbiol, vol. 47, suppl.1, p.38-50. Oct 2016. ISSN 1517-8382. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27818091> >.

NORANATE, N. et al. "Characterization of chikungunya virus-like particles". PLoS One. v. 9, n. 9, p.108169, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25265335> >.

PETERSEN, L. R.; POWERS, A. M. "Chikungunya: epidemiology". F1000Res. v. 5, 2016. ISSN 2046-1402. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26918158> >.

PIJLMAN, G. P. "Enveloped virus-like particles as vaccines against pathogenic arboviruses". Biotechnol J, v. 10, n. 5, p. 659-70, May 2015. ISSN 1860-7314. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25692281> >.

POWERS, A. M.; LOGUE, C. H. "Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbivirus. J Gen Virol, v. 88, n. Pt 9, p. 2363-77, Sep 2007. ISSN 0022-1317. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17698645> >.

RODRIGUES, A. F. et al. "Adaptation of retrovirus producer cells to serum deprivation: Implications in lipid biosynthesis and vector production". Biotechnol Bioeng, v. 109, n. 5, p. 1269-79, May 2012. ISSN 1097-0290. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22179842> >

ROODENHOFF, R.; ANFASA, F.; MARTINA, B. "The pathogenesis of chronic chikungunya: envolving concepts

ROSS, R. W. "The virus: isolatin, pathogenic properties and relationship to the epidemic". The Newala epidemic, v. 54, n. 2, p. 177-91, Jun 1956. ISSN 0022-1724. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13346078> >.

ROSSI, N. et al. "Effect of hypothermic temperatures on production of rabies virus glycoprotein by recombinant Drosophila melanogaster S2 cells cultured in suspension". J Biotechnol, v. 157, n. 1, Jan 2012. ISSN 0168-1656. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22820340> >.

RUNOWSKA, M. et al. "Chikungunya virus: a rheumatologist's perspective". Clin. Exp. Rheumatol. Mar 2018. n. 36, p. 494–501. ISSN 0392-856X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29533749> >.

SAM, I. C. et al. "Updates on chikungunya epidemiology, clinical disease, and diagnostics. Vector Borne Zoonotic Dis. v. 15, n. 4, p. 223-30, Apr 2015. ISSN 1557-7759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25897809> >.

SANTOS, N. G. et al. "Impacto f recombinant Drosophila S2 cell population enrichment on expression of rabies virus glycoprotein. Cytotechnology, May 2016. ISSN 0920-9069. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27216014> >.

SERGON. K. et al. "Seroprevalence of chikungunya virus infection on grande comore island, union of the comoros, 2005". Am. J. Trop. Med. Hyg, v. 6, n. 76, p. 1189-1193. Jun 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17556634> >.

SWIECH, K. et al. "Enhanced production of recombinant rabies virus glycoprotein (rRVGP) by Drosophila melanogaster S2 cells through control of culture conditions". Cytotechnology, v. 57, p. 67-72, Feb 2008. Desponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19003174> >.

THARMARAJAH, K.; MAHALINGAM, S.; ZAID, A. "Chikungunya: vaccines and therapeutics". F1000Res, v. 6, p. 2114, 2017. ISSN 2046-1402. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29259782> >.

THIBERVILLE, S. D. et al. "Chikungunya fever: a clinical and virological investigation of outpatients on Reunion Island, South-West Indian Ocean". PLoS Negl Trop Dis, v. 7, n. 1, p. e2004, 2013. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23350006> >.

VAN DER VALK, J. et al. "Optimization of chemically defined cell culture media – replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods". Toxical In Vitro, v. 24,

n.4, p.1053-63, Jun 2010. ISSN 1879-3177. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13346078> >.

VASCONCELOS, P. C.; CALISHER, C. H. "Emergence of Human Arboviral Diseases in the Americas", 2000-2016. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, v. 16, n. 5, p. 295-301, May 2016. ISSN 1530-3667. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26991057> >.

WEAVER, S. C. et al. "Chikungunya virus and prospects for a vaccine". Expert Rev Vaccines, v. 11, n. 9, p. 1087-101, Sep 2012, ISSN 1744-8395. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23151166> >.

WEAVER, S. C.; REISEN W. K. "Present and Future Arboviral Threats". Antiviral Research. v. 85, n. 2, p. 328-45. Feb 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19857523> >.

YANG, L. et al. "HIV-1 virus like particles produced by stably transfected Drosophila S2 cells: a desirable vaccine component". J Virol, v. 86, n. 14, p. 7662-76, Jul 2012. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22553333> >.

YOKOMIZO, A. Y. et al. "Rabies vírus glycoprotein expression. In Drosophila S2 cells. I. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line". Biotechnol J, v. 2, n. 1, p. 102-9, Jan 2007. ISSN 1860-7314. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17225257> >.

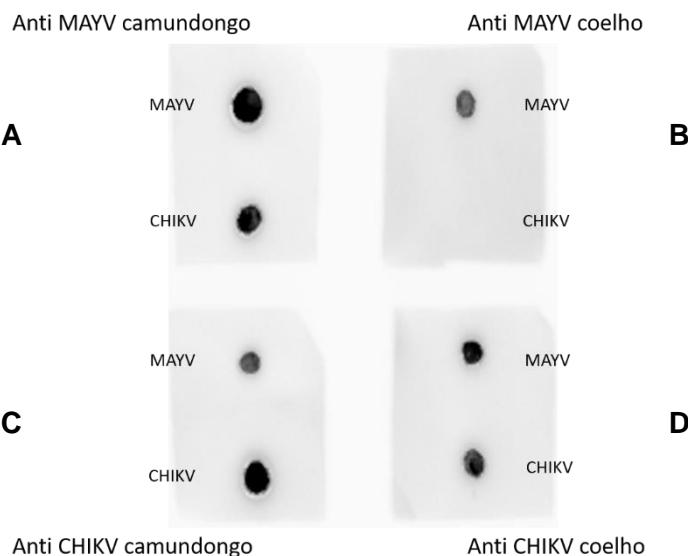
ZELTINS, A. "Construction and characterization of virus-like particles: a review. Mol Biotechnol, v. 53, n. 1, p. 92-107, Oct 2012. ISSN 1873-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23001867> >.

APÊNDICE

Apêndice A

Devido a possíveis fatores limitantes que pudessem surgir ao longo do projeto, foi necessária uma verificação da presença de ligação cruzada entre anticorpos para CHIKV e MAYV, uma vez que estudos apontam esse ocorrido (Figueiredo e Figueiredo, 2014). Isso garantiria a continuidade dos trabalhos de padronização caso ocorresse algum problema com um dos anticorpos.

Figura 16. Dot blotting para verificar ligação cruzada



Dot blot para verificar ligação cruzada entre anticorpos de coelho e camundongo anti-MAYV e anti-CHIKV. Foram aplicados 10 µL de MAYV e CHIKV inativados em cada teste. (A) Anticorpo primário anti MAYV camundongo. (B) Anticorpo primário anti MAYV coelho. (C) Anticorpo primário anti CHIKV camundongo. (D) Anticorpo primário anti CHIKV coelho.

Apêndice B

Devido a necessidade do grupo de pesquisa em analisar quantitativamente a expressão de proteínas virais e análise de produtividade de VLP, tanto de proteínas de CHIKV quanto de MAYV, foi iniciada a padronização de um teste de ELISA.

Materiais e Métodos

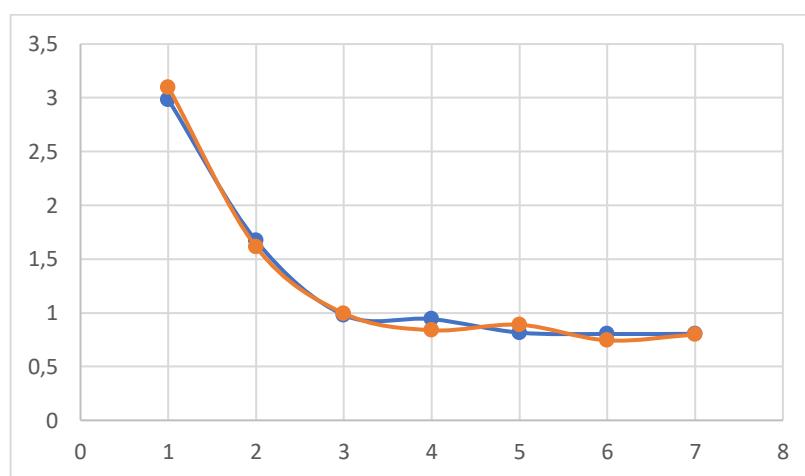
As placas foram sensibilizadas com anticorpo policlonal de coelho anti-CHIKV (tabela 6) diluído em tampão carbonato pH 9,6, incubadas a 37 °C por 1 hora e, em seguida, incubadas overnight a 4 °C. As placas foram bloqueadas com tampão carbonato contendo BSA a 3 %. Em seguida foi feita a lavagem com PBS contendo 0,05 % Tween 20 e adicionada a amostra contendo vírus Mayaro inativado ou VLP em diversas diluições seriadas em tampão PBS contendo Tween 20 (0,05 %) e BSA (0,5 %), sendo a placa incubada novamente a 37°C por 1 hora. Após a incubação das amostras foram adicionados o anticorpo secundário policlonal de camundongo anti-MAYV e o anticorpo terciário de cabra anti-camundongo, conjugado com peroxidase, cada um diluído em PBS-Tween-BSA, com incubação de uma hora e separados por 4 lavagens. Na etapa final, a placa foi lavada 5 vezes antes da adição de substrato cromógeno OPD (Sigma) com concentração de 2 mg/mL em tampão citrato pH 5,4 contendo peróxido de hidrogênio (Merck). Ao término de 15 minutos ao abrigo de luz foi adicionado o tampão stop (H₂SO₄, 4 N). A análise das amostras foi realizada no aparelho Multiskan (ThermoFisher) com o uso do aplicativo Ascent®. A peroxidase presente nos anticorpos terciários ligados após a série de procedimentos, converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, que por sua vez oxida o substrato cromógeno, fazendo com que mude de cor. A leitura da transmitância da amostra a 492 nm é convertida em valores de absorbância, ou que são proporcionais à quantidade da amostra capturada na placa.

Tabela 6. Características dos anticorpos utilizados na ELISA

Anticorpo	Descrição	Diluição
Anticorpo Policlonal Anti-CHIKV	(ATCC®) <i>Hyperimmune ascitic fluid (rabbit)</i> Reference reagent – produzido em coelho.	1:500
Anticorpo Policlonal Anti-MAYV	(ATCC®) <i>Hyperimmune ascitic fluid (mouse)</i> Reference reagent – produzido em camundongo.	1:2000
Anticorpo IgG-HRP	Goat anti-mouse HRP KPL®	1:2000

Resultado e Discussão

Figura 17. Gráfico de absorbância das diluições



Padronização incompleta de teste ELISA. Sensibilização de placa com anticorpo anti CHIKV coelho (1:500); anticorpo secundário mouse anti CHIKV (1:2000); anticorpo terciário anti mouse HRP (1:2000); (1) Diluição 1:10; (2) Diluição 1:100; (3) Diluição 1:1000; (4) Diluição 1:2000; (5) Diluição 1:4000; (6) Diluição 1:8000; (7) Branco. OPD em 2 mg/mL.

É possível notar que em diluições menores o gráfico tende a uma reta com tendência a zero, o que é esperado do teste ELISA, contudo quando aumentamos a diluição todos os pontos apresentam o mesmo valor de absorbância que o controle negativo. Possivelmente pode estar ocorrendo ligações inespecíficas dos anticorpos ou a concentração de OPD pode estar elevada a ponto de omitir o sinal do anticorpo ligado a proteína viral. Para a continuidade do trabalho, novos ensaios com essas variantes são necessários.