

ANA LIA PRADELLA PUGLIA

Obtenção e utilização do vetor viral SFV expressando GFP

Dissertação aprestada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

SÃO PAULO
2014

ANA LIA PRADELLA PUGLIA

Obtenção e utilização do vetor viral SFV expressando GFP

Dissertação aprestada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Renato Mancini Astray

Versão Corrigida. A Versão Original Eletrônica encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB quanto na biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

SÃO PAULO
2014

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

© reprodução total

Puglia, Ana Lia Pradella.

Obtenção e utilização do vetor viral SFV expressando GFP / Ana Lia Pradella Puglia. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Astray, Renato Mancini.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Vetores virais para aplicação em biotecnologia e vacinação.

Versão do título para o inglês: Production and utilization of na SFVvector expressing GFP.

1. Arbovirus 2. Vetores-Virologia 3. Proteínas recombinantes 4. PCR quantitativa 5. Virus Semliki Forest I. Astray, Prof. Dr. Renato Mancini II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB029/2014

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

Candidato(a): Ana Lia Pradella Puglia.

Título da Dissertação: Obtenção e utilização do vetor viral SFV expressando GFP.

Orientador(a): Prof. Dr. Astray, Renato Mancini.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

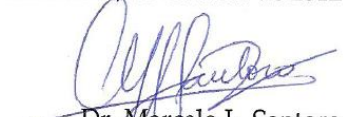
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da resposta imunológica de camundongos à glicoproteína do vírus rábico (RVGP) sintetizada in vivo pela imunização com Semliki Forest Virus (SFV) recombinante", protocolo nº 731/10, sob a responsabilidade de Renato Mancini Astray, Carlos Augusto Pereira e Ana Lia Pradella Puglia - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 11/4/12.

We certify that the research entitled "Evaluation of immune response in mice immunized with Semlik Forest Virus (SFV) carrying the genetic information for in vivo synthesis of rabies virus glycoprotein (RVGP)", protocol number 731/10, under the responsibility of Renato Mancini Astray, Carlos Augusto Pereira and Ana Lia Pradella Puglia - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research - is in agreement with Brazilian laws for use of experimental animals and the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 4/11/12.

Vigência do Projeto: 07/2010 - 07/2012 Laboratório de Imunologia Viral	Nº de animais/espécie 100 camundongos (M,F)
--	---

São Paulo, 18 de abril de 2012


Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

*Dedico esse trabalho à minha família,
Maria Bernadete e Jose Luiz e Ana Luiza*

AGRADECIMENTOS

À Deus, de forma muito especial, pela vida, por conduzir meus passos, me sustentar nas horas difíceis e por me renovar diariamente.

Agradeço ao Dr. Renato Mancini Astray, pela oportunidade que me foi concedida, e que nos anos de convivência, muito me ensinou e sua orientação foi decisiva para que este trabalho contribuísse para meu crescimento profissional.

Ao Dr. Carlos Augusto Pereira por todo conhecimento que ele me transmitiu durante esses anos no LIV.

Agradeço aos meus familiares pela força, incentivo e paciência fundamentais para que eu concluísse mais uma etapa de minha vida. Sei que minha vitória é também fruto de seus esforços.

Agradeço aos meus amigos de infância que são meu porto seguro, e sempre me acolheram e me fazem acreditar que a vida vale a pena.

Agradeço em especial aos atuais e antigos LIV's, Sandra, Thaissa, Dani, Nayara, Juliana, Polyana, Roses, Ana Elena, Mayra, Marcos, Alexandre, Luciana e Gustavo que durante esses anos de convivência foram minha família. Pelos ensinamentos de cada um deles para realização de meus experimentos e ainda pelos momentos de riso e choro.

Agradeço aos funcionários do Instituto Butantan, Jorge, Leme e Ivan, que sem o conhecimento e disponibilidade deles seria impossível a análise de meus dados. E as minhas amigas Vera e Fernanda por todos os momentos de ensaios, conversar e diversão.

A FAPESP e Cnpq pelo financiamento e incentivo a pesquisa.

Muito obrigada!

“Se podemos sonhar, também podemos
tornar nossos sonhos realidade.”

Walt Disney

RESUMO

PUGLIA, A. L .P. **Obtenção e utilização do vetor viral SFV expressando GFP**. 2014. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O Semliki Forest Vírus recombinante (rSFV) vem sendo apontado como um dos vetores virais mais promissores, tanto para a expressão de proteínas de interesse biotecnológico, como para a utilização como vetor vacinal. Neste trabalho obtivemos um rSFV carregando o gene da proteína verde fluorescente GFP (rSFV-GFP), que foi utilizado para a padronização de métodos de obtenção do vetor viral e de sua titulação, duas etapas importantes para os trabalhos que utilizam rSFVs. Por meio da análise da expressão da GFP em células BHK-21 infectadas por lotes de vírus obtidos por um reagente de transfecção lipídico ou por eletroporação, estabelecemos as melhores condições de obtenção dos rSFV e de sua utilização para a infecção e produção de proteínas recombinantes de interesse. Além disso, padronizamos criteriosamente uma metodologia de RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) absoluta, baseada em uma curva padrão, para realizar a titulação de partículas rSFV, independentemente do gene heterólogo clonado. A análise direta da quantidade de células infectadas, por citometria de fluxo e por microscopia de fluorescência, fez do rSFV-GFP a ferramenta adequada para nossos estudos de titulação viral por qRT-PCR. Foi demonstrada a associação entre o número de cópias do RNA viral utilizado para a infecção das células e a quantidade de células expressando GFP. Essa abordagem levou ao desenvolvimento de competências técnica e tecnológica (construção, avaliação e titulação) que facilitarão a obtenção de outros rSFV de interesse. Concluímos que a eletroporação é o melhor método de obtenção das partículas e que o título viral, determinado por qRT-PCR, pode ser utilizado para calcular o volume de um lote de rSFV necessário para obter a multiplicidade de infecção desejada.

Palavras-chave: Semliki Forest vírus. qRT-PCR. GFP.

ABSTRACT

PUGLIA, A. L. P. **Production and utilization of an SFV vector expressing GFP.** 2014.74 p. Masters thesis (Biotechnology)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The recombinant Semliki Forest Virus (rSFV) has been considered as one of the most promising viral vectors, both for the expression of proteins of biotechnological interest or as a vector for immunizations. In this study, an rSFV carrying the gene of the green fluorescent protein (GFP) was obtained (rSFV-GFP) and used for the standardization of rSFV production and of a novel titration methodology. Through the analysis of the amounts of GFP expressed in BHK-21 cells infected with virus stocks obtained by transfection with a lipid reagent or electroporation, we established the best conditions for rSFV production based on the production of this recombinant protein. In addition, a standardized method of absolute quantitative RT-PCR (qRT-PCR), based in a standard curve and applicable to virtually all rSFV particles, regardless of the heterologous gene cloned, was validated. The direct analysis of the quantity of infected cells, by flow cytometry and fluorescence microscopy, confirmed that the rSFV-GFP was an appropriated tool to support ours studies of viral titration by qRT-PCR. It was demonstrated the association between the amount of copies of viral RNA used for culture infection and the amount of GFP expression. This approach led to the development of technical and technological competence (construction, evaluation and titration) in the laboratory, that shall help the establishment of other rSFV of interest. We concluded that electroporation is the best methodology to obtain rSFV particles and the viral titre, as determined by qRT-PCR, can be used to calculate the volume of an rSFV stock necessary to obtain the desired multiplicity of infection.

Keywords: Semliki Forest virus. qRT-PCR. GFP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do sistema SFV de expressão recombinante.....	25
Figura 2- Esquema de obtenção e utilização do rSFV-GFP.....	31
Figura 3- Esquemas representativos do plasmídeos pSFV-GFP e pSFV-Helper.....	34
Figura 4- Sequência dos oligonucleotídeos e suas características.....	40
Figura 5- Análise da expressão de GFP por microscopia de fluorescência.	45
Figura 6- Avaliação dos lotes de rSFV obtidos por kit de transfecção	46
Figura 7- Células BHK-21 infectadas com 100 µL de rSFV-GFP lote 8, após 24 horas.....	47
Figura 8- Cinética de expressão de GFP em células BHK-21	48
Figura 9- Confirmação da digestão enzimática do rSFV	48
Figura 10- Curvas padrão obtidas por qPCR nos testes dos primers	49
Figura 11- Avaliação das etapas de extração de RNA e obtenção de cDNA.....	51
Figura 12- Análise de expressão de GFP em células BHK-21 após 24 horas.....	52
Figura 13- Análise de expressão de GFP de diferentes MOI por citometria de fluxo	53
Figura 14- Correlação entre MOI utilizado para infecção e % de células GFP+	54
Figura 15- Microscopia de fluorescência da expressão de GFP em células L929	55
Figura 16- Microscopia de fluorescência da expressão de GFP em células Huh-7	56
Figura 17- Microscopia de fluorescência da expressão de GFP em células VERO.....	56
Figura 18- Microscopia de fluorescência da expressão de GFP em células Hek293T.....	56
Figura 19- Porcentagem de células GFP+ em diferentes linhagens celulares	57
Figura 20- Avaliação de expressão de GFP em células IC-21	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Biofármacos obtidos através do cultivo de células animais	21
Tabela 2- Aplicações do sistema SFV	29
Tabela 3 - Produção de rSFV-GFP por transfecção com reagente lipídico	44
Tabela 4- Títulos virais determinados por qRT-PCR.....	52
Tabela 5 - Avaliação da infecção de células BHK-21 com diferentes MOI.	55

LISTA DE ABREVIATURAS

BHK-21	<i>Baby Hamster Kidneycells</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary cells</i>
DH5 α	Cepa da bactéria <i>Escherichia coli</i>
DMSO	Dimetilsulfoxido
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HEK 293	<i>Human Embryonic Kidney 293 cells</i>
HuH	<i>Células de Hepatocarcinoma</i>
Mabs	Anticorpo Monoclonal
Meio LB	Meio de cultura de bactérias Luria Bertani
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
PBS	Tampão salina
qRT-PCR	<i>PCR quantitativa em tempo real</i>
RVGP	Glicoproteína do vírus da raiva (<i>Rabies Virus Glycoprotein</i>)
SFB	Soro Fetal Bovino
SFV	<i>Semliki Forest Virus</i>
VERO	<i>African green monkey kidney cells</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.2 Objetivo	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Proteínas Recombinantes	19
2.2 Expressão de proteínas heterólogas em células	20
2.2.1 <i>Expressão gênica estável</i>	21
2.2.2 <i>Expressão gênica transiente</i>	22
2.3 Vetores de expressão	22
2.3.1 <i>Vetores não virais</i>	22
2.3.2 <i>Vetores Virais</i>	23
2.4 Organização genômica do Semliki Forest Virus (SFV)	24
2.5 Uso do Semliki Forest Virus como vetor de expressão	24
2.6 Aplicações do sistema SFV	26
2.6.1 <i>Produção de proteínas</i>	26
2.6.2 <i>Vacinação e tratamento</i>	27
2.7 rSFV-GFP	29
2.8 Metodos de Transfecção	32
2.8.1 <i>Eletroporação</i>	32
2.8.2 <i>Lipossomos</i>	32
2.9 Utilização da qRT-PCR para titulação viral	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Obtenção dos plasmídeos	34
3.2 Transformação bacteriana por choque térmico	34
3.3 Preparação dos plasmídeos	35
3.4 Transcrição in vitro	35
3.5 Linhagens celulares	35
3.5.1 <i>Células BHK-21</i>	35
3.5.2 <i>Green Monkey Kidney (VERO)</i>	36
3.5.3 <i>Linhagem L929 (ATCC – CCL-1)</i>	36
3.5.4 <i>Células SF-21</i>	36
3.5.5 <i>IC-21</i>	36
3.5.6 <i>Células HuH 7</i>	37
3.5.7 <i>Células HEK 293</i>	37

3.5.8 <i>Manutenção e congelamento</i>	37
3.6 Obtenção do rSFV-GFP	38
3.6.1 <i>Transfecção com reagente lipídico</i>	38
3.6.2 <i>Transfecção por eletroporação</i>	38
3.7 Ativação e infecção com rSFV-GFP	39
3.8 Análise da expressão de GFP	39
3.8.1 <i>Microscopia de fluorescência</i>	39
3.8.2 <i>Citometria de fluxo</i>	39
3.9 Padronização da qRT-PCR para a titulação de SFV	40
3.9.1 <i>Construção da curva padrão</i>	40
3.9.2 <i>qPCR</i>	41
3.10 Extração do RNA de amostras de SFV	41
3.11 Tratamento com DNase e síntese do cDNA	41
3.12 Titulação de lotes de rSFV-GFP	42
3.13 Avaliação de infecção in vitro de macrófagos murinos	43
4 RESULTADOS	44
4.1 Avaliação da transfecção	44
4.1.1 <i>Transfecção com reagente lipídico</i>	44
4.1.2 <i>Eletroporação</i>	46
4.2 Cinética de expressão de GFP	47
4.3 Padronização da qRT-PCR	48
4.4 Titulação de SFV por qRT-PCR	51
4.5 Avaliação da correlação entre título viral e taxa de infecção	52
4.6 Análise de expressão em outras linhagens celulares	55
4.7 Expressão de GFP em células IC-21 (linhagem macrófaga murina)	58
5 DISCUSSÃO	60
6 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	67
ANEXOS	73

1 INTRODUÇÃO

O Semliki Forest Vírus recombinante tem sido apontado como um dos vetores virais mais promissores, tanto para a expressão de proteínas de interesse biotecnológico, como para a utilização como vetor vacinal. O laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan iniciou os trabalhos com esse vetor há alguns anos (2007), tendo feito a transferência da tecnologia por meio de um acordo de cooperação científica FAPESP-CNRS com a Universidade de Strasbourg (França). Em nossos primeiros estudos já obtivemos alguns bons resultados expressando a glicoproteína do vírus da raiva com esse sistema (BEMAAMAR et al., 2009).

Nos trabalhos anteriores de nosso laboratório, a utilização do SFV como vetor de expressão apresentou algumas dificuldades técnicas na obtenção das partículas, através de transcrição *in vitro* e co-transfecção de RNAs. Normalmente esses procedimentos necessitam de uma correta padronização e avaliação em cada laboratório em que são realizados. Além disso, a titulação de SFVs recombinantes também é frequentemente apontada como uma dificuldade para a implantação desse sistema de expressão.

Dessa forma, para que fosse possível produzir e utilizar o sistema de SFV recombinante (rSFV) de maneira eficiente, uma série de padronizações de procedimentos de biologia molecular foi realizada. Para isso construímos um rSFV carregando o gene da GFP (rSFV-GFP), por ser este um gene em que a expressão é facilmente detectada e que permite métodos indiretos de quantificação da expressão. A expressão da GFP é uma ferramenta muito utilizada em biologia molecular como gene-repórter, basicamente porque outros genes exigem detecção por métodos analíticos, fundamentalmente baseados em ensaios imunoenzimáticos, que demandam uma série de padronizações (como titulação de anticorpos e diluição de amostras) o que torna as análises mais longas e sujeitas a variações.

Infectando culturas celulares com lotes de rSFV-GFP obtidos por diferentes protocolos, estabelecemos as melhores condições de obtenção e utilização dos rSFV. Isso foi realizado avaliando a quantidade de células infectadas em cada situação, por meio da detecção por citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência.

Além de auxiliar na padronização da metodologia de obtenção dos rSFV, a utilização de SFV-GFP foi de muita importância para a validação da estratégia de quantificação viral proposta neste trabalho. A quantificação da proporção de células infectadas foi correlacionada com a quantidade de vírus, titulado por qRT-PCR e utilizado para infectar uma cultura celular.

Os resultados da padronização da metodologia de qRT-PCR para a titulação de partículas de rSFV e os ensaios de validação dessa metodologia foram publicados como artigo científico “*qRT-PCR for titration of replication-defective recombinant Semiliki Forest Virus*” na revista *Journal of Virological Methods* (ANEXO I).

1.2 Objetivo

Obter partículas de Semliki Forest Vírus (SFV) recombinantes, carregando o gene da proteína verde fluorescente (GFP) e utilizá-las para a padronização dos procedimentos de titulação viral necessários à utilização do rSFV como vetor de expressão.

Objetivos específicos:

- Obter um SFV recombinante carregando o gene da GFP (rSFV-GFP);
- Utilizar o rSFV-GFP para avaliar as metodologias de produção das partículas recombinantes de SFV;
- Utilizar o rSFV para padronizar uma metodologia de titulação de construções de SFV por RT-PCR em tempo real, comparando com a taxa de infecção analisada por citometria de fluxo;
- Avaliar a capacidade do rSFV-GFP em infectar e expressar a GFP em diferentes linhagens de células.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Proteínas Recombinantes

Proteínas são macromoléculas localizadas em todas as células. Estão envolvidas no crescimento celular, metabolismo, organização, transporte e motilidade. Em organismos multicelulares, as proteínas controlam o sistema imunológico, a sinalização de neurônios, o crescimento e a diferenciação de todo o organismo. Mutações ou a expressão anormal de proteínas podem originar diversas doenças. Considerando-se que o genoma humano contém mais do que cerca de 30.000 genes e que o número de proteínas produzidas é ainda maior, as oportunidades para as empresas farmacêuticas a desenvolver novos medicamentos, baseados em proteínas recombinantes ou tratamentos de terapia gênica, são extremamente elevadas (WULHFARD, 2009).

Proteínas são obtidas através de microrganismos, linhagens de células de animais ou plantas. Sistemas microbianos, como os que usam *E.coli* têm a vantagem de apresentar baixo custo no estabelecimento, um rápido ciclo de produção, fácil controle durante o processo e também apresentar uma alta produtividade em comparação com os sistemas de expressão em células de mamíferos. No entanto, o sistema baseado em procariotos, como *E.coli*, apresenta algumas limitações, como ausência de modificações pós-traducionais complexas, principalmente glicosilação, que são características da expressão recombinante em células de mamíferos. Diversas proteínas recombinantes necessitam dessas modificações pós-traducionais para sua função biológica (BUTLER, 2005; ZHU, 2011). Ao analisar os sistemas de expressão utilizados na obtenção de estruturas depositadas em um banco de dados - *Protein Data Bank* (PDB), podemos observar que a *E. coli* continua a ser o sistema de primeira escolha para a expressão de proteínas. Assim, 88% das estruturas protéicas já definidas foram obtidas a partir de proteínas produzidas em *E. coli*. Apenas 9% foram obtidas a partir da expressão em eucariotos. Destes, o sistema baculovírus/células de inseto representa 4%, enquanto que as células de mamíferos, incluindo as linhagens celulares estáveis e, mais recentemente, os sistemas de expressão transiente, representam 2,4%. Estima-se que mais de 50% das proteínas humanas podem ser glicosiladas, fato que estimulou a utilização de células eucarióticas superiores para a produção de proteínas para estudos estruturais, que reflete no aumento do uso desses sistemas para a produção de proteínas. Os avanços na biologia molecular e na tecnologia de cultura celular facilitaram a utilização de células de insetos e

mamíferos, que são atualmente o segundo sistema mais utilizado para a produção de proteínas recombinantes (NETTLESHIP, et al., 2010).

2.2 Expressão de proteínas heterólogas em células

Um dos principais propulsores do desenvolvimento do cultivo em células animais em larga escala foi a procura por vacinas virais na década de 50 (principalmente vacina de Poliomielite). A partir desse fato, aumentou a utilização de culturas de células para a expressão de proteínas heterólogas.

Biofármacos são reagentes clínicos, vacinas e drogas produzidas usando biotecnologia moderna para o diagnóstico *in vivo* preventivo, ou uso terapêutico. A primeira proteína recombinante aprovada foi a insulina, produzida no início dos anos 80. Desde sua entrada bem sucedida no mercado, o FDA (Food and Drug Administration) aprovou mais de 100 novas proteínas terapêuticas recombinantes, incluindo anticorpos monoclonais (Mabs) e mais de 300 biofármacos não recombinantes como vacinas e hemoderivados, muitos deles obtidos em células de mamíferos (Tabela 1) (BUTLER, 2005; ZHU, 2011).

Entre as células de mamíferos mais utilizadas destacam-se: células VERO (linhagem celular de macaco) que são usadas para a produção de vacina contra a raiva, por exemplo; células de hibridomas que são utilizadas para a produção de anticorpos monoclonais; células CHO (*chinese hamster ovary*) geneticamente modificadas, que foram autorizadas para produção de diversos biofármacos, como o ativador de plasminogênio tecidual (tPA); células BHK-21 (*Baby hamster kidney*), de fibroblastos naturalmente aderentes, que são comumente usadas na propagação de vírus para a produção de vacinas veterinárias.

Células de insetos também são utilizadas para a expressão de proteínas heterólogas. Entre as células de insetos cultivadas *in vitro*, podemos citar as linhagens Sf-9, Sf-21 e S2. As células Sf-9 são derivadas da linhagem IPLBSF-21, isolada do tecido do ovário de pupa de borboleta *Spodoptera frugiperda*, sendo que essa linhagem é muito utilizada para expressão transiente de bioprodutos empregando baculovírus como vetores (RHIEL et al., 1997; SCHNEIDER, 1972).

Tabela 1- Biofármacos obtidos através do cultivo de células animais

Produto	Descrição	Indicação	Fabricante	Ano
Arcalyst	Inibidor de Interleucina-1	Tratamento de Gota	Regeneron	2008
Belatacept	Proteína de fusão (IgCTLA-4)	Prevenção de rejeição em pacientes transplantados de rim	BMS	2011
Herceptin	Anticorpo monoclonal	Câncer de mama	Roche	1998
Humira	Anticorpo monoclonal	Artrite Reumatoide	Abbot	2002
Lumizyme	Alfa-glucosidase	Doença de Pompe	Genzyme	2010
Yervoy	Anti-CTLA-4 MAb	Melanoma	BMS	2011

Fonte: Adaptado de ZHU (2011).

2.2.1 Expressão gênica estável

A produção de proteínas recombinantes para o mercado farmacêutico pode ser obtida através de uma expressão gênica estável, na qual o gene recombinante é integrado ao genoma da célula hospedeira seguido da seleção de um clone dentro da população celular transfectada. Detalhadamente, as linhagens de células recombinantes são obtidas através de um processo que tem seu início com a introdução do DNA heterólogo, através de um método de transfecção. Esse DNA é levado até o núcleo onde ocorre sua integração ao genoma hospedeiro e assim a informação genética é herdada a cada replicação. As células são então selecionadas através de marcadores de seleção gerando dessa forma clones recombinantes. O uso do marcador de seleção DHFR (dihydrofolate reductase), associado ao tratamento das células com metotrexato (MTX) para o aumento do número de cópias do gene de interesse (WULHFARD, 2009; ZHU, 2011) é um exemplo dessa abordagem usada para gerar linhagens celulares recombinantes para a produção de proteínas terapêuticas. As vantagens da expressão gênica estável são: I) Todas as células em cultura expressam a proteína de interesse; II) O DNA recombinante é replicado juntamente com a divisão celular; III) O rendimento pode chegar a 5 g/L de proteína recombinante.

A desvantagem desse método de expressão são o tempo e o custo para a sua obtenção e para a caracterização das linhagens celulares, o que pode chegar a 12 meses.

2.2.2 Expressão gênica transiente

Como uma alternativa à expressão estável de proteínas recombinantes, existe a abordagem da expressão gênica transiente. Comparada com a forma estável, tem a propriedade da célula expressar o DNA exógeno inserido durante curto período de tempo, permitindo obter quantidades razoáveis de proteína de maneira rápida (semanas) (BOLLATI; COMINI, 2008). Depois que o DNA entra no núcleo da célula, a transcrição do gene começa e a síntese de proteína é iniciada. Usualmente a proteína pode ser detectada dentro de umas poucas horas depois da transfecção. Uma das vantagens desse sistema é o fato de não ser necessária a seleção da população celular com DNA recombinante integrado. Porém é importante, quando não se tem muita informação sobre porcentagens de eficiência na transfecção, o uso dos marcadores repórter, cujo gene codifica para uma proteína que pode ser monitorada por métodos simples e sensíveis. Este método é de grande utilidade para otimizar e monitorar os veículos de transfecção de DNA. Dentre estes genes repórter, a Proteína Verde Florescente (GFP) vem sendo amplamente usada (ZHANG, et al. 1996).

2.3 Vetores de expressão

Diferentes vetores de expressão, tanto não virais como virais, foram desenvolvidos para transferir genes heterólogos a células de mamíferos. A escolha do vetor depende da aplicação, da célula hospedeira, da quantidade ou qualidade do produto pretendido, e segurança.

2.3.1 Vetores não virais

Os vetores não virais são bastante usados nas transfecções transientes. Os elementos básicos que constituem esses vetores são: um promotor constitutivo ou indutível, sinal de parada de transcrição e sequências procarióticas para origem de replicação e marcador de seleção em bactéria. Os promotores gênicos de origem viral usados em plasmídeos destinados a transfecções transientes geralmente são o promotor do Citomegalovírus (CMV) ou do Vírus de Símio 40 (SV40) (BALDI et al., 2007; UCHIDA, et al., 2002).

Esses vetores podem algumas vezes apresentar baixa eficiência de transfecção por haver várias barreiras físicas e químicas nas células até sua chegada ao núcleo: o contato entre o DNA e a membrana celular, o trânsito de todo o DNA através da membrana celular, o escape dos compartimentos endossomais ou lisossomais, o transporte através do citoplasma e a entrada no núcleo. Possuem uma maior flexibilidade no número e tamanho de genes a serem transferidos, bem como baixo risco em questões de biossegurança (BALDI et al., 2007; UCHIDA, et al., 2002).

2.3.2 Vetores Virais

Partículas virais, por natureza, são agentes infecciosos capazes de expressar sua informação genética nas células infectadas. Dentro ciclo vital de um vírus destacam-se duas etapas: a infecção, representando o momento de introdução do genoma viral na célula hospedeira, e a replicação. Para ambas as fases são necessários grupos de genes cuja expressão é regulada temporalmente, sendo os genes de função regulatória os primeiros a serem expressos, seguidos pelos genes estruturais. A produção de vírus recombinantes envolve a adição de elementos relacionados ao cassete de expressão do transgene (KAY, et al., 2001).

De acordo com a natureza do ácido nucléico que os compõe, assim como os vírus, os vetores virais são classificados em vetores de DNA ou de RNA. Nesses sistemas, a sequência de interesse é inserida de tal modo que, geralmente, substituirá algum gene ou região do genoma viral, de forma que o controle de sua transcrição fique a cargo de elementos de expressão viral. Se o material genético do vetor viral possuir um capsídeo, o vetor entrará na célula pelo mecanismo denominado infecção, o qual, na maioria dos casos, apresenta elevada eficiência. Se, entretanto, o ácido nucléico do vetor não possuir capsídeo, sua incorporação na célula será efetuada mediante técnicas de transfecção (BOLLATTI-FOGOLIN et al., 2008)

Entre os vetores derivados de vírus de DNA temos vírus SV-40 e o polioma, pertencentes à família dos poliomavírus, o adenovírus, os vírus adeno-associados (VAA), o vírus Epstein-Barr (EBV), o vírus do herpes simplex (HSV), o vírus da varíola atenuado (vaccinia) e os poxvírus recombinantes. Entre os vetores virais derivados de vírus de RNA temos os retrovírus, o coronavírus e na família Togaviridae, o gênero *Alphavirus* possui dois representantes que se destacam no emprego como vetores de expressão para fins biotecnológicos: o vírus Sindbis e o Semliki Forest.

2.4 Organização genômica do Semliki Forest Virus (SFV)

O SFV é um vírus envelopado de RNA positivo simples fita, pertencente ao gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae*. Os vírus pertencentes a essa família caracterizam-se por possuir um genoma de RNA simples fita não segmentado, que funciona como RNA mensageiro. Essa fita de RNA positivo é encapsidada por um único tipo de proteína, arranjada em configuração icosaédrica. Essa fita simples, de cerca de 12kb, é dividida em dois ORF's (open reading frames), sendo que o primeiro codifica quatro proteínas não estruturais, denominadas nsP1 a nsP4 que são responsáveis pela transcrição e replicação do RNA viral. Na região nsP2 situa-se o sinal de empacotamento do RNA viral. O segundo ORF, sob o controle do promotor subgenômico 26S, codifica as proteínas estruturais, necessárias para a encapsidação do genoma viral, ou seja, a proteína do capsídeo (C) e três proteínas do envelope (p62, que é precursora da E2, E3 e E1). As proteínas estruturais não são necessárias para a replicação do genoma viral, mas são essenciais para a propagação do vírus (RHÊME et al., 2005).

O envelope viral contém 240 heterotrímeros da glicoproteína E1, E2 e E3 que são responsáveis pela interação com receptores e entrada do vírus nas células alvo. A entrada viral ocorre através de endocitose seguida pela fusão do envelope viral com a membrana do endossomo, dissolução do nucleocapsídeo e liberação do RNA viral no citoplasma. Todo ciclo de replicação do SFV ocorre no citoplasma da célula infectada. O RNA genômico contém algumas características típicas do mRNA celular, como o CAP na região 5' e a cauda poliadenosina na região 3' (QUETGLAS, et al., 2010).

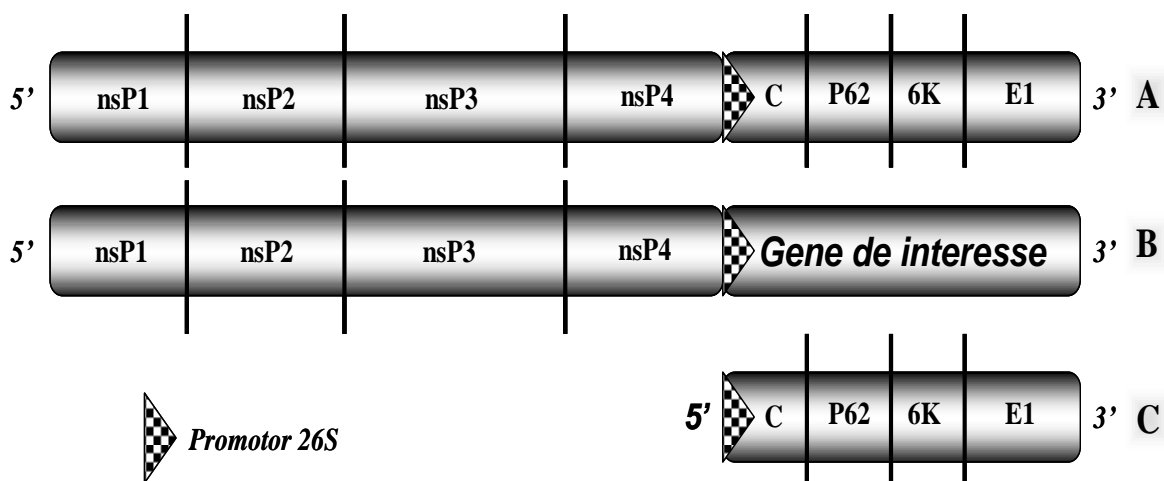
2.5 Uso do Semliki Forest Virus como vetor de expressão

O SFV tem sido usado como vetor de expressão de uma ampla variedade de genes em células eucarióticas. Sua eficiente replicação genômica, no citosol, mediada por polimerases tornou-o uma alternativa atrativa para a rápida e eficiente entrega de genes, permitindo a expressão de diferentes proteínas em uma ampla gama de células hospedeiras de mamíferos (LUNDSTROM, et al., 2001).

Para o desenvolvimento do vetor de expressão, o cDNA correspondente a seu genoma foi cortado e inserido em dois plasmídeos diferentes: O plasmídeo de expressão, que contém o gene (SFVgp1) das proteínas não estruturais do SFV (nsP1-4) e o promotor forte

subgenômico SFV 26S localizado antes de uma região de policlonagem destinada à introdução do gene de interesse; e um plasmídeo auxiliar que contém os genes das proteínas estruturais do envelope viral (Figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática do sistema SFV de expressão recombinante



Genoma do SFV selvagem, (A). Vetor de expressão em que os genes das proteínas estruturais foram substituídos por um sítio de policlonagem, em que é inserido o gene de interesse (B). Vetor auxiliar necessário para a formação de partículas virais na célula hospedeira (C).
Fonte: Adaptado de Riezebos-Brilman, 2006.

Após a realização da transcrição *in vitro* de ambos os plasmídeos, os RNAs são co-transfectados em células de mamífero (geralmente BHK-21). O RNA + do vetor de expressão funciona como um RNA mensageiro da célula hospedeira, com um códon AUG situado a 59 nucleotídeos do sítio 5' cap (m^7G). A tradução é encerrada antes do promotor 26S pela presença de um “stop códon”. A poliproteína não estrutural gerada é então clivada em diversos complexos associados ou em partes individuais. Esses polipeptídeos não estruturais então catalisam as atividades de replicação e de transcrição: atuam como RNA polimerase RNA-dependente e sintetizam uma fita negativa do RNA completo, que serve como molde para dois transcritos, um RNA + de tamanho total contendo o sinal de encapsidação e um RNA + subgenômico a partir do promotor 26S que dará origem às proteínas estruturais. Quando uma quantidade suficiente de proteína de capsídeo viral está disponível, o RNA + de expressão liga-se a ela formando o nucleocapsídeo viral. O estágio final ocorre principalmente na membrana plasmática de células animais, quando o nucleocapsídeo interage com o domínio citoplasmático da glicoproteína E2, iniciando o processo de brotamento (SCHELESINGER; SCHELESINGER et al., 1991).

Partículas de SFV recombinantes têm apresentado uma eficiente entrega de genes em células de neurônios primários em cultura, alcançando taxa de infecção de 75 a 95%, sendo que essas células permanecem intactas por vários dias pós-infecção. Ao comparar o SFV recombinante com outros vetores virais como adenovírus, adenovírus associados e lentivírus, ele é o preferido para uma expressão gênica rápida, de alto nível e neurônio específica (LUNDSTROM, et al., 2001).

2.6 Aplicações do sistema SFV

2.6.1 Produção de proteínas

Quando comparado a outros sistemas eucarióticos de expressão (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, Baculovírus/Sf9), quanto aos níveis de expressão, à qualidade, à atividade biológica, à localização e à solubilidade de todas as proteínas expressas a fim de identificar as vantagens de um sistema em relação ao outro, o sistema SFV apresentou em geral um bom desempenho (EIFLER et al., 2007).

O fato do SFV infectar uma ampla gama de células abre a possibilidade de estudar a expressão recombinante em substratos de células diferentes. Um rSFV carregando um RNA codificante para a glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) foi construído e a expressão dessa proteína foi avaliada em culturas de células animais, apresentando alta produtividade (BENMAAMAR et al., 2009).

O SFV foi aplicado na expressão de níveis elevados de mais de 50 diferentes GPCRs (*G protein-coupled receptors*), canais iônicos e vários outros tipos de proteínas transmembrana ou associadas à membrana. A expressão chegou até 150 pmol receptor/mg de proteína, com alguma variação de expressão entre linhagens celulares, dependendo do tempo de pós-infecção. Como exemplo, a expressão de hNK1R (*human neurokinin-1 receptor*) em células CHO (*chinese hamster ovary*), demonstrou ligação específica máxima em 12 horas pós-infecção, enquanto que em BHK-21 (*baby hamster kidney*) infectadas com SFV e expressando um receptor adrenérgico de hamster, o pico de expressão foi em 40 horas pós-infecção (LUNDSTROM, et al., 2001; 2003). As células BHK-21 também foram utilizadas para a expressão de proteínas terapêuticas pela infecção com SFV, como o fator de crescimento insulina-like I (IGF-I) e a cardiotrofina-1 (CT-1). Os níveis dessas proteínas em

culturas infectadas chegaram, respectivamente, a 1,0 e 8,6 $\mu\text{g}/10^6$ células em 24 horas de infecção (CASALES et al., 2010).

O sistema de SFV também foi empregado na produção de uma promissora proteína para o tratamento da doença de Parkinson e outras desordens neurodegenerativas, chamada de fator neurotrófico humano derivado das células da glia (hGDNF), que foi encontrada no sobrenadante e eficientemente purificada por cromatografia. A hGDNF purificada, apresentou um padrão de glicosilação típico de sistema de expressão de células de mamíferos e atividade biológica (ANSORENA et al., 2013).

Em larga escala, o SFV foi utilizado para a produção de receptores recombinantes, em células de mamíferos cultivadas em biorreatores e em frascos spinner (BLASEY et al., 2000). Esta abordagem foi bem sucedida na produção de mais de 10 mg/L de proteínas para aplicação em biologia estrutural (LUNDSTROM, 2004).

2.6.2 Vacinação e tratamento

A imunização profilática contra doenças infecciosas em geral tem como objetivo a indução de resposta imune humoral para prevenir a infecção. Essa resposta imune é mediada por células plasmáticas como linfócitos B. Por outro lado, uma imunização terapêutica contra células infectadas por vírus e células tumorais requer a indução de linfócitos T citotóxicos (TCD8), que podem reconhecer especificamente e lisar células infectadas e tumorais. Vetores baseados em *Alphavirus* são de grande interesse por se apresentarem como bons indutores de imunidade humoral e celular contra diversas doenças. Além de infectar diversos tipos celulares, os vetores SFV em geral não enfrentam uma imunidade pré-existente na maioria dos indivíduos, além de que suas proteínas estruturais não são expressas *in vivo*. As características que fizeram dos *Alphavirus* candidatos atrativos para o desenvolvimento de vetores virais com replicação-deficiente para uso em humanos são: (i) *Alphavirus* recombinantes induzem altos níveis de expressão do antígeno de interesse, (ii) após 48-72 horas de infecção as células morrem por apoptose resultando em corpos apoptóticos contendo altos níveis da proteína que podem induzir mecanismos de resposta imune via cross-priming, (iii) ativam tanto resposta a imune inata quanto a resposta imune adaptativa, (iv) humanos no geral não possuem anticorpos neutralizantes contra SFV que possam diminuir a eficiência da imunização (RIEZEBOS-BRILMAN, et al., 2006).

Uma estratégia para melhorar a imunogenicidade de vacinas de DNA envolve o uso de replicons de alphavirus que são construídos a partir de *Alphavirus* capazes de auto-replicação (YANG et al., 2009). O uso de SFV recombinante pode ser mais eficiente na indução de resposta imune que as vacinas de DNA tradicionais, e pode ter uma segurança maior devido a sua dispersão transiente e de curta duração (MORRIS; DOWNES et al., 2000).

Estudos relatam que o SFV induz a apoptose em células de mamíferos. A indução de apoptose é uma propriedade inerente ao vetor e não é dependente da expressão de genes heterólogos. Essa propriedade foi inclusive utilizada, quando partículas de SFV recombinante (rSFV) foram aplicadas para induzir a apoptose em células H358a (de carcinoma do pulmão). A Injeção direta de rSFV em tumores H358a, implantados em tecido subcutâneo de camundongos, inibiu o crescimento do tumor e, em alguns casos, causou sua regressão completa (MURPHY et al., 2000).

Há relatos de que a apoptose está associada com a perda de potencial da membrana mitocondrial, seguida da ativação das caspases 3, 8 e 9. Foi verificado que a morte celular pode ser parcialmente suprimida pelo tratamento com inibidor de pan-caspases zVAD-fmk (BARRY et al., 2010).

Esses trabalhos demonstraram o potencial do sistema SFV em ser utilizado para diferentes propósitos, evidenciando a diversidade de aplicações (Tabela 2).

O sucesso da terapia gênica depende da capacidade de entrega do gene de forma segura e eficaz às células alvo, o que pode ocorrer *ex vivo* ou *in vivo*. Na primeira, células alvo são extraídas do paciente, transfectadas com o gene terapêutico, e devolvidas ao paciente uma vez que a transferência gênica é completa. Vetores virais são as ferramentas mais eficazes de transferência de genes para modificar um tipo específico de célula ou tecido podendo ser manipulados a fim de expressar genes terapêuticos (WARNOCK, et al., 2011). Os vetores virais mais utilizados para a terapia gênica são os adenovírus, com 23% de ensaios clínicos em andamento, em seguida aparecem os retrovírus com 19% de ensaios clínicos, enquanto o Semliki Forest Virus apenas 0,2% de estudos clínicos (WILEY, 2013).

Tabela 2- Aplicações do sistema SFV

Aplicação	Objetivo	Referências
<i>Expressão Gênica</i>		
Linhagens de células	Caracterização de proteínas	Lundstrom, 2003
Produção em larga escala	Screening de Drogas	Bleseley, 2000
Neurônios primários	Localização, eletrofisiologia	Li, 2010
<i>Terapia Gênica</i>		
Vacinas de Câncer	Proteção do tumor, regressão	Quetglas, 2010
Linhagens células tumorais	Transdução, morte celular	Hardy, 2000
Injeção Intratumoral	Regressão do tumor	Murphy, 2000

A principal aplicação dos *Alphavirus* em terapia gênica envolve estudos em modelos animais de câncer. Como exemplo, a utilização do vetor viral SFV carregando um gene repórter ou gene terapêutico pela injeção intratumoral. Neste estudo, um SFV expressando as subunidades p40 e p35 de interleucina 12 (IL -12) levou a uma regressão significativa do tumor e à inibição da formação de vasos sanguíneos em um modelo tumoral murino B16. Além disso, partículas de SFV carregando o gene da GFP apresentaram efeito terapêutico, uma vez que provocaram a redução de tumores em camundongos imunodeficientes implantados com tumor de pulmão humano após injeções intratumorais. (LUNDSTROM, 2009).

2.7 rSFV-GFP

A proteína verde fluorescente na forma selvagem (GFP), extraída da *Aequorea victoria*, tem como característica a produção de uma luz verde brilhante fluorescente quando estimulada com a luz ultravioleta (UV) (WARD, 1998). Sua utilidade como marcador biológico deriva da constatação de que ela não requer um co-fator, o que a torna uma molécula usada como um indicador de localização da proteína dentro da célula, permitindo o estudo da dinâmica celular e o processo de desenvolvimento em tecidos intactos.

Devido ao seu amplo impacto em pesquisa básica, a GFP tem sido aplicada na avaliação de vetores virais em terapia gênica (CHALFIE et al., 2006), e também como marcador de expressão gênica em células de insetos, mamíferos e plantas (PLAUTZ, et al., 1996).

Sua utilização como marcador de expressão gênica foi avaliada em um estudo em que células VERO foram infectadas em diferentes MOI por um adenovírus recombinante expressando a GFP (Ad.CMV-GFP) e avaliado por citometria de fluxo. Foi observado um aumento proporcional entre fluorescência e MOI. Assim, a expressão de GFP pode ser analisada em uma população de células por citometria de fluxo, sendo um marcador gênico confiável (SOBOLESKI et al., 2005).

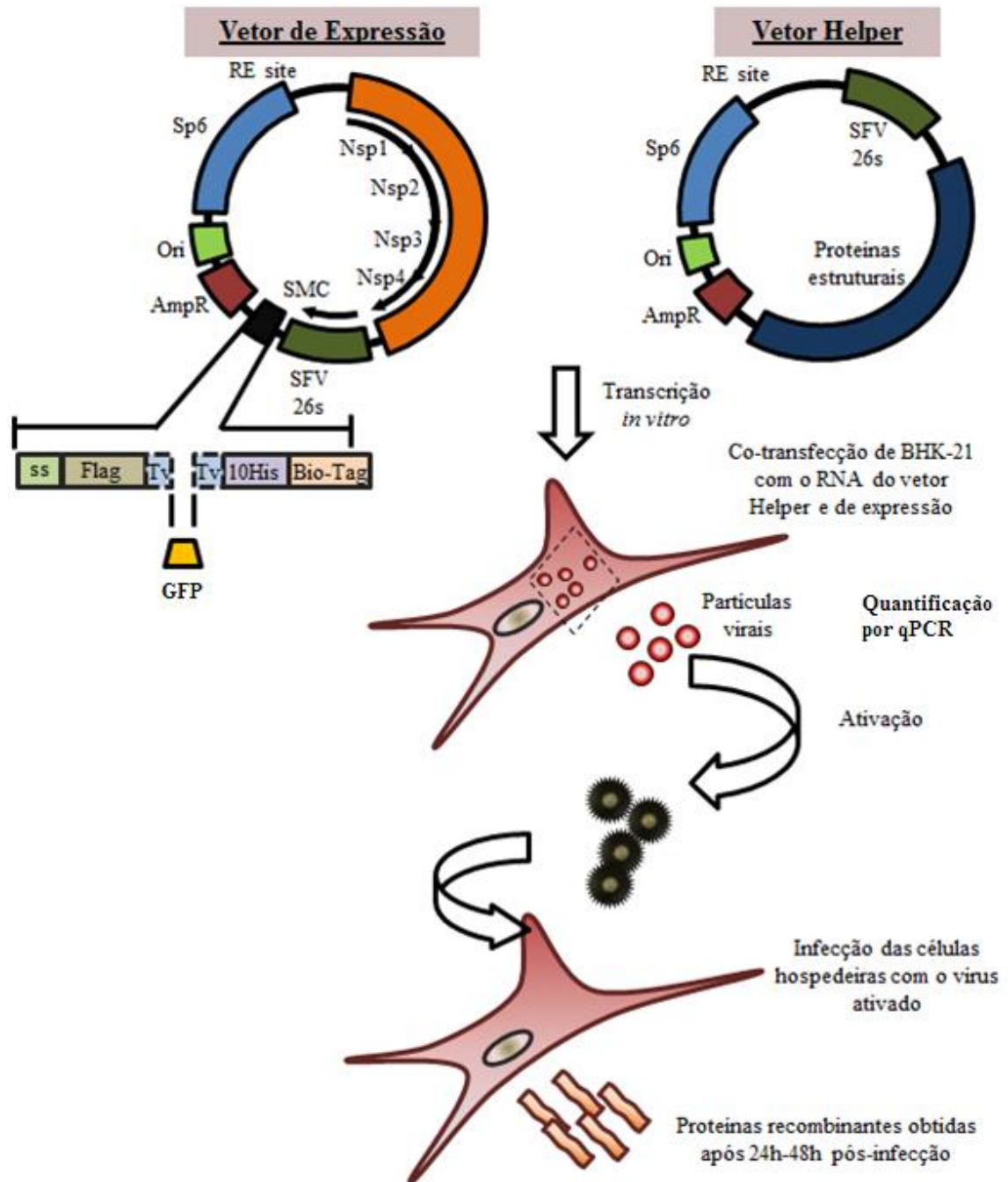
Sua análise qualitativa pode ser realizada por microscopia de fluorescência ou por observação em lâmpada UV de comprimento de onda entre 365 - 395 nm (CHIARINI et al., 2003). Por outro lado, sua análise quantitativa pode ser realizada por fluorimetria e citometria de fluxo.

Uma construção de rSFV-GFP já foi utilizada para o estudo da entrega gênica em experimento de infecção em duas regiões diferentes do cérebro de ratos. Após 36 horas da injeção do rSFV, o número de células GFP positivas, o volume de distribuição de GFP e o nível de expressão foram analisados revelando uma melhor entrega de genes no Corpo Caloso do que no córtex cerebral (LI et al., 2010).

Outra construção de rSFV-GFP foi utilizada para testar a infectividade em algumas linhagens de células de insetos. Como resultado, a taxa de infecção após 24h chegou a cerca de 100% em células de *Aedes albopictus* C6/36 e Aa23T, bem com em MOS55 de *Ae. aegypti* (PETTIGREW et al., 1999).

A obtenção e utilização de um vetor rSFV-GFP segue os mesmos princípios de obtenção de outros vetores de rSFV (Figura 2).

Figura 2- Esquema de obtenção e utilização do rSFV-GFP.



2.8 Metodos de Transfecção

2.8.1 Eletroporação

O método de eletroporação é um método físico de entrega gênica à célula alvo em que são utilizadas descargas elétricas de alta tensão para introduzir material genético (DNA ou RNA) nas células. Pode ser usado com uma grande variedade de tipos de células, muitas vezes resistentes a outros métodos de transfecção, tais como linfócitos, células tronco hematopoiéticas e células tronco embrionárias murinas. Apresenta em geral uma elevada frequência de transformação tanto estável como transiente e, por requerer menos passos, é mais simples que outras técnicas alternativas, e também de maior reprodutibilidade, podendo ser usada em células aderentes ou em suspensão. Além das propriedades físicas do pulso elétrico, deve-se levar em conta o tipo de solução tampão, a qualidade (células em fase exponencial de crescimento) e a concentração de células a serem usadas, uma vez que baixas densidades celulares rendem baixas eficiências de transfecção enquanto que altas densidades favorecem processos indesejados de fusão entre as células (POTTER; HELLER., 2011).

2.8.2 Lipossomos

A técnica de lipofecção é baseada na utilização de lipossomos, capazes de transportar o RNA para dentro das células. Os lipossomos são composições lipídicas de natureza variada, podendo ser formados por lipídeos aniônicos, catiônicos, neutros ou por combinações destes. A característica que faz dos lipossomos uma ferramenta para transportar nucleotídeos às células é sua capacidade de interação, entre si e com a água, quando expostos ao meio aquoso, promovendo, assim, a formação de bicamadas fechadas. No caso das formulações catiônicas, os lipídeos interagem espontaneamente com o RNA de carga negativa por forças iônicas, para formação dos complexos de transfecção, de forma que o RNA fique no interior da bicamada lipídica formada. Em geral, os lipossomas catiônicos são constituídos de uma mistura de lipídeos catiônicos sintéticos com lipídeos neutros, denominados auxiliares (ILARDUYA et al., 2010).

2.9 Utilização da qRT-PCR para titulação viral

Uma titulação viral precisa é necessária para se obter uma boa reprodutibilidade na produção de proteínas pelo sistema SFV. Os métodos tradicionais de titulação viral, como o ensaio de formação de placas, frequentemente são aplicados para titulação de SFV selvagem ou SFV replicativos, porém esse método não é aplicado para partículas de SFV não replicativas. A titulação de partículas de SFV com replicação deficiente é normalmente realizada por métodos de infecção viral de placa, seguidos por detecção por imunofluorescência usando anticorpos primários contra a proteína de interesse, ou contra a replicase viral ou mesmo com o uso de gene repórter como GFP e β -galactosidase. A titulação viral também pode ser realizada por dot blotting usando sondas de DNA radioativas. Entretanto, todos esses métodos consomem tempo, exigem muito trabalho e requerem um grau de experiência em cultura de células e manipulação viral. Além disso, algumas vezes os resultados são difíceis de serem interpretados (PUGLIA et al., 2013).

O método de PCR quantitativa (qPCR) para titulação viral já foi desenvolvido para pelo menos mais um vetor viral de utilização expressiva, os baculovírus. Foi descrita uma qPCR que permite de maneira muito mais rápida e simples, determinar os títulos virais com base na intensidade de um sinal de fluorescência, gerado durante a amplificação da PCR (LO; CHAO, 2004).

Devido à sua alta sensibilidade, a transcrição reversa seguida pela PCR quantitativa (qRT-PCR) é muito utilizada para quantificar mudanças fisiológicas na expressão gênica. A padronização da técnica depende da sequência alvo, da quantidade de RNA esperada, do grau de precisão necessário e da estratégia de quantificação relativa ou absoluta.

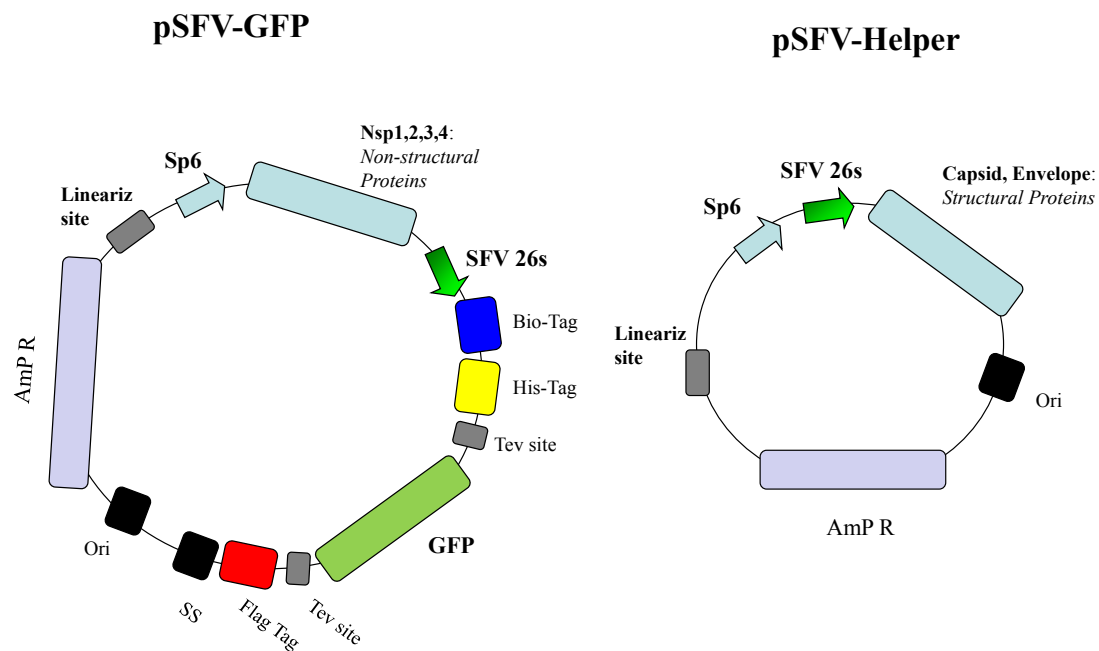
Em geral, duas curvas de calibração externas podem ser usadas, uma baseada no RNA recombinante e a outra baseada no DNA recombinante. Porém a curva baseada no DNA recombinante é mais estável que a baseada em RNA, não sofrendo atividade de RNases, além de permitirem estocagem por um longo tempo (PFAFFL; HAGELEIT, 2001).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos plasmídeos

Os plasmídeos pSFVgen2 e pSFV-Helper foram gentilmente cedidos pelo Dr Renaud Wagner da Universidade de Strasbourg (França). Os vetores recombinantes de SFV utilizados nesse trabalho foram obtidos pela clonagem do gene de interesse sob o controle do promotor forte subgenômico, SFV 26S, no plasmídeo pSFVgen2C, o qual codifica as proteínas não estruturais do SFV, obtendo assim o vetor pSFV-GFP. Os genes que codificam as proteínas estruturais do SFV são fornecidos pelo pSFV-Helper (Figura 3).

Figura 3- Esquemas representativos do plasmídeos pSFV-GFP e pSFV-Helper



3.2 Transformação bacteriana por choque térmico

Duas alíquotas de bactéria DH5 α competentes armazenadas em nitrogênio líquido foram descongeladas. Logo após, a cada uma delas foi adicionado o vetor pSFV-Helper ou pSFV-GFP. As misturas foram mantidas por 30 minutos no gelo. Em seguida, as bactérias foram mantidas à temperatura de 42 °C por 2 minutos e posteriormente por 5 minutos no gelo.

Após a transformação, as preparações bacterianas foram plaqueadas em placas de ágar LB (Luria-Bertani, HIMEDIA) contendo antibiótico ampicilina (100 mg/mL). As placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas e ao final desse período foi possível observar o crescimento de colônias transformadas.

3.3 Preparação dos plasmídeos

De cada colônia de DH5 α transformada com os vetores (pSFV-GFP ou pSFV-Helper) e crescidas em meio ágar LB (marca) foi retirada uma única colônia isolada, sendo então inoculada em 100 mL de meio LB (Luria-Bertani, HIMEDIA) com antibiótico ampicilina em um erlenmeyer estéril vedado, incubado overnight a 37 °C sob agitação a 250 RPM. Após o período de incubação, o DNA plasmidial foi extraído e purificado seguindo o protocolo de extração do kit (Qiagen Maxiprep Plasmid kit). A concentração dos vetores foi determinada por fluorimetria (Qubit, Invitrogen) e confirmada por leitura em espectrofotômetro a 260 nm.

3.4 Transcrição *in vitro*

Para obtenção das partículas de rSFV, o pSFV-GFP e o pSFV-Helper foram linearizados através do uso das enzimas de restrição NruI e SpeI (NEB), respectivamente. Uma eletroforese em gel agarose 0,8% foi realizada para avaliar a linearização. Em seguida foi realizada a transcrição *in vitro* dos plasmídeos linearizados, usando o kit SP6 MAXIScript® (Ambion) contendo RNA polimerase SP6, a 40 °C por 2 horas. Os RNAs obtidos foram então quantificados por fluorimetria com o uso do Kit RNA assay Quant-it™ (Life Technologies®) em fluorímetro (Qubit, Life Technologies®).

3.5 Linhagens celulares

3.5.1 Células BHK-21

Células BHK-21 (*baby hamster kidney*) na passagem 105 foram cultivadas em frascos T de 25 cm² com volume de trabalho de 5 mL e T de 75 cm² com volume de trabalho de 15 mL, ambas em meio α -MEM (Gibco® - Grand Island, NY., U.S.A.) suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino) a 37 °C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ à 37 °C.

Essa linhagem celular é comumente utilizada para a geração de partículas de SFV-GFP pelo método de co-transfecção dos vetores pSFV-Helper e pSFV-GFP e também para a expressão de GFP após a infecção com as partículas SFV-GFP.

3.5.2 Green Monkey Kidney (VERO)

A Linhagem celular derivada do rim do macaco verde africano (*Cerco pithecus Aethiops*), congeladas na passagem 62 a partir do banco de células do laboratório. Foram utilizadas nesse trabalho a fim de avaliar a expressão de GFP. Seu cultivo foi realizado em meio DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Gibco®), 10% de SFB (Invitrogen®), nas condições de 37 °C com 5% de CO₂.

3.5.3 Linhagem L929 (ATCC – CCL-1)

A célula L929 é um subclone da linhagem parental L. Foi uma das primeiras linhagens celulares a serem estabelecidas em cultura contínua. A linhagem L é derivada do tecido aureolar subcutâneo e adiposo de um camundongo macho C3H/An de 100 dias. Essa linhagem na passagem 120 também foi utilizada com o objetivo de avaliar a expressão de GFP. Seu cultivo foi realizado no mesmo meio e condições que as células VERO.

3.5.4 Células SF-21

As células SF21 (oficialmente IPLB-Sf21AE) pertencem a uma linhagem contínua desenvolvida a partir de ovário de *Spodoptera frugiperda*. Essa linhagem foi cultivada em meio livre de soro fetal bovino, SF900 (Gibco®), à 28 °C.

3.5.5 Células IC-21

A linhagem celular IC-21 é derivada de transformação de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 com vírus SV40. O meio de cultivo utilizado foi o RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB. Essa linhagem celular foi utilizada a fim de avaliar a capacidade dessas células em fagocitar ou serem infectadas com rSFV-GFP ativado ou não ativado.

3.5.6 Células HuH 7

A linhagem células HuH 7 é derivada de um Hepatocarcionoma, foram cultivadas com meio DMEM (Gibco®) com 10% de SFB em atmosfera com 5% de CO₂, e foram utilizadas na passagem 118 para também para avaliar a expressão de GFP após a infecção com rSFV.

3.5.7 Células HEK 293

Células HEK 293 (Human Embryonic Kidney 293 cells), foram cultivadas também em meio DMEM (Gibco®) suplementado com 10% de SFB. Foram utilizadas nesse estudo com a finalidade de avaliar a capacidade do rSFV infectar e expressar GFP.

3.5.8 Manutenção e congelamento

O banco de trabalho de células de mamífero foi estabelecido pelo congelamento de alíquotas de 1×10^6 células em meio de congelamento: 40% de SFB (Cultilab), 50% de meio fresco α -MEM ou DMEM (Gibco®) e 10% de DMSO. O congelamento foi realizado a uma taxa de resfriamento de 1 °C/minuto pela utilização de um contêiner posicionado em freezer - 80 °C (Nalgene® cryo 1 °C freezing container). Após 24 horas de congelamento os tubos foram transferidos para o nitrogênio líquido, onde permaneceram armazenados.

Quando necessário, as células foram submetidas ao descongelamento rápido em banho-maria a 37 °C, centrifugadas, o sobrenadante desprezado por centrifugação para retirada do meio de congelamento, e então resuspendidas em meio de cultivo e incubadas em estufa com 5% CO₂.

Os repiques das células de mamífero foram feitos geralmente duas vezes por semana. Para isso o meio condicionado foi desprezado, foi feita uma lavagem com 2 mL PBS para a retirada do SFB e em seguida a adição de 2 mL de tripsina para a dissociação das células. Após isso, 0,5 mL de células foram então passados para uma nova garrafa de cultivo.

A linhagem de células de insetos utilizada nesse estudo foi cultivada em frascos de cultura celular T de 25 cm² com volume de trabalho de 5 mL, a 28 °C. Para o repique das células foram utilizados 1 mL de células em meio condicionado e 4 mL de meio de cultura, sendo os repiques realizados duas vezes por semana.

A concentração celular foi determinada pela contagem em hemacitômetro. A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão com azul de Trypan 0,2%, em que é identificada a diferença entre células viáveis e não viáveis.

3.6 Obtenção do rSFV-GFP

3.6.1 Transfecção com reagente lipídico

A obtenção do rSFV-GFP foi realizada *in vitro* utilizando o kit TransMessenger™ (Qiagen). Esse kit foi desenvolvido especificamente para a transfecção de RNA em células eucarióticas. O método é baseado em uma formulação lipídica associada a um reagente específico de condensação do RNA, capaz de formar um complexo TransMessenger-RNA. Essa associação foi efetuada em proporções diferentes, sendo que a proporção de RNA de rSFV-GFP para RNA Helper foi sempre de 2:1. Os complexos foram então adicionados às culturas de células BHK-21 em 80% de confluência, cultivadas em placas de 6 poços a 37 °C, em meio de cultura α -MEM (Gibco®) sem SFB e atmosfera de 5% de CO₂. Após 24 /48 horas de incubação, o sobrenadante contendo as partículas virais foi coletado em alíquotas de 500 μ L e armazenado a -20 °C ou a -80 °C.

3.6.2 Transfecção por eletroporação

O método de eletroporação foi realizado segundo Karlsson & Liljestrom, 2003, com algumas modificações feitas em nosso laboratório.

Células BHK-21 na concentração de 1×10^7 cels/mL em PBS (isento de tripsina) foram transferidas juntamente com os RNAs de expressão e helper, para uma cubeta de eletroporação (0,4 cm). A eletroporação foi feita com eletroporador Gene PulserII (Biorad®-Hercules – California, EUA) Foram aplicados dois pulsos de 850 v/25 μ F à temperatura ambiente, sendo que a constante de tempo depois de cada pulso foi de 0,4 ms. Após a eletroporação, as células transfectadas foram transferidas para um frasco T de 75 cm² contendo 10 mL de meio de cultura, e incubadas em estufa de CO₂ a 37 °C por 24 horas. Após esse período de incubação, o sobrenadante contendo as partículas de rSFV-GFP foi coletado e centrifugado a 4000 g por 30 min a 4 °C para eliminar os debris e as células. Alíquotas de 1 ml foram congeladas rapidamente em gelo seco e estocadas a -80 °C até o momento da utilização.

3.7 Ativação e infecção com rSFV-GFP

As partículas virais foram obtidas inativas, necessitando assim de uma incubação com α -quimiotripsina (Sigma- Aldrich®) (0,5 mg/mL) por 30 minutos à temperatura ambiente (TA), para a ativação viral. Posteriormente, um tratamento com aprotinina (Life Technologies) (1 mg/mL) por 5 minutos à TA foi realizado para inativar a α -quimiotripsina.

As infecções foram feitas em placas de cultivo de 6 poços, contendo 5×10^5 células BHK-21 por poço, com 1,5 mL de meio α -MEM. Ao apresentarem 80% de confluência, os cultivos foram infectados com volumes de 10 μ L, 25 μ L, 50 μ L, 100 μ L de cada lote de rSFV-GFP, para analisar de forma preliminar a eficiência dos protocolos de transfecção. Após o estabelecimento da metodologia de quantificação viral por qRT-PCR, as células foram infectadas em diferentes MOI para diversos fins experimentais.

3.8 Análise da expressão de GFP

3.8.1 Microscopia de fluorescência

Após a infecção das células BHK-21 com vírus rSFV-GFP, os cultivos foram incubados em uma câmara de CO₂ (MIU-IBC) acoplada a um microscópio de fluorescência (IX81, Olympus) para aquisição das imagens. O desenvolvimento de fluorescência, correspondente à expressão da GFP foi acompanhado durante 30 horas, com auxílio do aplicativo OV100 in vivo Imagine System. Imagens da expressão de GFP também foram obtidas através de um microscópio de fluorescência invertido, diretamente na placa de cultivo após 24 horas de infecção.

3.8.2 Citometria de fluxo

Para a análise de expressão por citometria de fluxo, 24 horas após infecção com SFV-GFP as células foram descoladas das placas, centrifugadas (750 g / 5 min) e o sobrenadante descartado. As células foram resuspendidas em solução de PBS e armazenadas ao abrigo da luz para posterior leitura. A análise da proporção de células fluorescentes e da mediana de fluorescência foram realizadas no aparelho FACS Calibur (Becton Dickinson), a partir da contagem de 10.000 eventos para cada amostra. A proteína GFP quando excitada pelo raio laser do FACS emite luz que é detectada pelo filtro de 530 nm (FL1), capaz de detectar, portanto, a fluorescência verde da proteína.

3.9 Padronização da qRT-PCR para a titulação de SFV

3.9.1 Construção da curva padrão

Para a construção da curva padrão para a quantificação do SFV-RNA, foi utilizado o plasmídeo pSFV-RVGP, normalmente utilizado para a obtenção do RNA do SFV-RVGP por transcrição *in vitro*. O pSFV-RVGP foi amplificado em bactéria e purificado em coluna de extração (Maxi-prep, Qiagen), tratado com RNase livre de DNases e pré-quantificado por fluorimetria (Qubit, Life Technologies®). Em seguida, 2 µg do plasmídeo foram submetidos à digestão com a enzima Not I para linearização. O plasmídeo linearizado foi então submetido à PCR para verificar a eficiência da linearização. Posteriormente, o plasmídeo foi quantificado para se obter a concentração de DNA presente na preparação e, com base nos cálculos da quantidade de cópias da região alvo desejadas, foram feitas sete diluições em tampão (TE DNase RNase-free, pH 8,0) para a obtenção dos padrões da curva de quantificação contendo 6×10^7 , 6×10^6 , 6×10^5 , 6×10^4 , 6×10^3 ou 6×10^2 cópias a cada 3 µL da preparação. A curva de quantificação foi testada em quatro repetições, sendo que cada diluição foi analisada em triplicata. Foram desenhados três pares de oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) (Figura 4) com o auxílio do programa Primer Express 3.0 baseados na região da NSP3 do SFV, os quais foram sintetizados (Life Technologies) e testados juntamente com a curva.

Figura 4- Sequência dos oligonucleotídeos e suas características

Nome	Seqüência	T _m (°C)	%GC
F-I-2	ACA GAC TGT CAC TGA GCA G	52	53
R-I-2	TCT CTG CAG TAG ATG GTC AC	54	50
SFV1	TGT GCC GCT ACG CAA TGA	64	56
SFV2R	CAT GCT TTT AAC TTG GTG TGA CCT A	62	40
SFV3	AGA CCA TGT GGA CCT CGA GAA	62	52
SFV4R	GAG GCA AGG TAT GCA GCT CTC T	62	55

3.9.2 qPCR

A qPCR foi desenvolvida no equipamento StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems®). Foi utilizado o kit Power SYBER® (Life Technologies) contendo uma mistura de dNTPs, MgCl₂, TaqDNA polimerase e reagente intercalante de bases e fluorescente syber green, em tampão próprio para uso. A essa mistura foi adicionado o par de primers na concentração de 50 nM) e, posteriormente 12 µL dessa mistura foram distribuídos em cada poço da placa MicroAmp™ (Applied Biosystems) juntamente com 3 µL dos padrões ou amostras de cDNA, todos em triplicatas. A placa foi selada e brevemente centrifugada para unir todo volume no fundo do recipiente. A qPCR foi realizada utilizando o seguinte ciclo de amplificação: 95 °C / 10 minutos, 34 x (95 °C /15 s, 55 °C /15 s, 60 °C /15 s), sendo a leitura da fluorescência realizada à temperatura de 60 °C. Após a amplificação, foi efetuada a análise da curva de melting (60 °C a 95 °C) de todas as amostras para verificar a especificidade da reação, sendo que o fragmento amplificado (145 bp) apresentou dissociação à temperatura de 83 °C ± 0,3 °C. As reprodutibilidades entre corridas e dentro de uma mesma corrida (*interassays* e *intra-assays*) foram determinadas pela amplificação de uma única amostra de cDNA obtida a partir de uma mistura de RNAs de rSFV. Essa amostra foi aplicada em nove replicatas, em cada uma de duas corridas independentes de PCR. Os desvios padrão médios foram calculados.

3.10 Extração do RNA de amostras de SFV

Para realizar a titulação do SFV, o RNA viral foi purificado a partir de 100 µL das suspensões de SFV, utilizando o kit RNAeasy (QIAGEN®) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. As partículas virais foram dissociadas e o RNA viral foi precipitado com etanol, para ser posteriormente passado nas colunas de sílica que possuem alta afinidade por ácidos nucleicos. Após a lavagem, o RNA foi eluído utilizando 80 µL de água destilada livre de RNase e quantificado por fluorimetria. O rendimento de RNA extraído foi calculado e em seguida foi feito o tratamento de DNase.

3.11 Tratamento com DNase e síntese do cDNA

Para a remoção do DNA contaminante, 1 µg de cada amostra de RNA extraído foi tratado com uma unidade de enzima DNase I (Promega) durante 30 minutos a 37 °C, na

presença de inibidor de RNase (RNase-Out, Life Technologies), seguida de adição de EGTA e incubação a 65 °C por 10 minutos para inativação enzimática, em um volume total de 20 µL.

Cada amostra de RNA livre de DNA foi então imediatamente submetida à reação de transcrição reversa com M-MLV (Life Technologies). Primeiramente, 600 ng de RNA tratados com DNase foram incubados a 65 °C durante 5 minutos, juntamente com 1 µM de iniciadores anti-senso específico, 0,5 mM de dNTPs e água livre de DNase e RNase. Em seguida, a mistura foi resfriada rapidamente no gelo e adicionados o tampão, o DTT 0,1 M e 200 U de M-MLV, em um volume total de 20 µL. A reação foi incubada a 37 °C durante 30 minutos para a síntese do cDNA do SFV. A reação foi interrompida pela incubação a 70 °C durante 15 minutos. As amostras foram então armazenadas -20 °C até a análise. Durante a padronização dos protocolos, as preparações de RNA tratadas com DNase foram testadas em reações de nested-PCR, para avaliar a eficácia da digestão do DNA contaminante. Após a confirmação da remoção do DNA contaminante, 3 µL de cDNA de cada amostra viral foram submetidos à qRT-PCR juntamente com a curva padrão para obtenção do título viral.

3.12 Titulação de lotes de rSFV-GFP

Para a determinação do título viral, o resultado da média dos Cts encontrados para as triplicatas de cada amostra foi aplicado à equação da curva de quantificação. O valor resultante corresponde à concentração de cópias de RNA de SFV na amostra de cDNA. Para calcular o título correspondente na amostra de partida, isto é, no lote de rSFV armazenado, o resultado da titulação foi multiplicado pelas diluições efetuadas e pelo rendimento do processo de extração:

$$\text{Título do rSFV} = (A \times B \times C \times D) / (E \times F \times G)$$

Em que:

Título do rSFV = concentração (RNA viral / µL) na amostra de partida

A = resultado obtido pela qRT-PCR (cDNA / µL)

B = volume total da RT (µL)

C = volume total do tratamento do RNA extraído com DNase (µL)

D = volume de eluição da coluna de extração de RNA da amostra de vírus (µL)

E = volume de RNA tratado com DNase inserido na reação de RT (μL)

F = volume de RNA extraído utilizado no tratamento com DNase (μL)

G = volume da amostra usada para extrair o RNA viral (μL)

3. 13 Avaliação de infecção *in vitro* de macrófagos murinos

Células IC-21 foram cultivadas em placas de seis poços e infectadas com suspensões contendo rSFV-GFP não ativados (falsa infecção) ou ativados com α -quimiotripsina, utilizando os MOI 1 e 10. Os efeitos foram analisados por microscopia de fluorescência (BX-21, Olympus[®]).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da transfecção

4.1.1 Transfecção com reagente lipídico

Para avaliação da obtenção de rSFV-GFP através de transfecção com reagente lipídico, foram produzidos sete lotes em sete diferentes condições de co-transfecção utilizando o kit de transfecção Transmessenger (Qiagen), variando: a quantidade de RNA utilizado; a proporção entre RNA e lipídio na formação do complexo de transfecção; o tempo entre a transfecção e a coleta das partículas virais; e a condição de armazenamento, buscando o melhor procedimento para obter o rSFV-GFP (Tabela 3).

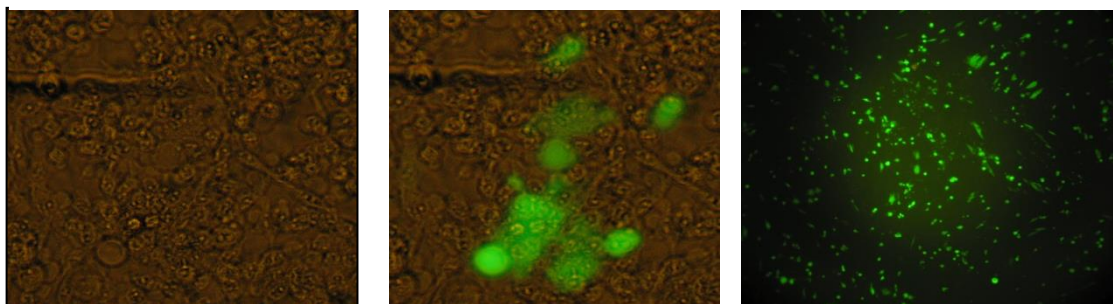
Tabela 3 - Produção de rSFV-GFP por transfecção com reagente lipídico

	Quantidade de RNA	Proporção RNA: Lipídio	Coleta	Estoque
Lote 1	16µg	1:2	24 h	-20 °C
Lote 2	32µg	1:2	24 h	-20 °C
Lote 3	2µg	1:2	24 h	-80 °C
Lote 4	2µg	1:2	48 h	-80 °C
Lote 5	2µg	1:2	24 h	-80 °C
Lote 6	2µg	1:4	24 h	-80 °C
Lote 7	4µg	1:2	24 h	-80 °C

Como no momento da obtenção desses lotes de rSFV-GFP, a metodologia de qRT-PCR não estava completamente padronizada, volumes iguais (100 µL) das suspensões virais obtidas foram utilizados para a infecção de 3×10^5 células BHK-21, de maneira a medir indiretamente a quantidade de vírus gerada em cada abordagem.

Foi verificado por microscopia que todos os cultivos apresentaram níveis elevados de fluorescência (Figura 5), mas diferenças quanto à quantidade de células infectadas.

Figura 5- Análise da expressão de GFP por microscopia de fluorescência.



Análise da expressão de GFP por microscopia de fluorescência. Células BHK-21 foram infectadas com 100 μ L de rSFV-GFP lote 7, durante 24 horas. Aspecto do cultivo celular após a infecção, luz transmitida, 400x (A). Sobreposição de luz transmitida e fluorescência demonstrando a intensidade da expressão da GFP, 400x (B). Visualização geral de um cultivo contendo 30% de células infectadas,

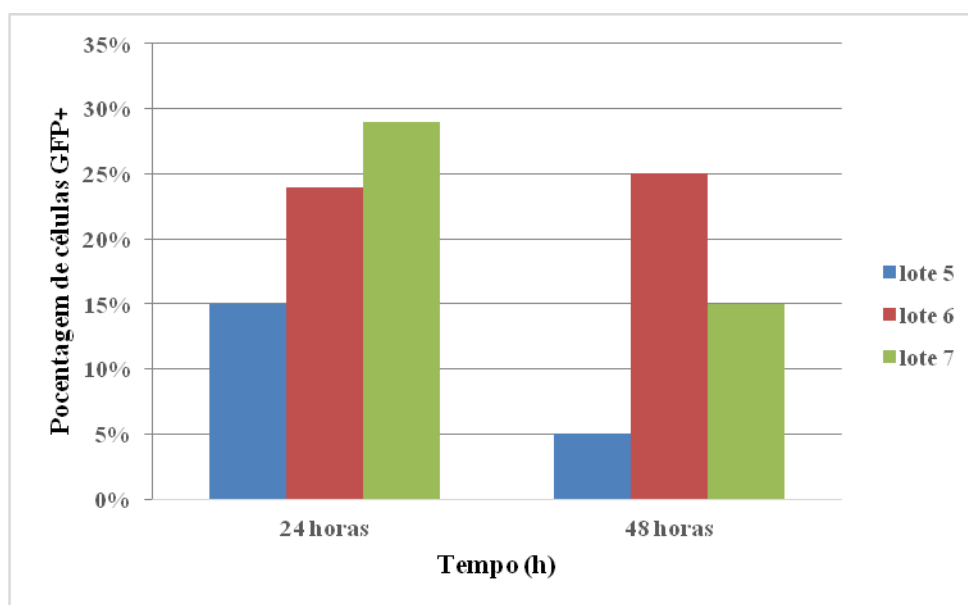
Foi realizada uma análise semi-quantitativa das diversas imagens obtidas, determinando a expressão da GFP como alta ou baixa, de acordo com a proporção de células que apresentavam fluorescência em um cultivo infectado durante 24 horas (imagens não mostradas).

A análise dos dois primeiros lotes mostrou que a utilização de uma grande quantidade de RNA para transfecção não gera necessariamente uma grande quantidade de partículas, já que o lote 1, obtido com 16 μ g de RNA apresentou melhor expressão que o lote 2 com 32 μ g de RNA. Como ambos os lotes perderam infectividade em poucas semanas, resolvemos testar a produção de pequenas quantidades de rSFV-GFP, coletadas após 24 e 48 horas da transfecção, sendo então armazenadas a -80 °C (lotes 3 e 4, respectivamente). Tendo observado que os vírus coletados após 48 horas (lote 4) infectaram apenas uma pequena proporção de células BHK-21, em comparação aos vírus coletados após 24 h (lote 3), optamos por realizar a coleta apenas em 24 horas para os próximos lotes. Os últimos lotes (5, 6 e 7) foram produzidos para definir a melhor proporção de RNA e lipídio no complexo de transfecção.

Os cultivos infectados com 100 μ L de rSFV-GFP dos lotes 5, 6 e 7 foram analisados por citometria de fluxo, apresentando respectivamente 14,5%, 24% e 29% de células fluorescentes em 24 horas após a infecção (Figura 6). Com 48 horas de infecção, todos os cultivos apresentaram menores taxas de células GFP-positivas.

Com base nesses resultados, definimos como o melhor procedimento de obtenção do rSFV-GFP pela transfecção com reagente lipídico, aquele utilizado para a produção e armazenamento do lote 7. Sua diferença principal em relação ao lote 6, que apresentou resultados semelhantes, é a utilização de uma maior proporção de RNA em relação ao lipídio. Esse protocolo é mais acessível que o utilizado para a produção do lote 6, pois necessita de menor quantidade de lipídio por transfecção, um reagente que possui alto custo.

Figura 6- Avaliação dos lotes de SFV obtidos por kit de transfecção



Células BHK-21 foram infectadas com 100 μ L de rSFV-GFP de três lotes diferentes obtidos por transfecção com reagente lipídico e a porcentagem de células fluorescentes foi determinada por citometria de fluxo em 24 e 48 horas após a infecção.

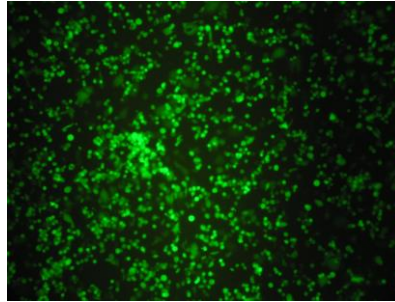
4.1.2 Eletroporação

O método de transfecção por eletroporação (KARLSSON; LILJESTROM, 2003) necessitou de algumas alterações devido à diferença existente entre o eletroporador descrito no método e o adquirido por nosso laboratório. Foram obtidos três lotes de rSFV-GFP (lotes 8, 9 e 10) pela transfecção de 10 μ g de RNA por eletroporação, sendo posteriormente armazenados a -80 °C.

Os lotes obtidos por eletroporação, quando utilizados para infectar 3×10^5 células BHK-21 nas mesmas condições testadas anteriormente (100 μ L de suspensão em 24 horas), apresentaram taxas de infecção visivelmente superiores às obtidas pelos lotes de vírus obtidos

por transfecção com reagente lipídico (Figura 7), sendo determinada uma quantidade de 80% de células fluorescentes por citometria de fluxo.

Figura 7- Células BHK-21 infectadas com 100 μ L de rSFV-GFP (lote 8), após 24 horas.



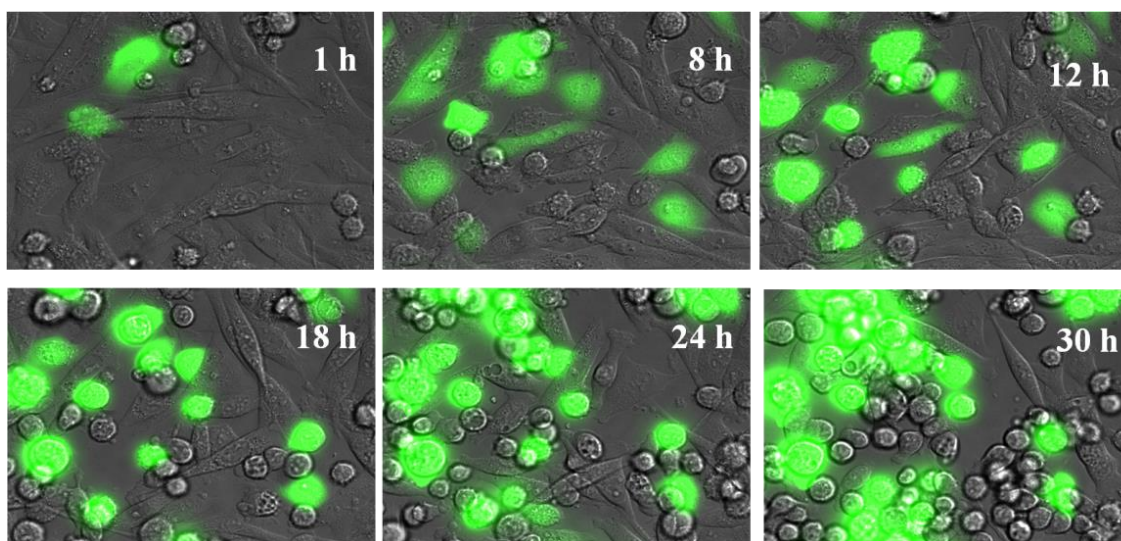
Análise da expressão de GFP por microscopia de fluorescência. Células BHK-21 foram infectadas com 100 μ L de rSFV-GFP (lote 8) e visualizadas após 24 horas. Cultivo (100x) apresentando 80% de células infectadas, conforme determinado em paralelo por citometria de fluxo.

4.2 Cinética de expressão de GFP

Uma alíquota de rSFV-GFP (lote 7) foi utilizada na infecção de células BHK-21 a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 10, para avaliação da cinética de expressão de GFP por 30 horas (Figura 8).

Com base nas imagens, podemos observar que os primeiros sinais da expressão da GFP foram detectados após 1 hora de infecção. Durante o período de incubação foi evidenciado um aumento no número de células fluorescentes até 30 horas após a infecção e um descolamento progressivo das mesmas.

Figura 8- Cinética de expressão de GFP em células BHK-21 infectadas com 10 MOI de rSFV-GFP (lote 7).

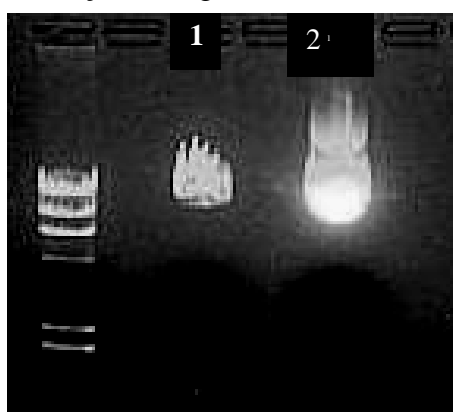


As células foram incubadas em câmara de CO₂ acoplada ao microscópio de fluorescência. As imagens foram obtidas automaticamente, sendo mantidos o campo de observação e o aumento (400x).

4.3 Padronização da qRT-PCR

Após a padronização dos procedimentos de biologia molecular e transfecção aplicados à obtenção de partículas rSFV-GFP, passamos aos estudos para a padronização da titulação de partículas rSFV por qRT-PCR. Para isso, após a linearização do pSFV-RVGP foi feita uma eletroforese em gel de agarose 0,8% para confirmar a digestão enzimática (Figura 9)

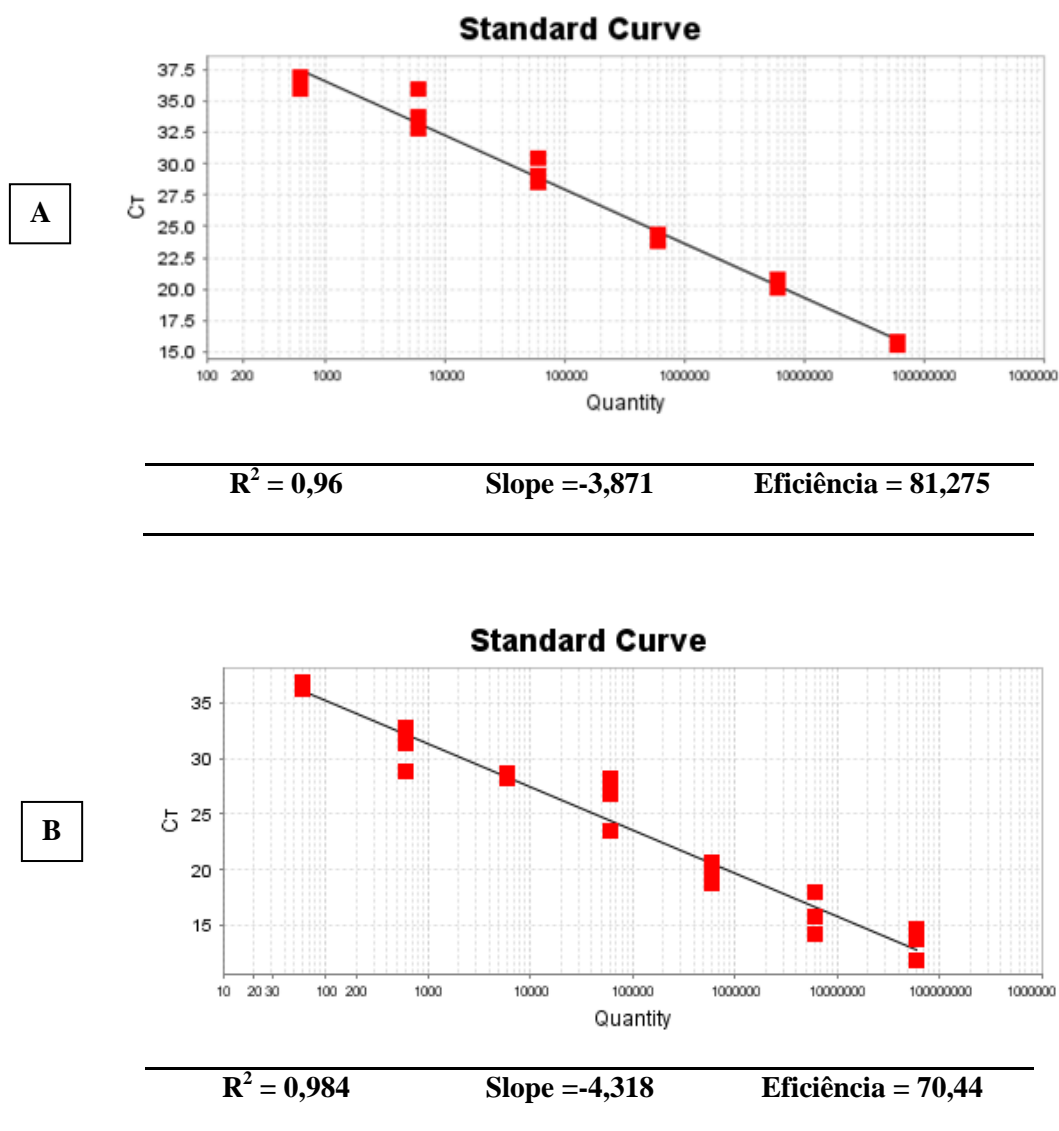
Figura 9- Confirmação da digestão enzimática do rSFV

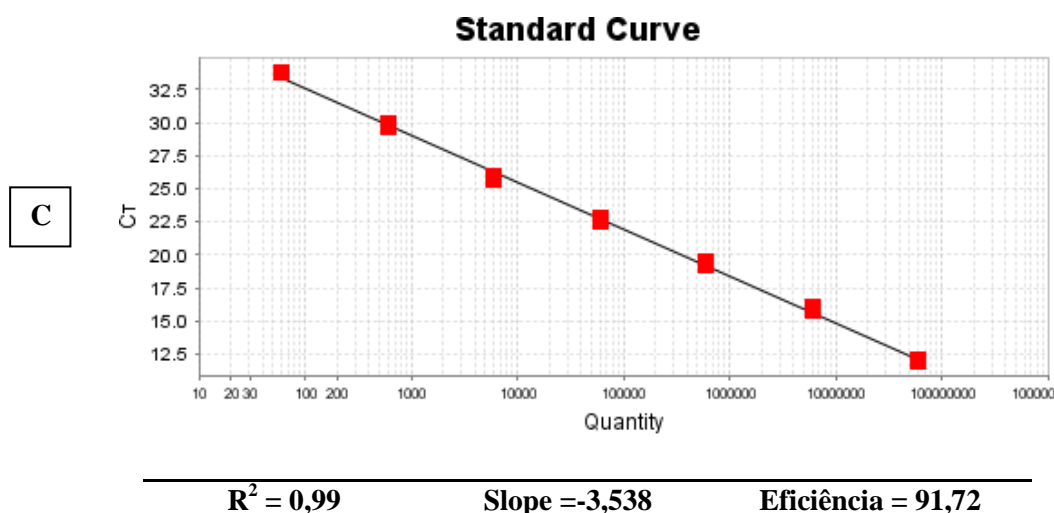


Eletroforese em gel de agarose 0,8% representativa da digestão enzimática.
1) plasmídeo pSFV-RVGP 2) digestão enzimática do pSFV-RVGP.

Com a confirmação da digestão, foram feitas sete diluições do plasmídeo linearizado para a construção da curva padrão da qRT-PCR. A curva foi estabelecida entre as quantidades iniciais de 60 até 6×10^7 cópias. Por meio da amplificação em triplicatas de cada diluição da curva, foram avaliados os três conjuntos de primers sintetizados (Figura 10).

Figura 10- Curvas padrão obtidas por qPCR nos testes dos primers





Cada curva representa esquetivamente cada pares de primers: SFV 1 / SFV 2R (A); SFV 3 / SFV 4R (B) e F-I-2 / R-I-2 (C).

Quando foram utilizados os pares de primers SFV1 e SFV2R, SFV3 e SFV4R, os CTs de cada diluição da curva padrão foram detectados tardiamente (a amplificação do primeiro ponto ocorreu próximo ao 15^o ciclo em ambas as curvas) e não houve reprodutibilidade entre as triplicatas. Também não houve amplificação do padrão contendo 60 cópias quando utilizado o par SFV3, SFV4R. A curva obtida com o par de primers F-I-2 e R-I-2 (Figura 10, curva C) apresentou boa reprodutibilidade entre as replicatas, com um valor elevado de R², uma eficiência de cerca de 90% e o primeiro ponto contendo 6x10⁷ cópias foi detectado já no 12^o ciclo.

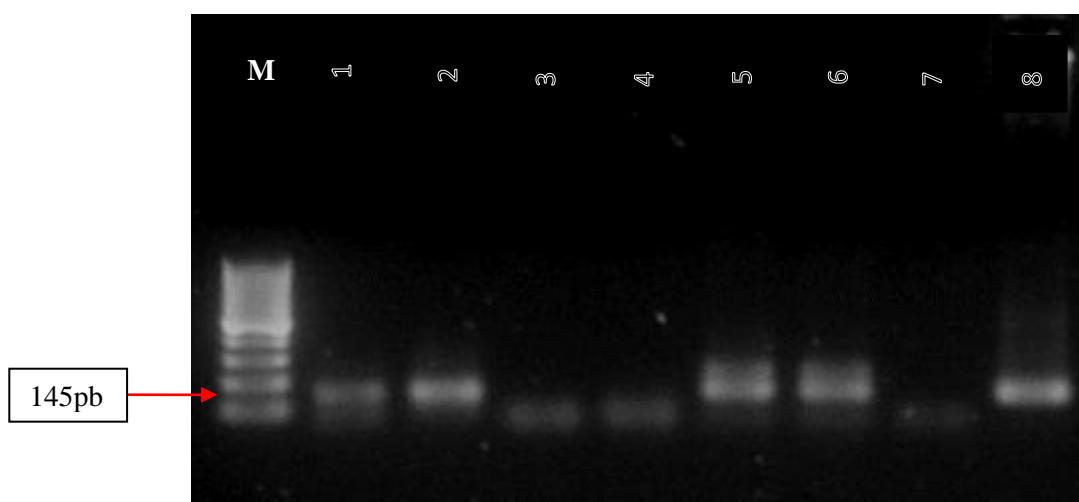
Dessa forma, optamos pelos pares de primers F-I-2 e R-I-2 para utilizar na quantificação dos rSFV por qRT-PCR. Com esse conjunto de primers, as curvas obtidas apresentaram os requisitos fundamentais para a construção de uma curva em qRT-PCR: Utilização de pelo menos 5 diluições do padrão, alta eficiência de amplificação e valor de R² = 0,99 (NOLAN et al., 2006).

A reprodutibilidade da qRT-PCR foi por fim avaliada através de uma série de amplificações de uma única amostra de cDNA obtida a partir de uma mistura de RNAs de rSFV. Essa amostra foi aplicada em nove replicatas, em cada uma de duas corridas independentes de PCR. Os desvios padrão médios encontrados foram de 0,23 ± 0,06 Ct entre corridas (*interassays*) e de 0,10 ± 0,06 Ct na mesma corrida (*intra-assays*). Esses dados indicam que o método padronizado demonstra boa reprodutibilidade, podendo ser utilizado para a análise da quantidade de RNA de rSFVs nas amostras pretendidas.

4.4 Titulação de SFV por qRT-PCR

Como os rSFV-GFP foram obtidos a partir da transfecção de RNA potencialmente contaminado com restos de DNA plasmidial, utilizado na etapa da transcrição *in vitro*, foi necessário realizar um tratamento com DNase das amostras de RNA viral extraído. Para certificar que o tratamento com DNase foi bem sucedido, amostras de cada RNA extraído a partir de um lote viral, desse mesmo RNA tratado com DNase, do cDNA obtido após a transcrição reversa, o controle negativo e o controle positivo foram submetidos a uma PCR convencional com os mesmos pares de primers utilizados para a padronização da curva de qPCR. Os fragmentos obtidos após a PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (Figura 11). Os fragmentos de amplificação do gene NSP3 do SFV, utilizando o par de primers F-I-2 e R-I-2 possuem 145 bp e podem ser visualizados entre as bandas de 100 bp e 200 bp. Nas amostras 2, 3 e 7, podemos ver a formação de bandas mais abaixo de 100 bp, recorrentes na amplificação feita na ausência de fita molde.

Figura 11- Resultado da PCR para avaliar as etapas de extração de RNA e obtenção de cDNA



Gel em agarose 1,5 % com os produtos da PCR-Nested;(M) Marcador de peso molecular (100bp) (1 e 2) RNA extraído das partículas virais; (3 e 4) RNA extraído tratado com DNase; (5 e 6) cDNAs; (7) Água; (8) pSFV-GFP (C+).

Após a confirmação do tratamento com DNase, os cDNAs obtidos após transcrição reversa das amostras de RNA dos rSFVs foram amplificados por qPCR juntamente com a curva padrão em 3 triplicatas. Os títulos virais dos lotes de rSFV-GFP de 6 a 10 foram determinados, atingindo valores entre $0,2 \times 10^3$ e 39×10^3 RNA/ μ L (Tabela 4).

Tabela 4. Títulos virais determinados por qRT-PCR

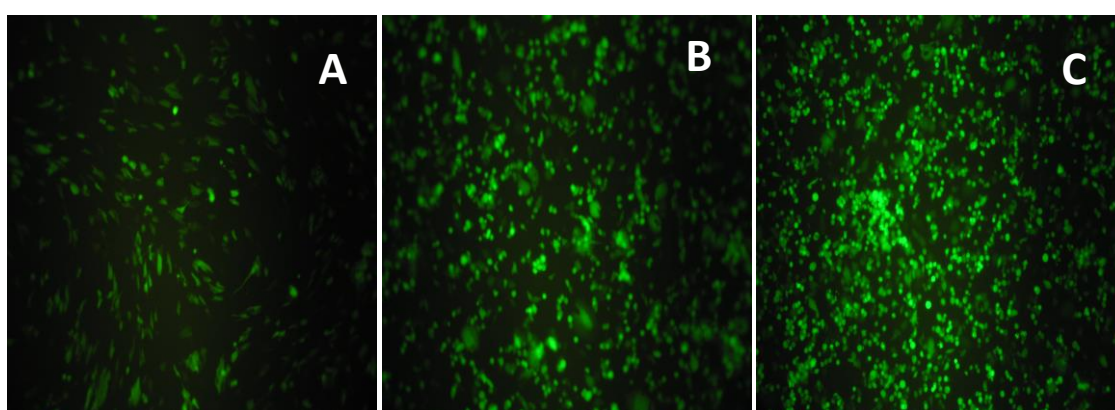
Lote	Título (cópias RNA/ μ L)	Origem
Lote 6	$0,2 \times 10^3$	Transmessenger
Lote 7	$4,8 \times 10^3$	Transmessenger
Lote 8	39×10^3	Eletroporação
Lote 9	$9,1 \times 10^3$	Eletroporação
Lote 10	$0,9 \times 10^3$	Eletroporação

*Os títulos foram determinados pela amplificação das amostras de cada lote em triplicatas.

4.5 Avaliação da correlação entre título viral e taxa de infecção

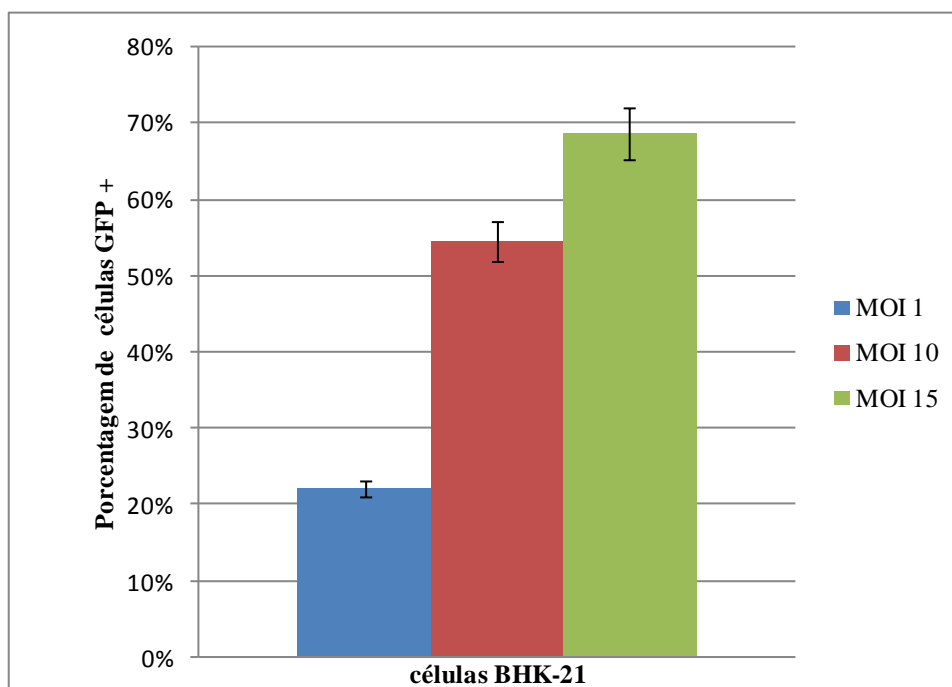
Assumindo que cada cópia de RNA corresponda a um vírus rSFV-GFP, foram realizadas duplicatas de infecções em culturas de BHK-21 em MOIs de 1, 10 e 15, utilizando um mesmo lote de rSFV-GFP. Devido ao esgotamento do lote 8, foi utilizado o lote 9 nesses experimentos. Após 24 horas de infecção, a quantidade de células infectadas foi visualizada por microscopia de fluorescência (Figura 12) e a porcentagem de células fluorescentes foi determinada por citometria de fluxo (Figura 13 e ANEXO I).

Figura 12- Análise por microscopia de fluorescência da expressão de GFP em células BHK-21, após 24 horas de infecção com diferentes MOI de rSFV-GFP (lote 9).



Células BHK-21 foram infectadas com rSFV-GFP lote 9, em MOI 1 (A), MOI 10 (B) e MOI 15 (C). As fotos foram tiradas em microscópio de fluorescência (x100).

Figura 13- Análise por citometria de fluxo da expressão de GFP em células BHK-21, após 24 horas de infecção com diferentes MOI de rSFV-GFP (lote 9),(Anexo I).



Células BHK-21 foram infectadas com rSFV-GFP (lote 9), em MOI 1, MOI 10, e MOI 15. Após 24 horas de infecção as culturas foram analisadas por citometria de fluxo. As médias foram consideradas diferentes entre si pela aplicação de teste T Student, com $p < 0,05$.

Para avaliar a correlação entre o título viral determinado por qRT-PCR e a quantidade de células infectadas, ou seja, entre a quantidade de RNA do rSFV utilizado para infectar uma cultura celular e a quantidade de células que apresentam a infecção, utilizamos diferentes lotes de rSFV-GFP (Tabela 6).

Tabela 5 - Avaliação da infecção de células BHK-21 com diferentes MOI.

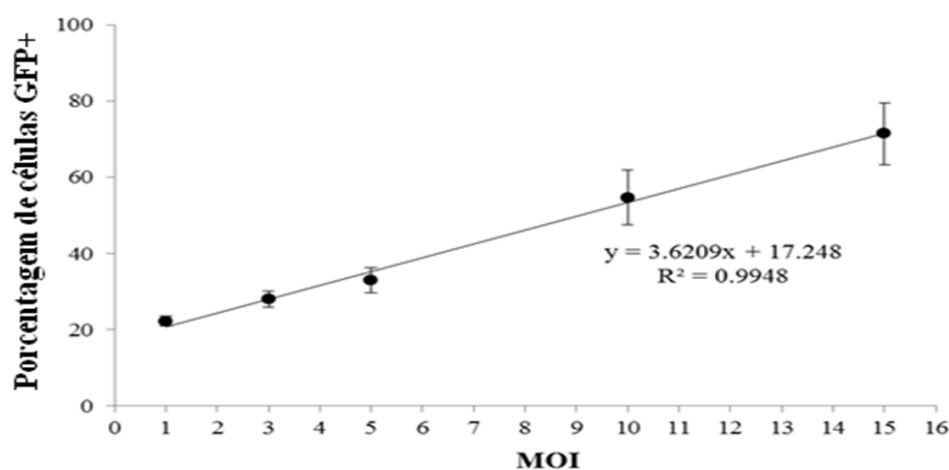
Ensaio	MOI	Células GFP+	lote
1	1	23,1%	9
2	1	21,3%	8
3	3	28%	7
4	3	24%	7

5	5	33%	7
6	10	54,4%	9
7	10	55,0 %	9
8	10	45,9%	10
9	15	65,7%	9
10	15	77,2%	9

*Quando realizados com lotes e MOIs iguais, os ensaios foram realizados em dias diferentes.

A análise dos dados revela que quando diferentes lotes de rSFV-GFP foram utilizados para a infecção de células BHK-21 em MOIs iguais (MOIs 1 e 10), as quantidades de células fluorescentes (infectadas) foram muito semelhantes, com coeficiente de variação médio de 9,46 % para as células infectadas com MOI 10. A análise estatística (T Student) dos dados não demonstrou diferença significativa entre as infecções realizadas com MOI 1 e 3 ($p = 0.112$). Porém foi encontrada diferença entre os MOI 3 e 10 ($p = 0.020$) e entre MOI 10 e 15 ($p = 0.029$). Essa relação (Figura 14) comprova que o título viral determinado por qRT-PCR pode ser utilizado para realizar os cálculos do volume de suspensão viral necessário pra a infecção de uma determinada cultura celular, no MOI desejado.

Figura 14- Correlação entre MOI utilizado para infecção e porcentagem de células infectadas (GFP+)



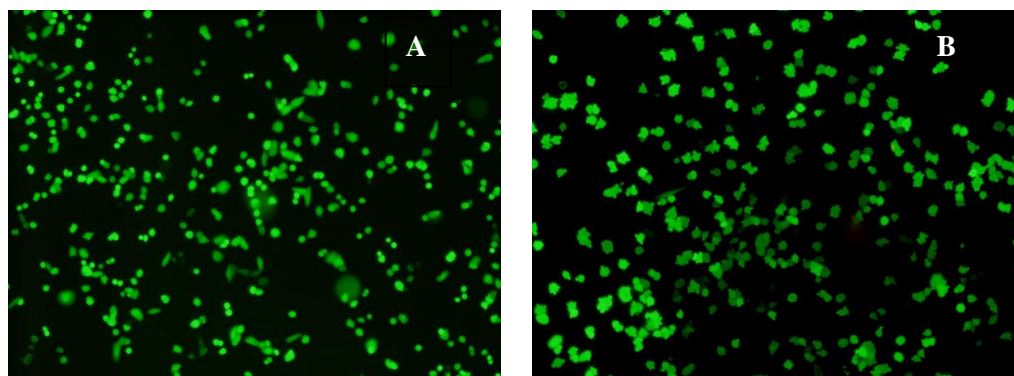
Células BHK-21 foram infectadas com três lotes de rSFV-GFP utilizando diferentes MOI por 24 horas. As porcentagens de células fluorescentes (GFP+) foram determinadas por citometria de fluxo. Os dados mostram a média de fluorescência e o desvio padrão (●). Os coeficientes de variação foram 5,7 %, 7,5 %, 9,6 %, 13,1 % e 11,4%, referentes aos MOIs 1, 3, 5, 10 e 15, respectivamente.

Com base nesses dados, a infecção com rSFV-GFP em MOIs maiores é necessária para que 100% das células sejam infectadas e expressem a proteína. Pela equação da reta de correlação (Figura 14) entre MOI e fluorescência, isso deve ocorrer com a utilização de MOI com valor de 23.

4.6 Análise de expressão em outras linhagens celulares

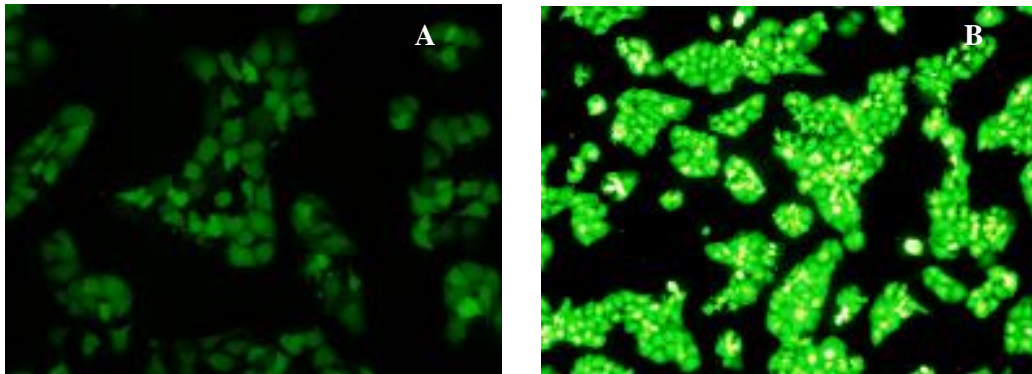
A capacidade do SFV em infectar diferentes tipos celulares constitui uma das características importantes desse sistema, pois abre a possibilidade de sua utilização para diferentes aplicações. Porém, a padronização de uma condição de infecção definindo MOI e tempo após a infecção para a coleta do produto de interesse, ou medição da expressão, em geral não é transponível de um tipo celular a outro. Logo, é necessário realizar um estudo de infecção e produção recombinante para cada célula-alvo de interesse. Por esse motivo, foi avaliada por microscopia (Figuras 15 a 18) e citometria de fluxo (Figura 19), a capacidade do vetor viral rSFV-GFP em infectar e expressar GFP em algumas das linhagens celulares presentes em nosso laboratório, pela medida da porcentagem de células fluorescentes.

Figura 15- Microscopia de fluorescência da expressão de GFP em células L929



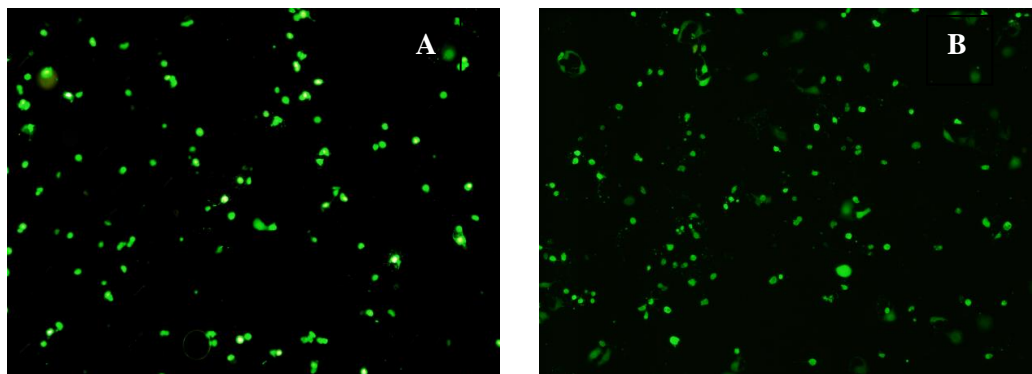
Células L929 infectadas com rSFV-GFP em MOI 1 (A) ou MOI 10 (B). Imagens (100X) mostram a expressão da GFP monitorada por microscopia de fluorescência após 24 h de infecção.

Figura 16- Microscopia de fluorescência da expressão de GFP em células Huh-7



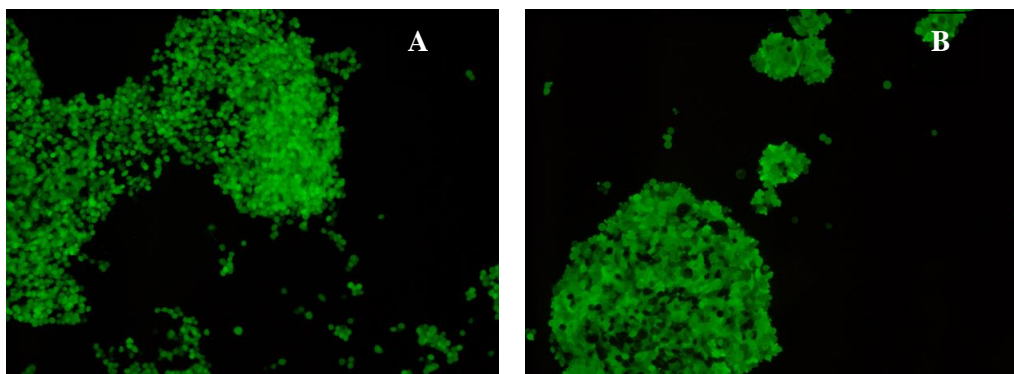
Células Huh-7 infectadas com rSFV-GFP em MOI 1 (A) ou MOI 10 (B). Imagens (200X) mostram a expressão da GFP monitorada por microscopia de fluorescência após 24 h de infecção

Figura 17- Microscopia de fluorescência da expressão de GFP em células VERO



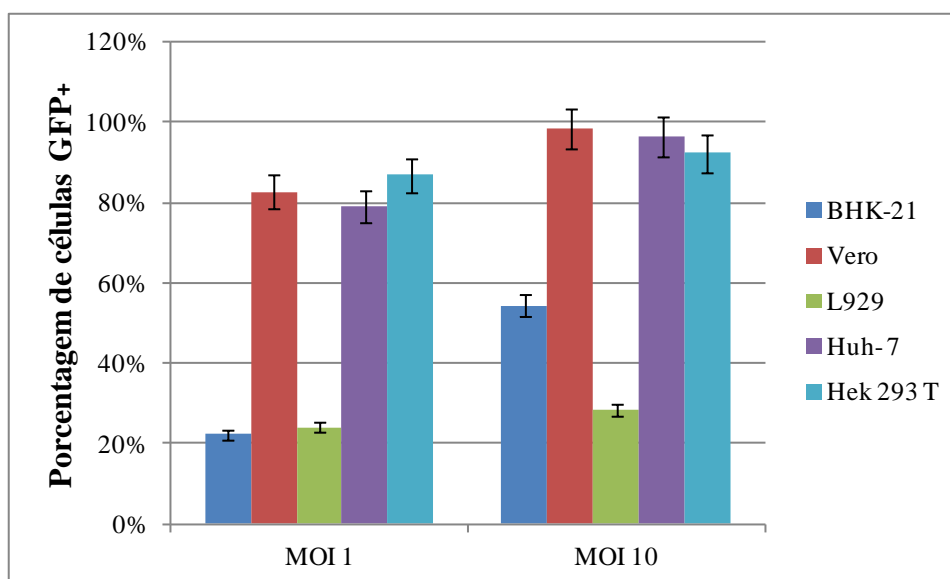
Células VERO infectadas com rSFV-GFP em MOI 1 (A) ou MOI 10 (B). Imagens (100 X) mostram a expressão da GFP monitorada por microscopia de fluorescência após 24 h de infecção.

Figura 18- Microscopia de fluorescência da expressão de GFP em células Hek293T



Células HEK293T infectadas com rSFV-GFP em MOI 1 (A) ou MOI 10 (B). Imagens (100 X) mostram a expressão da GFP monitorada por microscopia de fluorescência após 24 h de infecção.

Figura 19- Porcentagem de células expressando GFP em diferentes linhagens celulares infectadas com rSFV-GFP.



Com base na porcentagem de células expressando GFP, foi observado que as linhagens de células VERO, Hek293T e Huh-7 apresentaram semelhantes quantidades de células fluorescentes em comparação às outras linhagens. Todas elas quando infectadas com MOI 1 apresentaram cerca de 80% de células fluorescentes. Ao serem infectadas com MOI 10, cerca de 100% das células apresentaram expressão de GFP.

As células L929 não apresentaram um aumento significativo na quantidade de células fluorescentes quando foram utilizados MOIs maiores, tendo em média $27,23\% \pm 3,41$ de células fluorescentes, o que pode ser observado também nas imagens (Figura 14).

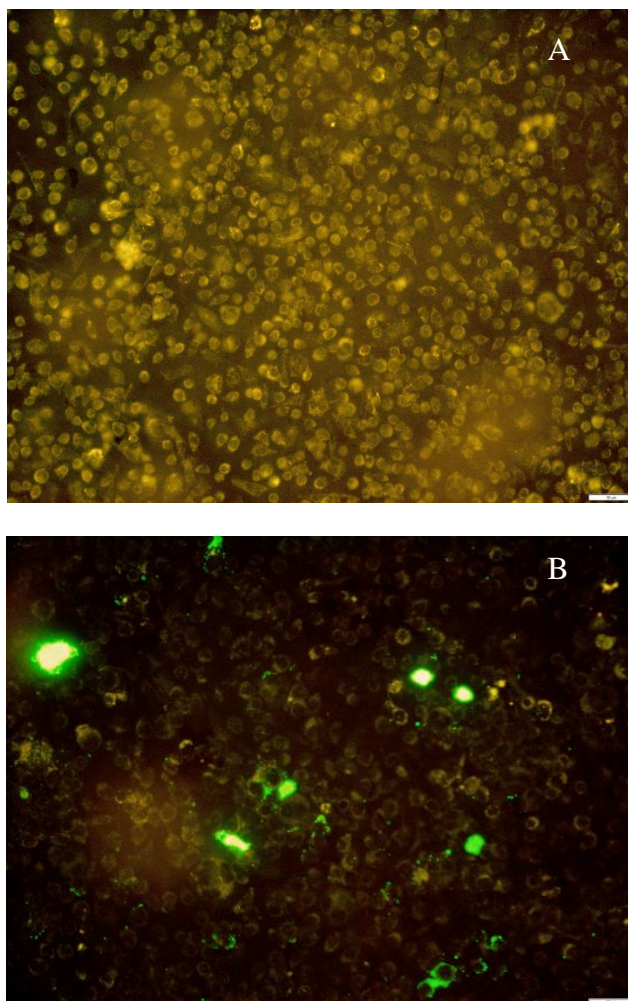
Nesse experimento, as células BHK-21 foram infectadas como controle positivo de expressão e análise por citometria de fluxo e apresentaram padrão de infecção com taxas semelhantes aos valores apresentados anteriormente (Tabela 5).

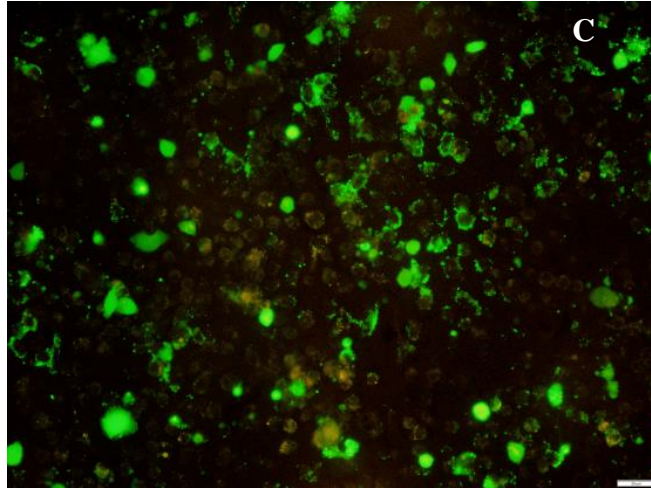
Por fim, as células de inseto Sf-21 não apresentaram fluorescência, o que sugere que não foram infectadas pelo SFV, ou que a maquinaria genética do SFV não foi capaz de atuar no interior dessa célula.

4.7 Expressão de GFP em células IC-21 (linhagem macrofágica murina)

Para avaliar a capacidade do rSFV de infectar ou ser fagocitado por células da linhagem macrofágica murina IC-21 em cultura estabelecida, foi realizado um ensaio de infecção com rSFV-GFP ativado e não ativado utilizando os MOI 1 e MOI 10. Após 24 horas foram obtidas imagens de microscopia de fluorescência (Figura 20).

Figura 20- Avaliação de expressão de GFP em células IC-21 infectadas com vírus ativados e não ativados





Avaliação de expressão de GFP em células IC-21 infectadas com vírus ativados e não ativados, A) rSFV-GFP não ativado e falsa infecção com MOI 10; B) rSFV-GFP ativado e infecção com MOI 1; C) rSFV-GFP ativado e infecção com MOI 10.

Com base nas imagens obtidas, podemos observar que o cultivo que recebeu rSFV-GFP não ativado não foi infectado e não expressou GFP. Já nos cultivos que receberam rSFV-GFP ativado nos MOI 1 e 10, podemos observar um aumento significativo na quantidade de células fluorescentes e na intensidade da fluorescência ao utilizar MOI mais elevado.

5 DISCUSSÃO

Para que pudéssemos produzir e utilizar o sistema rSFV de maneira eficiente, uma série de padronizações de procedimentos de biologia molecular foi realizada. Para isso construímos um rSFV carregando o gene da GFP (rSFV-GFP), por ser este um gene em que a expressão é facilmente detectada e que permite métodos indiretos de quantificação da expressão, como a citometria de fluxo e a microscopia de fluorescência.

A etapa de padronização para a obtenção de um eficiente vetor rSFV-GFP foi muito laboriosa. A partir da transferência da tecnologia da Universidade de Strasbourg, foi necessária uma adaptação dos métodos para a obtenção do vetor. Após a realização da transcrição *in vitro*, o RNA obtido era pouco estável, ocorrendo sua rápida degradação. Com isso, foi observada a necessidade de que a etapa de transcrição e transfecção fossem realizadas no mesmo dia.

Alguns testes foram necessários na escolha da melhor condição de transfecção quando utilizamos o reagente lipídico. Além disso, para testar a estabilidade das partículas virais, estas foram armazenadas a -20 °C ou -80 °C por mais de um ano. Quando os níveis de expressão de GFP foram comparados, as amostras armazenadas a -20 °C apresentaram uma redução na expressão devido à degradação das partículas, com isso optamos por estocá-las a -80 °C.

O método já descrito de transfecção por eletroporação (KARLSSON; LILJESTROM, 2003) quando finalmente tornou-se acessível, necessitou de algumas alterações devido à diferença existente entre eletroporadores. As partículas obtidas por esse método de transfecção apresentaram alta infectividade e expressão de GFP. Ao comparar os títulos de cada lote, foi observada uma variação considerável (Tabela 5). Isso revela que é necessária uma padronização mais extensa da transfecção por eletroporação para a obtenção de lotes de vírus com concentrações mais próximas. Por outro lado, esse dado reforça a necessidade de um método preciso de titulação viral para adequar o volume de vírus necessário a cada infecção. Uma etapa de concentração do lote viral pode ser necessária para que infecções com MOI de 50 a 100 possam ser realizadas, afim de que 100% das células BHK-21 em cultura sejam infectadas.

Ao comparar os títulos virais obtidos entre os dois métodos de transfecção (Tabela 5), o método de eletroporação em geral produziu suspensões de partículas virais com títulos maiores e, por ser um método mais econômico, foi determinado como o mais adequado para a produção das partículas de rSFV-GFP.

Após a padronização dos procedimentos de biologia molecular e transfecção aplicados à obtenção de partículas rSFV-GFP, passamos aos estudos para a padronização da titulação de partículas rSFV por qRT-PCR.

O método de titulação das partículas de rSFV por qRT-PCR foi proposto neste trabalho, devido a alguns fatores já abordados para a titulação de vetores virais por qPCR. Quando utilizada para a titulação de partículas recombinantes de baculovírus, por exemplo, o método gerou economia de material e principalmente de tempo para a determinação do título. Além disso, um método universal para a titulação de diferentes construções do mesmo vetor viral é muito vantajoso, pois não demanda nova padronização a cada vírus recombinante construído (HICHTMAN et al., 2007). De fato, o método de qRT-PCR, desde que bem padronizado, como neste trabalho, é um dos mais precisos para fins de titulação viral. As técnicas tradicionais de titulação do SFV (titulação em placa e citometria de fluxo) apresentam diversas imprecisões, desde subjetividade na avaliação da infecção até diferenças na eficiência da marcação por anticorpos. Já a qRT-PCR nos dá um resultado mais seguro, podendo prever, com base no número de cópias do SFV-RNA utilizado em uma infecção, os possíveis resultados em termos de número de células infectadas (Figura 14).

Durante o desenvolvimento do método de qRT-PCR, alguns testes foram necessários e algumas dificuldades foram superadas. Três pares de *primers* foram propostos. Esses *primers* foram testados em uma série de amplificações, de diluições do plasmídeo pSFV linear ou de amostras de vírus, até a definição do melhor par (F-I-2 e R-I-2). Após a extração do RNA das amostras de rSFV e sua quantificação, deparamos com o desafio de remoção do DNA contaminante das amostras. Nesse processo era fundamental que o tratamento com DNase fosse eficiente para que não obtivéssemos falsos títulos virais. Foram testadas DNases de dois fornecedores distintos, em diversos protocolos, até a definição da melhor condição de trabalho seção(3.11).

Por fim, a padronização da qRT-PCR para a titulação de diferentes construções de rSFV foi realizada com sucesso, o que foi demonstrado pelas propriedades das curvas de quantificação (com uma inclinação entre -3.3 e -3.8 e R^2 de 0.99) e de sua reprodutibilidade. Além disso, a variação na amplificação de amostras extraídas de um mesmo lote viral (variação intra-ensaio) foi pequena (0.10 ± 0.06) (PUGLIA et al., 2013). Esses dados em conjunto estão de acordo com as recomendações para o estabelecimento de uma metodologia de quantificação por qRT-PCR (NOLAN et al., 2006).

Na avaliação da expressão de GFP em células BHK-21 utilizando diferentes MOI (Tabela 6), observamos que entre os ensaios 6, 7 e 8, em que foi utilizado MOI 10 em dias diferentes de ensaio, a porcentagem de células fluorescentes após 24 h de infecção foi muito próxima, obtendo uma média de fluorescência de 51,7%. Esse dado reforça que o MOI pode ser calculado com base no título viral obtido pela quantificação por qRT-PCR, pois os resultados em termos de expressão (quantidade de células fluorescentes) são muito semelhantes, mesmo quando são utilizados diferentes lotes de rSFVs ou para utilizações com a diferença de alguns dias.

Quando culturas de BHK-21 foram infectadas com os lotes produzidos por eletroporação e a expressão da GFP analisada por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo, ficou evidente o aumento da proporção de células expressando GFP ao comparar os MOI 1, 10 e 15 (Tabela 6 e Figura 13). Também pode ser observado que o aumento do MOI e a porcentagem de células fluorescentes alteram o aspecto do cultivo celular. Na imagem de MOI 1 (Figura 12), poucas células estão expressando GFP, e ainda se apresentam aderentes, mas à medida que se aumenta o MOI, algumas células se soltam da placa e tomam forma arredondada, o que pode ser devido à indução de apoptose, característica da infecção por SFV (URBAN et al., 2008).

Um sistema de expressão baseado na construção de um baculovírus não replicativo, expressando EGFP, apresentou resultados semelhantes aos de nosso estudo. Ao infectar células de insetos com MOI de 5, 10, 25, 50 e 100, e analisar a expressão por citometria de fluxo, foram obtidos respectivamente 39, 51, 73, 85 e 100% de células fluorescentes após 36 horas de infecção (DUNG-FANG-LEE et al., 2000).

Nossos dados apontam que a utilização de rSFV-GFP poderá infectar 100% das células BHK-21 quando utilizado MOI de 23 (Figura 14). Embora fosse razoável esperar que a um MOI de 10, pela aplicação da probabilidade definida pela distribuição de Poisson (probabilidade de um determinado número de eventos ocorrer em um intervalo fixo de tempo ou espaço), praticamente 99,95% das células seriam infectadas com pelo menos uma partícula de rSFV-GFP ou do baculovírus do exemplo acima, fica claro que quando se trata de utilizar um vetor viral não replicativo e cuja determinação de eficácia da transdução depende da expressão de uma proteína recombinante, quantidades maiores do vetor podem ser necessárias para garantir que, efetivamente, cada célula presente na cultura expresse a proteína de interesse.

Quando as células BHK-21 foram submetidas a um ensaio cinético de infecção a MOI 10, observamos o aparecimento de células fluorescentes em apenas uma hora após a introdução do vírus (Figura 8). Isso demonstra o grande potencial da utilização da GFP como ferramenta para avaliar esse sistema. Por outro lado, esse rápido acúmulo de GFP no citoplasma das células, até o ponto em que a fluorescência se torne detectável tão precocemente, também comprova a rápida multiplicação do RNA da GFP dentro das células, através do mecanismo de produção do RNA negativo molde e da atividade neste, do promotor SP6 subgenômico que, reconhecido pela RNA polimerase viral, leva à expressão da proteína.

Nessa cinética de expressão também podemos observar claramente que à medida que as células expressam a proteína, a intensidade da fluorescência aumenta e algumas células se descolam da placa. O fato das células infectadas começarem a apresentar fluorescência com muita diferença de tempos pós-infecção deve-se provavelmente à diferente quantidade de vírus com que cada célula foi infectada, uma vez que o rSFV-GFP não é capaz de se replicar.

Ao analisar a expressão de GFP em diferentes linhagens celulares (Figuras 15 a 18), houve uma diferença de infecção e produção da GFP entre elas, o que pode indicar a existência de diferença na permissibilidade à infecção viral pelo SFV. Isso é aceitável na medida em que a superfície externa da membrana plasmática possui diferentes padrões bioquímicos entre linhagens celulares, portanto diferente composição de receptores. Com base nos resultados, podemos considerar as células VERO, Huh-7 e Hek 293 T como eficientes quanto a expressão de GFP através do sistema baseado no SFV, alcançando altos níveis de fluorescência mesmo com MOI mais baixos (MOI 1).

Embora na literatura alguns estudos afirmem que células de insetos são passíveis de serem infectadas por SFV, as células Sf-21 utilizadas neste trabalho não apresentaram fluorescência, sugerindo que não foram infectadas pelo rSFV-GFP. Esse dado está de acordo com os resultados de PETTIGREW, et al 1999, em que as células S2 e Sf-9 foram incapazes de serem infectadas com um rSFV. Nesse estudo, apenas as linhagens de células de insetos Aa23T, C6/36, MOS55 e MOS20 foram infectadas com rSFV utilizando MOI 3 e apresentaram sinais de fluorescência observados por microscopia. Caso seja do interesse futuro de nosso laboratório a expressão de proteínas recombinantes em células de inseto, pela infecção com SFV, essas células podem ser testadas.

Em pelo menos outro estudo células L929 e BHK-21 foram infectadas com rSFV nos MOI de 1, 10 e 100 para a expressão de INF- β . Foi observado que as células BHK-21 não apresentaram diferenças significativas de expressão entre os MOIs. As células L929 infectadas nos MOIs de 10 e 100 apresentaram expressão de níveis maiores de INF- β . Esses dados diferem dos nossos resultados de expressão da GFP, em que a expressão em BHK-21 foi mais elevada e com diferença entre os MOIs. Essa diferença pode estar relacionada ao tipo de proteína expressa, padrão de glicosilação e à susceptibilidade à infecção diferenciada entre as linhagens de células de cada laboratório (QUINN et al., 2008).

Comumente o sistema de expressão de proteínas por rSFV envolve o uso de células BHK-21. Com base nos dados apresentados, a utilização de outras células para expressão de proteínas por esse sistema merece ser estudada a fim de alcançar maiores níveis de proteína. Adicionalmente, estudos futuros sobre a etapa do ciclo celular das células no momento da infecção, abordagens de sincronização celular e mesmo o estudo da apoptose induzida após a infecção, poderão esclarecer melhor as diferenças entre as proporções de células infectadas.

Os experimentos envolvendo a infecção de células IC-21 por rSFV-GFP realizados nesse trabalho fazem parte de outro estudo conduzido no laboratório em que se avalia o sistema rSFV como vetor de imunização contra raiva (rSFV-RVGP). Nesse estudo, camundongos foram eficientemente imunizados contra o vírus da raiva (dados não publicados), após receberem injeções intraperitoneais do vírus recombinante. Para responder à questão sobre se os macrófagos murinos poderiam ser infectados pelos rSFV, culturas de células da linhagem IC-21 foram infectadas com rSFV-GFP. Os resultados demonstraram que os macrófagos murinos podem ser alvo da expressão do antígeno de interesse após a

imunização intraperitoneal, através de infecção ativa e expressão da GFP. Por outro lado, quando os vírus estão inativos, a expressão da GFP não é detectada, evidenciando que as partículas ativadas entraram nos macrófagos por mecanismos de infecção próprios do vírus.

6 CONCLUSÃO

- Partículas de rSFV-GFP foram obtidas com sucesso. Quando utilizadas para a infecção de células BHK-21, foram capazes de desenvolver altos níveis de fluorescência, visíveis por microscopia e analisados por citometria de fluxo.
- A eletroporação demonstrou ser o melhor método de transfecção para obtenção do rSFV-GFP. Esses vírus foram eficientes para a infecção e apresentaram em geral títulos mais altos que os obtidos por transfecção com reagente lipídico.
- A metodologia da qRT-PCR para titulação de diversas construções do rSFV foi padronizada com sucesso.
- Lotes de rSFV-GFP titulados por qRT-PCR, quando utilizados para a infecção de células BHK-21 nos mesmos MOIs, produziram porcentagens semelhantes de células fluorescentes (infectadas), demonstrando que há uma correlação entre a quantidade de RNA do rSFV utilizada para a infecção e a taxa de infecção obtida.
- Ensaios com células BHK-21 e rSFV-GFP demonstraram que são necessários MOIs elevados para alcançar grandes quantidades dessas células infectadas.
- Ao comparar as proporções de células infectadas pelo rSFV-GFP em diferentes linhagens celulares, utilizando MOIs iguais, constatamos que cada linhagem celular responde diferentemente à infecção pelo sistema SFV. As linhagens VERO, HEK 293 T e Huh-7 apresentaram altas taxas de células expressando GFP quando infectadas com MOI 1, podendo ser utilizadas para expressão de proteínas através do sistema de rSFV.

REFERÊNCIAS*

ANSORENA, E., et al. A simple and efficient method for the production of human glycosylated glial cell line-derived neurotrophic factor using a Semliki Forest virus expression system. **Int J Pharm.**, v.2, p.19-26, 2013.

BALDI, L., et al. Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. **Biotechnol Letters.**, v. 29, p. 677-684, 2007.

BARRY, G., et al. Semliki forest virus-induced endoplasmic reticulum stress accelerates apoptotic death of mammalian cells. **J Virol.**, v.84, p7369-77, 2010.

BENMAAMAR, R, et al. High-level expression of rabies virus glycoprotein with the RNA-based Semliki Forest Virus expression vector. **J Biotechnol.**, v. 23, p.283-90, 2009.

BLASEY, H, D, et al., Large scale transient 5-HT₃ receptor production with the Semliki Forest Virus Expression System. **Cytotechnol.**, v.32, p. 199-208, 2000.

BOLLATI-FOGOLIN, M., COMINI, M. A. Clonagem e expressão de proteínas heterólogas em células animais In: Moraes A. M.; Augusto, E.F. P; Castilho L. R. **Tecnologia do Cultivos de Células Animais de Biofármacos a Terapia Gênica.**, 1 ed. Brasil: Editora Roca. cap. 3. p. 48-52, 2008.

BUTLER, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v.68, p.283–291, 2005.

CASALES, E, et al. A novel system for the production of high levels of functional human therapeutic proteins in stable cells with a Semliki Forest virus noncytopathic vector. **N. Biotechnol.**, v.27, p.138-48, 2010.

CHALFIE, M. The uses of Green Fluorescent protein in mammalian cells. In: CHALFIE, M. **Green fluorescent protein| properties, applications and protocols.** Agilent Technologies, 2nd Ed., Cap. 14. P. 305, 2006.

CHIARINI, E. B. et al. Extração, purificação e caracterização físico-química da proteína verde fluorescente recombinante (GFPuv) expressa em Escherichia coli. **Rev Bras Cienc Farm.**, v. 39, n. 4, 2003.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências, elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

DUNG-FANG, LEE., et al. A Baculovirus Superinfection System: Efficient Vehicle for Gene Transfer into *Drosophila* S2 Cells. **J Virol.**, v.74, p. 11873–11880, 2000.

EIFLER, N., et al. Functional expression of mammalian receptors and membrane channels in different cells. **J Struct Biol.**, v. 159, p. 179-9, 2007.

HARDY, P. A., et al. Recombinant Semliki forest virus infects and kills human prostate cancer cell lines and prostatic duct epithelial cells ex vivo. **Int J Mol Med.**, v. 5, p.241-5, 2000.

HITCHMAN, R. B., SIATERLI, E. A., NIXON, C.P., KING, L.A. Quantitative real-time PCR for rapid and accurate titration of recombinant baculovirus particles. **Biotechnol Bioeng.**, v. 96, p. 810-4, 2007.

ILARDUYA, C. T., et al. Gene delivery by lipoplex and polyplexes. **Euro J of Pharma Scie.**, v. 40, p. 159-170, 2010.

KARLSSON- GUNILLA, B., LILJESTROM P., Live viral vectors: Semliki Forest Virus. In: ROBINSON, A., HUDSON, M. J., CRANAGE, M. P. **Methods in molecular medicine: vaccine protocols.**, New Jersey: Humana Press, 2003. v. 20, p. 69-82.

KAY, M. A., et al. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. **Nature M.**, v.7,p. 33-40, 2001.

KLIMPI, A. H., et al. Activation of peritoneal cells upon in vivo transfection with a recombinant alphavirus expressing GM-CSF. **Gen Ther.**, v. 8, p.300-7, 2001.

LI, Z. J., et al. Corpus callosum: a favorable target for rSFV mediated gene transfer to rat brain with broad and efficient expression. **J Mol Neurosci.**, v. 42, p. 255-260, 2010.

LILJESTROM, P., GARROF, H. A new generation of animal cell expression vectors based on the SemlikiFores Virus replicon. **Biotechnology**, v.9, p.1356-61, 1991.

LILJESTROM, P., LUSA, S., HUYLEBROECK, D., GAROFF, H. In vitro mutagenesis of a full-length cDNA clone of Semliki Forest Virus: the small molecular-weight membrane protein modulates virus release. **J Virol.**, v.65, p. 4107-4113, 1991.

-
- LO, H.R., CHAO, Y.C. Rapid titer determination of baculovirus by quantitative real-time polymerase chain reaction. **Biotechnol Prog.**, v. 20, p. 354-360, 2004.
- LUNDSTROM, K., et al. Semliki Forest virus vectors: efficient vehicles for in vitro and in vivo gene delivery. **FEBS Lett.**, V. 504, p. 99-103, 2001.
- LUNDSTROM, K., Semliki Forest virus vectors for rapid and high-level expression of integral membrane proteins. **Biochim Biophys Acta.**, v.16,10 p.90-96, 2003.
- LUNDSTROM, K. Structural genomics on membrane proteins: the MePNet approach. **Curr Opin Drug Discov Devel.**, v.7, p.342-346, 2004.
- LUNDSTROM, K. Alphaviruses in Gene Therapy. **Viruses**, v. 1, p.13-25, 2009.
- MORRIS-DOWNES, M. M., et al. Semliki Forest virus-based vaccines: persistence, distribution and pathological analysis in two animal systems. **Vaccine.**, v. 19, p. 1978-88, 2001.
- MURPHY, A. M., et al. Inhibition of human lung carcinoma cell growth by apoptosis induction using Semliki Forest virus recombinant particles. **Gene Ther.**, v.7, p. 1477-1482, 2000.
- NETTLESHIP, J. et al. Recent advances in the production of proteins in insect and mammalian cells for structural biology. **J of Stru Biol.**, v. 172, p. 55-65, 2010.
- NOLAN, T., HANDS, R. E., BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nat Protoc.**, v.1, p. 1559-1582, 2006.
- PETTIGREW, M. M., O'NEILL, S. L. Semliki Forest virus as an expression vector in insect cell lines. **Insect Mol Biol.**, v. 8, p. 409-414, 1999.
- PFAFFL, M. W., HAGELEIT, M. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. **Biotech Let.**, v.23, p.275-282, 2001.

-
- PLAUTZ, J. D., et al. Green fluorescent protein and its derivatives as versatile markers for gene expression in living *Drosophila melanogaster*, plant and mammalian cells. **Gene**, v. 173, p. 83-87, 1996.
- POTTER, H.; HELLER, R. Transfection by electroporation. In: **Curr Protoc Cell Biol.**, Capítulo 9.3, 2011.
- QUETGLAS, J. I., et al. Alphavirus vectors for cancer therapy. **Virus Res.**, v.153, p.179-196, 2010.
- QUINN, K., GALBRAITH, S. E., SHEAHAN, B. J., ATKINS, G. J. Effect of intranasal administration of SemlikiForest virus recombinant particles expressing interferon- β on the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Mol Med Rep.**, v.1, p. 335-342, 2008.
- RAYNER, J.O., DRYGA, S. A., KAMRUD, K.I. Alphavirus vectors and vaccination. **Rev Med Virol.**, v.12, p. 279–296, 2002.
- RHÊME, C., EHRENGRUBER, M. U., GRANDGIRARD, D. Alphaviral cytotoxicity and its implication in vector development. **Exp Physiol.**, v.90, p. 45-52, 2005.
- RHIEL, M., et al. Comparison of *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (high five) and *Spodoptera frugiperda* Sf-9 insect cell line metabolism in suspension cultures. **Biotechnol Bioeng.**, v. 55, p. 909-920, 1997.
- RIEZEBOS-BRILMAN, A. et al. Recombinant alphaviruses as vectors for anti-tumour and anti-microbial immunotherapy. **J Clin Virol.**, v. 35, p. 233-243, 2006.
- SCHLESINGER, S, SCHELESINGER, M.J. Replication of Togaviridae and Flaviridae. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MARTIN, S. H.; MONATH, T. P; ROIZMAN, B. **Fundamental virology.**, 2.ed. New York: Raven Press, 1991. p. 453-467.

SCHNEIDER, I. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. **J Embryol Exp Morphol.**, v. 27, p. 353- 365, 1972.

SOBOLESKI, M. R., et al. Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells. **The FASEB J.**, v. 19, p. 440-442, 2005.

STRAUSS, J. H., STRAUSS, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiol Rev.**, v.58, p.491-562, 1994.

UCHIDA, E. et al., Compararion of the efficiency and safety of non-viral vector-mediated gene transfer into a wide range of human cells. **Biol Pharm Bull.**, v.25, p.:891-897, 2002.

URBAN, C., et al., .Apoptosis induced by Semliki Forest vírus is RNA replication dependent and mediated via Bak. **Cell Death Differ.**, v. 15, p. 1396-407, 2008.

WARNOCK, J.N., et al. Introduction to viral vectors. **Methods Mol Biol.**, v. 737 p.1-25, 2011.

WAHLFORS, J., MORGAN, R.A. Viral vectors for gene therapy: methods and protocols. In: WAHLFORS, J, MORGAN, R. A. **Methods in Molecular Medicine**. Totowa: Humana Press, 2002. p.564-678.

WARD, W. W. Biochemical and Physical Properts of Green Fluorescent Protein. In: **CHALFIE, M.,KAIN, S.**, eds. **Green fluorescent protein: properties, applications and protocols**. New York: Wiley-Liss, 1998., p.45–75.

WULHFARD, S. Development of analytical techniques in capillary electrophoresis with laser induced fluorescence for the analysis of proteins. Focusing on transgenic proteins Lasic, D. D; Liposomes revisited. **Science**, v. 267, n.5202, p.1276-1995.

WULHFARD, S. **Transient recombinant protein expression in mammalian cells: the role of mRNA level and stability**. 2009.145 f. Tese. (Doutorado em Ciências) - École Polytechnique Fédérale De Lausanne, Lausanne.

YANG, S.G., et al. Construction and cellular immune response induction of HA-based alphavirus replicon vaccines against human-avian influenza (H5N1). **Vaccine**. v.27, p.7451-7458, 2009.

ZHANG, G. et al. An Enhanced Green Fluorescent Protein Allows Sensitive Detection of Gene Transfer in Mammalian Cells. **Bioch and Bioph Re Commu.**, v. 227, p. 707- 711, 1996.

ZHU, J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. **Biotechnol Adv.**, v.30, p.1158-1170, 2012.

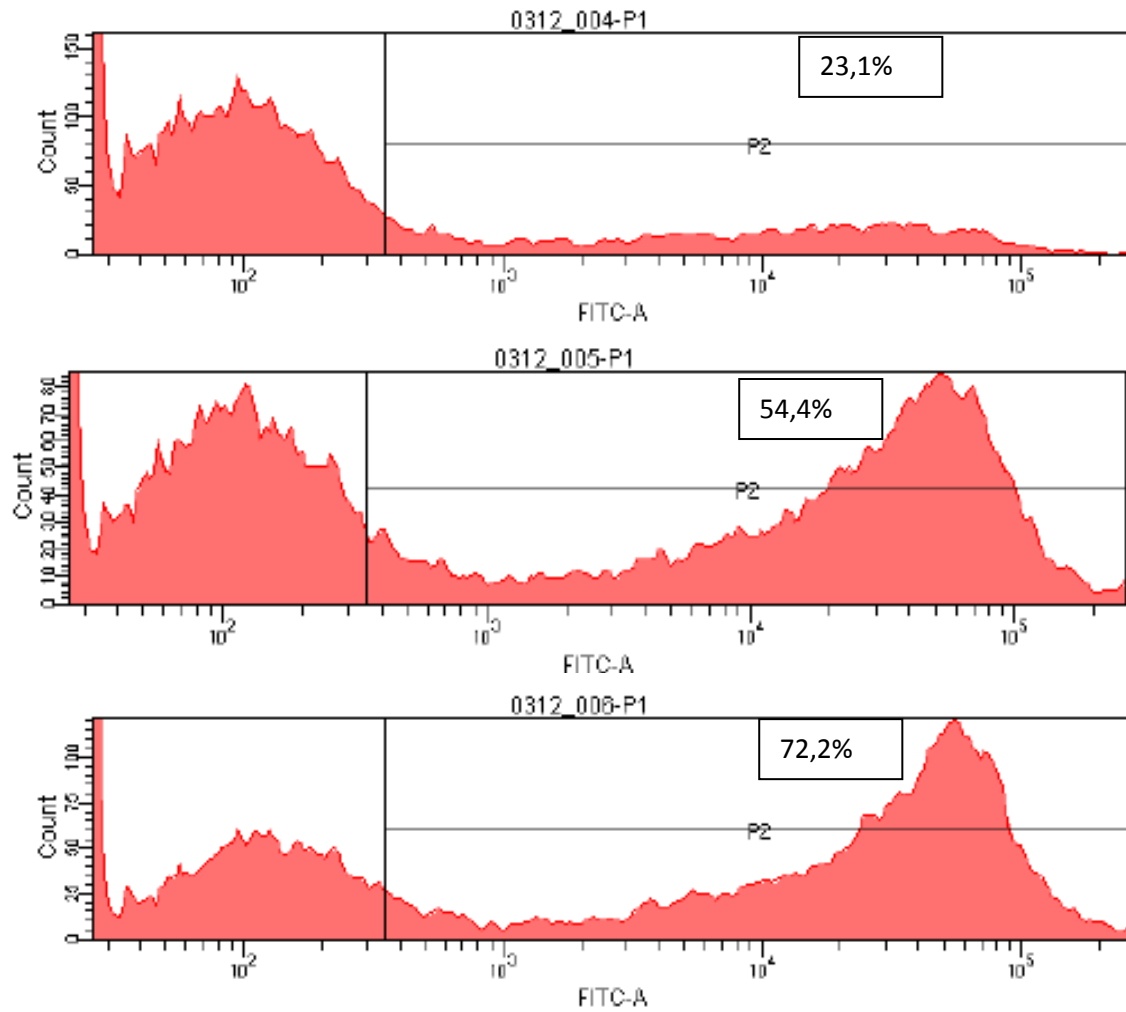
ZUSINAITE, E., et al. Mutations at the palmitoylation site of non-structural protein nsP1 of Semliki Forest virus attenuate virus replication and cause accumulation of compensatory mutations. **J Gen Virol.**, v.88,p .1977-1985, 2007.

ANEXOS

Anexo I- Histogramas da análise por citometria de fluxo de células BHK-21 infectadas com lote 9 de SFV-GFP.

Anexo II- Artigo: “*qRT-PCR for titration of replication-defective recombinant Semiliki Forest Virus*”

Anexo I



Células BHK-21 GFP+. Análise obtida por citometria de fluxo de células BHK-21 infectadas com lote 9 de SFV-GFP apresentando respectivamente com MOI 1 23,1%, MOI 10 54,4% e MOI 15 72,2% de células fluorescentes.



Quantitative RT-PCR for titration of replication-defective recombinant Semliki Forest virus



Ana L.P. Puglia^{a,1}, Alexandre G. Rezende^{a,1}, Soraia A.C. Jorge^{a,1}, Renaud Wagner^{b,2}, Carlos A. Pereira^{a,1}, Renato M. Astray^{a,*}

^a Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil 1500, CP 05503-900 São Paulo, Brazil

^b Institut de Recherche de l'Ecole de Biotechnologie de Strasbourg, University of Strasbourg, CNRS, Bd. Sébastien Brandt, CP 10413, F-67412 Illkirch, France

ABSTRACT

Article history:

Received 14 May 2013

Received in revised form 17 July 2013

Accepted 22 July 2013

Available online 6 August 2013

Keywords:

Semliki Forest virus

qRT-PCR

Virus titration

Virus titration may constitute a drawback in the development and use of replication-defective viral vectors like Semliki Forest virus (SFV). The standardization and validation of a reverse transcription quantitative PCR (qRT-PCR) method for SFV titration is presented here. The qRT-PCR target is located within the *nsp1* gene of the non-structural polyprotein SFV region (SFV RNA), which allows the strategy to be used for several different recombinant SFV constructs. Titer determinations were carried out by performing virus titration and infection assays with SFVs containing an RNA coding region for the rabies virus glycoprotein (RVGP) or green fluorescent protein (GFP). Results showed that the standardized qRT-PCR is applicable for different SFV constructs, and showed good reproducibility. To evaluate the correlation between the amount of functional SFV RNA in a virus lot and its infectivity in BHK-21 cell cultures, a temperature mediated titer decrease was performed and successfully quantitated by qRT-PCR. When used for cell infection at the same multiplicity of infection (MOI), the temperature treated SFV-RVGP samples induced the same levels of RVGP expression. Similarly, when different SFV-GFP lots with different virus titers, as accessed by qRT-PCR, were used for cell infection at the same MOI, the cultures showed comparable amounts of fluorescent cells. The data demonstrate a good correlation between the amount of virus used for infection, as measured by its SFV RNA, and the protein synthesis in the cells. In conclusion, the qRT-PCR method developed here is accurate and enables the titration of replication-defective SFV vectors, an essential aid for viral vector development as well as for establishment of production bioprocesses.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The Semliki Forest virus (SFV) is an enveloped, single-stranded RNA virus of positive polarity belonging to the genus *Alphavirus*, family *Togaviridae*. The viruses of this family comprise a single non-segmented RNA molecule, which acts as a messenger RNA (Schlesinger and Schlesinger, 1991). The finding that the SFV was able to infect many cell types with high efficiency in gene delivery and that the use of a strong viral promoter allowed the amplification of heterologous RNA into the host cell led to the development of the SFV expression vector (Liljeström and Garoff, 1991). For

this purpose, the cDNA corresponding to its genome was cut and inserted into two different plasmids. The expression plasmid contains the genes for SFV non-structural proteins (*nsp1-4*) and the strong subgenomic SFV 26S promoter located upstream of a polycloning site. The helper plasmid contains the genes for the structural proteins (Liljeström and Garoff, 1991; Smerdou and Liljeström, 1999). In order to obtain SFV particles, both plasmids are linearized and transcribed *in vitro* in expression and helper RNAs. After the electroporation of the RNAs in mammalian cells, infectious but non-replicative virus particles are formed, which can be collected from the supernatant (for review see Lundstrom et al., 2001; Rayner et al., 2002). These particles can be used for infecting several cell types *in vitro* or for *in vivo* gene delivery. Infected cells can then translate the heterologous RNA and synthesize the recombinant protein. In a previous study, an SFV vector carrying the rabies virus glycoprotein (SFV-RVGP) was constructed. Upon baby hamster kidney (BHK-21) cell infection with SFV-RVGP, RVGP mRNA amplification took place and high levels of RVGP could be produced (Benmaamar et al., 2009).

An essential step in using recombinant SFV particles is the virus titration. Traditional methods for assessing cytopathic effects in

* Corresponding author. Tel.: +55 11 26 27 96 21.

E-mail addresses: ana.puglia@butantan.gov.br (A.L.P. Puglia), alexandre.biotech@butantan.gov.br (A.G. Rezende), soraia.jorge@butantan.gov.br (S.A.C. Jorge), renaud.wagner@unistra.fr (R. Wagner), carlos.pereira@butantan.gov.br (C.A. Pereira), renato.astray@butantan.gov.br, renatoastray@yahoo.com (R.M. Astray).

¹ Tel.: +55 11 26 27 96 21.

² Tel.: +33 03 68 85 47 31.

plaque assays are often used for the titration of replicative wild or modified strains of SFV (Liljestrom et al., 1991; Zusinaite et al., 2007), but these methods are not applicable to non-replicative SFV vectors, which do not develop plaques. The titration of replication-deficient SFV vectors has traditionally been accomplished by the use of methods such as virus infection of plated cells with subsequent detection by immunofluorescence using primary antibodies against the protein of interest (Karlsson and Liljestrom, 2003; Hubby et al., 2007) or against the viral replicase (Klimpi et al., 2001), or even using a reporter gene like green fluorescent protein (GFP) or β -galactosidase (Ni et al., 2005; Zusinaite et al., 2007; Lundstrom, 2012). The viral titration can also be performed by dot-blotting technique, using radioactively labeled DNA probes (Wahlfors and Morgan, 2002). Nevertheless, these methods are time-consuming and often not sensitive enough. It is clear that the titration of SFV vectors still lacks a simple and sensitive technique for an accurate evaluation of the system. A similar demand led to the standardization of a qPCR approach for baculovirus titration (Lo and Chao, 2004; Hitchman et al., 2007). The qRT-PCR technique is a good alternative for the titration of SFV vector particles since the diffusion of qRT-PCR technology and prior knowledge about its use in viral titration provide considerable support for this approach (Rohr et al., 2002; Hitchman et al., 2007; Morsy El-Senousy et al., 2007; Zhang et al., 2008; Zhao et al., 2007).

This study presents the standardization of a method for qRT-PCR titration of non-replicative SFV particles. The method proposed here could be applicable to virtually any non-replicative SFV particles since the target for amplification is a conserved region of the gene coding for the nonstructural protein 1 (nsp1). Results of using different SFV constructs show that qRT-PCR is a suitable method for SFV titration since there is a good correlation between the amount of SFV containing RNA used for cell infection, the amount of infected cells, and the production of the recombinant protein.

2. Materials and methods

2.1. SFV vectors

Different recombinant SFV vectors were obtained by cloning the gene of interest under the control of the strong subgenomic promoter, SFV 26S, into the pSFVgen2C plasmid, which code for non-structural SFV proteins as already described (Karlsson and Liljestrom, 2003; Benmaamar et al., 2009). SFV vectors carrying genes coding for membrane proteins were used: SFV-RVGP, SFV-melatonin A1 receptor (Mta-1), SFV-modified adenosine receptor (Ala-80) and SFV-adenosine receptor A2A (20A2). An SFV-GFP vector expressing cytoplasmic GFP was also used. For obtaining SFV particles, the genes coding for structural proteins were supplied by SFV-Helper2 plasmid (Berglund et al., 1993). Briefly, helper and different expression plasmids were linearized using Spe I and Nru I restriction enzymes, respectively. Linearized plasmids were transcribed *in vitro* using SP6 RNA polymerase and the MAXIScript[®] SP6 kit (Life Technologies, Carlsbad, USA) at 40 °C for 2 h. RNA was then quantitated by fluorimetry using the Quant-it[™] RNA assay kit (Life Technologies, Eugene, USA). Expression and helper RNAs were used for co-transfect of BHK-21 cells by electroporation. After 24 h recombinant SFV particles were harvested from supernatant. Before utilization, SFV particles were activated with α -chemotrypsin 0.5 mg/mL (Sigma–Aldrich, Saint Louis, USA) followed by enzymatic inactivation with aprotinin 1 mg/mL (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA). Activated SFV particles were titrated and used for BHK-21 infection. All virus stocks were maintained at –80 °C until the moment of activation and utilization. Alternatively, activated SFV-RVGP aliquots were submitted to temperatures of 24 °C or 37 °C for 1 h or 3 h and then titrated and utilized for infection.

2.2. RNA extraction from SFV samples

RNA extraction from SFV samples was performed using the RNeasy kit (Qiagen, Maryland, USA), following the manufacturer's instructions. First, three SFV-RVGP sample volumes were assayed (50 μ L, 100 μ L, and 200 μ L) to determinate the best sample size, based on the amount of RNA required for analysis. The best qRT-PCR amplification performance was found using 100 μ L. As the amount of total RNA in any SFV sample was below the limit of quantitation of our available quantitation methodologies, the RNA recovery after extraction was evaluated by the introduction of 3 μ g yeast tRNA (Life Technologies, Carlsbad, USA) in each SFV sample. After the extraction process, total extracted RNA was quantitated by fluorimetry, and the RNA extraction yield was calculated.

2.3. DNase treatment and cDNA synthesis

For contaminant DNA removal, 1 μ g of total RNA was treated with 1 U of DNase I (Promega Corporation, Fitchburg, USA) and 1 U of RNase inhibitor (Life Technologies, Carlsbad, USA) for 30 min at 37 °C, followed by incubation with ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) for 10 min at 65 °C for DNase I inactivation. Each 600 ng sample of DNA-free RNA was then reverse transcribed with 200 U M-MLV (Life Technologies, Carlsbad, USA), 1 μ M reverse specific primer SFV-R1 (5'-CTCAATGATGACGTGGAGCT), 0.5 mM dNTPs, 0.1 M DTT, and RNase-free water. The reaction was incubated at 37 °C for 30 min, followed by enzyme inactivation at 70 °C for 15 min. cDNA samples were stored at –20 °C until processed.

2.4. qPCR

qPCR runs were performed in a StepOne[™] (Life Technologies, Singapore) real-time fluorescence detector thermocycler. The reaction was set-up using the Power SYBR[®] Green kit (Life Technologies, Foster City, USA), 3 μ L cDNA sample, 50 nM forward primer SFV-S2 (5'-ACAGACTGTCCTGAGCAG), 50 nM reverse primer SFV-R2 (5'-GTGACCATCTACTGCAGAGA) in 15 μ L total reaction volume. After distribution of samples and standards, the optic plates (Life Technologies, Foster City, USA) were sealed and briefly centrifuged (1200 rpm for 3 min). qPCR was performed at 95 °C for 10 min, 34 \times (95 °C/15 s, 55 °C/15 s, 60 °C/15 s), and the fluorescence was measured at 60 °C. The threshold fluorescence level for quantification was set within the exponential phase where all amplification curves exhibited the most significant signal increase. The cycle threshold (Ct) was obtained by recording the number of cycles required for the fluorescent signal to cross the threshold. After amplification, the melting curve (60–95 °C) was developed in order to verify reaction specificity, with the amplified fragment (145 bp) presenting dissociation at 83 \pm 0.3 °C.

2.5. Standard curve

The standard curve for SFV-RNA quantitation was obtained by serial dilution of pSFV-RVGP plasmid. pSFV-RVGP was produced in bacteria, extracted, and purified using the Plasmid Maxi-Prep kit (Qiagen, Maryland, USA). Plasmid was treated with DNase-free RNase, quantitated by spectrophotometry and subsequently 2 μ g of pSFV-RVGP was linearized by Not I digestion and quantitated by fluorimetry using the Quant-it[™] DNA assay kit (Life Technologies, Carlsbad, USA). The concentration required for a specific number of the target sequence was calculated based on the mass of a single plasmid molecule and the mass of plasmid containing the copy number of interest. Six dilutions were performed in 10 mM Tris + 1 mM EGTA buffer, generating the standard dilutions containing 6 \times 10⁷, 6 \times 10⁶, 6 \times 10⁵, 6 \times 10⁴, 6 \times 10³ or 6 \times 10² copies in each 3 μ L. Four independent runs with three replicates of each

standard dilution were performed, and each standard curve was defined as the regression line of the logarithm of standard copy number versus Ct. A mean standard curve was calculated from previous curves and data was plotted. All curves were evaluated in accordance with published guidelines (Nolan et al., 2006). Efficiency was determined by the formula (Pfaffl, 2001)

$$E = 10^{(-1/S)}$$

where “E” is efficiency and “S” is the slope of the standard curve.

2.6. Titration of SFV RNA

cDNA obtained after reverse transcription of SFV RNA samples were amplified together with standard curve dilutions, in three replicates each. Mean Cts were applied to the standard curve equation to determinate the cDNA copy number in each sample. The total SFV RNA copy number present in the original SFV sample was calculated by the multiplication of the cDNA copy number by a conversion factor specific to each sample, which considered all dilutions made and the yield of RNA extraction. Each SFV RNA copy was considered to belong to one potentially infective particle, so virus titer was expressed in virus particle per milliliter (VP/mL).

2.7. Cell cultures and infection

BHK-21 cells were cultivated in α -MEM medium (Life Technologies, Carlsbad, USA) containing 10% fetal calf serum (FCS), at 37 °C and 5% CO₂. For infection studies, cells were seeded in six-well plates at a concentration of 7×10^5 cells/well; the medium was replaced with α -MEM containing the desired amount of recombinant SFV. The multiplicity of infection (MOI), or the amount of SFV/cell, was calculated based on the SFV titer and the cell number. To provide a homogeneous infection and avoid temperature-mediated degradation of viruses, the cultures were kept under gentle agitation at room temperature (24 ± 2 °C) for 2 h. The culture medium was then replaced with 1.5 mL of α -MEM with FCS, and cells were incubated at 37 °C. At different time points after infection, cells were resuspended in PBS + 5 mM EDTA by incubation at 37 °C for 5 min. Samples containing 3×10^5 cells were analyzed by ELISA (Perrin et al., 1996) for determination of RVGP production following previously published procedures of sample treatment (Astray et al., 2008; Benmaamar et al., 2009). For RVGP mRNA quantitation, samples of 8×10^5 cells were RNA-extracted and the procedures of DNase treatment, reverse transcription, and qPCR were followed as previously described (Benmaamar et al., 2009).

2.8. Flow cytometry analysis

To analyze the relationship between the MOI used for infection and the relative amount of infected cells, three different lots of SFV-GFP were produced and titrated by qRT-PCR. Following titration, virus lots were used for BHK-21 infection with MOI 1, 3, 5, 10, or 15. After 24 h cells were harvested with PBS + 5 mM EDTA, washed and fixed with PBS + 0.2% para-formaldehyde. The proportions of fluorescent cells were determined by counting 10,000 events on a FACSCalibur™ flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, USA). The equipment was calibrated with a mock infected BHK-21 as negative control, and samples were read at wavelength of 530 nm.

2.9. Fluorescence microscopy

The kinetics of GFP expression was evaluated by infecting BHK-21 cells with SFV-GFP (MOI 10) and incubation at 37 °C in a MIU-IBS CO₂ chamber coupled to an IX-81 fluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japan). Photomicrographs were taken automatically

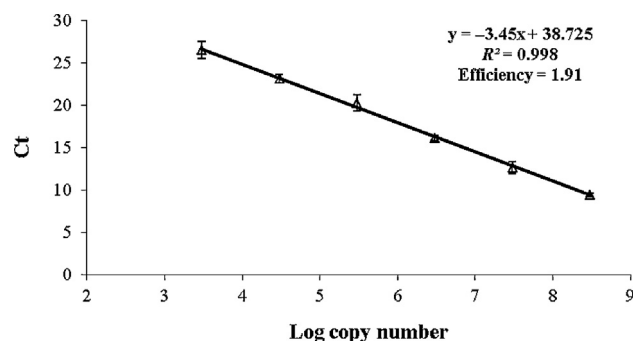


Fig. 1. qRT-PCR standard curve for the titration of SFV. Four qRT-PCR standard curves were obtained in parallel from six 10-fold dilutions of a reference DNA. Mean values of cycle thresholds (Ct) corresponding to each logarithm of standard copy number were plotted. Equation of regression line shows the slope (−3.45) used for calculation of amplification efficiency as indicated above (1.91) and the correlation coefficient R^2 (0.998). Error bars show SD.

from the same observation field at several time points after infection using the OV100 *in vivo* imaging system (Olympus, Tokyo, Japan).

2.10. Statistical analysis

The ANOVA test with a confidence interval of 95% ($p < 0.05$) was used for the RVGP and RVGP mRNA expression studies.

3. Results

The initial steps for standardizing the best conditions for analysis included the determination of the following parameters: amount of sample for RNA extraction, DNase treatment efficacy, primer concentration, cDNA sample quantity, and qPCR amplification cycle. A qRT-PCR standard curve for SFV RNA titration was then established after four amplifications to confirm the reproducibility between different runs and to calculate the average efficiency of amplification (Fig. 1). The standard curve showed the basic requirements necessary for qRT-PCR, namely, the use of at least five dilutions of standard and a slope of standard curve preferably between −3.3 and −3.8 and R^2 value of 0.99. The reproducibility of qRT-PCR was accessed by the amplification of a single cDNA sample obtained from an SFV pool, in nine replicates, in each one of two independent PCR runs. The average standard deviations were 0.23 ± 0.06 Ct interassays and 0.10 ± 0.06 Ct intra-assays. These data indicated that the standardized method was reproducible and the assay suitable for analyzing the amount of SFV RNA in intended samples. To prove that the proposed method actually applies to all SFV constructs, three separate samples of each different SFV stock (SFV-Mta-1, SFV-Ala-80, SFV-20A2, SFV-GFP, and SFV-RVGP) were titered. All viruses were efficiently amplified, with an average accumulated coefficient of variation (CV) of 15.1% (i.e. for the whole process of RNA extraction, DNase treatment, and qRT-PCR). Virus titers ranged from 3.2×10^7 VP/mL to 8.3×10^8 VP/mL, a difference of approximately 26 times between viral lots obtained by the same molecular biology and transfection procedures (Table 1).

To demonstrate the correlation between the amount of viral RNA used for cell infection and the amount of recombinant protein produced, BHK-21 cells were infected with different amounts of a single lot of SFV-RVGP and then the mRNA accumulation was measured; the RVGP produced is shown in Fig. 2A and B shows the cell growth kinetics. Infections at MOIs of 0.15, 1.5 or 15 SFV RNA/cell produced similar profiles of RVGP mRNA exponential accumulation into cells, leading to maximum quantities statistically different between 12 h and 24 h. RVGP accumulation was proportional to RVGP mRNA levels and reached the highest

Table 1
qRT-PCR titration of different recombinant SFV.

Virus	Viral titer (VP/mL)	Standard deviation	CV (%)
SFV-Mta-1	6.31×10^8	5.6×10^7	9.0
SFV-Ala-80	8.20×10^8	1.4×10^8	17.6
SFV-20A2	0.32×10^8	6.2×10^6	19.3
SFV-GFP	1.45×10^8	2.2×10^7	15.2
SFV-RVGP	8.30×10^8	1.2×10^8	14.4

SFV-RVGP, rabies virus glycoprotein; SFV-GFP, green fluorescent protein; SFV-Mta-1, melatonin A1 receptor; SFV-Ala-80, modified adenosine receptor and SFV-20A2, adenosine receptor A2A. CV, coefficient of variation. Data represent the mean value of three independent assays.

concentrations at 30 h post-infection. After 30 h the amounts of transcript and RVGP decreased, mainly in cells infected with MOI 15 (Fig. 2A). At this time, viable cell concentration started to increase due to the multiplication of uninfected cells (Fig. 2B). These data also showed that when less than MOI 15 was used for infection, many cells were not infected and continued to divide, which was evident mainly after 24 h post-infection. Surprisingly, a large number of BHK-21 cells infected with an MOI 0.15 showed high cytotoxicity despite low RVGP expression levels, reaching 24 h of infection with only 59.7% of initial culture viability, while the cultures infected with MOI 1.5 and 15 presented viabilities of 51.8% and 29.7%, respectively.

In order to show further the correlation of qRT-PCR titrated virus input and the amount of RVGP produced in infected cells, aliquots of a single lot of SFV-RVGP were subjected to different temperature treatments and then qRT-PCR titrated in five replicates (mean

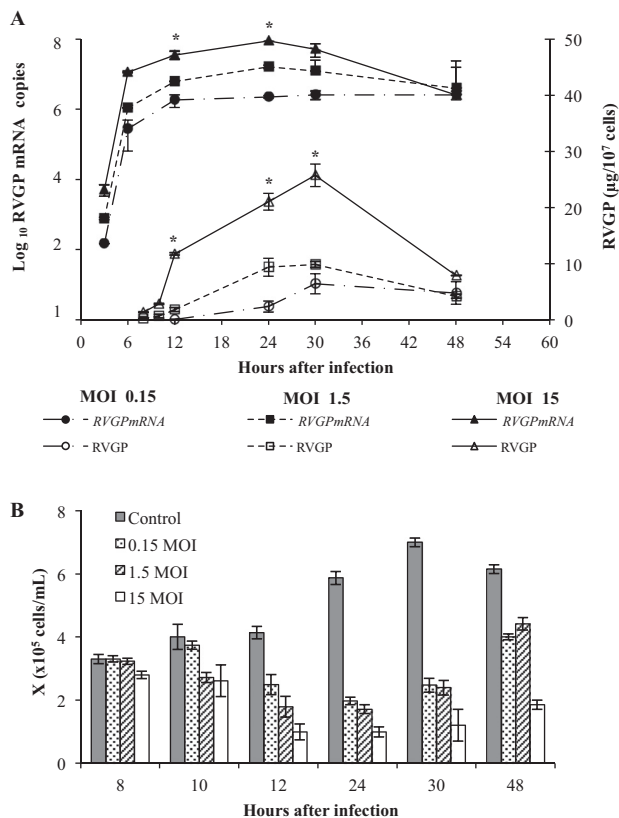


Fig. 2. Kinetics of RVGP mRNA copy number, RVGP expression, and growth in cultures of BHK-21 infected with different MOI (0.15, 1.5, and 15) of SFV-RVGP. RVGP mRNA was determined by qRT-PCR in 90 ng of total RNA and expressed in Log₁₀ copy number; RVGP was determined by ELISA and expressed as µg of RVGP/10⁷ cells (A); viable cell concentration was determined by cell counting in a hemocytometer by a trypan exclusion method. X, cells/mL × 10⁵ (2B). *Statistically different from other values ($p < 0.05$).

Table 2

Effect of temperature treatment on SFV-RVGP inactivation. SFV-RVGP titration by qRT-PCR, and RVGP synthesis in infected BHK-21 cells.

SFV-RVGP inactivation			SFV-RVGP infection
Incubation	Titer (VP/mL)	Titer decrease (%)	RVGP (ng/mL)
24 °C/1 h	8.12×10^8	2.2	265.3 ± 25.1
24 °C/3 h	7.66×10^8	7.7	260.8 ± 14.6
37 °C/1 h	3.61×10^8	56.5	241.3 ± 22.2
37 °C/3 h	1.45×10^8	82.5	244.4 ± 15.9
-20 °C (stock)	8.30×10^8	-	302.1 ± 9.6

Identical SFV-RVGP samples were incubated at different temperatures for different times and then submitted to qRT-PCR titration, and used for BHK-21 infection (MOI 10) in three replicates. Virus inactivation is expressed in % related to the viral stock at -20 °C. RVGP synthesis in the different groups ($n = 3$) was measured by ELISA and was considered statistically equivalent ($p = 0.015$).

CV = 15%). Subsequently, temperature-treated virus aliquots were used for infection of BHK-21 cells at MOI 10, and RVGP production was measured (Table 2). The results show that the incubation of virus suspensions at temperatures of 25 °C or 37 °C, for 1 h or 3 h, led to the partial SFV RNA degradation since virus titers decreased as compared to virus stock maintained at -20 °C. The treatment at 37 °C for 3 h, especially, resulted in a significant loss of viral titer (82.4%). In comparing RVGP production among the cultures infected with an MOI 10 of the temperature-treated SFV particles, results were very similar (standard deviation [SD] = 11.87 ng/mL; CV = 4.69%), demonstrating a correlation between the amount of SFV RNA used for infection and the RVGP expression, which reinforces the applicability of qRT-PCR for titration of SFV constructs. Cultures infected with SFV stocked at -20 °C presented RVGP values 14–20% higher than temperature-treated cultures, raising variation values (SD = 24.26 ng/mL; CV = 9.23%).

Finally, the qRT-PCR method was used for the titration of different lots of SFV-GFP, which were used to infect BHK-21 cells with different MOIs. Infected cells expressed the GFP and were analyzed by fluorescence microscopy or flow cytometry (Fig. 3). Fluorescence microscopy analysis was used for defining the best time after infection for measuring the amount of infected cells in a kinetic study of GFP expression after BHK-21 infection with SFV-GFP with MOI 10 (Fig. 3A). Photomicrographs show the first signs of GFP expression at 1 h of infection. Increased amounts of fluorescent cells were observed until 24 h of infection, so this time point was chosen for analysis of GFP expression after infecting cells with different MOIs (Fig. 3B). The results show that an increase in the MOI corresponded to an increase, although not proportionally, in the percent of infected cells. Most importantly, when three different SFV-GFP lots were used with the same MOIs, similar amounts of cells were shown to express GFP, as indicated by the low SD observed in the assays. From the equation on the data graph, the predicted MOI for attaining 100% of infected cells would be 22.9.

4. Discussion

The SFV expression system has been used widely for recombinant protein expression in mammalian cells, markedly for membrane proteins (Lundstrom, 2003; Hassaine et al., 2006). This system is also a promising vector for studies of immunization, cancer therapy (Riezebos-Brilman et al., 2006), and for neuroscience investigations (Lundstrom et al., 2001). The application of an qRT-PCR method for easy and reliable recombinant SFV titration is suggested. First, a standard curve was established based on the linearized SFV expression plasmid, and its characteristics were evaluated, which corresponded to the basic requirements needed to validate the qRT-PCR (Nolan et al., 2006). The amplification of different SFV constructs confirmed that the standardized method is applicable to any SFV with a conserved *nsP1* gene in the

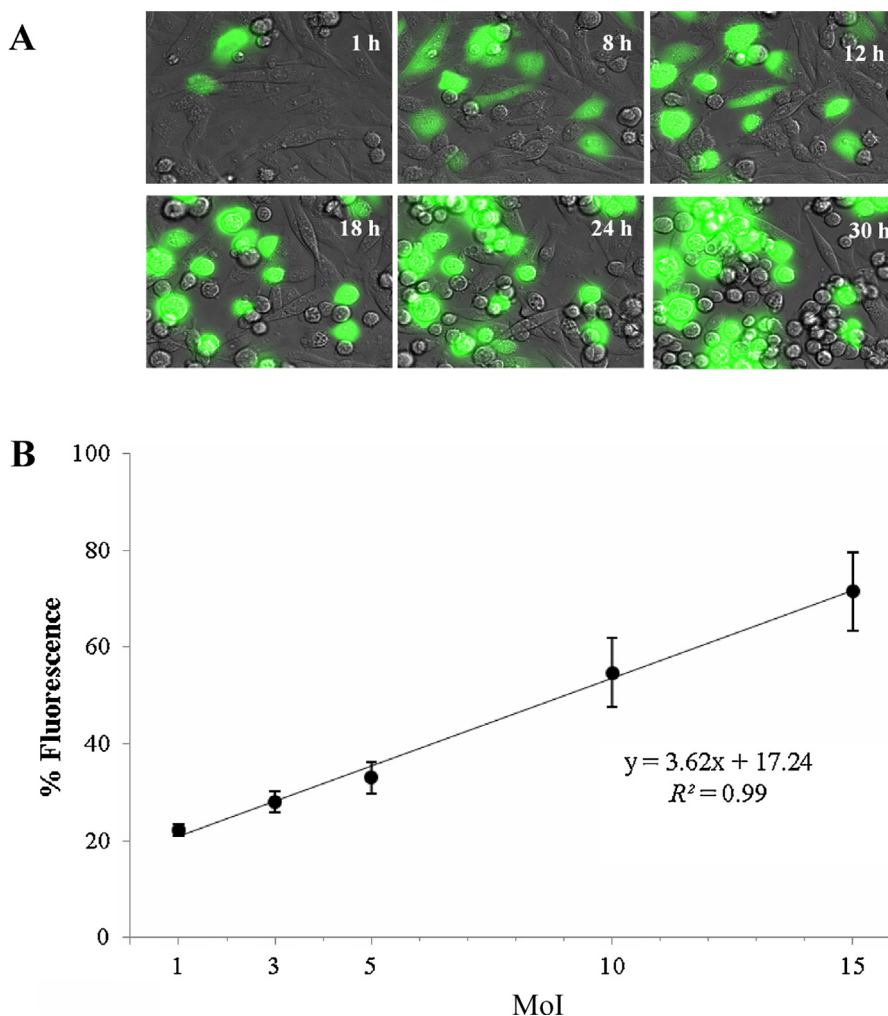


Fig. 3. Correlation between MOI and infection of BHK-21 cells with SFV-GFP. Microphotographs of the same observation field were taken at several time points for the study of GFP expression kinetics on SFV-GFP (MOI 10) infected BHK-21 cells. Amounts of infected cells increased until 24 h after infection (400 \times) (A). Three lots of SFV-GFP were used for BHK-21 infection with different MOI for 24 h. Amounts of fluorescent cells were determined by flow cytometry. Data show mean fluorescence (●). Error bars show SD. Fluorescence CV were 5.7%, 7.5%, 9.6%, 13.1%, and 11.4%, for MOIs 1, 3, 5, 10, and 15, respectively (B).

non-structural polyprotein region. Furthermore, the large difference in viral titers between these constructions showed that even if the same steps are followed for producing recombinant SFV particles, a broad range of viral titers can be obtained after completion of all processes of molecular biology, transfection, cultivation of cells, and virus harvesting. The qRT-PCR method is able to determine the virus titer on the interval between 600 and 60 million copies of SFV RNA per sample, in one reaction in a few hours. This is an advantage if compared to quantitation by immunofluorescence, which is not sensitive enough and requires performing several virus dilutions, cell cultivation, antibody labeling, and a few days to complete. In addition, large stocks of SFV, even stored under the best conditions, are subjected to potency loss due to the labile nature of RNA. When different aliquots of the same batch of SFV-RVGP were treated at different temperatures to promote partial degradation of the SFV RNA, the standardized qRT-PCR titration method was able to measure with accuracy the extent of degradation. When the temperature-treated viruses were used for BHK-21 infection with the same MOI, very similar amounts of RVGP were produced, demonstrating that there was a good correlation between the amount of SFV-containing preserved RNA used for infection and the RVGP expression. The difference between the amounts of RVGP produced by cultures infected with freezer stock SFV-RVGP and temperature-treated stock, although not

statistically significant, may represent the effect of virus degradation due to an additional freeze-thaw step of SFV particles which were frozen after temperature treatment while qRT-PCR titration was performed. Therefore, it is important to have aliquots of an SFV stock available for titration, as repeated freeze-thaw cycles can interfere with the determination of the correct virus titer and MOI. Taking this into consideration, virus samples may be titrated accurately before use, allowing a precise and reliable calculation of the amount of SFV particles under optimal conditions. This finding is important because it demonstrates that the degradation of a viral batch can be measured effectively. It is different from the titration of DNA virus vectors, whose degradation sometimes are not apparent by qPCR analysis because DNA is more stable than RNA and can remain in suspension, resulting in overestimation of viral titer (Hitchman et al., 2007).

The reproducibility of this method was evaluated by assays using SFV-GFP. Three different SFV-GFP batches were titrated by qRT-PCR, showing very different amounts of SFV RNA. When they were used for infecting cells with the same MOI, the rates of fluorescent cells were very similar. Therefore, with the qRT-PCR titration approach, the titer variability between SFV batches can be well-identified by evaluating the number of active virus particles. qRT-PCR virus titers can then be accurately used to calculate the virus input based on the desired MOI, obtaining reproducible

results. Finally, when an SFV-RVGP batch was titrated based on the SFV RNA content and then used for infection in three log different MOIs, the amount of virus used was shown to be proportional to the amount of RVGP mRNA produced by cells, and consequently, proportional to RVGP production.

5. Conclusion

In conclusion, SFV titers determined by qRT-PCR can be accurately used to calculate the virus input based on the desired MOI, obtaining reproducible results. Also, qRT-PCR methods targeting viral RNA of non-structural proteins, as the method established here, can be accurate and reliable tools for the titration of any replication-defective viral vector.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Dr. Jorge Mário da Costa Ferreira Jr. and Ivan Novaski Avino, Laboratório de Imunoquímica and Laboratório Especial de Ciclo Celular – LETA, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil, for flow cytometry and microscopy analysis. This work was financially supported by grants from FAPESP (2010/08742-8 and 2011/15269-0), CNPq and Butantan Foundation. C.A. Pereira is recipient of a CNPq 1A senior fellowship.

References

- Astray, R.M., Augusto, E.F., Yokomizo, A.Y., Pereira, C.A., 2008. Analytical approach for the extraction of recombinant membrane viral glycoprotein from stably transfected *Drosophila melanogaster* cells. *Biotechnology Journal* 3, 98–103.
- Benmaamar, R., Astray, R.M., Wagner, R., Pereira, C.A., 2009. High-level expression of rabies virus glycoprotein with the RNA-based Semliki Forest virus expression vector. *Journal of Biotechnology* 139, 283–290.
- Berglund, P., Sjöberg, M., Garoff, H., Atkins, G.J., Sheahan, B.J., Liljestrom, P., 1993. Semliki Forest virus expression system: production of conditionally infectious recombinant particles. *Biotechnology* 11, 916–920.
- Hassaine, G., Wagner, R., Kempf, J., Cherouati, N., Hassaine, N., Prual, C., André, N., Reinhart, C., Pattus, F., Lundstrom, K., 2006. Semliki Forest virus vectors for over-expression of 101 G protein-coupled receptors in mammalian host cells. *Protein Expression and Purification* 45, 343–351.
- Hitchman, R.B., Siaterli, E.A., Nixon, C.P., King, L.A., 2007. Quantitative real-time PCR for rapid and accurate titration of recombinant baculovirus particles. *Biotechnology and Bioengineering* 96, 810–814.
- Hubby, B., Talarico, T., Maughan, M., Reap, E.A., Berglund, P., Kamrud, K.I., Copp, L., Lewis, W., Cecil, C., Norberg, P., Wagner, J., Watson, A., Negri, S., Burnett, B.K., Graham, A., Smith, J.F., Chulay, J.D., 2007. Development and preclinical evaluation of an alphavirus replicon vaccine for influenza. *Vaccine* 25, 8180–8189.
- Karlsson, G.B., Liljestrom, P., 2003. Live viral vectors – Semliki Forest virus. In: Robinson, A., Hudson, M., Cranage, M.P. (Eds.), *Vaccine Protocols*. Humana press, Totowa NJ, pp. 69–82.
- Klimpi, A.H., Vaart, E., Lansink, P.O., Withoff, S., Vries, E.G.E., Scherphof, G.L., Wilschut, J., Daemen, T., 2001. Activation of peritoneal cells upon in vivo transfection with a recombinant alphavirus expressing GM-CSF. *Gene Therapy* 8, 300–307.
- Liljestrom, P., Garoff, H., 1991. A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnology (NY)* 9, 1356–1361.
- Liljestrom, P., Lusa, S., Huylebroeck, D., Garoff, H., 1991. In vitro mutagenesis of a full-length cDNA clone of Semliki Forest virus: the small molecular-weight membrane protein modulates virus release. *Journal of Virology* 65, 4107–4113.
- Lo, H.R., Chao, Y.C., 2004. Rapid titre determination of baculovirus by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology Progress* 20, 354–360.
- Lundstrom, K., Schweitzer, C., Rotmann, D., Hermann, D., Schneider, E.M., Ehrenguber, M.U., 2001. Semliki Forest virus vectors: efficient vehicles for in vitro and in vivo gene delivery. *FEBS Letters* 504, 99–103.
- Lundstrom, K., 2003. Semliki Forest virus vectors for rapid and high-level expression of integral membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1610, 90–96.
- Lundstrom, K., 2012. Determination of alphaviral titers. *Cold Spring Harbor Protocols* 2012 (7), 835–837.
- Morsy El-Senousy, W., Guix, S., Abid, I., Pintó, R.M., Bosch, A., 2007. Removal of astrovirus from water and sewage treatment plants, evaluated by a competitive reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 164–167.
- Ni, B., Wenda, G., Zhu, B., Lin, Z., Jia, Z., Zhou, W., Zhao, J., Wang, L., Wu, Y., 2005. Induction of specific human primary immune responses to a Semliki Forest virus-based tumor vaccine in a Trimer mouse model. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 54, 489–498.
- Nolan, T., Hands, R.E., Bustin, S.A., 2006. Quantitation of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols* 3, 1559–1582.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantitation in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, 2002–2007.
- Perrin, P., Lafon, M., Sureau, P., 1996. Enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA) for the determination of glycoprotein content of rabies vaccines. In: Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.), *Laboratory Techniques in Rabies*. WHO, Geneva, pp. 383–388.
- Rayner, J.O., Dryga, S.A., Kamrud, K.I., 2002. Alphavirus vectors and vaccination. *Reviews in Medical Virology* 12, 279–296.
- Riezebos-Brilman, A., de Mare, A., Bungener, L., Huckriede, A., Wilschut, J., Daemen, T., 2006. Recombinant alphaviruses as vectors for anti-tumour and anti-microbial immunotherapy. *Journal of Clinical Virology* 35, 233–243.
- Rohr, U.P., Wulf, M.A., Stahn, S., Steidl, U., Haas, R., Kronenwett, R., 2002. Fast and reliable titration of recombinant adeno-associated virus type-2 using quantitative real-time PCR. *Journal of Virological Methods* 106, 81–88.
- Schlesinger, S., Schlesinger, M.J., 1991. Replication of Togaviridae and Flaviviridae. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Chanock, R.M., Melnick, J.L., Martin, S.H., Monath, T.P., Roizman, B. (Eds.), *Fundamental Virology*. Raven Press, New York, pp. 453–467.
- Smerdou, C., Liljestrom, P., 1999. Two-helper RNA system for production of recombinant Semliki Forest virus particles. *Journal of Virology* 73, 1092–1098.
- Wahlfors, J., Morgan, R.A., 2002. Viral vectors for gene therapy: methods and protocols. In: Machida, C.A. (Ed.), *Methods in Molecular Medicine*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 564–678.
- Zhang, X., Wang, X., Zhou, G., 2008. A one-step real time RT-PCR assay for quantifying rice stripe virus in rice and in the small brown planthopper (*Laodelphax striatellus* Fallén). *Journal of Virological Methods* 151, 181–187.
- Zhao, X., Bailey, M.R., Emery, W.R., Lambooy, P.K., Chen, D., 2007. Evaluation of viral removal by nanofiltration using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 47, 97–104.
- Zusinaite, E., Tints, K., Kiiver, K., Spuul, P., Karo-Astover, L., Merits, A., Sarand, I., 2007. Mutations at the palmitoylation site of non-structural protein nsP1 of Semliki Forest virus attenuate virus replication and cause accumulation of compensatory mutations. *Journal of General Virology* 88, 1977–1985.