ALEXANDRE GONÇALVES DE REZENDE

**“OBTENÇÃO DE *VIRUS-LIKE PARTICLES* (VLPs) DE
MAYARO USANDO DIFERENTES SISTEMAS DE
EXPRESSÃO”**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP / Instituto
Butantan / IPT, para obtenção do título de Doutor
em Biotecnologia.

São Paulo
2018

ALEXANDRE GONÇALVES DE REZENDE

“Obtenção de *virus-like particles* (VLPs) de Mayaro usando diferentes sistemas de expressão”

Tese apresentada ao programa de pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP / Instituto Butantan /IPT, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Soraia Attie Calil Jorge

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

São Paulo
2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Gonçalves de Rezende, Alexandre
Obtenção de virus-like particles (VLPs) de Mayaro
usando diferentes sistemas de expressão / Alexandre
Gonçalves de Rezende; orientador Soraia Attie Calil
Jorge. -- São Paulo, 2018.
115 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Mayaro virus. 2. Baculovírus. 3. Pichia
pastoris. 4. Virus like particles (VLPs). I. Attie
Calil Jorge, Soraia , orientador. II. Título.

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

Candidato(a): Alexandre Gonçalves de Rezende

Título da Tese: Obtenção de *virus like particles* (VLPs) de Mayaro usando diferentes sistemas de expressão

Orientador(a): Dra. Soraia Attie Calil Jorge

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:.....

Nome:

Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB)

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

São Paulo, 17 de outubro de 2014

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto “Estudo da expressão gênica das glicoproteínas do Vírus Mayaro através de baculovírus e *Pichia pastoris*”, protocolo nº **I-1322/14**, sob a responsabilidade de Soraia Attie Calil Jorge, não envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica.

This is to certify that the proposal “Gene Expression of Mayaro virus glycoproteins using baculovirus system and *Pichia pastoris*”, protocol nº **I-1322/14**, under the responsibility of Soraia Attie Calil Jorge, has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee, and that it does not involve breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata, in scientific research.

Dra. Wania H. K. Cabrera
Coordenadora da CEUAIB

Aos meus pais, Alberto (*in memoriam*) e Almira, por me proporcionarem todas as condições para seguir meus sonhos, e a minha amada Kelly, pelo amor e grande parceria, em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que tanto me ajudou nos momentos mais difíceis e me guiou pelo caminho certo, colocando pessoas especiais no seu decorrer, que me acrescentaram muito, e que sem duvida, são responsáveis pelo que sou hoje.

A meu pai Alberto (*in memorian*), pela presença e por me guiar sempre pelo melhor caminho.

A minha mãe Almira, por sempre me proporcionar condições e formas para realizar meus sonhos, sendo a minha grande inspiração.

A minha eterna companheira Kelly, pelo apoio incondicional, pelas palavras certas nos momentos difíceis, e pelo seu amor que tão bem me faz, sendo a grande responsável por essa conquista.

Aos meus irmãos Érica e Nuno, meus cunhados Gil, Simone, Gizeli, Jeferson, Nilza e Júlio, meus sogros Maria e Omar, e todos os sobrinhos e sobrinhas por todo o apoio e convivência harmoniosa em família,.

A minha orientadora Soraia, pela oportunidade, confiança e apoio em todas as etapas do projeto.

Ao amigo Renato Astray, pelas importantes sugestões durante todo o projeto, e por todo conhecimento compartilhado.

Ao amigo Dr. Carlos Augusto (*in memorian*), que tanto me ajudou na estadia e desenvolvimento do trabalho em Strasbourg.

Aos amigos do LIV que tanto me ajudaram nos experimentos, pela troca de conhecimentos e por proporcionarem um excelente ambiente de trabalho.

Aos novos amigos do Laboratório de dor e sinalização celular, da Universidade de Strasbourg, Renaud Wagner, Valerie Kugler e Lucie Hartmann, que me acolheram muito bem e foram peças fundamentais no desenvolvimento do trabalho.

Aos meus amigos e amigas de Juruiaia (MG), por serem um refugio de todos os problemas e pela demonstração de que serão pessoas que poderei sempre confiar.

Ao Instituto Butantan, pelo acolhimento, em especial ao Laboratorio de Imunologia Viral, pela estrutura fornecida, e todos os seus funcionários pela excelência e companheirismo, propiciando o correto desenvolvimento das pesquisas.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia da USP pelos serviços prestados.

Ao CNPQ pelo financiamento dos estudos, sem o qual o projeto não seria possível (Processo: 142423/2014-9).

A CAPES por possibilitar a execução de parte do trabalho na França, através da bolsa PDSE.

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém”

Dalai Lama

RESUMO

REZENDE, A. G. Obtenção de *virus-like particles* (VLPs) de Mayaro usando diferentes sistemas de expressão. 2018. 115 p. Tese de doutorado (Doutorado em Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Recentemente, vários arbovírus têm acometido a população de países emergentes ocasionando sérios problemas de saúde pública, como as doenças causadas pelos vírus da dengue, Chikungunya, Zika e febre amarela. Um vírus emergente e já circulante no Brasil, chamado Mayaro (MAYV), do mesmo gênero do Chikungunya (*Alphavirus*), possui potencial prejudicial semelhante a esses já estabelecidos. Seu vetor de transmissão é o mosquito do gênero *Haemagogus*, característico de regiões isoladas, principalmente florestas. Entretanto, estudos demonstraram que o *Aedes aegypti* é um competente vetor desse agente, o que possibilita sua disseminação em regiões urbanas. O presente trabalho avaliou a expressão das proteínas estruturais do vírus Mayaro (E1, E2, E3, C e 6K), utilizando dois sistemas de expressão distintos, um baseado na levedura *Pichia pastoris*, e outro derivado de Baculovírus (BEVS). Essa estratégia foi estabelecida para que a expressão dessas proteínas promova a formação de partículas semelhantes ao vírus (*virus like particles*), estruturas multiprotéicas que mimetizam a conformação de uma partícula viral podendo ser utilizada como um candidato vacinal. O trabalho evidenciou a correta obtenção de organismos recombinantes em ambos os sistemas, com a avaliação da expressão sendo feita com técnicas de *dot blot*, *western blot* e imunofluorescência indireta (IFI). Com o sistema baculovírus, foram avaliadas as linhagens Sf-9 e Hi-5, sendo evidenciada a expressão de proteínas do MAYV em ambas, utilizando MOI 10 e tempos pós-infecção de 96 e 72 h, respectivamente. A correta expressão das proteínas de MAYV também foi evidenciada com a levedura *Pichia pastoris*, com cultivo a 30 °C e tempo de análise 48 h após indução. A geração de VLPs foi avaliada em amostras de sobrenadantes de ambos os sistemas após a concentração por ultracentrifugação em gradiente de iodixanol, e análise por microscopia eletrônica de transmissão, sendo observadas nos dois sistemas com tamanhos variando entre 30-60 nm. Os resultados desse projeto podem gerar ferramentas importantes no desenvolvimento de kits diagnósticos e métodos vacinais contra o MAYV.

Palavras chave: *Virus like particles* (VLPs); vírus Mayaro; Baculovírus; *Pichia pastoris*

ABSTRACT

REZENDE, A. G. Obtaining Mayaro virus-like particles (VLPs) using different expression systems. 2018. 115 p. Doctoral theses (Phd in Biotechnology). Institute of Biomedical Sciences. University of São Paulo, São Paulo, 2018.

Recently, several arboviruses have affected emerging countries causing serious public health problems, such as diseases caused by dengue viruses, Chikungunya, Zika and yellow fever. An emerging and already circulating virus in Brazil, called Mayaro (MAYV), of the same genus of Chikungunya (Alphavirus), has harmful potential similar to those already established. Its transmission vector is the mosquito of the genus *Haemagogus*, characteristic of isolated regions, mainly forests. However, studies have demonstrated that *Aedes aegypti* is a competent vector of this agent, which would allow its dissemination in urban areas. The present work evaluated the expression of the structural proteins of the Mayaro virus (E1, E2, E3, C and 6K) using two distinct expression systems, one based on the yeast *Pichia pastoris* and another derived from Baculovirus (BEVS). The strategy of expressing structural proteins has been established so that the expression of these proteins promotes the formation of virus-like particles or VLPs, multiprotein structures that mimic the conformation of a viral particle and can be used as a vaccine candidate. The work evidenced the correct obtaining of recombinant organisms in both systems, with the evaluation of the expression being done with dot blot, western blot and indirect immunofluorescence (IFI) techniques. With the baculovirus system, the Sf-9 and Hi-5 strains were evaluated, and the expression of the MAYV proteins was evidenced in both, using MOI 10 and the time of post-infection analysis of 96 and 72 h, respectively. Correct expression of MAYV proteins was also evidenced with yeast *Pichia pastoris*, with culture at 30 ° C and analysis time 48 h after induction. The generation of VLPs was evaluated in both supernatants after concentration by iodixanol gradient ultracentrifugation and transmission electron microscopy analysis, being observed in both systems with sizes ranging from 30-60 nm. The results of this project can generate important tools in the development of diagnostic kits and vaccine methods against the MAYV.

Keywords: Virus like particles (VLPs); *Mayaro* virus; Baculovirus; *Pichia pastoris*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo replicativo dos <i>Alphavirus</i>	26
Figura 2 - Esquema da metodologia empregada para obtenção do baculovírus recombinante (Bac-E-MAYV) e expressão dos genes do MAYV	35
Figura 3 - Mapa do vetor pFast-E-MAYV	40
Figura 4 - Esquema da metodologia empregada para obtenção de <i>Pichia pastoris</i> recombinante (Pp-E-MAYV) e análise da expressão das proteínas do MAYV.....	49
Figura 5 - Mapa do vetor pPIC9K-E-MAYV.....	51
Figura 6 - Esquema da lise de membrana da Pp-E-MAYV e obtenção das amostras analisadas por <i>dot blot</i> e <i>western blot</i>	56
Figura 7 - Confirmação de obtenção do vetor pMT-E-MAYV por digestão com enzimas ScaI, EcoRI e KpnI, e análise em gel de agarose 0,8 %.....	58
Figura 8 - Confirmação de obtenção do vetor pFast-E-MAYV por digestão com as enzimas BamHI e SpeI e análise em gel de agarose 0,8 %	59
Figura 9 - Análise da transposição do pFast-E-MAYV nos clones de DH10Bac.....	60
Figura 10 - Confirmação de obtenção do Bacmídeo-E-MAYV através de PCR e análise em gel de agarose 1,5 %	61
Figura 11 - Imagens de microscopia óptica de células Sf-9 transfectadas com Bacmídeo-E-MAYV	62
Figura 12 - Imagem de microscopia de fluorescência de células Sf-9 ET infectadas com baculovírus-E-MAYV	63
Figura 13 - Cálculo da distância proporcional (PD) do end point de 50%.....	64
Figura 14 - Imagens de microscopia óptica do efeito citopático ocasionado pela infecção com Bac-E-MAYV.....	65
Figura 15 - Imagens de microscopia óptica do efeito citopático em diferentes tempos de células Sf-9 infectadas com Bac-E-MAYV	66
Figura 16 - Imagens de microscopia óptica do efeito citopático em diferentes tempos de células Hi-5 infectadas com Bac-E-MAYV	67
Figura 17 - IFI para avaliação de infecção com Bac-E-MAYV em células Hi-5 com diferentes MOIs	68
Figura 18 - IFI com células Sf-9 infectadas com Bac-E-MAYV.....	69
Figura 19 - IFI com células Hi-5 infectadas com Bac-E-MAYV	70
Figura 20 - Dot blot de células Sf-9 e Hi-5 em diferentes tempos após infecção com Bac-E-MAYV	71
Figura 21 - <i>Western blot</i> com lisado celular do ensaio de infecção com Bac-E-MAYV.....	72
Figura 22 - Cinética de crescimento e viabilidade de células controle e infectadas com Bac-E-MAYV	73
Figura 23 - Resultados do processo de concentração de VLPs com gradiente de sacarose em células Sf-9	75

Figura 24 - Resultados do processo de concentração de VLPs com gradiente de iodixanol em células Sf-9	76
Figura 25 - Resultados do processo de concentração de VLPs com gradiente de iodixanol em células Hi-5	78
Figura 26 - Confirmação de obtenção do vetor pPIC-E-MAYV por digestão com enzimas <i>SpeI</i> e <i>BamHI</i> e análise em gel de agarose 0,8 %	80
Figura 27 - Placas de YPD com os clones de Pp-E-MAYV em diferentes concentrações de geneticina.....	81
Figura 28 - Yeastern blotting com clones de Pp-E-MAYV	82
Figura 29 - Análises de expressão da Pp-E-MAYV com <i>dot blot</i> e <i>Western blot</i>	83
Figura 30 - Resultados do processo de concentração de VLPs de MAYV com gradiente de iodixanol em Pp-E-MAYV.....	84
Figura 31 - IFI com células Sf-9 e Hi-5 infectadas com Bac-E-CHIKV	111
Figura 32 - Dot blot de células Sf-9 e Hi-5 em diferentes tempos após infecção com Bac-E-CHIKV	112
Figura 33 - <i>Western blot</i> com lisado celular do ensaio de infecção com Bac-E-CHIKV	113
Figura 34 - Resultados do processo de concentração de VLPs de CHIKV com gradiente de iodixanol em células Sf-9	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos para obtenção do Bac-E-MAYV.....	37
Tabela 2 – Composição dos géis utilizados para SDS-PAGE e <i>Western blotting</i>	46
Tabela 3 – Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos para obtenção de Pp-E-MAYV..	50
Tabela 4 – Indicativo da presença de focos fluorescentes em células Sf-9 ET infectadas com diferentes diluições de baculovírus-E-MAYV.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcMNPV - *Autographa californica multinuclear polyhedrosis*

Bac-E-CHIKV - Baculovírus recombinante expressando proteínas estruturais do MAYV

Bac-E-MAYV – Baculovírus recombinante expressando proteínas estruturais do MAYV

BEVS – *Baculovirus expression vectors system*

BMGY - extrato de levedura; bactopectona; glicerol; tampão fosfato; *yeast nitrogen base*

BMMY - extrato de levedura; bactopectona; metanol; tampão fosfato; *yeast nitrogen base*

C636 – Células de inseto derivadas de *Aedes albopictus*

CHIKV – Vírus Chikungunya

Hi-5 – *Trichoplusia ni*

IFI – Imunofluorescência indireta

MAYV – Vírus Mayaro

MOI – *Multiplicity of infection*

nsP – *Non structural proteins*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

pFast-E-MAYV – Vetor pFastBac1 com genes das proteínas estruturais do MAYV

Pp-E-MAYV – *Pichia pastoris* recombinante expressando proteínas estruturais do MAYV

pPIC-E-MAYV – Vetor pPIC9K com genes das proteínas estruturais do MAYV

RT-PCR – *Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction*

SDS-PAGE - *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

Sf-9 – *Spodoptera frugiperda*

Sf-9 ET – Células Sf-9 *Easy titration*

TCID₅₀ - *Tissue culture infective dose*

TNE - Tris-Cl (1 M - pH – 7,5); NaCl (5 M); EDTA (0,5 M);

VLP – *Virus like particles*

YPG - extrato de levedura – 10 mg/mL; peptona – 20 mg/mL; glicose – 20 mg/mL

SUMÁRIO

1 Introdução	18
2 Revisão Bibliográfica.....	20
2.1 Arboviroses.....	20
2.2 Febre Mayaro.....	22
2.3 Vírus Mayaro (MAYV).....	25
2.4 Partículas semelhantes a vírus - Virus Like Particles (VLPs)	27
2.5 Baculovírus	29
2.6 <i>Pichia pastoris</i>	31
3 Objetivos.....	34
3.1 Objetivos Gerais	34
3.2 Objetivos Específicos	34
4 Materiais e Métodos	35
4.1 Obtenção do baculovírus recombinante (Baculovírus-E-MAYV)	35
4.1.1 Linhagens celulares de inseto	35
4.1.2 Desenho de oligonucleotídeos	36
4.1.3 Obtenção dos genes estruturais do MAYV (E-MAYV).....	37
4.1.3.1 Extração do RNA viral	37
4.1.3.2 Transcrição Reversa e PCR (RT-PCR)	38
4.1.3.3 Obtenção do vetor pMT-E-MAYV	39
4.1.4 Obtenção do pFastBac-E-MAYV.....	40
4.1.5 Obtenção do Bacmídeo recombinante	41
4.1.6 Transfecção.....	42
4.1.7 Titulação viral com Sf-9 ET	42
4.1.8 Ensaios de infecção com Bac-E-MAYV em placa.....	43
4.1.9 Ensaios de infecção com Bac-E-MAYV em Schott (cultivo em suspensão)	43
4.1.10 Obtenção de VLPs	43
4.1.10.1 Gradiente de Sacarose	44
4.1.10.2 Gradiente de iodixanol (Optiprep).....	44
4.1.11 Análise de expressão e obtenção de VLPs	45
4.1.11.1 <i>Dot Blot</i>	45
4.1.11.2 <i>Western blot</i>	45

4.1.11.3	Imunofluorescência indireta (IFI).....	47
4.1.11.4	Microscopia Eletrônica.....	47
4.2	<i>Pichia pastoris</i> recombinante (Pp-E-MAYV).....	49
4.2.1	Obtenção do vetor pPIC9K-E-MAYV	50
4.2.2	Competência <i>Pichia pastoris</i>	52
4.2.3	Eletroporação.....	52
4.2.4	Seleção dos clones	53
4.2.5	<i>Yeastern blotting</i>	53
4.2.6	Cultivo	54
4.2.7	Tratamento de membrana	55
4.2.8	Obtenção das VLPs	56
4.2.9	Análise de expressão e obtenção de VLPs	57
4.2.9.1	Dot Blot	57
4.2.9.2	<i>Western Blot</i>	57
4.2.9.3	Microscopia eletrônica	57
5	Resultados	58
5.1	Baculovírus-Mayaro (Bac-E-MAYV).....	58
5.1.1	Obtenção do baculovírus recombinante (Bac-E-MAYV)	58
5.1.1.1	Obtenção do pMT-E-MAYV.....	58
5.1.1.2	Obtenção do pFastBac-E-MAYV.....	59
5.1.1.3	Obtenção do Bacmídeo recombinante.....	59
5.1.1.4	Transfecção em Sf-9.....	61
5.1.2	Titulação dos baculovírus utilizando as células Sf-9 ET.....	62
5.1.3	Infecção com Baculovírus-E-MAYV	64
5.1.4	Imunofluorescência indireta (IFI).....	68
5.1.5	<i>Dot blot</i>	71
5.1.6	<i>Western blot</i>	72
5.1.7	Ensaio de infecção com cultivos em suspensão.....	73
5.1.8	Gradiente de sacarose	74
5.1.9	Gradiente de iodixanol (Optiprep).....	75
5.2	<i>Pichia pastoris</i> recombinante (Pichia-E-MAYV)	80
5.2.1	Obtenção do vetor pPIC9K-E-MAYV	80
5.2.2	Obtenção da cepa Pp-E-MAYV e seleção por geneticina.....	81
5.2.3	<i>Yeastern blotting</i>	82
5.2.4	Cultivo Pp-E-MAYV.....	82
5.2.5	Gradiente de iodixanol (Optiprep).....	84

6 Discussão	86
6.1 Baculovírus	87
6.1 Pichia pastoris	95
7 Conclusões	100
8 Referências	101
ANEXO.....	109
1 Obtenção do baculovírus recombinante Chikungunya (Baculovírus-E-CHIKV)	109
1.1 Obtenção do pFastBac-E-CHIKV e Bacmídeo recombinante	109
1.2 Ensaios de infecção e análise de expressão	110
1.2.1 Imunofluorescência indireta (IFI).....	110
1.2.2 <i>Dot blot</i>	112
1.2.3 <i>Western blot</i>	112
1.2.4 Gradiente de iodixanol (Optiprep).....	113
1.3 Discussão	115

1 Introdução

O vírus Mayaro (MAYV) é um *Alphavirus*, encontrado em regiões de florestas da América do Sul, sendo o agente causador de uma doença denominada febre Mayaro, caracterizada por febres, dores de cabeça, artralgia, vômitos e diarreias (PINHEIRO et al., 1998). Seu vetor de transmissão são mosquitos do gênero *Haemagogus*, característico de regiões isoladas, principalmente florestas. Entretanto, estudos demonstraram que o *Aedes aegypti* é um competente vetor desse agente, o que possibilita sua disseminação em regiões urbanas altamente povoadas, e consequentemente, o desenvolvimento de epidemias (LONG et al., 2011). Nesse sentido, epidemias recentes, de doenças causadas por vírus semelhantes, como Chikungunya, dengue, Zika e da febre amarela, reforçam o potencial de disseminação dessa doença, e casos isolados já confirmados da febre Mayaro em diferentes regiões do país, o credencia como um possível próximo desafio na saúde pública. Sendo assim, são necessários estudos visando o desenvolvimento de abordagens para o combate e detecção desse vírus.

Nossa proposta neste trabalho é expressar os genes das proteínas estruturais do MAYV (C / E3 / E2 / 6K / E1), através de dois sistemas de expressão distintos: baculovírus e *Pichia pastoris*. A estratégia de expressar proteínas estruturais foi estabelecida para que a expressão dessas proteínas promova a formação de partículas semelhantes a vírus ou VLP (*virus like particles*). As VLPs são estruturas multiprotéicas que mimetizam a conformação de uma partícula viral sem carregar genoma, formando uma partícula que não se replica, mas gera resposta imune semelhante a uma infecção natural, podendo assim ser utilizada como um candidato vacinal (GRGACIC et al., 2006)

Nos últimos tempos, o sistema de expressão baseado no baculovírus, vem sendo largamente utilizado para expressão de proteínas heterólogas em células de inseto. Dentre as suas principais vantagens estão os altos níveis de expressão obtidos, quando comparados com outros sistemas e sua facilidade de produção em larga escala (STEFAN et al., 2011). Outro ponto relevante é o fato de a expressão ser em células eucarióticas, tendo assim, a capacidade de expressar proteínas complexas, realizando modificações pós-traducionais que resultam em um índice maior de similaridade com proteínas expressas em células de mamíferos, quando comparado com outros sistemas.

Por outro lado, o sistema de expressão baseado em *P. pastoris* também apresenta diversos estudos envolvendo a expressão dos mais variados tipos de proteínas, com bons níveis de expressão e com preservação das características imunogênicas. A principal vantagem do sistema *P. pastoris* para a expressão de proteínas heterólogas é a combinação de duas importantes características em um só organismo: simplicidade de manipulação por ser um organismo unicelular e a sofisticação celular de um organismo eucarioto. Enquanto o primeiro aspecto tem um impacto positivo e direto sobre o tempo experimental e em questões de custo e aumento de escala, o último indica os mecanismos celulares necessários para alcançar a síntese, maturação e tráfego de proteínas complexas (BERTHELEME et al., 2015).

Existem no mercado diversas vacinas licenciadas que utilizam VLPs produzidas tanto em baculovírus, como em leveduras. No caso de baculovírus, tem-se a vacina Cervarix[®] (Glaxo-Smith Kline), contra o papilomavírus humano (HPV), e a Fluoblock[®] (Protein Sciences), contra o vírus Influenza (ROLDAO et al., 2010). Além dessas, outros estudos se encontram em desenvolvimento, com resultados bastante promissores, como a produção de VLPs de HIV, ebola e enterovírus 71 (PILLAY et al., 2009; SUN et al., 2009; CHUNG et al., 2006). Com relação à produção em *P. pastoris*, já estão comercialmente aprovadas as vacinas EngerixTM (Glaxo-Smith Kline), a Enivac-HB (Panacea Biotec) e a Recombivax (Merck), contra a Hepatite B. Além de outras vacinas que utilizam essa abordagem com outras leveduras, como a GardasilTM (Merck) contra papilomavírus humano (HPV) que é produzida em *Saccharomyces cerevisiae*, enfatizando o potencial desses organismos. Portanto, são dois sistemas já reconhecidos e aprovados pelos órgãos reguladores, como sendo capazes de gerarem produtos biotecnológicos de maneira segura e eficiente.

Nossa expectativa foi estabelecer dois sistemas recombinantes e avaliar a expressão das proteínas estruturais do MAYV e a partir disso obter as VLPs. Nossos resultados constituem uma importante ferramenta no desenvolvimento de métodos vacinais e kits diagnósticos para a febre Mayaro, que tem grande potencial de vir a ser um problema de saúde pública e que ainda não dispõe de trabalhos na literatura com esse propósito. Este estudo ainda possibilita a extrapolação dessa abordagem para arbovírus semelhantes.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Arboviroses

São classificadas como arboviroses as doenças causadas por vírus denominados arbovírus (*arthropod-borne virus*), que tem como característica a transmissão entre artrópodes hematófagos e vertebrados, durante o seu ciclo de vida (WEAVER et al., 2010). Os mosquitos são os principais vetores dos arbovírus, com destaque para os *culicídeos*, que engloba os gêneros *Culex* e *Aedes*, sendo os transmissores das arboviroses mais relevantes à saúde humana. No entanto existem outros insetos capazes de transmitir os arbovírus, como carrapatos, piolhos, percevejos, ácaros e alguns tipos de moscas (ADELMAN et al., 2013). O reservatório natural desses vírus são primatas não humanos, roedores, entre outros mamíferos e aves. Os humanos são hospedeiros acidentais, pois não produzem grande viremia, sendo mínimas as chances de transmissão entre humanos sem a presença do vetor hematófago (WEAVER et al., 1997). Os arbovírus podem ainda ser transmitidos verticalmente (progenitora infectada gera prole infectada) e por transmissão sexual ou venérea (FERREIRA-DE-LIMA et al., 2018).

Esses vírus estão distribuídos principalmente em cinco famílias virais: *Bunyaviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae*, sendo estimadas mais de 545 espécies de arbovírus, das quais mais de 150 estão relacionadas com doenças em seres humanos (RUST et al., 2012). Os vírus pertencentes a essas famílias possuem RNA como material genético, possuindo maiores taxas de mutações e com uma grande variedade na forma do genoma (fita dupla, fita simples senso positivo, fita simples senso negativo) (HOLLAND et al., 1998). Essa plasticidade genética aliada a mutações permitem acomodar um ciclo de replicação alternada em hospedeiros vertebrados e invertebrados, além de permitir uma grande capacidade de adaptação a novos hospedeiros e fatores ambientais (COFFEY et al., 2013).

A distribuição dos arbovírus é bastante ampla, estando presente em todos os continentes, com exceção da Antártida. No entanto, cada espécie viral tende a ter uma distribuição geográfica e climática restrita à distribuição dos vetores, dos hospedeiros e reservatórios (WEAVER et al., 2010). Geralmente circulam através de animais em florestas, mas eventualmente podem emergir para as áreas urbanas e causar epidemias, como por

exemplo, a que ocorre com o vírus da dengue e mais recentemente com o vírus Zika e o vírus da febre amarela (VALENTINE et al., 2016). A emergência e reemergência de arboviroses são fenômenos naturais relacionados à evolução da espécie e sua adaptação, de forma que durante a infecção de múltiplos e distintos organismos, os vírus podem ser selecionados dentro do hospedeiro e produzir populações mais virulentas (PILJMAN et al., 2011).

Existem vários fatores associados à urbanização dos arbovírus, sendo a principal, as mudanças ecológicas produzidas pelo homem no habitat do vetor, através de desflorestamento, invasões para comércio ou turismo e atividades agrícolas. Essas atividades criam novos reservatórios, ou selecionam arbovírus adaptados para a manutenção do seu ciclo replicativo, permitindo uma maior proliferação. Além disso, facilidades de transportes oriundas da globalização, facilitam o espalhamento dos vírus a longas distâncias, atingindo novos continentes e países, inserindo novas arboviroses em locais onde antes não existiam (FIGUEIREDO et al., 2007). Vários exemplos de urbanização de arbovírus podem ser citados, como o caso do vírus *West Nile* (WNV), da Encefalite Japonesa (JEV), da febre do vale *Rift* (RVFV), da língua Azul (BTV), da encefalite equina venezuelana (VEEV), da dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV), Zika (ZIKV), entre outros (WEAVER et al., 2010).

Atualmente, um dos principais problemas de saúde pública no Brasil têm sido as arboviroses, principalmente a dengue, febre Chikungunya, febre Zika e febre amarela. São doenças que apresentam sintomatologia semelhante, que debilitam os acometidos por muitos dias e em alguns casos levam a óbito. Em todas essas doenças o vetor responsável pela transmissão é o *Aedes aegypti*, um mosquito típico de regiões urbanas que por motivos climáticos e pela ineficácia no seu controle, hoje é altamente disseminado em todas as regiões do país (KOTSAKIOZI et al., 2017).

Há décadas, a dengue vem sendo um problema crônico no país com o número de casos crescendo a cada ano. Além da dengue, recentemente no Brasil houve uma grande mobilização por parte do governo frente ao crescente número de casos da febre Zika, que além das consequências típicas desse tipo de doença, apresentou outros graves problemas oriundos da infecção, como a microcefalia e a síndrome de *Guillan Barré*. O último boletim epidemiológico do ministério de saúde confirma 3037 casos de alterações no crescimento de recém-nascidos, com 70 mortes, no período de Novembro de 2015 a Dezembro de 2017 (BRASIL, 2018). As medidas tomadas incluíram maiores investimentos por parte do governo

em combate aos vetores, medidas e campanhas de conscientização, além dos tratamentos de pessoas acometidas (BRASIL, 2018).

Outra importante arbovirose que ressurgiu no cenário nacional foi a febre amarela, uma doença com alta taxa de mortalidade, que teve 846 casos confirmados entre Julho de 2017 e Março de 2018, com 260 mortes (BRASIL, 2018). Um aumento expressivo frente ao mesmo período entre 2016 e 2017, quando houve 597 casos confirmados com 190 mortes (BRASIL, 2017). Sendo novamente tomadas ações por parte do governo para tentar conter o avanço da mesma, realizando uma grande campanha de vacinação, além de intensificação de outras medidas já realizadas rotineiramente para as demais doenças relacionadas.

Além dos problemas relacionados à saúde da população, as arboviroses são doenças que geram um grande custo aos cofres públicos. Um estudo calculou que os gastos com a dengue no país em um ano, podem chegar a 2,7 bilhões de reais, incluindo gastos do sistema de saúde, custo social com dias perdidos de trabalho, deslocamentos, dentre outros. Estima-se que os gastos direto do governo, através de unidades de saúde, chegue a 1 bilhão de reais, considerando que esse número poderia ser ainda maior, visto que grande parte das pessoas não procuram a rede pública de saúde (MARTELLI et al., 2015).

Portanto, todos esses dados evidenciam o quanto o país é propenso ao surgimento de novas arboviroses, seja pelas condições climáticas ou pela ineficácia em melhorias de saneamento e controle de vetores. Sendo assim, são necessários estudos e ações para evitar que possíveis novas doenças venham a integrar essa extensa lista de problemas de saúde pública.

2.2 Febre Mayaro

O vírus Mayaro (MAYV) é um *Alphavirus* responsável por uma enfermidade conhecida como febre Mayaro, que ocorre principalmente em áreas de florestas (MUÑOZ et al., 2012). Esta infecção resulta em uma doença aguda que dura de 3 a 5 dias, sendo responsável por uma alta debilidade clínica que inclui febre, cefaléia, exantema, mialgias, artralgias, fotofobia, edema articular e manifestações gastrointestinais (PINHEIRO et al., 1998). Semelhante à febre Chikungunya, o sintoma mais característico da doença é a artralgia, que consiste em fortes dores nas articulações, oriundas do acúmulo viral nesses locais,

ocasionando muitas vezes a impossibilidade de movimentação nos locais afetados. Essa condição pode durar por meses, gerando uma morbidade significativa (COIMBRA et al., 2007; TESH et al., 1999). O tratamento é sintomático, já que não existe uma terapia específica contra o MAYV.

A doença foi relatada pela primeira vez em Trinidad e Tobago, em 1954. Posteriormente, o vírus foi isolado em humanos, vertebrados selvagens e mosquitos na Colômbia, Venezuela, Peru, Bolívia, Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Haiti e Brasil, principalmente em regiões de florestas (ROBERT et al., 1999; LEDNICKY et al., 2016). Atualmente, a doença é caracterizada como endêmica nas regiões amazônicas desses países, com casos sendo relatados constantemente, mas com poucos surtos.

No Brasil, casos esporádicos da doença vêm sendo registrados desde 1955, quando foi notificada pela primeira vez no país, às margens do rio Guamá, próximo de Belém, no estado do Pará. Esses casos têm sido registrados principalmente nos estados das regiões Norte e Centro-Oeste, embora os registros de surtos sejam ocasionais (BRASIL, 2018). Recentemente, foram registrados 343 casos humanos suspeitos de doença pelo vírus Mayaro, entre dezembro de 2014 e janeiro de 2016. Os casos suspeitos foram identificados em onze estados distribuídos nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, com destaque para o estado de Goiás com a maior frequência 183 (53,3%), seguido do Pará com 68 (19,8%) e Tocantins, com 25 (7,2%) casos suspeitos. Entre os casos notificados, 70 foram confirmados (60 em Goiás), 29 foram descartados e 244 permanecem em investigação, aguardando os resultados laboratoriais. No caso de Goiás, análises das pessoas acometidas, concluiu que todos os casos confirmados eram de moradores que habitavam ou estiveram expostos, possivelmente durante atividades de trabalho ou lazer, em áreas rurais, silvestres ou de mata em período menor de 15 dias, antes do início dos sintomas (BRASIL, 2018).

Os principais vetores do MAYV são os mosquitos *Haemagogus*, que habitam áreas rurais e copas das árvores em florestas, longe do contato direto com altas densidades populacionais humanas. Entretanto, foi demonstrado em laboratório, que os mosquitos *Aedes aegypti* são competentes vetores para o MAYV, sugerindo que um artrópode urbano pode vir a ser um transmissor importante desse agente, e conseqüentemente, ocasionar a disseminação da doença (LONG et al., 2011). Além disso, estudos já demonstraram a presença do vírus MAYV nos vetores *Aedes aegypti* e o *Culex sp* coletados em Mato Grosso, sendo

comprovado também a infecção por esse vírus de pessoas residentes em áreas urbanas, mas próximas de matas (SERRA et al., 2016; ZUCHI et al., 2014).

Atualmente, não existem vacinas disponíveis para os *Alphavirus*, sendo que os estudos em desenvolvimento visam principalmente o vírus Chikungunya. Com relação ao vírus Mayaro, apenas duas abordagens são relatadas na literatura. Um estudo avaliou o potencial de inativação do vírus com formalina e seu uso como agente vacinal, obtendo bons níveis de proteção, mas sem prosseguimento dos estudos (ROBINSON et al., 1976). Outro trabalho mais recente avaliou a atenuação do vírus utilizando uma sequência IRES (*internal ribosome entry site*) do vírus *encephalomyocarditis*, abordagem já empregada para outros *Alphavirus*. A sequência IRES foi inserida no lugar do promotor subgenômico 26S, de forma que as proteínas estruturais não fossem expressas quando em células de inseto, visto o não reconhecimento dessa sequência pelos ribossomos desses organismos, evitando assim a proliferação do vírus (WEISE et al., 2014). Esses vírus com a sequência IRES foram utilizados em testes em camundongos e demonstraram um alto grau de atenuação, indução de anticorpos neutralizantes e eficácia contra o desafio letal. No entanto, as abordagens que utilizam vírus vivos atenuados apresentam desvantagens como o risco de reversão da virulência e as necessidades estruturais de biossegurança para manipulação do produto.

Por se tratar de dois vírus do mesmo gênero, a febre Mayaro é muito semelhante à febre Chikungunya, causada pelo vírus CHIKV, o que dificulta em muito o diagnóstico diferencial entre elas. Recentemente um aumento expressivo de casos de febre Chikungunya foi relatado nas Américas, especialmente no Brasil, com casos autóctones já comprovados. A entrada do CHIKV no país levou o Ministério da Saúde a tratar a doença com a mesma importância da dengue, sendo emitida em 2014, uma cartilha denominada “Preparação e Resposta à Introdução do Vírus Chikungunya no Brasil”, informando medidas a serem tomadas a respeito desse patógeno (BRASIL, 2018). No ano de 2014, foram notificados 3.657 casos suspeitos de febre Chikungunya no país, enquanto que esse número subiu para 20.661 casos em 2015, dos quais 7.823 foram confirmados através de exames diagnósticos (BRASIL, 2018). A rápida e eficiente proliferação do CHIKV pelo país potencializa ainda mais os riscos de o mesmo acontecer com o MAYV, em um futuro próximo.

Outro fato relevante é que os surtos de febre Mayaro podem estar subestimados, devido à precariedade nos diagnósticos e, consequente associação do caso a uma doença semelhante. O diagnóstico laboratorial pode ser feito através do isolamento viral ou

verificação da presença do material genético (PCR em tempo real), em até 5 dias após o aparecimento dos sintomas, ou mais tardiamente através de ensaios sorológicos (ELISA) verificando a presença de anticorpos específicos para cada espécie de vírus (ZUCHI et al., 2014).

Esses cenários evidenciam a necessidade de estudos e pesquisas com relação ao MAYV, visando o desenvolvimento de abordagens inovadoras para prevenção da doença por ele causada. Portanto, o estudo epidemiológico deve ser intensificado e estratégias de controle e prevenção da infecção do MAYV são necessárias para evitar uma possível epidemia, como a que assistimos recentemente com outras arboviroses (WEAVER et al., 2010; BRASIL, 2018).

2.3 Vírus Mayaro (MAYV)

O vírus Mayaro (MAYV), pertence à família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*, no qual são encontradas 30 espécies classificadas de acordo com os seus determinantes antigênicos e as diferenças genômicas, sendo todos arbovírus, ou seja, transmitidos por artrópodes (WEAVER et al., 2012).

O MAYV é um vírus envelopado que contém uma única fita de RNA positivo, linear, com aproximadamente 12 kb. Seu genoma foi completamente sequenciado e é subdividido em regiões genômica (42S) e subgenômica (26S), que codificam para proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) e estruturais (C, E3, E2, 6K e E1), respectivamente (LAVERGNE et al., 2006). O genoma viral forma um complexo com a proteína C, originando o nucleocapsídeo viral, de formato icosaédrico. No envelope viral encontram-se as glicoproteínas E1 e E2, enquanto a E3 está relacionada com a sinalização dessas para o transporte até a membrana, sendo possível sua presença no envelope viral (ISHIMARU et al., 1998, FERREIRA et al., 2000).

O ciclo de replicação dos *Alphavirus* está evidenciado na **Figura 1**. Basicamente, a entrada do MAYV nas células hospedeiras é mediada por receptores e ocorre por endocitose. Neste processo, a glicoproteína E2 é responsável pelo contato entre a partícula viral e a membrana celular, interagindo para que a partícula viral seja introduzida por uma vesícula endocítica. Então o envelope viral se funde à membrana vesicular através da glicoproteína E1,

dependente de pH ácido, liberando o genoma viral no citoplasma (JOSE et al., 2009). O RNA positivo é então traduzido dando origem às proteínas não estruturais como primeiro passo para a replicação viral (ISHIMARU et al., 1998). Após esse processo, essas proteínas geradas pelo RNA genômico, auxiliam na tradução das proteínas estruturais, a partir de um RNA gerado do RNA genômico, chamado RNA subgenômico. Na expressão das proteínas estruturais, é gerada uma poliproteína, que é então clivada dando origem à proteína do capsídeo (C) e às proteínas p62, 6K e E1. A proteína C possui atividade autoproteolítica, realizando sua própria clivagem durante a tradução, a partir do polipeptídeo. A p62 é clivada dando origem à E2 e à E3, que são então direcionadas para a membrana, para a formação da nova partícula viral (STRAUSS E STRAUSS, 1994).

Figura 1 - Ciclo replicativo dos *Alphavirus*

Fonte: Adaptado de SCHWARTZ, 2010.

A glicoproteína E2 do vírus Mayaro possui aproximadamente 50 KDa e está presente no envelope viral. Por ser responsável pela adesão do vírus aos receptores da célula hospedeira, constitui o alvo preferencial para os anticorpos neutralizantes no organismo

exposto ao MAYV (STRAUSS E STRAUSS, 1994, ISHIMARU et al., 1998). Portanto, qualquer estudo visando o desenvolvimento de um potencial agente vacinal, deve levar em conta a correta expressão dessa proteína, de forma que a indução de anticorpos seja adequada para gerar a imunidade.

2.4 Partículas semelhantes a vírus - *Virus Like Particles* (VLPs)

As partículas denominadas *Virus Like Particles* (VLPs) consistem em estruturas proteicas que mimetizam a organização e conformação das partículas virais, podendo conter uma ou mais proteínas estruturais de determinado vírus (ROLDAO et al., 2010). As VLPs podem ser divididas em duas classes: não envelopadas e envelopadas. As VLPs não envelopadas podem ser compostas com uma ou mais proteínas, de forma que essas tenham a capacidade de automontagem. Enquanto as VLPs envelopadas se mostram mais complexas, uma vez que apresentam parte da membrana plasmática do hospedeiro com proteínas virais inseridas, sendo portanto, muito importante a escolha da célula em que será expressa (PIJLMAN et al., 2015).

As VLPs possuem enorme potencial para uso como candidatos vacinais, uma vez que sua semelhante composição com a partícula viral induz relevante resposta imunológica, tanto em nível humoral quanto celular, de maneira quase idêntica a uma infecção natural (GRGACIC et al., 2006). Essa abordagem combina a eficácia de uma vacina atenuada com o perfil de segurança de uma vacina de subunidade (PIJLMAN et al., 2015). Não por acaso, existem atualmente, uma grande quantidade de vacinas comerciais utilizando VLPs como componentes, com destaque para vacinas contra os vírus da Hepatite B, e contra o vírus do HPV. Além dessas, há diversos trabalhos sobre obtenção de VLPs de mais de 30 diferentes vírus, com alguns estudos já em fase clínica, com possibilidade de inserção no mercado nos próximos anos (ROLDAO et al., 2010).

A fim de produzir uma VLP funcional que efetivamente reproduza a estrutura de um vírus selvagem, muitas vezes são necessárias múltiplas proteínas estruturais onde todos os componentes virais devem ser montados de maneira correta, não comprometendo a conformação do mesmo (AKAHATA et al., 2010). Portanto, é importante que o sistema de expressão utilizado para produzir as partículas, seja ao mesmo tempo, seguro e capaz de produzir as proteínas tanto em pequena escala (de teste) quanto em maior escala (para a

produção de vacinas), além de satisfazer as necessidades de modificações em proteínas complexas, não alterando assim sua imunogenicidade (KUSHNIR et al., 2012)

Neste sentido, houve um interesse considerável na utilização do sistema de expressão baseado em baculovírus para a produção de vacinas de VLPs, como alternativa para atender aos requisitos acima mencionados. Recentemente, o FDA autorizou a utilização e comercialização de uma vacina humana de VLP produzida em baculovírus, chamada Cervarix®, da GlaxoSmithKline, e ampliou o interesse no estudo do sistema de baculovírus para a produção de VLPs. Esta vacina é composta por VLPs da proteína L1 do papilomavírus humano (HPV) (HPV-16 e HPV-18). Recentemente, outra vacina produzida em baculovírus foi aprovada pelo FDA, a Flublock, da empresa ProteinScience. Essa vacina é trivalente e é composta da proteína hemaglutinina de 3 cepas do vírus da Influenza, expressa em células Sf-9 utilizando o sistema baculovírus (ProteinScience).

Existem diversos trabalhos que avaliam a geração de VLPs de diferentes vírus como dengue, Chikungunya, Norwalk, HIV dentre outros. Os ensaios iniciais evidenciam boa resposta imunológica e os potencializam como possíveis futuros componentes vacinais (HERBST-KRALOVETZ et al., 2010; URAKAMI et al., 2017; TOHIDI et al., 2017). Trabalhos mais recentes têm demonstrado também a capacidade de VLPs produzidas em baculovírus de encapsidar mRNA recombinante, como por exemplo, o mRNA portando sequências do vírus do mosaico de ervilha (PEMV- *pea enation mosaic virus*), o que permitiria otimizar a resposta imunológica do organismo vacinado com uma VLP, sendo capaz de infectar e expressar proteínas virais não estruturais, porém sem se replicar, mimetizando desta forma uma infecção viral, mas sem o aumento de carga viral e desenvolvimento da doença (SIVAKUMAR et al., 2009).

Existem também no mercado, vacinas de VLPs produzidas em *P. pastoris*, principalmente contra a Hepatite B. As vacinas Heberbiovac-HB (CIGB – Heber Biotec), Enivac-HB (Panacea Biotec) e Revac-B (Bharat Biotec International), se baseiam em VLPs do antígeno de superfície do vírus da Hepatite B (HBsAg) expresso nesse organismo (KUSHNIR et al., 2012).

Além disso, existem muitos trabalhos em desenvolvimento relacionados à produção de VLPs através do sistema *P. pastoris*. Um estudo recente evidenciou a produção de VLPs com a proteína do envelope do vírus da dengue, com forte indução de anticorpos neutralizantes

(MANI et al., 2013). Em outro estudo, foi possível gerar VLPs de Norovírus com a proteína estrutural VP1, e ensaios para avaliar a indução de imunidade estão sendo desenvolvidos (TOMÉ-AMAT et al., 2014). Em proposta semelhante, um grupo de pesquisa relatou recentemente, a produção de VLPs de Chikungunya utilizando *P. pastoris*, evidenciando uma promissora resposta imunológica das partículas, em ensaios de imunização em camundongos (SARASWAT, et al. 2016).

Assim a geração de VLPs de MAYV através desses sistemas possui grande potencial, não só pelos bons níveis de expressão alcançados com outros vírus, como também pela aceitação frente a órgãos reguladores.

2.5 Baculovírus

Os baculovírus são vírus pertencentes à família *Baculoviridae*, são vírus envelopados e possuem 80 a 180kpb de DNA fita dupla como material genético. Os baculovírus têm formato de bastão com tamanho de 200-350 nm de comprimento e 30-100 nm de largura. Eles têm a capacidade de infectar insetos, principalmente da ordem *Lepidoptera*, aos quais são patogênicos (BONNING et al., 2005). São vírus espécie-específico e por esse motivo, são empregados em atividades de controle biológico de larvas que acometem diferentes plantações (SZEWCZYK et al., 2006).

Naturalmente, o baculovírus produz dois tipos de fenótipos denominados corpos de inclusão (*occlusion bodies* – OB) e vírus extracelulares (*budded virus* – BV). Os OBs são estruturas revestidas por poliedrina, produzida pelo próprio vírus, formadas dentro do núcleo das células de inseto infectadas, sendo altamente resistentes. Quando no meio ambiente, os OBs são ingeridos por lagartas, o revestimento de poliedrina é degradado e o vírus é capaz de infectar as células do hospedeiro. Os nucleocapsídeos são direcionados ao núcleo celular, onde o DNA liberado inicia o processo de replicação. Após essa etapa, os DNAs gerados são então envoltos por novos nucleocapsídeos e são liberados da célula por brotamento, levando parte da membrana plasmática celular como envelope viral. Esses baculovírus liberados por brotamento são os chamados BVs, que fazem novas infecções em outras células e produzem novos BVs e OBs.

Com base nos estudos desses vírus e a necessidade do desenvolvimento de novos sistemas de expressão em células eucarióticas, que produzissem grandes quantidades de proteína recombinante em pouco tempo, foram desenvolvidos sistemas baseados nos baculovírus (BEVS - *Baculovirus expression vectors system*). Esses sistemas usam comumente o baculovírus *Autographa californica multinuclear polyhedrosis* (AcMNPV) e se baseiam na utilização das partículas BVs, pois não possuem o gene da poliedrina, não gerando assim os poliedros (LOPEZ-VIDAL et al., 2015). No entanto, eles preservam o promotor de poliedrina, considerado de forte expressão e que já demonstrou ser eficiente na produção de grandes níveis de proteínas heterólogas.

Baseado em Ciccarone et al. (1997) e Luckow et al. (1993), um protocolo rápido e eficiente foi desenvolvido para gerar baculovírus recombinantes, sendo comercializado pela empresa Thermo Fischer Scientific, e denominado Bac-to-Bac®. Neste sistema, inicialmente é realizada a inserção do gene de interesse em um plasmídeo “doador”, o pFastBac™, flanqueado por sítios de transposição (Tn7), que possibilita a transferência dos genes de interesse do pFastBac para o genoma do baculovírus AcMNPV (bacmídeo), presente em uma cepa de *Escherichia coli* DH10Bac™. Esse bacmídeo também possui os sítios de transposição flanqueando um sítio alvo, além de um plasmídeo auxiliar (*helper*), que gera as enzimas necessárias para que a transposição ocorra. Uma vez obtido o genoma do baculovírus recombinante, é possível transfectá-lo em células de inseto para a produção dos lotes virais, e após reinfecções para amplificação do título viral, ensaios para avaliar a expressão das proteínas podem ser realizados.

O ciclo de replicação do baculovírus se inicia com a interação entre as glicoproteínas GP64 do vírus com receptores de células de inseto, proporcionando sua entrada por endocitose. Logo após a entrada na célula ocorre a descapsidação do vírus no citoplasma através da fusão do envelope viral com a membrana endossomal, também mediada pela glicoproteína GP64. Esse processo gera um mecanismo de polimerização de fibras de actina, que se associam ao nucleocapsídeo, sendo este transportado até o núcleo, onde ocorre a liberação do DNA e sua transcrição. Dentro das primeiras horas já é possível detectar a presença de RNA viral na célula infectada. No período de 6 a 24 h.p.i, ocorre intensa replicação de DNA viral e produção de baculovírus, momento em que os primeiros efeitos citopáticos já podem ser observados, como por exemplo, o aumento de volume do núcleo. Nesse processo, os nucleocapsídeos formados migram para a membrana plasmática, de onde

brotam levando uma parte da mesma juntamente com as glicoproteínas previamente inseridas. A produção de baculovírus é logarítmica de 12 a 20 h.p.i., sendo que a partir desse tempo, ela decai e cessa. A partir de 24 h.p.i o promotor de poliedrina é ativado e expressa as proteínas heterólogas, havendo um bloqueio na síntese das proteínas da célula hospedeira. A expressão das proteínas heterólogas se mantém predominantes até aproximadamente 72 h.p.i.

Atualmente, o sistema BEVS, tem sido um dos mais atrativos métodos de expressão de proteínas recombinantes, uma vez que é capaz de promover altos níveis de expressão (HONGLI et al., 2016). O sistema também permite a inserção de grandes fragmentos de DNA no vírus recombinante, e a expressão de proteínas que requerem modificações pós-traducionais, como acetilação, glicosilação, fosforilação, entre outras (ALTMANN et al., 1999, CHESHENCO et al., 2001, MILLER et al., 1993). Além disso, por serem capazes de transduzir em células de mamíferos, embora nestas linhagens não haja replicação, os BEVS se tornam interessantes também para estudos de terapia gênica (BOYCE E BUCHER, 1996, KOST et al., 2005, RYCHLOWSKA et al., 2011). Não por acaso, nos últimos 30 anos os BEVS foram bastante estudados, e muitas modificações genéticas e otimizações foram realizadas neste sistema (LI et al., 2012). No entanto, alguns estudos no sentido de melhorar a expressão de proteínas de membrana, ou secretadas, ainda devem ser realizados para expandir mais sua aplicação (VAN OERS et al., 2001).

2.6 *Pichia pastoris*

Assim como os baculovírus, as leveduras são largamente utilizadas como sistemas de expressão para os mais variados tipos de proteínas. Seu emprego se deve a algumas características típicas desse tipo de organismo, como a fácil manipulação genética propiciando rapidez na obtenção de recombinantes, associada ao crescimento rápido em meios de cultivo relativamente simples e com baixo custo frente a outros sistemas, além da capacidade de expressão de proteínas complexas realizando modificações pós-traducionais (BALAMURUGAN et al., 2007). Todos esses fatores contribuem para os processos de expansão do cultivo, permitindo a produção de proteínas em escalas industriais (CEREGHINO e CREGG, 2000).

Entre as leveduras estudadas, os principais organismos utilizados são a *Sacharomyces cerevisiae* e a *Pichia pastoris*. A escolha de cada um depende dos propósitos do estudo, de modo que em muitos trabalhos, ambos são avaliados simultaneamente. O primeiro se destaca pelo fato de ser mais estudado, com uma maior variedade de proteínas já expressas, dispondo de maiores informações genéticas e metabólicas e consequentemente, de um número maior de ferramentas, como meios de cultura e plasmídeos comerciais (DARBY et al., 2012). No entanto a *P. pastoris* é mais indicada para expressão de proteínas secretadas, uma vez que possui baixa secreção de proteínas endógenas, facilitando o processo de purificação. Aliado a esse fato, existem hoje várias cepas de *P. pastoris* desenvolvidas com deficiência em proteases, evitando assim a degradação dos produtos gerados (OGUNJIMI et al., 1999). Outra importante vantagem para a *P. pastoris* está relacionada ao processo de glicosilação, uma vez que em *S. cerevisiae* é comum um processo denominado hiperglicosilação, onde muitas vezes há uma inserção não controlada de resíduos de manose em determinados sítios, alterando substancialmente a proteína e sua imunogenicidade, fato esse não verificado em *P. pastoris* (BRETTHAUER et al., 1999).

A levedura metilotrófica *P. pastoris* é um sistema já bastante utilizado para a produção de proteínas, sendo também muito empregada para a expressão de proteínas complexas, incluindo um grande número de proteínas de membrana eucarióticas (EMPs). Nos últimos tempos, tem sido relatada com sucesso a expressão de mais de 150 EMPs, sendo que muitas delas foram purificadas para determinação da sua estrutura cristalográfica, indicando bons níveis qualitativos. Dentre essas EMPs, incluem-se enzimas, transportadores e aquaporinas, ilustrando assim a notável eficácia e versatilidade deste sistema de expressão (BINDA et al, 2002; MARTINEZ MOLINA et al, 2007; ALLER et al, 2009; HORSEFIELD et al, 2008).

A *P. pastoris* tem a capacidade de utilização de metanol como fonte de carbono, através do promotor álcool oxidase (AOX), que é um promotor forte e altamente regulado por esse produto, sendo essa característica muito explorada para expressão induzida de altos níveis de proteínas recombinantes (BORNET et al., 2012). Na presença de metanol e ausência de glicose, o promotor regula a expressão da enzima álcool oxidase, que transforma o metanol em formaldeído, utilizando oxigênio molecular e gerando peróxido de hidrogênio. Por esse último ser tóxico, o processo é realizado nos peroxissomos, que tem a capacidade de conter esses produtos tóxicos. A enzima álcool oxidase tem uma fraca afinidade pelo oxigênio molecular sendo compensado por uma grande quantidade de produção da enzima.

Essas características são bem exploradas comercialmente, sendo que vários plasmídeos já foram desenvolvidos com a capacidade de integração ao genoma da *P. pastoris*, como por exemplo, o pPIC9K da empresa Thermo Fischer Scientific, que dispõe do promotor AOX1 como regulador do gene de interesse a ser inserido. Basicamente, o processo se resume em clonar o gene de interesse nesse vetor, e posteriormente transformá-lo na cepa de *P. pastoris* escolhida, de forma que sua expressão possa ser induzida pela presença de metanol, possibilitando um maior controle do processo. Os plasmídeos possuem sequências que se recombinam com sequências do genoma da levedura, permitindo a integração do mesmo. Sendo que após a integração, a sequência permanece disponível para uma nova integração de outro plasmídeo e assim sucessivamente, permitindo a inserção de múltiplas cópias. Cada sequência inserida possui além do gene de interesse, um gene de resistência ao antibiótico geneticina, de forma que um clone que apresente maior resistência a uma concentração do antibiótico, possivelmente será um clone com mais cópias do gene de resistência e consequentemente, possuirá mais cópias do gene de interesse (SCORER et al., 1994).

As proteínas expressas pelo sistema *P. pastoris* geralmente são identificadas pela presença de uma sequência sinal, como um sinal de secreção da proteína nativa, o α -factor de *Saccharomyces cerevisiae* (α -MF), a fosfatase ácida (PHO1) da *P. pastoris* e a sequência de sinal da invertase (SUC2). Alternativamente, a adição de sequências marcadoras (TAGs), permitem a detecção e o isolamento da proteína alvo usando técnicas e ferramentas genéricas. Uma marcação ideal deve exercer um mínimo efeito sobre a estrutura terciária e a atividade biológica da proteína fundida. Deve permitir também um único passo de purificação e ser facilmente e especificamente removido da proteína nativa, além de ser aplicável a uma série de diferentes proteínas (LOGEZ et al., 2012). Embora seja difícil decidir sobre a melhor sequência de fusão e posição a ser utilizada para uma proteína especificamente, existem inúmeras referências de marcas e locais de clivagem da protease para liberá-las, de grande utilidade para a produção de proteínas em *P. pastoris* (TERPE et al., 2003).

O desenvolvimento da abordagem envolvendo *P. pastoris* tem como suporte, a colaboração com o Laboratório de Biotecnologia e Sinalização Celular, da Universidade de Strasbourg, França, visto como referência nos trabalhos envolvendo expressão de proteínas através de *P. pastoris* (BORNET et al., 2012; SINGH et al., 2012; LOGEZ et al., 2012).

3 Objetivos

3.1 Objetivos Gerais

O objetivo desse trabalho foi expressar as proteínas estruturais do MAYV em dois sistemas de expressão distintos, baculovírus e *P. pastoris*, e avaliar a geração de partículas semelhantes a vírus (*virus like particles* - VLPs).

3.2 Objetivos Específicos

- Construir vetores para obtenção de baculovírus (BEVS) e *P. pastoris* recombinantes.
- Obter baculovírus (BEVS) e *P. pastoris* recombinantes portando os genes estruturais do MAYV.
- Estabelecer um método de titulação/quantificação dos baculovírus recombinantes
- Avaliar diferentes parâmetros (MOI; Tempo) e linhagens celulares no processo de infecção com os BEVS.
- Avaliar a expressão das proteínas estruturais e a formação de VLPs em ambos os sistemas – Dot blot; *Western blot*; Imunofluorescência indireta (IFI); Microscopia eletrônica de transmissão.

4 Materiais e Métodos

4.1 Obtenção do baculovírus recombinante (Baculovírus-E-MAYV)

O processo de obtenção do baculovírus recombinante, contendo os genes das proteínas estruturais do MAYV (E-MAYV), foi desenvolvido com base no esquema apresentado na **Figura 2**, utilizando o kit comercial Bac-to-Bac (Thermo Fischer Scientific), conforme instruções do fabricante.

Figura 2 - Esquema da metodologia empregada para obtenção do baculovírus recombinante (Bac-E-MAYV) e expressão dos genes do MAYV

Baseado em “Bac-to-Bac Baculovirus Expression”, Thermo Fisher Scientific.

4.1.1 Linhagens celulares de inseto

Neste trabalho foram utilizadas quatro linhagens de células de insetos. As células Sf-9, que é um clone isolado da linhagem Sf-21, derivada do tecido ovariano da lagarta *Spodoptera frugiperda*, células Sf-9 *Easy Titration* (Sf-9 ET), com ambas sendo cultivadas em meio SF-900 III (Gibco), em estufa a 27° C. Outra linhagem avaliada foi a *High Five* (Hi-5), que é derivada de células do ovário da lagarta *Trichoplusia ni*, e foram cultivadas em meio *Express*

Five (Gibco) e mantidas em estufa a 27° C. Um banco de células foi feito para cada linhagem, a partir do qual as mesmas foram utilizadas, de forma que fosse mantida uma mesma passagem nos experimentos. As células C636, oriundas do mosquito *Aedes albopictus*, foram utilizadas para cultivo do MAYV selvagem, a partir do qual foram obtidos os genes utilizados no trabalho, sendo também utilizado como controle positivo nos experimentos de dot blot e *Western blot*. As células C636 foram cultivadas em meio *Leibovitz L15* (Thermo Fisher Scientific).

As células Sf-9 foram utilizadas para a produção dos baculovírus recombinantes, através da transfecção do bacmídeo-E-MAYV, e também para amplificação dos lotes virais. As linhagens Sf-9 e Hi-5 foram utilizadas em ensaios de infecção com baculovírus-E-MAYV, e avaliadas quanto à expressão de proteínas do MAYV e geração de VLPs. Já as células Sf-9 ET foram utilizadas para ensaios de titulação dos lotes virais.

4.1.2 Desenho de oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos RT-MAYV, E-MAYV F / R, IF-pMT-MAYV F / R foram utilizados nos experimentos de obtenção dos genes estruturais do vírus Mayaro e clonagem no vetor pMT-Hy. Os oligonucleotídeos IF-pFast-E-MAYV F / R foram utilizados para clonagem do fragmento E-MAYV no vetor pFastBac1. Enquanto os oligonucleotídeos M13 F / R e E2-MAYV F / R foram utilizados para confirmação de obtenção do bacmídeo recombinante, sendo o primeiro par sugerido pelo kit Bac-to-Bac, estando todos apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos para obtenção do Bac-E-MAYV

Nome	Sequência	T _m (°C)
RT-MAYV	TTACCTTCTCAAAGTCACACAAGT	63,0
E-MAYV F	TGCGGAGCCACCATGGACTTCCTACCAACTCAAGTG	58,1
E-MAYV R	CTCGAGCGGCCGCCATTACCTTCTCAAAGTCACACAAG	58,4
IF-pMT-MAYV F	TGGCGGCCGCTCGAGTCTAG	68,8
IF-pMT-MAYV R	CATGGTGGCTCCGCAGAATTC	64,5
IF-pFast-E-MAYV F	CGACGAGCTCACTAGACCATGGACTTCCTACCAACTC	72,2
IF-pFast-E-MAYV R	AGCGGCCGCGACTAGTTACCTTCTCAAAGTCACACAAG	73,5
M13 F	CCCAGTCACGACGTTGTAAACG	52,0
M13 R	AGCGGATAACAATTCACACAGG	48,0
E2-MAYV F	TGTCCACCTGGCGAAC	55,1
E2-MAYV R	TGCGCTCTGCTTGCATC	56,4

T_m – Temperatura de melting

4.1.3 Obtenção dos genes estruturais do MAYV (E-MAYV)

4.1.3.1 Extração do RNA viral

Os genes estruturais do vírus Mayaro utilizados nos estudos, foram obtidos a partir da cepa BeAr20290 (GenBank: KT754168.1), cultivada em células C636 com meio Sf-900 III (Thermo Fisher Scientific). O sobrenadante contendo as partículas virais foi submetido a um processo de extração do RNA viral, através do kit QIAmp Viral RNA (Qiagen), conforme instruções do fabricante.

O RNA obtido foi quantificado através do reagente Quant-it RNA assay kit (Invitrogen) e do fluorímetro Qubit (Invitrogen). O material foi então tratado com a enzima DNase I (Promega, Madison, WI., U.S.A.), para eliminar possíveis DNAs contaminantes que possam existir na solução, sendo utilizado 3 unidades da enzima para cada 3 microgramas do

material, e a solução foi incubada a 37°C, 30 min. Terminado esse período, adicionou-se 2 µL de um inibidor enzimático à base de EGTA (*Stop Solution*), e a reação foi incubada a 65 °C, 10 min. Este passo visa a inativação da enzima, para que não haja ação da mesma no cDNA viral que será obtido posteriormente. O RNA tratado foi imediatamente submetido a uma reação de transcrição reversa.

4.1.3.2 Transcrição Reversa e PCR (RT-PCR)

No processo de transcrição reversa, visando obter o cDNA correspondente ao material genético viral, foi utilizado o oligonucleotídeo RT-MAYV (**Tabela1**). Cada amostra de RNA livre de DNA foi então imediatamente submetida à reação de transcrição reversa com a enzima M-MLV (Invitrogen). Primeiramente, 200 ng de RNA tratado com DNase foram incubados a 65 °C, 5 min, juntamente com 1 µM de oligonucleotídeos anti-senso específico, 0,5 mM de dNTPs e água livre de DNase e RNase. Em seguida, a mistura foi resfriada rapidamente com gelo e adicionou-se o tampão, juntamente com o DTT 0,1M e 200 U de M-MLV, em um volume total de 20 µL. A reação foi incubada a 37 °C, 30 min, para a síntese do cDNA, sendo interrompida pela incubação a 70 °C, 15 min. A confirmação de obtenção do cDNA foi feita através de um gel de agarose 0,8 %.

Posteriormente, foi realizado um procedimento de PCR convencional (PCRc) com oligonucleotídeos flanqueando a região dos genes das proteínas estruturais (E-MAYV F / E-MAYV R - **Tabela 1**). A reação de PCRc foi desenvolvida com o kit comercial Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), seguindo recomendações do fabricante. Foram adicionados 5 µL de amostra, para 1 µL de cada primer (5µM), 1 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 0,5 µL dNTP (10 mM), 2,5 µL de Buffer 10x, 0,2 µL de enzima (1 U) e água para um volume final de 20 µL. A reação foi realizada no termociclador PTC-200 (MJ Research) com o seguinte ciclo de amplificação: 94 °C / 3 minutos, (94°C/ 15s, 55°C/ 30s, 72°C/ 3 min) x 34, 72°C / 10 minutos; e M13 F / R 94 °C / 3 minutos, (94°C/ 45s, 55°C/ 40s, 72°C/ 7 min) x 34, 72°C / 10 minutos.

4.1.3.3 Obtenção do vetor pMT-E-MAYV

Após a confirmação de obtenção do cDNA correspondente aos genes estruturais do vírus Mayaro (E-MAYV), o mesmo foi clonado em um vetor intermediário, o pMT-V5b (Thermo Fisher Scientific) utilizando o kit *In Fusion* (Clontech), conforme instruções do fabricante. Primeiramente, com o auxílio do programa “*Primer design tool*”, disponível no site da empresa Clontech, foi desenhado um par de primers, com cada um contendo regiões específicas tanto para a região flanqueadora do fragmento a ser obtido, quanto para a região flanqueadora do local onde o mesmo será inserido (Primers IF-pMT-MAYV F / IF-pMT-MAYV R – **Tabela 1**). Uma reação de PCRc foi então realizada com o fragmento E-MAYV e os *primers* obtidos, utilizando 1 uL do fragmento E-MAYV, 0,6 µL de cada primer (5µM), 6,25 uL de “*Phusion mix*” (contido no kit), e água para um volume final de 20 µL. A reação foi realizada no termociclador PTC-200 (MJ Research) com o seguinte ciclo de amplificação: 98 °C / 30 segundos, (98°C/ 10s, 55°C/ 30s, 72°C/ 4 min) x 5, 98 °C / 30 segundos, (98°C/ 10s, 58°C/ 30s, 72°C/ 1 min) x 30, 72°C / 10 minutos, 4°C.

Simultaneamente à reação de PCRc, o vetor de destino (pMT-Hy) foi linearizado com a enzima *SpeI*, presente no sítio de clonagem. Um procedimento de eletroforese em gel de agarose 1 % foi feito para verificar o êxito de ambas as reações, e as bandas correspondentes ao fragmento E-MAYV e ao vetor pMT-Hy linearizado, foram purificadas com o kit *Nucleospin Gel and PCR clean-up* (Macherey Nagel). Posteriormente, foram utilizados em um procedimento de ligação na proporção 1:3 (vetor: inserto), utilizando 2 uL do tampão “*In fusion 5x*” (contido no kit), 2,5 uL do vetor, 2,2 uL do inserto, e água para um volume final de 20 uL, sendo incubados a 50 °C por 15 minutos. Após esse período, a reação foi colocada em gelo por 5 minutos, e transformada em bactéria *Stellar* (Takara) na proporção 3:30 (ligação:bactéria) através de choque térmico (gelo – 30 minutos / 42° C – 1 minuto / gelo – 2 minutos). Após a transformação, foram adicionados 100 uL de meio SOC e a reação foi incubada a 37 ° C por 1 hora, sendo posteriormente adicionada em placas LB contendo ampicilina (10 mg/mL) e incubada a 37 ° C por 24 h.

As colônias crescidas em placa após a ligação foram cultivadas em meio líquido (LB) e então submetidas a um procedimento de Maxiprep (Qiagen), conforme instruções do fabricante. Os plasmídeos obtidos foram então digeridos com a enzima *NruI* e o padrão de

digestão avaliado em eletroforese em gel de agarose 0,8%, a fim de confirmar a correta obtenção do vetor pMT-MAYV.

4.1.4 Obtenção do pFastBac-E-MAYV

A partir do vetor pMT-E-MAYV, o fragmento E-MAYV foi recuperado e clonado no vetor pFastBac1, contido no kit Bac-to-Bac. Esse processo de clonagem foi realizado também com o kit *In Fusion* (Clontech), de maneira semelhante ao já citado anteriormente. Sob as mesmas condições, na reação de PCR foram utilizados os *primers* IF-pFast-E-MAYV F / pFast-E-MAYV R (**Tabela 1**) e o vetor pMT-E-MAYV, com o ciclo de amplificação 98 °C / 30 segundos, (98°C/ 10s, 55°C/ 30s, 72°C/ 4 min) x 5, 98 °C / 30 segundos, (98°C/ 10s, 58°C/ 30s, 72°C/ 1 min) x 30, 72°C / 10 minutos, 4°C. O vetor de destino (pFastBac1) foi linearizado com a enzima *SpeI*, e um gel de eletroforese 1% foi feito para avaliar ambos os produtos, e para posterior purificação. Respeitando as mesmas condições já citadas, um procedimento de ligação foi realizado e as colônias obtidas tiveram seus plasmídeos avaliados por padrão de restrição com as enzimas *BamHI* e *SpeI*, para confirmar a obtenção do vetor pFast-E-MAYV. A **Figura 3** mostra o mapa do vetor pFast-E-MAYV.

Figura 3 - Mapa do vetor pFast-E-MAYV

4.1.5 Obtenção do Bacmídeo recombinante

O pFastBac-E-MAYV foi utilizado para transformar uma bactéria *E.coli* modificada contida no kit Bac to Bac (DH10Bac) através de choque térmico, sendo as bactérias adicionadas em placa de LB ágar contendo tetraciclina (10 ug / mL), gentamicina (7 ug / mL), kanamicina (50 ug / mL), Bluo-Gal (100 ug / mL) e IPTG (40 ug / mL), e incubadas a 37° C por 48 h, segundo as instruções do fabricante. Após esse período, são visualizadas colônias brancas e colônias azuis, das quais as brancas correspondem àquelas que fizeram a transposição, sendo uma delas escolhida para ser feito um pré-inóculo em meio LB líquido para amplificação e posterior extração do bacmídeo, utilizando o kit MAXIprep (Qiagen), conforme instruções do fabricante.

Um protocolo de PCR convencional (PCRC) foi realizado para confirmar a inserção do fragmento de interesse no Bacmídeo, conforme descrito nas instruções do kit. Para isso, foram utilizados *primers* já estabelecidos pelo kit que flanqueiam a região de transposição (pUCM13 F / pUCM13 R, **Tabela 1**), sendo possível a confirmação com base na diferença de tamanho do fragmento amplificado. A reação foi feita com o kit comercial *Taq* DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), seguindo recomendações do fabricante. Foram adicionados 5 µL de amostra, para 1 µL de cada *primer* (5µM), 1 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 0,5 µL dNTP (10 mM), 2,5 µL de Buffer 10x, 0,2 µL de enzima (1 U) e água para um volume final de 20 µL. A reação foi realizada no termociclador PTC-200 (MJ Research) com o seguinte ciclo de amplificação: 94 °C / 3 minutos, (94°C/ 45s, 55°C/ 40s, 72°C/ 7 min) x 34, 72°C / 10 minutos. Outra PCR convencional também foi realizada com *primers* específicos para a região E2 (E2-MAYV F/R, **Tabela 1**), nas mesmas condições citadas anteriormente, e com o seguinte ciclo de amplificação: 94 °C / 3 minutos, (94°C/ 15s, 55°C/ 30s, 72°C/ 3 min) x 34, 72°C / 10 minutos, afim de confirmar a presença da E2, complementando o resultado anterior.

Os fragmentos amplificados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1,5 %, contendo 0,5 µg / mL de Gel Red (Biotium), com revelação no fotodocumentador Uvitec Cambridge, sob luz ultravioleta e análise com aplicativo Alliance (Uvitec Cambridge).

4.1.6 Transfecção

O procedimento de transfecção do Bacmídeo recombinante foi realizado em células Sf-9 em placas de cultivo de seis poços, com 8×10^5 células/poço em um volume de 1,5 mL de meio SF-900III (Thermo Fisher Scientific). Em seguida foram adicionados o bacmídeo (3 ug) e 8 uL do agente de transfecção Cellfectin II (Thermo Fisher Scientific) sendo incubado por 4h a temperatura ambiente. Após esse tempo, foi realizada a troca do meio, adicionando-se 1,5 mL de SF-900III, e a placa foi incubada a 27°C. Os baculovírus recombinantes (Baculovírus-E-MAYV) foram coletados 72 h após a transfecção.

Os vírus coletados foram amplificados também em placas de 6 poços com células Sf-9 (8×10^5 células/poço), utilizando 500 uL de suspensão viral para um volume de trabalho de 2 mL de meio Sf-900III, sendo coletados após 72 h. Foram realizados 3 ciclos de amplificação, sendo esse lote (Bac-E-MAYV) então quantificado e utilizado para os ensaios de infecção.

4.1.7 Titulação viral com Sf-9 ET

A titulação dos vírus recombinantes foi realizada utilizando as células Sf-9 ET (*Easy titration*), conforme descrito por Hopkins e Esposito, 2009. Esta linhagem possui o gene da proteína verde fluorescente (GFP) sob a ação do promotor de poliedrina do baculovírus, de forma que células infectadas fiquem fluorescentes. A titulação foi realizada em placas de 96 poços, com $7,5 \times 10^4$ células por poço, em um volume de trabalho de 100 uL. Foi feita uma diluição seriada da suspensão viral de 10^{-1} a 10^{-8} , sendo utilizadas as diluições de 10^{-3} a 10^{-8} , em octoplicatas. A placa foi incubada e analisada após três dias em microscópio de fluorescência, para verificar a formação de focos de células adjacentes que apresentem fluorescência. O cálculo para estabelecer o título viral foi feito com base na TCID₅₀, calculada baseado em Reed-Muench. Importante ressaltar que células isoladas que apresentam fluorescência não são consideradas no cálculo.

4.1.8 Ensaios de infecção com Bac-E-MAYV em placa

Os ensaios de infecção em placa foram realizados nas linhagens Sf-9 e Hi-5, sendo utilizadas 1×10^6 células / poço em placas de 6 poços. Esses experimentos foram realizados para avaliar a expressão das proteínas do MAYV utilizando o vírus Bac-E-MAYV. Inicialmente, ensaios foram realizados variando o MOI (0,5, 1, 2, 5 e 10) em células Hi-5 e Sf9, a fim de verificar o ideal para uma maior porcentagem de infecção, sendo a análise feita por imunofluorescência indireta (IFI). Posteriormente foram avaliados diferentes tempos de coleta (24, 48, 72, 96, 120 e 144 h) para análise de expressão tanto no lisado celular, quanto no sobrenadante de ambas as linhagens. As análises foram feitas por *dot blot*, *western blot* e imunofluorescência indireta (IFI).

4.1.9 Ensaios de infecção com Bac-E-MAYV em frascos agitados de 100 mL (Schott)

Foram realizados ensaios de infecção em suspensão com as células Sf-9 e Hi-5, com inóculo inicial de $0,3 \times 10^6$ células / mL, com um volume de trabalho de 20 mL, sendo incubadas em agitador orbital a 27°C e com agitação de 100 rpm. A concentração celular foi contada diariamente, de forma que a infecção viral somente foi realizada quando atingia $2,5 \times 10^6$ células / mL, o que ocorria aproximadamente 72 h após o inóculo inicial. Neste ensaio a infecção com Bac-E-MAYV foi feita com MOI 10, e a coleta foi realizada 72 h pós-infecção. O sobrenadante do cultivo foi então utilizado para procedimentos de concentração e detecção das VLPs.

4.1.10 Obtenção de VLPs

O sobrenadante dos cultivos em suspensão foi clarificado por centrifugação a 1300 g por 15 minutos, e posteriormente filtrado com filtro 0,45 μM , sendo então utilizado para procedimentos de concentração das VLPs.

4.1.10.1 Gradiente de Sacarose

Inicialmente, foi realizada uma ultracentrifugação a 170.000 g por 1 hora com o volume de 20 mL coletado do cultivo em suspensão, utilizando o rotor ML-50 da ultracentrífuga Optima MAX-XP (Beckman Coulter). O sobrenadante foi descartado e o pellet gerado foi então ressuspensionado cuidadosamente com TNE (EDTA (0,5 M); NaCl (5 M); Tris-Cl (1 M - pH – 7,5). Após esse processo foi feito um “colchão de sacarose” com solução de sacarose a 20%. Foram adicionados 7,5 mL de solução de sacarose e 500 uL da amostra ressuspensionada, sendo realizada uma nova ultracentrifugação a 260.000 g por 2 horas. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado com 200 uL de PBS, sendo esse utilizado diretamente no gradiente de sacarose ou armazenado a -80° C.

Para fazer o gradiente foram utilizadas soluções de sacarose com diferentes concentrações (10%, 20% e 45%), preparadas com o auxílio de um refratômetro. Aplicou-se no tubo de ultracentrifugação 1,5 mL de cada solução cuidadosamente, do mais para o menos concentrado, e 400 uL da amostra na parte superior do tubo. Para esse procedimento foi utilizado o rotor MLS-50, a 160.000 g por 1,5 horas. Foram coletadas frações de 500 uL para posterior análise.

4.1.10.2 Gradiente de iodixanol (Optiprep)

Primeiramente, foi feito um procedimento de ultracentrifugação a 160.000 g por 1 hora a 4 °C, com uma solução de optiprep 5%, e o pellet gerado foi ressuspensionado *overnight* através da adição de uma solução de NaCl (0,1 M), EDTA (0,5 mM) e Tris-HCl (50 mM – pH 7,4). O gradiente foi feito com soluções de 5% e 30% de Optiprep, conforme instruções do fabricante (Sigma-Aldrich), sendo utilizado 2 mL de cada uma e 1mL de amostra, e a ultracentrifugação 160.000 g por 1,5 hora a 4 °C. Foram coletadas frações de 500 uL para posterior análise.

4.1.11 Análise de expressão e obtenção de VLPs

4.1.11.1 *Dot Blot*

As amostras de células foram submetidas a um processo de lise, adicionando-se 100 uL de tampão RIPA (NaCl 150 mM, IGEPAL1 %, deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0.1%, Tris 50 mM, pH 8.0), com posterior homogeneização por vortex, incubação por 30 minutos a 4°C e centrifugação por 10 minutos a 20.900 g. Posteriormente, foi utilizado 40 uL do sobrenadante para aplicar na membrana de nitrocelulose Amersham Hybond – ECL de 0,45 um (GE Healthcare, Piscataway, NJ, U.S.A.) contida no aparato Bio-dot (Biorad). As amostras de sobrenadante e frações da obtenção de VLPs foram aplicadas diretamente na membrana (40 uL), sem o processo de lise.

Após a aplicação das amostras e utilização do vácuo, esperou-se 30 minutos para a secagem da membrana e retirada da mesma do aparato de *dot blot*, sendo então incubada em solução de bloqueio (leite em pó desnatado 3% em PBS 1x) por 1 hora. A membrana foi então lavada 3x por 10 minutos com PBS + Tween 20 (0,05%), e posteriormente foi adicionado o anticorpo primário, diluído 1:1000 em 20 mL de BSA 1%, sendo incubado *overnight* a 4°C. Após esse período, três novos procedimentos de lavagem com PBS + Tween 20 (0,05%) foram realizados e, em seguida, adicionou-se o anticorpo secundário, diluído 1:2000 em 20 mL de BSA 1%, sendo novamente incubado por 1 h sob agitação. O mesmo procedimento de lavagem já descrito foi realizado novamente. A membrana foi revelada com o reagente ECL Select, da empresa GE HealthCare, no fotodocumentador Uvitec Cambridge, com análise no aplicativo Alliance (Uvitec Cambridge).

4.1.11.2 *Western blot*

Foram montados dois géis de poliacrilamida (**Tabela 2**), para a realização simultânea dos procedimentos de *Western blotting*, e da coloração do gel por prata. As amostras de células foram submetidas a um processo de lise, semelhante ao descrito para o processo de *dot blot*, enquanto as amostras de sobrenadante e frações de obtenção de VLPs foram utilizadas diretamente. Após esse processo, foram utilizados 50 µL do sobrenadante juntamente com 10

μ L de Loading buffer 6x com β -mercaptoetanol e a reação foi incubada a 70 °C por 10 minutos, sendo posteriormente aplicadas em seus respectivos géis. A corrida do gel foi realizada a 110V, por 2,5 h.

Após a corrida, o gel para *Western blotting* foi colocado em um aparato específico para realizar a transferência úmida para membrana de nitrocelulose Amersham Hybond – ECL de 0,45 μ m (GE Healthcare), a 110 V por 1 hora. Sendo posteriormente, a membrana transferida para a solução de bloqueio (leite em pó desnatado 3 % em PBS 1x), e incubada por 1 hora com agitação. A membrana para *Western blotting* foi então lavada 3x por 10 minutos com PBS + Tween 20 (0,05%). Logo após, foi adicionado o anticorpo primário, diluído 1:1000 em 20 mL de BSA 1%, sendo incubado *overnight* a 4°C. Após esse período, três novos procedimentos de lavagem com PBS + Tween 20 (0,05%) foram realizados, e em seguida adicionou-se o anticorpo secundário, diluído 1:2000 em 20 mL de BSA 1%, sendo novamente incubado por 1 h sob agitação. O mesmo procedimento de lavagem já descrito foi realizado novamente. A membrana foi revelada com o reagente ECL Select, da empresa GE HealthCare, no fotodocumentador Uvitec Cambridge, com análise no aplicativo Alliance (Uvitec Cambridge).

O gel para a coloração de prata foi primeiramente lavado 2x com água destilada por 10 minutos, fixado com solução contendo etanol 30%, e ácido acético 10%, e incubado por 30 minutos sob agitação. O gel foi então lavado 2x com etanol 10% por 5 minutos, e depois mais 2x com água destilada também por 5 minutos. O processo de coloração foi então realizado com o kit Pierce silver stain (Thermo Fischer Scientific), conforme instruções do fabricante.

Tabela 2 - Composição dos géis utilizados para SDS-PAGE e *Western blotting*

Reagentes	Gel de Separação (mL)	Gel de Empilhamento (mL)
Acrilamida/Bis 37 / 1 – 40%	1,5	0,312
Tris-HCl 1,5 M – pH 8,8	-	0,35
Tris-HCl 0,5 M – pH 8,8	0,35	-
H ₂ O Milli Q	2,1	1,85
SDS 20%	0,025	0,0125
Persulfato de amônia - APS 10%	0,045	0,0125
Temed	0,0042	0,006

4.1.11.3 Imunofluorescência indireta (IFI)

O ensaio de IFI foi realizado com células Sf-9 e Hi-5 infectadas com Bac-E-MAYV. O procedimento foi realizado de maneira semelhante aos ensaios de infecção em placa de 6 poços, porém com uma lamínula dentro de cada poço para que as células aderissem à mesma. Após o processo de infecção e o tempo para coleta, o meio foi retirado e as células nas lamínulas foram fixadas com 20 µL de metanol / acetona (1:1) e incubadas a 4 °C por 20 minutos. Posteriormente foi feita lavagem das lamínulas com PBS 1x, e o anticorpo policlonal anti-MAYV foi adicionado na diluição de 1:500 e incubado a 4°C por 1 hora. Após novo procedimento de lavagem com PBS 1x, foi adicionado o anticorpo secundário anti-anticorpo de camundongo, conjugado com FITC, diluído 1:1000 em solução de azul de Evans 0,02% em PBS. Um novo ciclo de lavagem foi realizado e as lamínulas receberam uma gota de reagente “*anti-fading*”, *SlowFade* (Thermo Fisher Scientific) antes de serem colocadas em uma lâmina. As amostras foram mantidas no escuro até o momento da visualização em microscópio de fluorescência (BX51, Olympus). Cada amostra foi fotografada em imagem digital após a visualização de toda a lâmina e a eleição de uma região representativa.

4.1.11.4 Microscopia Eletrônica

As frações que apresentaram resultados positivos no *dot blot* e *western blot* foram analisadas através de microscopia eletrônica para evidenciar a presença de VLPs. O procedimento utilizado para as amostras contendo VLPs foi o de contrastação negativa com uranila 4 %. Esse processo foi feito em colaboração com a Dra. Marta Maria Antoniazzi, no Laboratório de Biologia Celular, do Instituto Butantan.

O procedimento para visualização das VLPs nas células foi feito com o processamento em bloco, no qual as células infectadas foram obtidas por centrifugação a 950 g por 3 minutos, e o pellet tratado com solução fixadora de Karnowsky (solução de aldeído glutárico 2,5%; paraformaldeído 2%; tampão cacodilato 0,1 M e pH 7,2), sendo incubado a 4 °C por 24 h. No dia seguinte, foram feitas 3 lavagens com cacodilato de sódio (0,1 M) de 15 minutos cada, sendo pós-fixada posteriormente com tetróxido de ósmio (1 %) em tampão cacodilato (0,1 M), por 1 hora a temperatura ambiente. Foi feito então outro ciclo de 3 lavagens com cacodilato de sódio (1 M) por 15 minutos cada. O processo de desidratação foi feito com o

seguinte ciclo: 2x álcool etílico 70 – 10 minutos / 2x álcool etílico 95 – 15 minutos / 3x álcool etílico absoluto – 20 minutos / 1x óxido de propileno + álcool etílico absoluto (1:1) – 15 minutos / 2x óxido de propileno – 15 minutos / 1x óxido de propileno + resina – 2 horas. Após essa etapa, foi feita a pré embebição do material em resina pura, sendo incubada *overnight* a temperatura ambiente sob agitação. Posteriormente, o material foi colocado na câmara de vácuo, sendo o processo de fazer e desfazer vácuo repetido 3 vezes, e o mesmo foi incubado em estufa a 60 °C por 2 dias.

4.2 *Pichia pastoris* recombinante (*Pp-E-MAYV*)

A cepa de *P. pastoris* recombinante foi construída em parceria com o pesquisador Dr. Renaud Wagner, da unidade de GPCRs, dor e inflamação, da Universidade de Strasbourg, na França, conforme metodologia já descrita pelo grupo de trabalho (BORNET et al., 2012). Essa linhagem contém os mesmos genes estruturais do MAYV presentes no baculovírus recombinante descritos anteriormente (Item 4.1) (**Figura 4**).

Figura 4 - Esquema da metodologia empregada para obtenção de *Pichia pastoris* recombinante (*Pp-E-MAYV*) e análise da expressão das proteínas do MAYV

4.2.1 Obtenção do vetor pPIC9K-E-MAYV

O procedimento de clonagem da sequência E-MAYV no vetor pPIC9K foi feito utilizando o kit *In Fusion* (Clontech), conforme instruções do fabricante. De maneira semelhante aos procedimentos já citados anteriormente, foram desenhados dois *primers* com sequências específicas tanto para uma região da sequência a ser clonada (IF-pPIC-E-MAYV F/R), quanto para uma região específica do sítio de clonagem do vetor no qual a sequência será inserida (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos para obtenção de Pp-E-MAYV

Nome	Sequência	T _m (°C)
IF-pPIC-E-MAYV F	ATCCGAATTCACTAGACCATGGACTTCCTACCAACTC	65,2
IF-pPIC-E-MAYV R	CTCTTTCCAACTAGTTACCTTCTCAAAGTCACACAAG	62,9

T_m – Temperatura de *melting*

Com esses *primers* foi feita então uma PCR convencional utilizando como molde o vetor pMT-MAYV, a partir do qual a sequência E-MAYV foi obtida. A reação de PCR foi desenvolvida com base nas instruções do kit *In fusion* (Clontech). Foram adicionados 1 µL do vetor, para 0,6 µL de cada *primer* (5µM), 6,25 uL do mix *Fusion* e água para um volume final de 10 µL. A reação foi realizada no termociclador PTC-200 (MJ Research) com o seguinte ciclo de amplificação: 98 °C / 30 segundos, (98°C/ 10s, 55°C/ 30s, 72°C/ 4 min) x 5, 98°C / 30 segundos (98 °C / 10 segundos, 58°C/ 30s, 72°C/ 1 min) x 30, 72°C / 10 minutos.

O produto de PCR foi aplicado em um gel de agarose 1,5 % com 0,5 µg / mL de Gel Red (Biotium), com revelação no fotodocumentador Uvitec Cambridge, sob luz ultravioleta e análise com aplicativo Alliance (Uvitec Cambridge). O fragmento amplificado foi purificado utilizando o kit *Nucleospin Gel and PCR clean-up* (Macherey Nagel).

O vetor pPIC9K foi linearizado utilizando a enzima *SpeI*, com 2 uL de DNA (1 ug), 2 uL do buffer *Fastdigest*, 1 uL de enzima e água para completar 20 uL, sendo a reação incubada a 37°C / 30 minutos. A confirmação da linearização foi feita com um procedimento

de gel de agarose 1,5 % com 0,5 µg / mL de Gel Red (Biotium). Após esse processo, o fragmento purificado (E-MAYV) foi ligado ao vetor pPIC9K na proporção 3:1 com base nas instruções do kit *In Fusion*, utilizando a reação 2,5 uL vetor, 2,2 uL do inserto, 2 uL do mix *In Fusion*, e água para um volume final de 20 uL. A reação foi incubada a 50⁰ C / 15 min, e posteriormente transformada através de choque térmico (30 minutos no gelo / 1 minuto a 42⁰ C / 2 minutos no gelo) na bactéria *Stellar*, também contida no kit, na proporção 3:30 (bactéria / reação de ligação). A transformação foi incubada a 37⁰ C por 1 h sob agitação de 240 rpm, e posteriormente colocadas em placas com meio LB contendo kanamicina, e incubadas a 37⁰ C / 24 h.

Para verificar a correta obtenção do vetor pPIC9K-E-MAYV, foi feita uma extração do DNA plasmidial das colônias bacterianas por lise alcalina e posteriormente, os plasmídeos obtidos de cada colônia foram digeridos com as enzimas *SpeI* e *BamHI* que flanqueiam o fragmento inserido, sendo o padrão de bandas avaliado quanto a presença do mesmo. Após a confirmação do vetor recombinante, uma colônia foi inoculada em meio LB para amplificação e posteriormente submetida a um procedimento de MAXIprep (Qiagen) para obtenção do vetor purificado. A **Figura 5** mostra o mapa do vetor pPIC9K-E-MAYV.

Figura 5 - Mapa do vetor pPIC9K-E-MAYV

- E-MAYV – Genes das proteínas estruturais
- PAOX1 – Promotor indutível por metanol
- HIS4 – Marcador de seleção
- Kanamicina – Gene de resistência a kanamicina/geneticina
- Ampicilina - Gene de resistência a ampicilina
- 5'AOX e 3'AOX – Sequencias para inserção no genoma

4.2.2 Competência *Pichia pastoris*

A cepa de *Pichia pastoris* SMD1163 foi inoculada em 50 mL de meio YPD e incubada a 30⁰ C / *overnight*. No dia seguinte foi medida a DO do cultivo, através de espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm. Após atingir 3 DO/mL, o cultivo foi então centrifugado a 2.000 g por 5 minutos a 4 °C, e o pellet posteriormente ressuspendido em 12,5 mL de YPD, 2,5 mL HEPES (1 M – pH 8,0) e 2,5 mL DTT (1 M), sendo incubado a 30⁰ C por 15 minutos, e posteriormente incubado em gelo e adicionado 50 mL de água gelada. Após 5 minutos, a suspensão foi centrifugada a 2.000 g por 5 minutos a 4⁰ C, e o pellet formado foi lavado com 50 mL de água gelada, e novamente centrifugado a 2.000 g por 5 minutos a 4⁰ C. O pellet foi então ressuspendido em 5 mL de Sorbitol (1 M) gelado e novamente centrifugado a 2.000 g por 5 minutos a 4⁰ C, sendo o pellet finalmente ressuspendido em 60 uL de Sorbitol (1 M) gelado.

4.2.3 Eletroporação

O vetor pPIC9K-E-MAYV foi linearizado com a enzima *PmeI* utilizando 25 uL do vetor, 20 uL de buffer, 5 uL de enzima e 150 uL de água, sendo incubado a 37 °C por 2 horas. A linearização foi confirmada através de um gel de agarose 0,8 % com 0,5 µg / mL de Gel Red (Biotium).

Posteriormente, na reação de digestão do vetor foi adicionado 400 uL de clorofórmio e a solução foi vortexada por 20 segundos. Após esse processo foi feita uma centrifugação a 18.000 g por 5 minutos, de forma que duas fases foram formadas, sendo a superior coletada. Foi adicionado então 1 mL de etanol (100 %) e 50 uL de acetato de sódio (3 M) e incubado por 1 hora a – 20⁰ C. Após esse tempo a solução foi centrifugada a 18.000 g por 30 minutos a 4⁰ C. O pellet gerado foi lavado com etanol (70 %) e novamente foi feita uma centrifugação a 18.000 g por 30 minutos a 4⁰ C. Após o *pellet* secar, o mesmo foi ressuspendido com 10 uL de água estéril.

Primeiramente uma cubeta de 0,2 mm (Biorad) foi incubada no gelo por 15 minutos. Posteriormente, foi adicionado 40 uL de suspensão de *Pichia pastoris* competente juntamente

com 7,5 uL do vetor linearizado e a cubeta foi incubada novamente no gelo por 5 minutos. O procedimento de eletroporação foi realizado utilizando o equipamento GenePulser XCell (Biorad) com as seguintes condições: 1500 v / 25 uF / 400 / 1 pulso. Imediatamente após o processo, foi adicionado 1 mL de sorbitol (1 M) gelado e o volume foi transferido para um tubo estéril, sendo incubado a 30⁰ C por 1 hora. A amostra foi então centrifugada a 2.000 g por 10 minutos, e o pellet gerado foi ressuspensionado com 500 uL de sorbitol (1 M) gelado. Essa suspensão foi inoculada em uma placa MD (1,34 g base nitrogenada de levedura sem aminoácidos, 2 g de dextrose, 2 g de ágar, e água q.s.p. 100 mL) para seleção HIS⁺, e incubadas 3 dias a 30⁰ C.

4.2.4 Seleção dos clones

As colônias que cresceram na placa MD foram inoculadas em poços de uma placa de 96 poços com 100 uL YPG por poço contendo geneticina (25 mg / mL), e incubadas a 30 °C, *overnight* sob agitação (220 rpm). Após esse processo, os clones foram inoculados em uma mesma posição em 3 placas com diferentes concentrações de geneticina (50, 100 e 150 mg/mL), sendo incubadas a 30 °C por 3 dias.

4.2.5 Yeastern blotting

Com base nos resultados da seleção com geneticina, foram selecionadas colônias que cresceram nas placas com 150 mg / mL de geneticina. Essas colônias foram colocadas em poços de placa de 96 poços com 100 uL YPG (extrato de levedura – 10 mg/mL; peptona – 20 mg/mL; glicose – 20 mg/mL) por poço contendo geneticina (150 mg / mL), e incubadas a 30⁰ C / o/n sob agitação (220 rpm).

No dia seguinte, em uma placa de BMGY (extrato de levedura - 10 mg/mL; peptona – 20 mg/mL; glicerol - 10% v/v; tampão fosfato - 0,1 M; *yeast nitrogen base* – 13,4 mg/mL) ágar, foi colocada uma membrana de nitrocelulose, e 5 uL de cada colônia na mesma ordem da placa de 96 poços. A placa foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos para a secagem das colônias, e incubadas posteriormente a 30⁰ C por 24 h. Após esse tempo, a membrana foi retirada da placa de BMGY ágar e colocada em uma placa de BMMY (extrato de levedura - 10 mg/mL; peptona – 20 mg/mL; metanol – 5% v/v; tampão fosfato – 0,1 M;

yeast nitrogen base – 13,4 mg/mL) ágar para indução da expressão nas colônias, sendo novamente incubada a 30⁰ C por 24 h.

Posteriormente, em outra placa de Petri foram colocados 10 papéis filtro juntamente com 50 mL de tampão de lise. Após a adsorção do líquido pelo papel filtro, a membrana da placa de BMMY ágar foi colocada em cima dos papéis e incubada a 65⁰ C por 3 h. A membrana foi então lavada com água para retirada de todo o excesso das colônias e incubada em PBS 1x a 4⁰ C. Após essa etapa, a membrana foi bloqueada com leite em pó (3 % em PBS 1x) por 1 h, sendo feita depois três lavagens com PBS 1x. O anticorpo primário (anti-MAYV) foi adicionado diluído 1:1000 em BSA 1%, e incubado por duas horas, sendo um novo processo de três lavagens realizado com PBS 1x. Posteriormente, adicionou-se o anticorpo secundário (anti-mouse conjugado com HRP) diluído 1:2000 em BSA 1 % e incubado por 1 h, sendo também submetido a três lavagens com PBS 1x. Finalmente a membrana foi revelada com o reagente ECL Select, da empresa GE HealthCare, no fotodocumentador Uvitec Cambridge, com análise no aplicativo Alliance (Uvitec Cambridge).

4.2.6 Cultivo

Os clones selecionados no procedimento anterior foram então inoculados em 50 mL de meio BMGY (extrato de levedura - 10 mg/mL; peptona – 20 mg/mL; glicerol - 10% v/v; tampão fosfato - 0,1 M; *yeast nitrogen base* – 13,4 mg/mL). O cultivo foi incubado 20 horas em um agitador a 250 rpm, 30° C. No dia seguinte, a DO ($\lambda = 600$ nm) da cultura foi medida, de modo a se calcular a quantidade para um inóculo ideal (10⁷ células / mL). O volume calculado foi então inoculado em um balão de 500 mL com 100 mL de meio BMGY, sob agitação de 220 rpm, a 30° C. Quando a cultura atingiu uma DO ~ 1 (após 4 a 5 horas), as células foram centrifugadas em tubos estéreis por 5 min a 2000 g, temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas com 100 mL de meio BMMY (extrato de levedura - 10 mg/mL; peptona – 20 mg/mL; metanol – 5% v/v; tampão fosfato – 0,1 M; *yeast nitrogen base* – 13,4 mg/mL), seguido de incubação de 48 horas num agitador a 30° C, 220 rpm. A coleta foi realizada por centrifugação a 2655 g, com o precipitado e o sobrenadante sendo armazenados a -80° C, para posterior análise.

4.2.7 Tratamento de membrana

Para que possa ser avaliada a expressão das proteínas nas leveduras, é necessário primeiramente realizar um tratamento específico de lise da membrana, conforme representado na **Figura 6**. Para isso, o precipitado de leveduras foi ressuscitado com 10 mL de Tampão TNGE (Tris-Base – 50 mM; NaCl – 0,5 M; Glicerol – 10%; PMSF – 1mM; EDTA – 1mM). Foram adicionados grânulos de vidro “acid-washed”, e então realizado um ciclo de lise utilizando o vortex (1 minuto) e incubação em gelo (1 minuto), quatro vezes. Após esse processo, foi feita uma centrifugação das amostras a 5.000 g, por 5 minutos, a 4° C, e o sobrenadante coletado foi novamente centrifugado 5.000 g, por 5 minutos, a 4° C. O *pellet* e uma amostra do sobrenadante foram armazenados para posterior análise (P1 e S1, respectivamente), sendo o restante do sobrenadante novamente centrifugado a 20.000 g por 10 minutos. Novamente o *pellet* e uma amostra do sobrenadante foram armazenados para posterior análise (P2 e S2, respectivamente), enquanto o restante do sobrenadante foi ultracentrifugado a 160.000 g por 1 hora, gerando as amostras de pellet (P3) e sobrenadante (S3), também avaliados posteriormente. As amostras obtidas foram então submetidas a um procedimento de *dot blot* e *Western blot* para detecção das proteínas.

Figura 6 - Esquema da lise de membrana da Pp-E-MAYV e obtenção das amostras analisadas por *dot blot* e *western blot*.

4.2.8 Obtenção das VLPs

A amostra S2, indicada na figura 6 foi submetida a processos de concentração de VLPs através de gradiente de iodixanol, conforme descrito no item 4.1.10.2, para posterior análise de microscopia eletrônica de transmissão.

4.2.9 Análise de expressão e obtenção de VLPs

4.2.9.1 Dot Blot

Os experimentos de *dot blot* foram realizados com as amostras S0, S1, S2, S3, P1, P2 e P3, conforme indicado na **Figura 6**. O procedimento foi realizado conforme descrito no item **4.1.11.1**.

4.2.9.2 Western Blot

Os experimentos de *western blot* foram realizados com as amostras S2, S3, P2 e P3, de maneira semelhante àqueles apresentados para o sistema baculovírus (item **4.1.11.2**).

4.2.9.3 Microscopia eletrônica

Os procedimentos de microscopia eletrônica para as amostras de Pp-E-MAYV foram realizados de maneira semelhante ao citado para os experimentos com baculovírus (item **4.1.11.3**).

5 Resultados

5.1 Baculovírus-Mayaro (Bac-E-MAYV)

5.1.1 Obtenção do baculovírus recombinante (Bac-E-MAYV)

Os genes das proteínas estruturais do Mayaro (E-MAYV) foram obtidos do vírus selvagem e inicialmente clonados no vetor pMT (pMT-E-MAYV). Posteriormente, a partir desse vetor, os genes foram clonados no vetor pFastBac (pFast-E-MAYV), o qual foi utilizado para obter o bacmídeo e os baculovírus recombinantes utilizando o kit comercial Bac-to-Bac.

5.1.1.1 Obtenção do pMT-E-MAYV

A confirmação de obtenção do vetor pMT-E-MAYV foi feita através da análise do padrão de digestão quando utilizado a enzima *NruI*, conforme evidenciado na **Figura 7**. Foi visualizada 2 bandas na digestão com a enzima *ScaI* (2314;6838), 3 bandas com a enzima *EcoRI* (1243; 3177; 4732), e 4 bandas com a enzima *KpnI* (735; 1235; 3165; 4017), conforme esperado.

Figura 7 - Confirmação de obtenção do vetor pMT-E-MAYV por digestão com enzimas *ScaI*, *EcoRI* e *KpnI*, e análise em gel de agarose 0,8 %.

1 – Marcador λ HindIII - valores em pares de bases (pb) (Thermo Scientific); **2** – pMT-E-MAYV; pMT-E-MAYV digerido com **(3)** enzima *ScaI*; **(4)** enzima *EcoRI*; e **(5)** enzima *KpnI*.

5.1.1.2 Obtenção do pFastBac-E-MAYV

Após a ligação do fragmento contendo a sequência das proteínas estruturais do MAYV ao vetor pFast-Bac, a reação foi utilizada para transformar bactérias DH5 α . As colônias portadoras de possíveis construções foram selecionadas e o plasmídeo extraído por lise alcalina. Esses plasmídeos foram digeridos para análise do padrão de restrição e seleção da construção desejada. A **Figura 8** mostra um gel de agarose 0,8% após digestão com as enzimas *SpeI* e *BamHI*, dos plasmídeos obtidos por miniprep das colônias selecionadas no processo de ligação. Os sítios dessas enzimas flanqueiam o fragmento E-MAYV inserido, portanto, espera-se visualizar bandas correspondentes ao tamanho do fragmento E-MAYV (3,7 kb) e do tamanho do vetor pFastBac1 (4,7 kb). Os padrões de banda apresentados no plasmídeo analisado evidenciam a incorporação do fragmento de interesse (E-MAYV) no vetor pFastBac, gerando o vetor pFastBac-E-MAYV.

Figura 8 - Confirmação de obtenção do vetor pFast-E-MAYV por digestão com as enzimas *BamHI* e *SpeI* e análise em gel de agarose 0,8 %

1 – Marcador 1 Kb - valores em pares de bases (pb) (Thermo Scientific); **2-8** – Plasmídeos das colônias selecionadas após processo de ligação, digeridas com as enzimas *BamHI* e *SpeI*.

5.1.1.3 Obtenção do Bacmídeo recombinante

Após a obtenção do plasmídeo pFast-E-MAYV, o mesmo foi utilizado para transformar bactérias DH10Bac para obtenção do bacmídeo recombinante. Tanto o plasmídeo pFastBac-E-MAYV, quanto o bacmídeo contido na DH10Bac, possuem sítios de transposição

que permitem a transferência do fragmento de interesse para o bacmídeo. A **Figura 9** mostra como ficaram as colônias após esse processo, sendo as colônias brancas selecionadas para cultivo em 300 mL de meio LB, para posterior obtenção do bacmídeo recombinante, utilizando o kit MaxiPrep (Qiagen).

Figura 9 - Análise da transposição do pFast-E-MAYV nos clones de DH10Bac

DH10Bac transformada com pFast-E-MAYV em placa de LB ágar com tetraciclina (10 ug / mL), gentamicina (7 ug / mL), kanamicina (50 ug / mL), blu-Gal (100 ug / mL) e IPTG (40 ug / mL), incubadas a 37° C por 48h.

A confirmação de obtenção do bacmídeo-E-MAYV foi feita através de uma PCR convencional, utilizando o par de *primers* indicados pelo kit (M13F / R - **Tabela 1**), que são específicos para regiões do bacmídeo que flanqueiam a região que foi transposta. Sendo assim, é esperado um fragmento de 300 bp para um bacmídeo sem o inserto, e um fragmento de 6000 bp para um bacmídeo com o inserto. Outra PCR convencional também foi feita utilizando *primers* específicos para a o gene da proteína E2 (E2-MAYV F/ R – **Tabela 1**), que quando presente gera uma banda de 400 bp. A **Figura 10** mostra os géis de agarose 1,5 % com os fragmentos amplificados pela PCRc.

Figura 10 - Confirmação de obtenção do Bacmídeo-E-MAYV através de PCR e análise em gel de agarose 1,5 %

(A) *primers* M13F / R; 1 – Marcador 1 Kb - valores em pares de bases (pb) (Thermo Scientific); 2-4 – Colônias brancas selecionadas; 5 – Colônia azul; 6 – Marcador *HindIII* - valores em pares de bases (pb); e (B) *primers* E2MAYV F / R; 1 – Marcador 100 bp - valores em pares de bases (pb) (Thermo Scientific); 2 – Colônia 3 do gel anterior; 3 – Colônia azul.

5.1.1.4 Transfecção em Sf-9

Uma vez obtido o bacmídeo recombinante, este foi utilizado para a transfecção em células de inseto. O procedimento de transfecção do bacmídeo foi feito em células Sf-9, com coleta do lote viral 72 h pós-transfecção. Imagens de microscopia óptica foram obtidas a cada 24 h para analisar os efeitos citopáticos típicos desse procedimento (**Figura 11**).

Figura 11 - Imagens de microscopia óptica de células Sf-9 transfectadas com Bacmídeo-E-MAYV

Células Sf-9 controle (não transfectadas) e transfectadas com Bacmídeo-E-MAYV, analisadas nos tempos de 24, 48 e 72 h em microscópio óptico, com objetivas de 10 e 40x.

5.1.2 Titulação dos baculovírus utilizando as células Sf-9 ET

O procedimento de titulação dos baculovírus-E-MAYV (Bac-E-MAYV) em Sf-9 ET foi feito em placas de 96 poços, com diferentes diluições da suspensão viral, sendo que a **Tabela 4** resume a presença ou não de focos fluorescentes para cada diluição. A **Figura 12** evidencia como as células Sf-9 ET se apresentam quando infectadas com baculovírus.

Figura 12 - Imagem de microscopia de fluorescência de células Sf-9 ET infectadas com baculovírus-E-MAYV

Fonte: Hopkins e Esposito, 2009.

Tabela 4 - Indicativo da presença de focos fluorescentes em células Sf-9 ET infectadas com diferentes diluições de baculovírus-E-MAYV.

Diluições	Poços Infectados	Poços Não Infectados	Total Infectados	Total Não Infectados	% Total Infectados
1E-02	8	0	39	0	100
1E-03	8	0	31	0	100
1E-04	8	0	23	0	100
1E-05	7	1	15	1	93,75
1E-06	6	3	8	4	66,67
1E-07	2	6	2	10	16,67
1E-08	0	8	0	18	0

Com base nesses dados, é possível calcular a dose infectiva- “*tissue culture infective dose*” (TCID₅₀), que consiste na quantidade de vírus suficiente para infectar 50 % das células, e com isso estimar a quantidade de unidades formadoras de placa por mL (pfu/mL). Sendo assim, analisando a tabela é possível observar qual é a ultima diluição em que se tem 50 % ou mais de poços infectados, podendo estabelecer que entre essa diluição e a próxima, encontra-se a diluição “*end-point*”. Portanto, esse ponto está entre as diluições 1E-06 e 1E-07,

sendo necessário realizar o cálculo da distância proporcional (PD) do “*end point*” de 50%, a partir destas diluições através da fórmula exibida na **Figura 13**.

Figura 13 - Cálculo da distância proporcional (PD) do end point de 50%

$$PD = \frac{(\% \text{ da diluição acima de } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ da diluição acima de } 50\%) - (\% \text{ da diluição abaixo de } 50\%)}$$

Com esses dados é possível determinar o log de TCID₅₀, subtraindo o valor do log da maior diluição a gerar 50% (-6), do valor de PD (0,333), possibilitando assim, calcular o valor da TCID₅₀ (2,15 E06), e com isso fazer a conversão para estimar o valor de unidades formadoras de placa por mL (pfu/mL), multiplicando a TCID₅₀ por 0,69 (O'REILLY, 1994). Portanto, com base nos cálculos, o título do baculovírus-E-MAYV foi estimado em 1,5E7 pfu/mL.

5.1.3 Infecção com Baculovírus-E-MAYV

Ensaio de infecção com Bac-E-MAYV foram realizados em placas de 6 poços com células Sf-9 e Hi-5, com um MOI de 10. Imagens de microscopia óptica foram obtidas no momento antes da coleta (72 e 96 h pós-infecção) para evidenciar efeitos citopáticos oriundos do processo de infecção, quando comparados com células não infectadas (**Figura 14**). Nas **Figuras 15 e 16**, é possível verificar a progressão dos efeitos citopáticos no decorrer do tempo de infecção em células Sf-9 e Hi-5, respectivamente.

Figura 14 - Imagens de microscopia óptica do efeito citopático ocasionado pela infecção com Bac-E-MAYV

Células Sf-9 (A) e Hi-5 (B) controle (não infectadas) e infectadas com Bac-E-MAYV nos tempos de 72 e 96 h, visualizadas em microscópio óptico com objetivas de 10 e 40x.

Figura 15 - Imagens de microscopia óptica do efeito citopático em diferentes tempos de células Sf-9 infectadas com Bac-E-MAYV

Células Sf-9 infectadas com Bac-E-MAYV nos tempos de 24, 48, 72, 96, 120 e 144 h pós-infecção, visualizadas em microscópio óptico nos aumentos de 10 e 40x.

Figura 16 - Imagens de microscopia óptica do efeito citopático em diferentes tempos de células Hi-5 infectadas com Bac-E-MAYV

Células Hi-5 infectadas com Bac-E-MAYV nos tempos de 24, 48, 72, 96, 120 e 144 h pós-infecção, visualizadas em microscópio óptico com objetivas de 10 e 40x.

5.1.4. Imunofluorescência indireta (IFI)

Primeiramente foi feita uma análise por IFI de ensaios de infecção com Bac-E-MAYV em células Hi-5 para avaliar diferentes MOIs (0,5; 1; 2; 5 e 10), e selecionar aquele que apresentasse a maior porcentagem de células infectadas, de forma que seja utilizado no decorrer do trabalho (**Figura 17**).

Figura 17 - IFI para avaliação de infecção com Bac-E-MAYV em células Hi-5 com diferentes MOIs

Células Hi-5 infectadas com Bac-E-MAYV com MOIs 0,5, 1, 2, 5 e 10, avaliadas no tempo de 72h pós-infecção, visualizadas em microscópio de fluorescência com objetiva de 10x. Anticorpo Anti-MAYV policlonal (1:500).

Para analisar a expressão das proteínas, foram realizados experimentos de imunofluorescência indireta (IFI), conforme ensaios de infecção já descritos anteriormente. As células Sf-9 e Hi-5 foram submetidas a esse protocolo com análise nos tempos de 72 e 96h

pós-infecção, utilizando-se o anticorpo policlonal anti-MAYV, sendo os resultados apresentados na **Figura 18** para células Sf-9 e na **Figura 19** para células Hi-5.

Figura 18 - IFI com células Sf-9 infectadas com Bac-E-MAYV

Células Sf-9 controle (não infectadas) e infectadas com Bac-E-MAYV com MOI 10, avaliadas nos tempos de 72h (**A**) e 96h (**B**) pós-infecção, visualizadas em microscópio de fluorescência com objetivas de 10, 20 e 50x. Anticorpo Anti-MAYV policlonal (1:500).

Figura 19 - IFI com células Hi-5 infectadas com Bac-E-MAYV

Células Sf-9 controle (não infectadas) e infectadas com Bac-E-MAYV com MOI 10, avaliadas nos tempos de 72h (**A**) e 96h (**B**) pós-infecção, visualizadas em microscópio de fluorescência com objetivas de 10, 20 e 50x. Anticorpo Anti-MAYV policlonal (1:500).

5.1.5 Dot blot

Os experimentos de *dot blot* foram realizados com amostras coletadas de ensaios em placa com as células Sf-9 e Hi-5, conforme já descrito. Foram avaliados diferentes tempos de coleta (24, 48, 72, 96, 120 e 144 h) e as análises foram feitas tanto no sobrenadante, quanto no lisado celular, utilizando o anticorpo policlonal anti-MAYV (**Figura 20**).

Figura 20 - Dot blot de células Sf-9 e Hi-5 em diferentes tempos após infecção com Bac-E-MAYV

(A) lisado celular e (B) sobrenadante do ensaio de infecção com Bac-E-MAYV em células Sf-9 e Hi-5, em placas de 6 poços, coletados em diferentes tempos (24, 48, 72, 96, 120 e 144 h); anticorpo anti-MAYV policlonal.

5.1.6 Western blot

Foram realizados experimentos de SDS-PAGE e *Western blot* com as mesmas amostras avaliadas nos experimentos de dot blot (**Figura 21**).

Figura 21 - *Western blot* com lisado celular do ensaio de infecção com Bac-E-MAYV

(A) Sf-9 e (B) Hi-5, em placas de 6 poços, coletados em diferentes tempos (24, 48, 72, 96, 120 e 144 h); Anticorpo anti-MAYV policlonal; 1 – Marcador Pageruler Plus - valores em KDa (Thermo Scientific); 2 – Controle negativo; 3 – 24 h p.i.; 4 – 48 h p.i.; 5 – 72 h p.i.; 6 – 96 h p.i.; 7 – 120 h p.i.; 8 – 144 h p.i.; 9 – vírus Mayaro selvagem.

5.1.7 Ensaios de infecção com cultivos em suspensão

Com base nas melhores condições apresentadas pelos ensaios em placa, experimentos de infecção com Bac-E-MAYV em cultivo em suspensão foram realizados com células Sf-9 e Hi-5. Os gráficos evidenciados na **Figura 22** mostram o crescimento celular e a viabilidade do cultivo de células infectadas e não infectadas (controle) para ambas as linhagens.

Figura 22 - Cinética de crescimento e viabilidade de células controle e infectadas com Bac-E-MAYV

B

Crescimento celular e viabilidade das células (A) Sf-9 e (B) Hi-5 cultivadas em suspensão (20 mL), controle (não infectadas) e infectadas por bac-E-MAYV, avaliadas a cada 24 h até o tempo de 168 h. Infecção feita no tempo de 72 h após início do cultivo.

5.1.8 Gradiente de sacarose

Os sobrenadantes dos cultivos foram coletados, clarificados e filtrados, sendo então submetidos a um processo de concentração das VLPs. Primeiramente foi avaliado o método de ultracentrifugação com gradiente de sacarose, que consiste de 3 etapas de ultracentrifugação: 1 – somente a amostra; 2 - colchão de sacarose (20%); 3 - gradiente de sacarose (10, 30 e 45%). Após o último passo, foram retiradas frações de 500 μ L do gradiente gerado, e as mesmas foram submetidas a análises por *dot blot* e *western blot*. A ausência de uma única fração contendo VLPs fez com que não fosse feita análise de microscopia

eletrônica para esse caso. Os resultados do processo de obtenção das VLPs e suas análises estão evidenciados na **Figura 23**.

Figura 23 - Resultados do processo de concentração de VLPs com gradiente de sacarose em células Sf-9

(A) Concentração das VLPs por ultracentrifugação com gradiente de sacarose; (B) Dot Blot das frações obtidas (1-10); e (C) *Western blot* das frações obtidas (2-10); Marcador Pageruler Plus - valores em KDa (Thermo Scientific).

5.1.9 Gradiente de iodixanol (Optiprep)

Outro método utilizado para concentração das VLPs foi a ultracentrifugação com gradiente de iodixanol (Optiprep), com etapas de ultracentrifugação semelhantes ao processo com sacarose: 1 – somente a amostra; 2 - colchão de iodixanol (5%); 3 - gradiente de iodixanol (5 e 30%). Amostras de 500 uL foram retiradas de cada fração e avaliadas por *dot blot*, *Western blot* e microscopia eletrônica. Esse procedimento foi realizado com células Sf-9 e Hi-5, e os resultados estão evidenciados na **Figura 24** e **Figura 25**, respectivamente.

Figura 24 - Resultados do processo de concentração de VLPs com gradiente de iodixanol em células Sf-9

Bac-E-MAYV em células Sf-9: (A) Concentração das VLPs por ultracentrifugação com gradiente de iodixanol; (B) *Dot Blot* das frações obtidas (1-11); (C) SDS-PAGE e (D) *Western blot* das frações obtidas (2-10) - Marcador Pageruler Plus - valores em KDa (Thermo Scientific); e (E) Microscopia eletrônica de transmissão da fração selecionada (fração 6). Setas em preto indicam VLPs; Seta em vermelho indica o baculovírus.

Figura 25 - Resultados do processo de concentração de VLPs com gradiente de iodixanol em células Hi-5

Bac-E-MAYV em células Hi-5: (A) Concentração das VLPs por ultracentrifugação com gradiente de iodixanol; (B) Dot Blot das frações obtidas (1-11); (C) SDS-PAGE e (D) *Western blot* das frações obtidas (2-10); e (E) Microscopia eletrônica de transmissão da fração selecionada (fração); Setas em preto indicam VLPs.

5.2 *Pichia pastoris* recombinante (*Pichia-E-MAYV*)

As cepas de *P. pastoris* recombinantes foram construídas em parceria com o pesquisador Dr. Renaud Wagner, do Laboratório de Biotecnologia e Sinalização Celular, da Universidade de Strasbourg, França, segundo estudos anteriores (BORNET, et al, 2012).

5.2.1 Obtenção do vetor pPIC9K-E-MAYV

Primeiramente os genes das proteínas estruturais do MAYV foram obtidos do vetor pMT-E-MAYV e clonados no vetor pPIC9K obtendo assim o vetor pPIC9K-E-MAYV. A confirmação do vetor obtido foi feita através do padrão de digestão gerado com as enzimas *SpeI* e *BamHI*, e corrida de eletroforese em gel de agarose 0,8 % (**Figura 26**).

Figura 26 - Confirmação de obtenção do vetor pPIC-E-MAYV por digestão com enzimas *SpeI* e *BamHI* e análise em gel de agarose 0,8 %

1 – λ HindIII; 2 – pPIC9K; 3 – pPIC9K-E-MAYV; 4 – pPIC9K; 5 – pPIC9K-E-MAYV

5.2.2 Obtenção da cepa Pp-E-MAYV e seleção por geneticina

O vetor recombinante obtido por eletroporação na cepa de *Pichia pastoris* SD115, e as colônias transformadas foram selecionada com placas His-. As colônias obtidas foram então novamente selecionadas através de placas com diferentes concentrações de geneticina, a fim de se obter os clones mais resistentes ao antibiótico, e consequentemente, aqueles que possuem mais cópias dos genes de interesse (**Figura 27**).

Figura 27 - Placas de YPD com os clones de Pp-E-MAYV em diferentes concentrações de geneticina

Placas YPD ágar com diferentes concentrações de geneticina (50, 100 e 150 ug/mL).

5.2.3 Yeastern blotting

As colônias que cresceram nas placas com a maior concentração de geneticina foram selecionadas para o procedimento de “*Yeastern blot*”. Essa técnica consiste em um procedimento semelhante ao *western blot*, mas com a diferença de ser feito diretamente na placa de cultivo, de forma que as colônias cresçam e sejam induzidas em cima da membrana de nitrocelulose, para posteriormente serem lisadas e submetidas a todo o processo de incubação com anticorpos e revelação (**Figura 28**).

Figura 28 - Yeastern blotting com clones de Pp-E-MAYV

Imagem demonstrativa do crescimento das colônias na membrana de nitrocelulose; (B) Revelação do *Yeastern blotting* utilizando o anticorpo anti-MAYV policlonal (1:1000).

5.2.4 Cultivo Pp-E-MAYV

Com base nos resultados do experimento de *yeastern blot*, as colônias 10 e 33 foram selecionadas para serem cultivadas em escala maior para posterior análise de por *dot blot* e *western blot* (**Figura 29**).

Figura 29 - Análises de expressão da Pp-E-MAYV com *dot blot* e *Western blot*

(A) Dot Blot; (B) *Western blot* com amostras de *P. pastoris* controle (Não transformada) e Pp-E-MAYV; (C) *Western blot* vírus MAYV selvagem (D) e (E) *Western blot* dos clones 10 e 33 de Pichia-E-MAYV, respectivamente, em diferentes etapas do processo de lise da membrana. (B) - 1 - Page ruler; Controle (2 - S2; 3 - S3; 4 -P2; 5 - P3); Pp-E-MAYV (2 - S2; 3 - S3; 4 -P2; 5 - P3); (C) - 1 - Page ruler; 2 - MAYV selvagem; (D) e (E): 1 - Page ruler; 2 - S1; 3 - S2; 4 -S3; 5 - P2; 6 - P3. Anticorpo anti-MAYV policlonal (1:1000).

5.2.5 Gradiente de iodixanol (Optiprep)

O processo de obtenção das VLPs foi feito através de ultracentrifugação com gradiente de iodixanol (Optiprep) com a fase S3 do clone #10, obtido após a lise da membrana. Foram utilizadas as mesmas etapas de ultracentrifugação já apresentadas anteriormente: 1 – somente a amostra; 2 - colchão de iodixanol (5%); 3 - gradiente de iodixanol (5 e 30%). Amostras de 500 uL foram retiradas de cada fração e avaliadas por *dot blot*, *Western blot*, sendo a fração 7 avaliada por microscopia eletrônica (**Figura 30**).

Figura 30 - Resultados do processo de concentração de VLPs de MAYV com gradiente de iodixanol em Pp-E-MAYV

Pp-E-MAYV: (A) Concentração das VLPs por ultracentrifugação com gradiente de iodixanol; (B) Dot Blot das frações obtidas (1-11); (C) SDS-PAGE e (D) *Western blot* das frações obtidas (2-10); e (E) Microscopia eletrônica de transmissão da fração selecionada (Fração 7); Setas em preto indicam as VLPs.

6 Discussão

O presente trabalho teve como principal objetivo avaliar a geração de VLPs de MAYV, através da expressão de suas proteínas estruturais, utilizando dois sistemas de expressão largamente empregados na literatura e que são utilizados na obtenção de diversos produtos comerciais, baculovírus e *Pichia pastoris*. A ideia se baseia em outros trabalhos que relataram com sucesso a obtenção de VLPs expressando uma ou mais proteínas estruturais, com conformação e imunogenicidade que propiciam seu uso como agente vacinal (METZ, 2013).

A febre Mayaro é uma doença febril com uma alta taxa de morbidade, uma vez que pode causar sérias artralgias, impossibilitando certos movimentos da pessoa acometida. A capacidade de transmissão do MAYV pelo mosquito *Aedes aegypt*, aliado à semelhança dessa doença com a febre Chikungunya, recentemente disseminada no país, evidenciam o perigoso potencial dessa doença, e justificam o trabalho em questão que visa uma abordagem para prevenção e combate ao vírus Mayaro.

O potencial das VLPs como componentes vacinais é comprovado pela existência atualmente de diversas vacinas comerciais baseadas nessa abordagem. Nesses produtos, a produção das VLPs é feita utilizando variados sistemas de expressão, como células de mamíferos, leveduras e baculovírus com células de inseto (ROLDAO, 2010). A primeira vacina de VLP licenciada foi contra o vírus da hepatite B, produzida na levedura *S. cerevisiae*, através da expressão do antígeno de superfície do vírus (HBsAg) (MICHEL, 2010). Atualmente, existem várias vacinas de VLPs contra esse vírus, sendo a grande maioria composta de VLPs produzidas em leveduras, principalmente *S. cerevisiae*, *P. pastoris* e *Hansenula polymorpha*. A grande utilização desse sistema, possivelmente se deve ao fato da simplicidade da forma de expressão, uma vez que apenas uma proteína é expressa, e das modificações necessárias serem condizentes com aquelas que as leveduras são capazes de fazer, acrescentando ainda, as vantagens desse sistema na produção em larga escala como produtividade, robustez e custos (KIM, 2016). No caso de vacinas contra o HPV, destacam-se duas vacinas compostas de VLPs da proteína L1 do vírus, sendo uma produzida utilizando o sistema baculovírus (Cervarix), e outra produzida em leveduras (Gardasil). Ambas as vacinas possuem semelhante capacidade de indução imunológica com consequente capacidade de proteção, e também não diferem quanto ao preço final no mercado (TOFT, 2014). A relevância dos sistemas de expressão baseados em baculovírus e leveduras (*P. pastoris*), no

contexto das vacinas licenciadas demonstram a viabilidade do trabalho em avaliar ambos para a geração de VLPs do MAYV, visando futuramente uma produção em larga escala e aprovações frente a órgãos regulatórios.

Outro fator relevante para a escolha desses sistemas é o fato de existirem trabalhos com ambos, evidenciando a geração de VLPs de outros *Alphavirus*, como Chikungunya, expressando as proteínas estruturais (SARASWAT, et al. 2016; METZ, et al. 2013). Em ambas as abordagens foram expressas as proteínas estruturais do vírus Chikungunya, e as metodologias utilizadas serviram de base para o desenvolvimento desse trabalho ,em anexo descrevemos alguns experimentos que realizamos com essas proteínas também.

Alia-se aos fatos já citados, o grande conhecimento por parte do grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan, em expressão de proteínas heterólogas em cultivos com células de inseto, possibilitando o emprego do sistema baculovírus. E uma colaboração com o grupo do Dr. Renaud Wagner, da Universidade de Strasbourg, que possui grande experiência no sistema *P. pastoris*, permitindo assim a inclusão desse sistema no trabalho, e o início das atividades com esse organismo em nosso laboratório.

6.1 Baculovírus

Para a obtenção dos baculovírus recombinantes, foi utilizado o sistema comercial Bac-to-Bac (Thermo Fisher). A escolha desse kit se deve pelo fato de ser um dos principais produtos empregados em estudos da literatura, e também pela sua facilidade de uso, aliado ao pouco tempo requerido para obtenção dos organismos recombinantes.

Os genes das proteínas estruturais do MAYV (E-MAYV) foram obtidos a partir do vírus selvagem, cepa BeAr20290, através de RT-PCR. A clonagem desses genes foi feita inicialmente no vetor pMT, uma vez que o mesmo seria utilizado para outros trabalhos no laboratório, sendo que somente a partir desse, a clonagem no pFastBac1 foi efetuada. No vetor pFast, os genes clonados são controlados por um promotor de poliedrina. No procedimento de obtenção dos genes E-MAYV, um dos *primers* utilizados para amplificação continha uma sequência de Kozak, sendo inserida *upstream* aos genes, visando um aumento nos níveis de expressão, conforme já demonstrado em outros trabalhos com baculovírus (SIVAKUMAR, 2008). Os processos de clonagem foram feitos utilizando o kit comercial *In*

fusion (Clontech), demonstrando uma alta taxa de eficiência, uma vez que todas as colônias avaliadas após o processo de ligação continham os genes de interesse.

Após a obtenção do vetor pFastBac-E-MAYV, o mesmo foi transformado em bactérias *E. coli* DH10Bac, para obter o bacmídeo-E-MAYV. A purificação do bacmídeo foi feita utilizando o kit MaxiPrep (Qiagen), respeitando as condições indicadas pelo fabricante para purificação de um vetor com mais de 135 Kb, que é o caso do bacmídeo, sendo necessário um aquecimento prévio a 60 °C do tampão de eluição. A confirmação de obtenção do bacmídeo-E-MAYV foi feita utilizando PCR convencional, com os *primers* indicados no kit (**M13F / R – Tab. 1**). O fragmento amplificado esperado para esse experimento possui aproximadamente 6 kb, que corresponde ao tamanho do fragmento E-MAYV (3785 bp), juntamente com uma parte do pFastBac que também é transferida ao bacmídeo (2083 bp), e mais uma região do bacmídeo que é amplificada (300 bp). Uma padronização do experimento foi feita, para obter os melhores tempos e temperaturas para o ciclo de amplificação. Por se tratar de um fragmento muito longo a ser amplificado, outro procedimento de PCR convencional foi realizado, utilizando *primers* específicos para o gene da E2 do MAYV (**E2 MAYV F / R – Tab. 1**), que resulta em um fragmento de 400 bp (**Figura 10**). Pela análise dos resultados, foi possível confirmar a obtenção do bacmídeo contendo as proteínas estruturais do MAYV, sendo que foi escolhido aquele que apresentou apenas a banda de 6 kb, uma vez que os outros apresentaram bandas de 300 bp, indicando a presença também de bacmídeo sem a transposição.

Dentre os trabalhos de literatura que empregam o kit Bac-to-Bac, a maioria utiliza células Sf-9 para gerar e para amplificar os baculovírus, enquanto outros utilizam a linhagem Sf-21 para o mesmo propósito, evidenciando resultados semelhantes que não comprometem o trabalho (GOMEZ-SEBASTIAN, 2014). Nesse trabalho, tanto a geração dos baculovírus (L1), quanto a amplificação viral (L2 e L3), foram feitas em células Sf-9. A célula Hi-5 não é indicada para a produção viral, uma vez que estudos demonstraram que a geração dos baculovírus em Sf-9 pode gerar um título até 100 x maior quando comparado com os gerados em Hi-5 (WILDE et al, 2014).

Outro ponto relevante na obtenção e amplificação dos lotes virais é o meio de cultura. No trabalho em questão, toda a obtenção dos baculovírus recombinantes foi feita com o meio SF-900 III. Entretanto, o próprio kit recomenda o uso do meio *Grace's Insect Cell Culture Medium* não suplementado para transfecção. A indicação do kit pelo meio *Grace's* se deve ao

fato de ele não conter alguns suplementos comuns em outros meios, melhorando o processo de transfecção com reagente lipídico. Pelos resultados preliminares obtidos nesse trabalho, o tipo de meio não influenciou qualitativamente no vírus obtido, e com base no título observado ($1,5 \times 10^7$) também não houve grandes diferenças frente aqueles indicados pelo kit (1×10^7 a 1×10^8). Entretanto, para estudos de otimização, visando um aumento de escala do processo, outros meios com capacidade de gerar aumento do título viral poderão ser avaliados.

O lote viral foi obtido pela transfecção do bacmídeo-E-MAYV em células Sf-9, utilizando Cellfectin II, um reagente lipídico catiônico sugerido para esse propósito. A coleta das partículas virais foi feita 72 h pós-transfecção, sendo esse o tempo utilizado em diversos outros trabalhos. O processo foi monitorado por microscopia óptica para avaliar os efeitos citopáticos (**Figura 11**), evidenciando as principais características em um processo de transfecção, como por exemplo, o aumento de 25-50 % do diâmetro das células frente ao controle negativo, nas primeiras 24 h, e a diminuição na taxa de crescimento após 48 h. No tempo de 72 h, quando é realizada a coleta, muitas células ainda apresentam um bom aspecto morfológico e possivelmente ainda produzam vírus, no entanto é possível verificar a presença de muitas células mortas, de modo que a extensão do tempo de coleta poderia levar ao carregamento junto ao lote viral, de componentes intracelulares de células já lisadas, podendo assim prejudicar a estabilidade dos vírus e das proteínas a serem expressas posteriormente.

Visando o aumento do título viral, é recomendada pelo kit a amplificação viral, ou seja, os vírus coletados do processo de transfecção (L1) são utilizados para infectar novamente células Sf-9, pelo menos mais duas vezes (L2 e L3). Essa amplificação não pode ser feita indiscriminadamente, sendo sugerido amplificar até no máximo cinco vezes (L5), para evitar a perda das características iniciais do baculovírus recombinante. Nesse trabalho, foi utilizado um lote com amplificação L3.

Existem diversas abordagens visando a titulação de baculovírus, mas nenhuma delas ainda é vista como unanimidade, de forma que diferentes trabalhos adotam técnicas distintas para esse propósito (ROLDAO et al., 2009). Nesse trabalho, foi empregada uma técnica de titulação que se baseia na utilização de células Sf-9 ET - *Easy titration* (HOPKINS e ESPOSITO 2009). As células Sf-9 ET consistem em uma linhagem Sf-9 que possui um plasmídeo auxiliar contendo o gene da GFP, sob a ação de um promotor de poliedrina, de forma que ele somente é expresso quando a célula é infectada por um baculovírus. Sendo assim, é possível estimar o título viral fazendo uma relação entre as diluições da suspensão

viral utilizada e a presença de focos de fluorescência, e com isso calcular a TCID₅₀, que consiste na quantidade de vírus suficiente para infectar 50% das células, com base em *Reed e Muench*. Com o valor da TCID₅₀, pode-se convertê-lo em pfu / mL, multiplicando-se por 0,69, com base na distribuição de *Poisson*. Neste trabalho, o título viral estimado foi de $1,5 \times 10^7$, sendo um resultado condizente com os apresentados em outros trabalhos e pelo kit (1E7 a 1E8) (O'REILLY et al., 1994; ROLDAO et al., 2009).

Os ensaios de infecção com Bac-E-MAYV foram feitos nas linhagens Sf-9 e Hi-5, utilizando o lote viral L3. O emprego da linhagem Sf-9 se deve ao fato de ser a mais utilizada para ensaios de expressão envolvendo baculovírus (USTUN-AYTEKIN, 2014). Já a linhagem Hi-5 tem apresentado altos níveis de expressão, muitas vezes superiores aos apresentados pela linhagem Sf-9, além do fato de ser largamente empregada na produção de insumos comerciais licenciados, a credenciando para usos futuros, facilitando o processo de regularização frente aos órgãos competentes (SCHILLER, 2008). Primeiramente foram realizados ensaios em placa de 6 poços para determinar as melhores condições, como MOI e tempo de coleta após a infecção, sendo realizado posteriormente ensaios de infecção em cultivo em suspensão com ambas as linhagens.

Os efeitos citopáticos foram monitorados após o processo de infecção, sendo que é possível verificar uma intensificação com o passar do tempo (**Figura 14, 15 e 16**). Nessas imagens é possível verificar também características de um processo de apoptose, sendo esse um processo natural da célula frente a uma infecção viral, visando a sua eliminação (ROHRMANN, 2013). Como forma de defesa, o baculovírus dispõe de alguns genes anti-apoptóticos visando postergar esse processo, permitindo a proliferação viral, mas com o passar do tempo é possível visualizar células mortas ou com características de apoptose, sendo que esse processo é desencadeado pela replicação do DNA do baculovírus (KIMBERLY, 2009; CLEM, 2007).

Para analisar a expressão das proteínas do MAYV, foram realizados diferentes imunoenaios, como *dot blot*, *Western blot* e IFI. Em todos esses experimentos, foi utilizado um anticorpo policlonal anti-MAYV, da ATCC, oriundo do fluido ascítico de camundongos. A produção desse anticorpo consiste em gerar ascite em camundongos, inoculando intraperitonealmente células de hidridoma produtoras do anticorpo desejado, formando tumores ascíticos no qual se acumulam grandes quantidades de anticorpos nesse fluido

ascítico, chegando a concentrações até 100x maiores do que os produzidos em culturas de hibridomas (YOKOYAMA, 2008).

Experimentos de imunofluorescência indireta (IFI) foram realizados nas diferentes linhagens avaliadas. Tal procedimento evidencia a presença de proteínas de MAYV nas membranas das células infectadas, sendo um método mais sensível e uma forma de caracterizar a proteína na própria célula, sem a necessidade de tratamentos prévios, possibilitando uma melhor detecção. Apesar da técnica de IFI não ser uma técnica quantitativa, ela é válida para comparações entre diferentes variáveis, uma vez que os procedimentos sejam realizados simultaneamente e sob as mesmas condições.

Inicialmente, foi feito com IFI um comparativo entre diferentes MOIs, visando estabelecer para o decorrer do trabalho aquele que apresentasse uma maior porcentagem de células infectadas. Os MOIs avaliados foram condizentes com aqueles citados na literatura: 0,5; 1; 2; 5 e 10. Conforme demonstrado na **Figura 17**, é possível verificar visualmente um aumento na quantidade de células infectadas conforme se aumenta o MOI. Quando utilizado os MOIs 0,5, 1 e 2, as marcações ficaram mais restritas a alguns “bolsões” de células infectadas, ou seja, uma determinada célula foi infectada por baculovírus e gerou novos baculovírus que infectaram as células vizinhas. Fato esse não observado quando utilizado MOIs 5 e 10, onde a marcação foi presente em toda a área avaliada, possivelmente porque as células já foram infectadas simultaneamente devido a uma quantidade maior de vírus. Esse fato também pode ser evidenciado pela diferença no “tapete celular” entre os MOIs, sendo que com MOIs menores, ele se apresenta de uma forma contínua, enquanto nos MOIs maiores, as células se apresentam mais isoladas, evidenciando nesses últimos o processo de desprendimento celular da superfície, que é um dos efeitos do processo de infecção viral, consequência da maior quantidade de vírus (ROHRMANN, 2013). Assim, com base nas análises dos resultados, foi estabelecido o MOI 10 para o desenvolvimento do trabalho, sendo esse dado reforçado por outros trabalhos que empregaram esse mesmo valor (METZ, 2013).

Alguns trabalhos evidenciam que a utilização de um baixo MOI pode ser mais vantajosa. Wong et al. (1996) estabeleceram o conceito de que independente do MOI, a cultura vai atingir a sua densidade celular ideal e o nível ótimo de expressão, desde que um correto tempo de infecção (TOI) seja escolhido. Esse conceito se baseia no fato de que as infecções secundárias e terciárias irão gerar a infecção global de um maior número de células,

propiciando um maior rendimento na expressão final (MARANGA, 2003). Além disso, ensaios de infecção com mais vírus do que o necessário pode aumentar a carga metabólica e causar diminuição da produtividade (WILDE et al, 2014). Assim, a definição de um correto MOI, aliado ao TOI e a quantidade de VLP produzida pode variar conforme o trabalho, sendo necessários processos de otimização para determinar as melhores condições.

Nesse sentido, nos experimentos de IFI para avaliar a expressão nas diferentes linhagens, foi possível também evidenciar uma forte marcação nas células, principalmente no tempo de 72 h, enquanto que no tempo de 96 h a marcação se mostrou menos intensa, sendo a marcação mais evidente na membrana. Possivelmente esse fato é devido à liberação dos baculovírus e das proteínas recombinantes no sobrenadante em forma de VLP, ou até mesmo pelas condições fisiológicas das células, que após esse tempo já não produzem a mesma quantidade das proteínas. Outro fato relevante é a visualização de uma marcação significativamente mais intensa na linhagem Hi-5, corroborando outros trabalhos que demonstram uma produtividade 5x maior de VLPs de rotavírus e da Influenza A nessa linhagem, quando comparada com a Sf-9 (JIANG, 1998).

Através da técnica de *dot blot* e *Western blot*, a expressão das proteínas estruturais foi avaliada em diferentes tempos tanto nas células, quanto no sobrenadante. Por conter um promotor de poliedrina, considerado tardio, espera-se um início de expressão após 24 h, fato observado nos resultados apresentados, sendo que nesse tempo, ou a marcação não ocorreu, ou se mostrou menos intensa frente aos outros tempos em ambas as técnicas e linhagens utilizadas (**Figura 20 e 21**).

Nos resultados da linhagem Sf-9 (**Figura 20**), é possível verificar pelo *dot blot* do lisado celular uma marcação mais intensa no tempo de 72 h.p.i., mesmo padrão observado na análise do sobrenadante. O *Western blot* também indica a marcação mais intensa 72 h.p.i, decaindo posteriormente, não sendo evidenciado no tempo de 120 e 144 h.p.i. (**Figura 21 –A**). Curiosamente, apenas uma banda foi evidenciada na altura de 25 kDa, possivelmente correspondente a proteína C, enquanto que no controle positivo (vírus selvagem), uma banda de aproximadamente 50 kDa também é visualizada, a glicoproteína E2 ou a glicoproteína E1, uma vez que possuem tamanhos semelhantes, 52 e 48 kDa respectivamente, podendo estar sobrepostas (METZ, 2011). Devido à utilização de um anticorpo policlonal, é provável que este tenha maior especificidade pela proteína E2, uma vez que ela é a principal responsável pela geração de anticorpos em um processo de infecção, indicando ser ela a proteína marcada (LEUNG, 2011). As proteínas E3 e 6K dificilmente seriam visualizadas no gel devido aos

seus tamanhos. No entanto, em muitos estudos envolvendo a geração de VLPs de *Alphavirus*, a proteína E3 é visualizada ainda junto a E2, como a proteína precursora p62 (65 kDa), evidenciando que a clivagem mediada por furina para separar a E3 e a E2 não foi completa, fato não observado neste trabalho (WAGNER, 2014). Importante ressaltar ainda, que tal fato não prejudicou a geração de VLPs nos trabalhos citados (METZ, 2013).

Já no caso da linhagem Hi-5, o *dot blot* do lisado celular (**Figura 20**) demonstra que a expressão vai aumentando com o passar do tempo, sendo que no tempo de 72 h.p.i. a marcação é a mais intensa, sendo mantida até 144 h.p.i., com o mesmo perfil observado na análise do sobrenadante. O *Western blot* das mesmas amostras também evidencia esse fato, sendo que no caso dessa linhagem, as duas bandas visualizadas no controle (vírus selvagem) também são evidenciadas nas amostras. Uma banda na altura de 50 kDa, correspondente a E2 e/ou E1, e uma banda de 25 kDa correspondente a C, somente a partir de 72 h.p.i. Uma terceira banda próxima da altura da proteína C é visualizada, podendo ser outra forma de glicosilação da proteína, conforme já presenciado em outros trabalhos, não prejudicando a geração de VLPs (WAGNER, 2014).

A princípio, mesmo não sendo técnicas quantitativas, as análises de IFI, *dot blot* e *Western blot*, evidenciam um possível maior nível de expressão na linhagem Hi-5 frente a Sf-9. Esse fato é condizente com o apresentado em alguns trabalhos, onde ensaios de infecção com baculovírus em Hi-5 podem gerar até três vezes mais expressão de uma mesma proteína expressa em Sf-9 (WILDER et al, 2014). Esse mesmo trabalho evidencia que as células Hi-5 são mais permissivas à infecção com baculovírus, o que explicaria esse maior nível de expressão, e o fato de as células Hi-5 apresentarem pico de expressão 72 h.p.i, mas mantendo nos demais tempos, enquanto a Sf-9 o maior nível é visto 72 h.p.i, com aparente diminuição posteriormente (WILDER et al, 2014). Outro fato a ser observado é que as VLPs oriundas de células Hi-5 podem ser qualitativamente melhores, uma vez que a presença da glicoproteína E2 já é visualizada na análise de expressão das células, o que possibilitaria a geração de VLPs com quantidades adequadas da glicoproteína.

A avaliação da geração das VLPs foi feita após a concentração dessas partículas através de processos de ultracentrifugação com gradiente de sacarose ou de iodixanol (Optiprep). Inicialmente, o sobrenadante do cultivo foi coletado, clarificado, ultracentrifugado, submetido a um procedimento com colchão de sacarose 5%, para finalmente ser adicionado ao gradiente de sacarose (10%, 20% e 45%). Com base na

literatura, esperava-se a concentração das VLPs na fração entre 30 e 40%, mas conforme visualizado no *Western blot* das frações coletadas (**Figura 23**), as partículas estavam presentes em todas as frações, indicando que o procedimento não foi bem sucedido. Por não ter havido um eficiente processo de concentração, as amostras oriundas do gradiente de sacarose não foram avaliadas por microscopia eletrônica. Importante ressaltar que nesse caso, a marcação evidenciou apenas as glicoproteínas E1 e E2, com duas bandas próximas a altura de 50 kDa, fato esse esperado uma vez que em uma VLP seriam as proteínas mais expostas, ao contrário da proteína C.

Com base nesses resultados, outro método de concentração foi avaliado, sendo semelhante ao anterior, mas utilizando um reagente comercial Optiprep. Esse produto consiste em uma solução de iodixanol, um reagente que apresenta melhores índices de purificação e rendimento, frente a outros como sacarose e cloreto de cézio (CsCl) (STROBEL, 2015). O protocolo utilizado foi baseado em Akahata, et al. 2012, utilizando a concentração de 5% para o colchão de iodixanol, as concentrações de 5% e 30% para a formação do gradiente. Resultados de SDS-PAGE e *Western blot* para as linhagens Sf-9 (**Figura 24**) e Hi-5 (**Figura 25**) evidenciaram uma adequada concentração das partículas, ficando as mesmas retidas na fração 7, com uma pequena parte distribuída nas frações adjacentes, 6 e 8. A partir desse resultado, a fração 7 foi então submetida para avaliação por microscopia eletrônica de transmissão.

As análises de microscopia eletrônica mostraram a presença de VLPs no tamanho esperado, entre 30-70 nm, em ambas as linhagens (**Figura 24 e 25**). Essas partículas são um pouco menores que o vírus selvagem (70 nm), mas condizente com os valores atribuídos a VLPs. Esse tamanho menor das VLPs frente ao vírus selvagem é visto em diversos trabalhos, sendo essa evidência explicada pela ausência de material genético na partícula, que muitas vezes possibilita um arranjo diferenciado, tornando-a menor que o observado naturalmente (LOPEZ-VIDAL, 2015) Sendo assim, os resultados obtidos por esse trabalho demonstram a correta obtenção de VLPs do MAYV através do sistema baculovírus, em duas linhagens distintas (Sf-9 e Hi-5).

6.1 *Pichia pastoris*

A parceria com o Dr. Renaud Wagner, da unidade de GPCRs, Dor e Inflamação, da Universidade de Strasbourg, França, possibilitou a avaliação e padronização do sistema *P. pastoris* neste trabalho. Todo o procedimento de obtenção dos organismos recombinantes, cultivo e análises de expressão foram incorporados ao Laboratório de Imunologia Viral, podendo o mesmo ser estendido futuramente para trabalhos com proteínas de outros vírus. O processo de obtenção da *P. pastoris* recombinante foi feito baseado em Bornet et al.(2012).

O plasmídeo utilizado foi o pPIC9K, da empresa Thermo Fisher Scientific, com algumas modificações, sendo gentilmente cedido pelo Dr. Renaud Wagner. Dentre as modificações têm-se a presença de um marcador de histidina *downstream* aos genes inseridos. Os genes das proteínas estruturais do MAYV foram obtidos conforme já descrito para o trabalho com baculovírus e foram clonados no sítio de clonagem do vetor utilizando também o sistema *In fusion* (Clontech), sendo o processo confirmado através de enzimas de restrição e o padrão de bandas gerados condizente com a geração do plasmídeo pPIC-E-MAYV (**Figura 27**).

O promotor utilizado para a expressão foi o PAOX1, indutível por metanol. Esse promotor expressa naturalmente a proteína álcool oxidase que tem a capacidade de oxidar o metanol em formaldeído utilizando oxigênio molecular. No entanto, essa enzima tem uma fraca afinidade pelo oxigênio molecular, sendo esse problema contornado através da expressão de altos níveis da mesma. Portanto, diversos sistemas de expressão baseado em *P. pastoris* o utilizam, uma vez que essa capacidade de ser induzido por metanol possibilita o controle do processo, pois a expressão pode ser iniciada quando alcançada uma densidade celular adequada. Essa abordagem tem como principal vantagem, a capacidade de regular um único momento no qual uma grande quantidade de células inicia a expressão, evitando que células expressem em momentos distintos, liberando metabólitos que prejudicam o crescimento e a expressão das demais (BALAMURUGAN, 2007). Outro fato relevante é ser considerado um promotor forte, gerando altos níveis de expressão das proteínas por ele reguladas (LOOSER, 2015).

A cepa utilizada foi a SMD1163, que possui mutações em dois genes que codificam proteases endógenas (Proteinase A - pep4; Proteinase B - prb1), visando diminuir a degradação dos produtos gerados. Estudos evidenciam bons resultados com essa cepa frente às outras disponíveis para expressão de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (SHIMAMURA, 2012).

Com o plasmídeo pPIC-E-MAYV construído, o mesmo foi transformado por eletroporação em *P. pastoris*. O processo de seleção foi feito por HIS+, ou seja, a ausência desse aminoácido essencial no meio de cultivo, somente será compensada nos clones que integraram corretamente o vetor transformado, uma vez que esse tem o gene para a expressão de histidina. Dessa forma, somente esses clones cresceram na placa de cultivo, sendo então utilizados para o decorrer do trabalho.

O próximo passo foi avaliar dentre os clones corretamente transformados, aqueles que possuíam o maior número de cópias integradas ao genoma, uma vez que o vetor pPIC9K possui essa capacidade. Juntamente com os genes a serem incorporados, existe um gene de resistência ao antibiótico geneticina, portanto, foi possível selecionar aqueles clones com maior número de cópias integradas, através do cultivo desses organismos na presença de concentrações crescentes de antibiótico (ANDRE, 2006). Os clones que apresentaram bom crescimento nas placas com maior concentração de geneticina (150 mg/mL) foram selecionados para o decorrer do trabalho, uma vez que possivelmente apresentam um número maior de genes de resistência, e consequentemente, um número maior dos genes E-MAYV.

Esses clones foram então submetidos a um procedimento denominado “*yeastern blotting*”, que consiste em uma adaptação da técnica de *Western blot*. Esse procedimento é realizado diretamente com os clones de *P. pastoris* crescendo e sendo induzidos sobre uma membrana de nitrocelulose, para posteriormente serem submetidos a um processo de lise, lavagem e detecção com anticorpos (McGREW, 1997). Essa técnica é bastante aplicada, tendo como principal vantagem, a capacidade de análise de uma grande quantidade de clones simultaneamente, sem a necessidade de cultivos em meio líquido e preparo de membrana, antes do processo de análise da expressão (ZHANG, 2005). Com base nos resultados apresentados, dois clones foram selecionados para serem cultivados em meio líquido e submetidos à análise de expressão por outros métodos. Essa escolha se deve pela marcação mais intensa na membrana dos clones, indicando bons níveis de expressão.

O cultivo foi feito em agitador a 220 rpm, a 30° C, inicialmente com meio de cultura contendo glicerol como principal fonte de carbono (BMGY), para que fosse alcançada uma alta densidade celular. Após atingir a concentração de 10^7 células por mL, foi feita indução com meio de cultura contendo metanol (BMMY) e a coleta foi feita após 48 h, sendo adicionado 2 mL de metanol após as primeiras 24 h. O tempo de coleta foi determinado com base em um trabalho que evidenciou a geração de VLPs de outro *Alphavirus* (Chikungunya) após 48 h (SARASWAT, 2016).

Para análise de expressão, foram coletados o sobrenadante e as células, sendo o último submetido a um processo de lise mecânica com *beads* de vidros, para que as proteínas pudessem ser obtidas, visto a resistência da parede celular das leveduras. Alguns trabalhos que expressam VLPs em *Pichia pastoris* evidenciam o fato de que essas estruturas ficam retidas entre a membrana e a parede celular da mesma, sendo necessário um tratamento enzimático ou físico após o cultivo para liberá-las no sobrenadante (LÜNSDORF, et al. 2011). O principal reagente utilizado para esse propósito é a *Zymolyase*, que tem como ação a degradação da parede celular, permitindo a secreção. Entretanto, um trabalho evidenciou a secreção de VLPs e *Alphavirus* no meio de cultura somente com a presença de um sinal secretor, como por exemplo, o fator α -mating oriundo de *Sacharomices cerevisiae* (SARASWAT, et al. 2016). No nosso trabalho, a presença de proteínas expressas no sobrenadante foi avaliada previamente sem o processo de concentração por ultracentrifugação, não sendo observadas nem VLP, nem proteínas endógenas da *P. pastoris*. Além disso, com base em um trabalho que verificou que VLPs de Dengue (30 nm) não foram secretadas no meio, é possível sugerir que a geração de VLPs de MAYV (70 nm) também fique retida (SUGRUE, et al. 1997).

Sendo assim, realizamos o processo de lise mecânica, para isso diferentes amostras foram coletadas a cada passo para avaliar a expressão das proteínas do MAYV. As análises de *dot blot* e *Western blot* evidenciaram em todas as amostras duas bandas próximas a altura de 50 kDa, e uma banda próxima a 35 kDa (**Figura 29**). As bandas superiores podem ser correspondentes às proteínas E2 (50 kDa), E1 (48 kDa), mas outra possibilidade seria de que as duas bandas correspondem a duas formas distintas da E2, uma vez que trabalhos com leveduras tem evidenciado importantes diferenças de glicosilação nas proteínas expressas (TEH, 2011). Além disso, reforça essa hipótese o fato de que no controle positivo (vírus

selvagem) só foram evidenciadas duas banda (E2 e C). Conforme já dito com o sistema baculovírus, a banda próxima a 35 kDa possivelmente corresponde à proteína C.

Nas amostras de lisado celular, a intensidade da marcação foi maior, sendo um possível indicativo de que a lise por quebra mecânica talvez não tenha sido suficiente para a liberação das VLPs. No entanto, mesmo que a intensidade tenha sido consideravelmente menor, a amostra de sobrenadante resultante do processo foi submetida à etapa de concentração através de gradiente de iodixanol. Resultados de *Western blot* evidenciaram a presença de marcação em uma única fração, possivelmente correspondente às VLPs (**Figura 30**). Essa fração foi então analisada através de microscopia eletrônica de transmissão e a presença de estruturas circulares com tamanhos variando entre 30 e 50 nm foram observadas, sendo condizentes com VLPs de *Alphavirus* encontradas em outros trabalhos (SARASWAT, 2016; METZ, 2013).

Portanto, os resultados apresentados sugerem que a produção de VLPs de MAYV, utilizando o sistema *Pichia pastoris*, tenha sido realizada com sucesso. Procedimentos de otimização para que as VLPs sejam obtidas do interior da levedura ainda se fazem necessários, o mesmo acontecendo com os procedimentos de concentração, uma vez que a continuidade do projeto, visando análises de imunogenicidade, necessita de VLPs altamente purificadas.

Assim, neste trabalho, ambos os sistemas foram capazes de expressar as proteínas do MAYV e gerar VLPs- MAYV. Uma comparação entre ambos, e a eleição da melhor abordagem, ainda não pode ser concluída, devido à ausência de um método de quantificação das VLPs geradas. No entanto, tendo como base as dificuldades e facilidades de cada processo de obtenção, cultivo e obtenção das VLPs para cada sistema, o sistema *Pichia pastoris* se mostra mais vantajoso, uma vez que basta o cultivo do organismo e sua indução, para que o processo seja realizado. Diferente do sistema com baculovírus, onde é necessário a produção viral e processos de infecção em condições específicas. Além disso, considerando os reagentes necessários para obter ambos os organismos recombinantes, é possível inferir que os custos com o sistema *Pichia pastoris* sejam inferiores frente aos necessários para o sistema baculovírus, porém apenas um estudo detalhado de custos poderia eleger o sistema economicamente mais viável neste caso. Com relação ao tempo, o processo de obtenção dos recombinantes se mostra semelhante, mas uma vez que eles estejam estabelecidos, a produção das VLPs é mais rápida no sistema *P. pastoris*. No entanto, a escolha do sistema baculovírus seria mais viável caso o nível de expressão das VLPs seja significativamente maior que o

apresentado pelo sistema *Pichia pastoris*, ou se a qualidade das VLPs formadas apresentarem melhores resultados de imunogenicidade. De qualquer forma, ambos demonstraram serem potenciais plataformas para geração de VLPs de MAYV e outros arbovírus, sendo que, através de trabalhos complementares, é possível vislumbrar futuramente, a avaliação e utilização das VLPs obtidas como candidatas vacinais.

7 Conclusões

- Foram obtidos vetores de expressão para as proteínas estruturais do MAYV em dois sistemas: Baculovírus (pFast-E-MAYV e bacmídeo-E-MAYV) e *Pichia pastoris* (pPIC-E-MAYV).
- Obtivemos organismos recombinantes: Baculovírus-E-MAYV e *Pichia*-E-MAYV.
- A titulação viral através da utilização de células Sf-9 *Easy titration* se mostrou adequada para determinar o MOI do processo de infecção.
- A expressão das proteínas estruturais do MAYV foi detectada em ambos os sistemas por diferentes técnicas: IFI, *dot blot* e *Western blot*.
- Foram estabelecidas como condições ótimas de expressão para o Bac-E-MAYV: MOI 10 e tempo de coleta de 72 h p.i.
- O método de concentração das VLPs com gradiente de iodixanol (Optiprep) se mostrou melhor quando comparado com o gradiente de sacarose.
- No sistema baculovírus, as VLPs foram secretadas no sobrenadante. Ao contrário do sistema *Pichia*, onde as VLPs somente foram liberadas após tratamento físico ou enzimático da membrana.
- Os dois sistemas foram capazes de gerar VLPs com tamanho de 30-60 nm, caracterizadas através de microscopia eletrônica de transmissão.
- Foi obtido também o Bac-E-CHIKV, utilizado como controle do processo, sendo capaz de expressar as proteínas estruturais do CHIKV e gerar VLPs (em anexo).

8 Referências

- ADELMAN, Z. N.; MILLER, D. M.; MYLES, K. M. Bed bugs and infectious disease: a case for the arboviruses. **PLoS Pathog.** 9(8):e1003462. 2013
- AKAHATA, W. A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection. **Nat Med.** 16(3):334-338. 2010.
- AKAHATA, W.; NABEL, G. J. A specific domain of the Chikungunya virus E2 protein regulates particle formation in human cells: implications for alphavirus vaccine design **J. Virol.** 86, 8879-8883. 2012
- ALLER, S. G., et al. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. **Science** 323:1718-1722. 2009.
- ALTMANN, F. et al. Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. **Glycoconj J.** 16(2):109-23. 1999.
- ANDERSON, C. R. et al. Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad, B.W.I. **Am J Trop Med Hyg.** 1957 Nov;6(6):1012-6.
- ANDRE N. et al. Enhancing functional production of G protein-coupled receptors in *Pichia pastoris* to levels required for structural studies via a single expression screen. **Protein Sci.** 15:1115-1126. 2006.
- BALAMURUGAN V. et al. *Pichia pastoris*: A notable heterologous expression system for the production of foreign proteins. **Indian Journal of Biotechnology.** Vol 6. pp 175-186, 2007
- BILL. R. In: Recombinant Protein Production in Yeast. **Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)**, vol 866. Humana Press.
- BINDA, C. et al. Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. **Nat. Struct. Biol.** 9:22-26. 2002.
- BONNING, B. C. Baculoviruses: biology, biochemistry and molecular biology. In: Gilbert, L. I.; Iatrou, K.; Gill, S. S. **Comprehensive Molecular Insect Science.** Oxford: Elsevier, p. 233-270. 2005
- BORNERT, O. et al. Overexpression of membrane proteins using *Pichia pastoris*. *Curr Protoc Protein Sci.* Chapter 29:Unit 29.2. doi: 10.1002/0471140864.ps2902s67, 2012.
- BOYCE, F. M.; BUCHER, N. L. Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(6):2348-52. 1996.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em:
<http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/preparacao_resposta_virus_chikungunya_brasil.pdf>, acessado em 18 de Janeiro de 2018.

- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em:
<<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/1205-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/febre-do-mayaro/20950-situacao-epidemiologica-dados>>, acessado em 03 de Fevereiro de 2018.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em:
<<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/15/svs2016-be003-dengue-se52.pdf>>, acessado em 03 de Fevereiro de 2018.
- BRETTTHAUER, R. K.; CASTELLINO, F. J. Glycosylation of *Pichia pastoris* – derived proteins. *Biotechnol Appl Biochem*. 30:193–200. 1999
- CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*. 2000 Jan;24(1):45-66. 2000.
- CHESHENKO, N. et al. A novel system for the production of fully deleted adenovirus vectors that does not require helper adenovirus. *Gene Ther*. 8(11):846-54. 2001.
- CHUNG, Y. C. et al. Expression, purification and characterization of enterovirus-71 virus-like particles. *World J. Gastroenterol*. 12(6), 921–927. 2006.
- CIARKOWSKA, A. JAKUBOWSKA, A. *Pichia pastoris* as an expression system for recombinant protein production. *Postepy Biochem*. 59(3):315-21. 2013.
- CICCARONE, V. C. et al. Generation of Recombinant Baculovirus DNA in *E. coli* Using Baculovirus Shuttle Vector. **Methods in Molecular Medicine** (Reischt, U., Ed.), 13, Humana Press Inc., Totowa, NJ. 1997.
- CLEM, R. J. Baculoviruses and Apoptosis: A Diversity of Genes and Responses. **Current Drug Targets**, 1069-1074 1069 1389-4501/07. Bentham Science Publishers Ltd. 2007
- COFFEY, L. L. et al. Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease; **Future Microbiol**. 8(2):155-76. 2013
- COIMBRA, T. L. M. et al. Mayaro virus: imported cases of human infection in São Paulo State, Brazil. **Rev Inst Med Trop de São Paulo**. 49: 221-224. 2007.
- DARBY, R. A. et al. Which yeast species shall I choose? *Saccharomyces cerevisiae* versus *Pichia pastoris* (review). **Methods Mol Biol**. 866:11-23. 2012
- DUNG-FANG, L. et al. A Baculovirus Superinfection System: Efficient Vehicle for Gene Transfer into *Drosophila* S2 Cells. **J Virol**. Dec; 74(24): 11873–11880. 2000.
- FERREIRA, D. F. et al. Weak bases affect late stages of Mayaro virus replicate cycle in vertebrate cells. **J. Med. Microbiol**. 49: 313-318. 2000.
- FERREIRA-DE-LIMA, V. H. LIMA-CAMARA, T. N. Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: a systematic review. **Parasites & Vectors**. 11:77. doi:10.1186/s13071-018-2643-9. 2018

- FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. Arboviroses emergentes no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira e Medicina Tropical**. 40(2):224-229. 2007.
- GOMEZ-SEBASTIAN, S.; LOPEZ-VIDAL, J.; ESCRIBANO, J. M. Significant Productivity Improvement of the Baculovirus Expression Vector System by Engineering a Novel Expression Cassette. **PLoS ONE** 9(5): e96562. doi:10.1371/journal.pone.0096562. 2014.
- GRGACIC, E. V.; ANDERSON, D. A. Virus-like particles: passport to immune recognition. **Methods**. 40(1):60-5 2006
- HERBST-KRALOVETZ, M.; MASON, H. S.; CHEN Q. Norwalk virus-like particles as vaccines. **Expert Rev Vaccines**. Mar;9(3):299-307. 2010.
- HOLLAND, J. DOMINGO, E. Origin and evolution of viruses. **Virus Genes**. 16(1):13-21. 1998
- HONGLI, J. et al. High-yield production of canine parvovirus virus-like particles in a baculovirus expression system. **Archives of Virology** 161. 705-710. 2015.
- HOPKINS, R. F.; ESPOSITO, D. A rapid method for titrating baculovirus stocks using the Sf-9 Easy Titer cell line. **BioTechniques**. 47:785-788. 2009.
- HORSEFIELD, R. et al. 2008. Highresolution x-ray structure of human aquaporin 5. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 105:13327-13332
- HITCHMAN, R. B. et al. Quantitative real-time PCR for rapid and accurate titration of recombinant baculovirus particles. **Biotechnol. Bioeng.** 96, 810-14. 2007.
- ISHIMARU, D.; MARCICANO, F. G.; REBELLO, M. A. Inhibition of Mayaro virus replication by prostaglandin A1 and B2 in Vero cells. **Braz J Med Biol Res**. 31(9):1119-23. 1998.
- JIANG, B. et al. Synthesis of rotavirus-like particles in insect cells: comparative and quantitative analysis. **Biotechnol Bioeng.** 5;60(3):369-74. 1998
- JOSE, J. et al. A Structural and Functional Perspective of Alphavirus Replication and Assembly. **Future microbiology** 4: 837–856. PMC. 2009.
- KIM, H. J. Yeast as an expression system for producing virus-like particles: what factors do we need to consider? **Letter in applied microbiology**. Vol. 64; 2:111-123. 2016.
- KIMBERLY, L. et al. Baculovirus DNA Replication-Specific Expression Factors Trigger Apoptosis and Shutoff of Host Protein Synthesis during Infection. **J Virol**. 83(21): 11123–11132. 2009.
- KOST, T. A.; CONDREAY, J. P.; JARVIS, D. L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. **Nat Biotechnol**. 23(5):567-75. 2005.

- KOTSAKIOZI, P. et al. Tracking the return of *Aedes aegypti* to Brazil, the major vector of the dengue, chikungunya and Zika viruses. **PLoS Negl Trop Dis**. Jul 25;11(7). 2017.
- KUSHNIR, N.; STREATFIELD, S. J.; YUSIBOV, V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. **Vaccine**. 31(1):58-83. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.10.083. 2012.
- LAVERGNE, A. et al. Mayaro virus: complete nucleotide sequence and phylogenetic relationships with other alphaviruses. **Virus Research**. 117: 283–290. 2006.
- LEDNICKY, J.; DE ROCHARS, V.; ELBADRY, M. et al. Mayaro Virus in Child with Acute Febrile Illness, Haiti, 2015. **Emerging Infectious Diseases**. 22(11):2000-2002. doi:10.3201/eid2211.161015. 2016
- LEUNG, J. Y. S.; MARY MAH-LEE, N.; CHU, J. J. H. Replication of Alphaviruses: A Review on the Entry Process of Alphaviruses into Cells. **Adv Virol**. 2011; 2011: 249640.
- LOGEZ, C.; WAGNER, R. et al. Preparation of *Pichia pastoris* expression plasmids. **Methods Mol Biol**. 866:25-40. doi: 10.1007/978-1-61779-770-5_3. 2012.
- LONG, K. C. et al. Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. **Am J Trop Med Hyg**. 85(4):750-7. 2011.
- LOOSER, V. et al. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. **Biotechnology Advances**. 33 ; 1177–1193. 2015.
- LÓPEZ-VIDAL, J. et al. Improved Production Efficiency of Virus-Like Particles by the Baculovirus Expression Vector System. **PLoS ONE** 10(10): e0140039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140039>. 2015.
- LI, S. F. et al. Genetic modification of baculovirus expression vectors. **Virol Sin**. 27(2):71-82. 2012.
- LUCKOW, V. A., LEE, C. S., BARRY, G. F., OLINS, P. O. Efficient Generation of Infectious Recombinant Baculoviruses by Site-Specific Transposon-Mediated Insertion of Foreign Genes into a Baculovirus Genome Propagated in *Escherichia coli*. **J. Virol**. 67:4566-4579. 1993.
- LÜNSDORF, H. et al. Virus-like particle production with yeast: ultrastructural and immunocytochemical insights into *Pichia pastoris* producing high levels of the Hepatitis B surface antigen. **Microbial Cell Factories**. 10:48. 2011.
- MANI, S. et al. *Pichia pastoris*-Expressed Dengue 2 Envelope Forms Virus-Like Particles without Pre-Membrane Protein and Induces High Titer Neutralizing Antibodies. **PLoS ONE** 8(5): e64595. 2013.
- MARANGA, L.; BRAZÃO, T. F.; CARRONDO, M. J.; Virus-like particle production at low multiplicities of infection with the baculovirus insect cell system. **Biotechnol Bioeng**. 20;84(2):245-53. 2003

- MARTELLI, C. M. T. et al. Economic Impact of Dengue: Multicenter Study across Four Brazilian Regions. **PLoS Negl Trop Dis** 9(9): e0004042. doi:10.1371/journal.pntd.0004042. 2015.
- MARTINEZ-MOLINA. et al. Structural basis for synthesis of inflammatory mediators by human leukotriene C4 synthase. **Nature**. 448:613-617. 2007.
- MCGREW, J. T. et al. Expression of trimeric CD40 ligand in *Pichia pastoris*: use of a rapid method to detect high-level expressing transformants. **Gene**. 18;187(2):193-200. 1997
- METZ, S. W.; PILJMAN, G. P. Arbovirus vaccine: opportunities for the baculovirus-insect cell expression system. **Journal of Invertebrate Pathology**. 107. S16–S30. 2011.
- METZ, S. W. et al. Effective Chikungunya Virus-like Particle Vaccine Produced in Insect Cells. **PLoS Negl Trop Dis** 7(3). 2013.
- MICHEL, M. L.; TIOLLAIS, P. Hepatitis B vaccines: protective efficacy and therapeutic potential. **Pathol. Biol.** 58(4), 288–295. 2010
- MILLER, L. K. Baculoviruses: high-level expression in insect cells. **Curr Opin Genet Dev**. 3(1):97-101. 1993.
- MORRIS, T. D.; MILLER, L. K. Promoter influence on baculovirus-mediated gene expression in permissive and nonpermissive insect cell lines. **J Virol**. 66:7397–7405. 1992.
- MUÑOZ, M., NAVARRO, J.C. Virus Mayaro: un arbovirus reemergente en Venezuela y Latinoamérica”. **Biomédica**. 32: 286-302. 2012.
- NORANATE, N. et al. Characterization of Chikungunya Virus-Like Particles. **PLoS ONE** 9(9): e108169. doi:10.1371/journal.pone.0108169. 2014.
- OGUNJIMI, A. A. et al. High-level secretory expression of immunologically active intact antibody from the yeast *Pichia pastoris*. **Biotechnol Lett**. 21:561–567. 1999
- O'REILLY, D. R., MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual. **Oxford University Press**, New York. 1994.
- PIJLMAN, G. P. Enveloped virus-like particles as vaccines against pathogenic arboviruses. **Biotechnology Journal**, 10: 659-670. doi:10.1002/biot.201400427. 2015
- PILLAY, S. et al. Optimization of chimeric HIV-1 virus-like particle production in a baculovirus-insect cell expression system. **Biotechnol. Prog.** 25(4), 1153–1160. 2009.
- PINHEIRO, F. P.; LEDUC, J. W. Mayaro virus disease. In: Monath TP, ed. The arboviruses: epidemiology and ecology, Vol. 3. Boca Raton, Florida: 23. **CRC Press**, 1998:137–50.
- TESH, R. B. Mayaro Virus Disease: An Emerging Mosquito-Borne Zoonosis in Tropical South America. **Clinical Infectious Diseases**, Vol. 28 1:1 Pages 67–73. 1999

- ROBINSON, D. M. et al. Inactivated Mayaro vaccine produced in human diploid cell cultures. *Military Medicine*. Vol.141 No.3 pp.163-166. 1976
- ROHRMANN, G. F. Baculovirus structural proteins. **J Gen Virol**. 73 (Pt 4):749-61.1992
- ROHRMANN, G. F. **Baculovirus Molecular Biology**. In: 3rd edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); Chapter 7, Baculovirus infection: The cell cycle and apoptosis. 2013.
- ROLDÃO, A. et al. Virus-like particles in vaccine development, **Expert Review of Vaccines**, 9:10, 1149-1176, DOI: 10.1586/erv.10.115. 2010.
- RUST, R. S. Human arboviral encephalitis. **Semin Pediatr Neurol**. 19(3):130-51. 2012
- RYCHLOWSKA, M. et al. Application of baculovirus-insect cell expression system for human therapy. **Curr Pharm Biotechnol**. 12(11):1840-9. 2011.
- SARASWAT, S. et al. “Expression and Characterization of Yeast Derived Chikungunya Virus Like Particles (CHIK-VLPs) and Its Evaluation as a Potential Vaccine Candidate.” Ed. Scott C. Weaver. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10.7. e0004782. PMC. 2016.
- SCHWARTZ, O.; MATTHEW, L. Biology and pathogenesis of chikungunya vírus. **Nature Reviews Microbiology**. Vol 8, 491–500. (2010)
- SERRA, O. P. et al. Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 111(1): 20-29. 2016
- SCHILLER, J. T. et al. An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. **Vaccine** 26 (Suppl. 10) K53–K61. 2008
- SCORER, C. A. et al. Rapid Selection Using G418 of High Copy Number Transformants of *Pichia pastoris* for High-level Foreign Gene Expression. **Bio/Technology** 12: 181-184. (1994)
- SHIMAMURA, T. et al. Structure of the human histamine H1 receptor. **Nature**. 475:65-70. 2012
- SINGH S. et al. Screening for high-yielding *Pichia pastoris* clones: the production of G protein-coupled receptors as a case study. **Methods Mol Biol**. 866:65-73. doi: 10.1007/978-1-61779-770-5_7. 2012.
- SIVAKUMAR, S. et al. Baculovirus-expressed virus-like particles of Pea enation mosaic virus vary in size and encapsidate baculovirus mRNAs. **Virus Res**. 139(1):54-63. 2009
- STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiol Rev**. 58(3):491-562. 1994.

- STROBEL, B. et al. Comparative Analysis of Cesium Chloride- and Iodixanol-Based Purification of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors for Preclinical Applications. **Hum Gene Ther Methods**. 26(4): 147–157. 2015
- SUGRUE, R. J. et al. Expression of the dengue virus structural proteins in *Pichia pastoris* leads to the generation of virus-like particles. **Journal of General Virology**. 78, 1861–1866. 1997.
- SUN, Y.; CARRION, R.; YE, L. et al. Protection against lethal challenge by Ebola virus-like particles produced in insect cells. **Virology**. 383(1), 12–21. 2009.
- SZEWCZYK, B. et al. Baculoviruses re-emerging biopesticides. **Biotechnol Adv**. 24(2):143-60. 2006
- TEH, S. H.; FONG, M. Y.; MOHAMED, Z. Expression and analysis of the glycosylation properties of recombinant human erythropoietin expressed in *Pichia pastoris*. **Genet Mol Biol**. 2011 Jul-Sep; 34(3): 464–470.
- TOHIDI, F. et al. Construction and Production of HIV-VLP Harboring MPER-V3 for Potential Vaccine Study. **Curr HIV Res**. 15(6):434-439. 2017.
- TERPE, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical Fundamentals to commercial systems. **Appl Microbiol Biotechnol** 60:523–533. 2003.
- TESH, R. B.; WATTS, T. M.; RUSSELL, K. L et al. Mayaro virus disease: an emergence mosquito borne zoonosis in tropical South America. **Clin Infect Dis**. 28:67-73. 1999.
- TOFT, L. et al. Comparison of the immunogenicity of Cervarix® and Gardasil® human papillomavirus vaccines for oncogenic non-vaccine serotypes HPV-31, HPV-33, and HPV-45 in HIV-infected adults. **Hum Vaccin Immunother**. 10(5): 1147–1154. 2014
- TOMÉ-AMAT, et al. Secreted production of assembled Norovirus virus-like particles from *Pichia pastoris*. **MICROBIAL CELL FACTORIES**. 13:134. 2014. 2014
- URAKAMI, A. et al. Envelope-Modified Tetravalent Dengue Virus-Like-Particle Vaccine Has Implications for Flavivirus Vaccine Design. **J Virol**. Nov 14;91(23). 2017.
- USTUN-AYTEKIN, O. et al. Monitoring of the effects of transfection with baculovirus on Sf9 cell line and expression of human dipeptidyl peptidase IV. **Cytotechnology**. 66:159–168 DOI 10.1007/s10616-013-9549-3. 2014.
- VALENTINE, G. et al. Zika virus epidemic: an update. **Expert. Review of Anti-infective Therapy**. V. 14. Issue: 12. 2016
- VAN OERS, M. M. et al. Effect of baculovirus infection on the mRNA and protein levels of the *Spodoptera frugiperda* eukaryotic initiation factor 4E. **Insect Mol Biol**. 10(3):255-64. 2001

WAGNER, J. M. et al. Enhanced Production of Chikungunya Virus-Like Particles Using a High-pH Adapted *Spodoptera frugiperda* Insect Cell Line. **PLoS ONE**. 9(4): e94401. 2014.

WEAVER, S. C. et al. Alphaviruses: Population genetics and determinants of emergence. **Antiviral Res.** Jun; 94(3): 242–25. 2012

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Res.** 85(2):328-45. 2010.

WEAVER, S. C. Vector Biology in Viral Pathogenesis. In: Nathanson, N., editor. **Viral Pathogenesis**. Lippincott-Raven; New York: p. 329-352. 1997.

WEISE, W. J. et al. A Novel Live-Attenuated Vaccine Candidate for Mayaro Fever. **PLoS Negl Trop Dis** 8(8): e2969. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002969>. 2014.

WILDE, M. et al. *Tnao38*, high five and *Sf9*—evaluation of host–virus interactions in three different insect cell lines: baculovirus production and recombinant protein expression. **Biotechnology Letters**. Volume 36, Issue 4, pp 743–749. 2014.

WONG, K. T. et al. Low multiplicity infection of insect cells with a recombinant baculovirus: The cell yield concept. **Biotechnol Bioeng.** 49: 659-666. 1996.

YOKOYAMA, W. M. Production of Monoclonal Antibody Supernatant and Ascites Fluid. **Current Protocols in Molecular Biology**. Vol. 18. Issue 1. Pag.11.10.1-11.10.10, 2008

ZHANG, Y. L. et al. Functional expression, purification, and characterization of human Flt3 ligand in the *Pichia pastoris* system. **Protein Expr Purif.** 42(2) : 246-54. 2005

ZUCHI, N. et al. Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 109(6): 820-823. 2014.

ANEXO

1 Obtenção do baculovírus recombinante Chikungunya (Baculovírus-E-CHIKV)

Em paralelo aos procedimentos realizados com o Bac-E-MAYV, utilizamos também a sequência correspondente aos genes das proteínas estruturais do CHIKV (E-CHIKV), para geração de baculovírus recombinantes (Bac-E-CHIKV), com abordagem semelhante à já descrita anteriormente. Esse trabalho serviu como referência para os nossos experimentos, uma vez que os estudos com o baculovírus expressando proteínas do CHIKV estão melhor padronizados e descritos na literatura.

1.1 Obtenção do pFastBac-E-CHIKV e Bacmídeo recombinante

A sequência das proteínas estruturais do vírus Chikungunya (E-CHIKV) da linhagem 37997 (GenBank: AY726732.1), foi sintetizada pela empresa Genecust, no vetor pUC 57 (pUC-E-CHIKV), na disposição natural (C / E3 / E2 / 6K / E1), com o fragmento de *Kozak* no início. O processo para obtenção do baculovírus-E-CHIKV foi feito também com base no kit Bac-to-Bac, da Thermo Fisher Scientific, conforme já descrito anteriormente para o baculovírus-E-MAYV.

A retirada desta sequência do vetor intermediário (pUC-E-CHIKV) foi feita através de digestão com as enzimas de restrição *SalI* e *BamHI*, que flanqueiam o fragmento, sendo incubadas a 37° C por 2 h. Simultaneamente, o vetor pFastBac foi digerido com as mesmas enzimas e sob as mesmas condições. Um gel de agarose 0,8% foi feito para confirmar a obtenção dos vetores digeridos. O fragmento de interesse (E-CHIKV) e o vetor pFastBac foram purificados do gel de agarose, utilizando o kit Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega), e foram utilizados em um protocolo de ligação utilizando a enzima T4 ligase (Thermo Fisher Scientific). Foi respeitada a proporção de 3:1 do fragmento de interesse para o vetor a ser clonado, sendo utilizados 100 ng do vetor, 231 ng do inserto, 1 uL de enzima T4 ligase (1 U), 4 uL do Buffer T4 e água q.s.p. 20 uL. A reação foi incubada a 4° C O/N e após esse período, a enzima foi inativada por aquecimento a 70° C / 10 min. O plasmídeo foi então transformado por choque térmico em *E. coli* (DH5α), sendo as cepas transformantes selecionadas com ampicilina (100 mg/mL) e cultivadas em um volume de 300 mL de LB

líquido, O/N a 37⁰C, para amplificação e posterior obtenção dos plasmídeos recombinantes através do kit MaxiPrep (Qiagen), conforme instruções do fabricante. Foram realizados quatro ensaios com diferentes enzimas de restrição (*DraI*, *BglII*, *PvuII* e *KpnI*) para confirmação da obtenção do pFastBac-E-CHIKV, com base no padrão de bandas gerados. O plasmídeo foi então utilizado para obtenção do bacmídeo recombinante e posterior transfecção em células Sf-9, conforme já descrito anteriormente para o procedimento com o MAYV.

1.2 Ensaios de infecção e análise de expressão

Foram realizados ensaios de infecção em placa de 6 poços e com cultivo em suspensão, nas mesmas condições utilizadas anteriormente, e as análises de expressão e obtenção das VLPs também foram realizada através de *dot blot*, *western blot*, IFI e microscopia eletrônica.

1.2.1 Imunofluorescência indireta (IFI)

A análise da expressão foi feita inicialmente através de IFI, conforme ensaios de infecção já descritos anteriormente. As células Sf-9 e Hi-5 infectadas com Bac-E-CHIKV foram submetidas a esse protocolo com análise nos tempos de 72 e 96 h pós-infecção, utilizando-se o anticorpo policlonal anti-CHIKV, sendo os resultados apresentados na **Figura 31**.

Figura 31 - IFI com células Sf-9 e Hi-5 infectadas com Bac-E-CHIKV

Células Sf-9 (A) e Hi-5 (B) infectadas com Bac-E-CHIKV com MOI 10, avaliadas nos tempos de 72h e 96h pós-infecção, visualizadas em microscópio de fluorescência com objetivas de 10x.

1.2.2 Dot blot

Amostras coletadas de ensaios em placa com as células Sf-9 e Hi-5 foram submetidas a experimentos de *dot blot*, conforme já descrito. Foram avaliados diferentes tempos de coleta (24, 48, 72, 96, 120 e 144 h) e as análises foram feitas tanto no sobrenadante, quanto no lisado celular, utilizando o anticorpo policlonal anti-CHIKV (**Figura 32**).

Figura 32 - Dot blot de células Sf-9 e Hi-5 em diferentes tempos após infecção com Bac-E-CHIKV

(A) lisado celular e (B) sobrenadante do ensaio de infecção com Bac-E-CHIKV em células Sf-9 e Hi-5, em placas de 6 poços, coletados em diferentes tempos (24, 48, 72, 96, 120 e 144 h); Anticorpo anti-CHIKV policlonal (1:1000).

1.2.3 Western blot

As mesmas amostras avaliadas por *dot blot*, foram utilizadas para experimentos de SDS-PAGE e *Western blot*, utilizando o anticorpo anti-CHIKV policlonal (**Figura 33**).

Figura 33 - Western blot com lisado celular do ensaio de infecção com Bac-E-CHIKV

(A) Sf-9 e (B) Hi-5, em placas de 6 poços, coletados em diferentes tempos após a infecção com L3 Bac-CHIKV (24, 48, 72, 96, 120 e 144 h); Anticorpo anti-CHIKV policlonal (1:1000); 1 – Marcador Pageruler Plus (Thermo Fisher Scientific); 2 – Controle negativo; 3 – 24 h p.i.; 4 – 48 h p.i.; 5 – 72 h p.i.; 6 – 96 h p.i.; 7 – 120 h p.i.; 8 – 144 h.p.i.

1.2.4 Gradiente de iodixanol (Optiprep)

Experimentos com células em suspensão foram realizados apenas com células Sf-9, nas mesmas condições citadas anteriormente. O sobrenadante foi coletado 72 h p.i., sendo clarificado, filtrado, e então submetido a um processo de concentração das VLPs. Para os experimentos com o Bac-E-CHIKV foi utilizado o método de ultracentrifugação com gradiente de iodixanol (Optiprep), da mesma forma já descrita anteriormente. Foram coletadas

frações de 500 uL do gradiente gerado, e as mesmas foram submetidas a análise por *dot blot*, para verificar a presença de VLPs, e posterior análise por microscopia eletrônica. Os resultados do processo de obtenção das VLPs e suas análises estão evidenciados na **Figura 34**.

Figura 34 - Resultados do processo de concentração de VLPs de CHIKV com gradiente de iodixanol em células Sf-9

Bac-E-CHIKV em células Sf-9: (A) Concentração das VLPs por ultracentrifugação com gradiente de iodixanol; (B) Dot Blot das frações obtidas (1-11); (C) SDS-PAGE; (E) Microscopia eletrônica de transmissão da fração selecionada (fração 7).

1.3 Discussão

Os resultados obtidos com o Bac-E-CHIKV foram semelhantes àqueles apresentados quando utilizado o Bac-E-MAYV. Foi evidenciado que no tempo de 72 h pós infecção já seria possível detectar as VLPs em ambas as linhagens. Importante ressaltar, que nos experimentos de *Western blot*, foi possível somente a detecção da proteína C (35 KDa), semelhante a alguns experimentos do Bac-E-MAYV, mas tal fato também não prejudicou a formação da VLP. Os resultados de concentração e caracterização das VLPs foram realizados apenas com a linhagem Sf-9, sendo que foi possível verificar a presença de partículas com tamanhos correspondentes ao que seriam VLPs de CHIKV. O trabalho com o Bac-E-CHIKV foi importante no direcionamento dos experimentos com Bac-E-MAYV, possibilitando mudanças no projeto e adequações, visando a obtenção de VLPs.