JULIANA FONTES BELTRAN PASCHOAL

**EXPRESSÃO GÊNICA EMPREGANDO PSEUDOPARTÍCULAS EM
CÉLULAS DE MAMÍFEROS CULTIVADAS (HEK 293T E HUH 7)
EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA LIVRES DE SORO**

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

São Paulo
2016

JULIANA FONTES BELTRAN PASCHOAL

**EXPRESSÃO GÊNICA EMPREGANDO PSEUDOPARTÍCULAS EM
CÉLULAS DE MAMÍFEROS CULTIVADAS (HEK 293T E HUH 7)
EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA LIVRES DE SORO**

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: Dra. Soraia Attie Calil Jorge

Versão corrigida: A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de teses e Dissertação da USP (BDTD).

São Paulo
2016

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

© reprodução total

Paschoal, Juliana Fontes Beltran.

Expressão gênica empregando pseudopartículas em células de mamíferos (HEK 293T e Huh 7.0) cultivadas em diferentes meios de cultura livres de soro / Juliana Fontes Beltran Paschoal. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Profa. Dra. Soraia Attie Calil Jorge.

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

Versão do título para o inglês: Gene expression using pseudoparticles in cultured mammalian cells (HEK 293T and Huh 7.0) in different serum free medium.

1. Células de mamíferos 2. Adaptação em meios livres de Soro (SFM)
3. Pseudopartículas virais 4. Glicoproteína do vírus rábico I. Jorge, Profa. Dra. Soraia Attie Calil II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB01/2016

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

Candidato(a): Juliana Fontes Beltran Paschoal.

Título da Tese: Expressão gênica empregando pseudopartículas em células de mamíferos (HEK 293T e Huh 7.0) cultivadas em diferentes meios de cultura livres de soro.

Orientador(a): Profa. 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

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

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo da expressão gênica empregando pseudopartículas virais em células de mamíferos (HEK-293T e Huh7) em diferentes meios de cultura livre de soro", **protocolo nº 906/12**, sob a responsabilidade de Soraia Attie Calil Jorge, Carlos Augusto Pereira e Juliana Fontes Beltran Paschoal – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 11/4/12.

We certify that the research entitled "Gene expression studies employing viral pseudo particles in mammalian cells (HEK293T and Hyh 7) in serum free medium", **protocol number 906/12**, under the responsibility of Soraia Attie Calil Jorge, Carlos Augusto Pereira and Juliana Fontes Beltran Paschoal – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research – is in agreement with Brazilian laws for use of experimental animals and the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 4/11/12.

Vigência do Projeto: 06/2012 - 06/2016	Nº de animais/espécie
Laboratório de Imunologia Viral	25 camundongos Balb/c (F)

São Paulo, 18 de abril de 2012

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

A minha querida filha Manuela, meu anjo, minha razão de viver, que pode ver minha incansável busca pela titulação acadêmica, minha fonte de inspiração, doçura e alegria.

AMO-TE!

AGRADECIMENTOS

Esses anos de pesquisa foram marcados de desafios e amadurecimento.

Nesse período, aprendi que uma tese é a extensão da vida do autor.

Dessa forma, para que algo de valor seja produzido, a pessoa deve primeiro criar algo de valor em si mesma, pois “entre as dificuldades se esconde a oportunidade”- palavras de Albert Einstein.

Assim sendo, nenhum ideal é realizado de forma fácil e sem esforço.

Por esse motivo, agradeço a todos aqueles, que contribuíram de forma direta e indireta ao longo do desenvolvimento deste trabalho, que culminaram para o aprendizado e conclusão do doutorado. O meu muito obrigada, por possibilitarem essa experiência única, enriquecedora, gratificante e de grande importância para meu crescimento como profissional e como ser humano.

Gratidão e humildade sempre!

Agradeço a Deus por essa oportunidade e por fazer de mim merecedora de todo conhecimento que me foi dado, sabendo que ainda é o começo de toda uma caminhada longa, mas muito bem amparada sempre. Que assim seja!

Aos meus grandes mestres da vida, que sempre me ajudaram com palavras de incentivo e carinho, sempre me impulsionando a dar o meu melhor e sempre acreditando em mim quando até eu mesma não acreditava mais. Meus pais, Luciane e Altino vocês são o alicerce mais forte da minha existência. Obrigada pela doação e compreensão.

Aos meus irmãos, Joana e Julio Cesar, que mesmo longe, sempre me apoiaram com palavras confortantes e muito carinho. Amo vocês...

A minha doce e querida filha Manuela, que a ela dedico este trabalho e minha vida, sem ela eu não seria nada e nada conseguiria, ela é minha força e inspiração para eu ser uma pessoa melhor todos os dias da minha vida. A você te dou a vida e o mundo, obrigada por existir em minha vida e me ajudar tanto mesmo sem saber. Amo incondicionalmente...

A todos da minha família, tios, tias, primos e principalmente meus avós, Luiza e Caetano, por sempre me darem apoio quando mais precisei, meus sinceros agradecimentos a vocês.

À minha orientadora Dra. Soraia Attie Calil Jorge, devo a você, um agradecimento especial, por aceitar compartilhar comigo esse desafio. Pela indescritível força de sua voz em

meu trabalho, pelo belíssimo exemplo de sabedoria e humildade. Obrigada por acreditar em mim e pela indelével marca que deixou em minha vida acadêmica e pessoal, gratidão eterna.

Ao Dr. Renato Mancini Astray, Dr. Carlos Pereira, aos amigos do Laboratório de Imunologia Viral Flávia, Roselane Paiva, Ana Lia Puglia, Daniella Ventini, Nayara Luiz, Mayra Rocca, Vera Boldorini, Lúcia Gomes, Marcos Lemos, Sandra Patiño, Alexandre Rezende, Polyana Ataliba, Thaissa Bernardino, Julia Ricioli e Silvana Silveira , muito obrigada pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário, pessoas que eu quero muito bem, por ter me incentivado e sempre ter uma conversa de conforto e sabedoria. Obrigada por essa convivência maravilhosa de companheirismo.

Ao meu querido amigo Deny Anderson, por ser um anjo iluminado que chegou para dar mais luz aonde já existia, a única palavra para você é gratidão. Obrigada pelas palavras de conforto e pelo ombro quando precisei.

Ao Instituto Butantan e ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia.

A CAPES e à FAPESP pela bolsa de doutorado e pelos auxílios de projetos de pesquisas, respectivamente.

“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor,
a eletricidade e a energia atômica: a vontade”.

Albert Einstein

RESUMO

PASCHOAL, J. F.B. **Expressão gênica empregando pseudopartículas em células de mamíferos (HEK 293T e Huh 7.0) cultivadas em diferentes meios de cultura livres de soro.** 2016. 114 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O soro fetal bovino (SFB) é um dos componentes de maior valor agregado ao meio de cultura e pode causar dificuldades no processo de recuperação e purificação de um bioproduto. A adaptação de células em meios livres de SFB (*serum free medium*- SFM) e proteínas animais pode permitir a otimização do crescimento celular e expressão de genes heterólogos, facilitando a recuperação de proteínas recombinantes. Assim, estes parâmetros foram avaliados em células de mamíferos cultivadas em quatro SFM (Pro293a, VP-SFM, Hybridoma-SFM e CHO-S-SFM II). Estas células foram analisadas em relação ao seu crescimento, produção/consumo de nutrientes e capacidade de produzir vírus recombinantes e expressar proteína heteróloga, utilizando-se um sistema de expressão de pseudopartículas do vírus da Leucemia Murina (MLV) e da hepatite C (HCV), denominado ppHCV. A adaptação para as duas linhagens celulares (HEK293T e Huh7) foi realizada inicialmente com células que cresceram em 100% DMEM suplementado com 10% de SFB, em seguida, submetidos a uma adaptação sequencial para SFM. Para linhagem HEK 293T conseguimos adaptar em dois SFM: Hybridoma-SFM e CHO-S-SFMII, para linhagem Huh 7.0 houve adaptação nos quatro SFM escolhidos. O consumo de substratos para cada linhagem foi diferente em SFM. Para a produção de partículas virais em células HEK 293T cultivadas em SFM, três vetores (pCMV-Gag/Pol, pCMV-E1/E2 e pCMV-RVGP) foram co-transfectados. As partículas virais obtidas foram quantificadas por qRT-PCR. A cinética de produção de ppHCVs mostrou que o melhor tempo para coleta foi em 48 horas para os três meios avaliados. O método de co-transfecção por lipofectamina produziu mais cópias de vírus em comparação com a eletroporação, sendo que quantificações de $5,30 \times 10^3$ cópias RNA/ μ L foram encontradas para ppHCVs produzidas em células adaptadas no meio Hybridoma-SFM. Estas ppHCVs portando um RNA para expressão da proteína G (RVGP) do vírus rábico foram usadas para infectar células Huh 7,0 adaptadas em SFM. Células infectadas produziram cerca de 10 ng de proteína RVGP/ 10^6 células. Pseudo-partículas produzidas com diferentes concentrações do vetor pCMV- E1/E2, foram avaliadas por qRT-PCR realizada para detectar a entrada e adesão de ppHCV-RVGP, os resultados mostraram que este processo de entrada foi ineficiente. Em conclusão, as células cultivadas em SFM são capaz de crescer de uma maneira semelhante às cultivadas com SFB e também são capazes de produzir ppHCV-RVGP, sendo alternativas promissoras para a produção de proteínas e/ou vírus recombinantes.

Palavras-chave: Células de mamíferos. Adaptação em meios livres de Soro (SFM). Pseudopartículas virais. Glicoproteína do vírus rábico (RVGP).

ABSTRACT

PASCHOAL, J. F.B. **Gene expression using pseudoparticles in cultured mammalian cells (HEK 293T and Huh 7.0) in different serum free medium.** 2016. 114 p. Thesis PhD (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The fetal bovine serum (FBS) is a component of higher value added to the medium, which may cause difficulty in the process of recovery and purification of byproduct. The adaptation to cell culture in the culture medium free of FBS and animal proteins can allow optimization of cell growth and expression of heterologous genes, facilitating recovery of recombinant proteins expressed in these cells. Thus, these parameters were evaluated in mammalian cells grown in four SFM (Pro293a, VP-SFM, Hybridoma-SFM and CHO-S-SFM II). These cells were analyzed for their growth, production / consumption of nutrients and the ability to produce recombinant viruses, and expressing heterologous protein using a pseudoparticles expression system murine leukemia virus (MLV), and Hepatitis C (HCV) called ppHCV. The adjustments to the two cell lines (HEK293T and Huh7) being initially carried out with cells grown in 100% of DMEM plus 10% FBS. These cells undergo a gradual adaptation, by FBS free medium. For HEK 293T line we adapted in two SFM: Hybridoma-SFM and CHO-SFM, for Huh 7.0 line was adapted in four different SFM. The consumption of substrates was different for each line in SFM. For production of viral particles in HEK 293T cells cultured in SFM, the three vectors (pCMV- Gal/Pol, pCM-VE1/E2 pCMV-RVGP) were co-transfected. The viral particles obtained were quantified by qRT-PCR. Kinetics of pseudoparticles production showed that the best collection time was 48 hours for the three tested media. The method of co-transfection with lipofectamine produced more copies of the virus into the cells, $5,30 \times 10^3$ RNA copies/ μL were found to ppHCVs produced in the cells adapted in Hybridoma- SFM. These ppHCVs carrying an RNA for expression of G protein (RVGP) of rabies virus were used to infect Huh 7.0 cells adapted to SFM. Infected cells produce about 10 ng RVGP protein / 10^6 cells. Pseudoparticles produced with different concentrations of the vector pCMV- E1/E2, were evaluated of qRT-PCR conducted to detect the adhesion and entry of ppHCV-RVGP, these results showed that this process was inefficient. In conclusion, the cells cultured in SFM are able to grow in a manner similar to those grown with FBS, and are also capable of producing ppHCV-RVGP, with promising alternatives for the production of proteins and /or recombinant viruses.

Keywords: Mammalian cell culture. Adaptation in serum free media (SFM). Viral Pseudoparticles. Glycoprotein of the rabies virus (RVGP).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Comparação dos protocolos mais usados para adaptação de células para SFM. (BIAGGIO et al., 2015 apud VAN DER VALK et al., 2010).....	26
Figura 2- Vírus da raiva e suas proteínas	35
Figura 3- Representação esquemática do trabalho.	39
Figura 4- Representação esquemática dos três vetores para a produção das ppHCV-RVGP.	40
Figura 5 - Células HEK 293T cultivadas em frasco de cultura T-25cm ² em meio DMEM 10% SFB	60
Figura 6 - Células HEK 293T cultivadas em frasco de cultura T-25 cm ² durante o processo de adaptação na fase de 75% SFM.	60
Figura 7- Células HEK 293T cultivadas em frasco de cultura T-25 cm ² durante o processo de adaptação na fase de 95% SFM.	61
Figura 8 - Células HEK 293T cultivadas em frasco de cultura T-25 cm ² durante o processo de adaptação na fase de 100% SFM.	61
Figura 9 - Células Huh 7.0 cultivadas em frasco de cultura T-25 cm ² durante o processo de adaptação na fase de 75% SFM.	63
Figura 10 - Células Huh 7.0 cultivadas em frasco de cultura T-25 cm ² durante o processo de adaptação na fase de 100% SFM.	63
Figura 11 - Diferença entre Diâmetro e Volume de células HEK 293T (A) e Huh 7.0 (B) em meio livre de soro e em DMEM 10% SFB.....	65
Figura 12 - Células HEK 293T, cultivadas em SFM, Hybridoma-SFM e CHO-S-SFM II. O controle usado foi DMEM + 10%SFB	67
Figura 13- Análise da velocidade máxima de crescimento celular da linhagem HEK 293T nos meios DMEM 10% SFB, CHO-S-SFM II e Hybridoma-SFM.	69
Figura 14 - Consumo e produção de nutrientes de células HEK 293T, cultivadas em SFM: Hybridoma-SFM e CHO-S-SFM II. O controle usado foi DMEM + 10%SFB	71
Figura 15 - Células Huh 7.0, cultivadas em meio SFM: Hybridoma- SFM, CHO-S-SFM II, Pro293a e VP-SFM. O controle usado foi DMEM + 10%SFB.....	72
Figura 16 - Análise da velocidade máxima de crescimento celular da linhagem Huh 7.0 nos meios Hybridoma-SFM, CHO-S-SFMII, Pro293a, VP-SFM e DMEM 10% SFB.....	74

Figura 17 - Consumo e produção de nutrientes em células Huh 7.0 cultivadas em SFM: Híbrido-SFM, CHO-S-SFM II, Pro293a e VP-SFM. O controle usado foi DMEM 10% SFB.....	75
Figura 18 - Gel de agarose 1,5 %. Análise em eletroforese dos fragmentos gerados por PCR convencional das amostras das pseudopartículas virais.	79
Figura 19 - Gel de agarose 0,8% linearização do pTGRVGP	80
Figura 20 - Curva Padrão e Curva de Melting obtidas por qRT-PCR.....	81
Figura 21 - Gel de agarose 1,5 %. Análise em eletroforese dos fragmentos gerados por PCR convencional das amostras de cinética de produção de pseudopartículas virais nos meios DMEM 10% SFB, CHO-S-SFM e Híbrido-SFM em 24, 48, 72 e 96 horas pós-transfecção.	83
Figura 22 - Cinética de produção de partículas virais ppHCV-RVGP. Nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas pós-transfecção.	84
Figura 23 - Expressão da RVGP (ng/10 ⁶ cels) em células Huh 7.0 adaptadas em SFM.	86
Figura 24 - Gel de agarose 1,5 %. Análise em eletroforese dos fragmentos gerados por PCR convencional das amostras das pseudopartículas virais produzidas com concentrações diferentes de glicoproteínas E1E2 nos meios DMEM 10% SFB e Híbrido-SFM.....	89
Figura 25 - Produção de pseudopartículas ppHCV-RVGP com concentrações diferentes do vetor pCMV-E1E2 nos meios Híbrido-SFM e DMEM 10% SFB	90
Figura 26 - Ensaio de detecção da entrada das pseudopartículas ppHCV-RVGP com concentrações diferentes do vetor pCMV-E1E2 nos meios Híbrido-SFM e DMEM 10% SFB	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais componentes do Soro fetal bovino (FRESNEY, 1992).....	22
Tabela 2 - Categorias químicas dos meios de cultura livres de Soro fetal bovino (VAN DER VALKS et al., 2010).....	23
Tabela 3- Suplementos mais utilizados no meio de cultura basal	25
Tabela 4- Meios de cultura livres de SFB usados na adaptação de células HEK 293T e Huh 7.0.	43
Tabela 5- Concentração de Glicose, Lactato, Glutamina e Glutamato nos meios de cultura usados na adaptação.....	43
Tabela 6 - Adaptação sequencial em meios livres de soro fetal bovino utilizado para linhagens HEK 293T e Huh 7.0.....	44
Tabela 7 - Condições para produção de pseudopartículas virais (ppHCV-RVGP) pelo método de Eletroporação.	51
Tabela 8 - Característica do oligonucleotídeo desenhado para Transcrição Reversa.....	52
Tabela 9 - Característica dos oligonucleotídeos desenhados para PCR	53
Tabela 10- Característica dos oligonucleotídeos desenhados para qRT- PCR.....	54
Tabela 11 - Obtenção de células HEK 293T e Huh 7.0 adaptadas ou não ao cultivo em SFM.	64
Tabela 12- Parâmetros cinéticos de HEK 293T em SFM e DMEM 10% SFB	69
Tabela 13 - Parâmetros cinéticos com Huh 7.0 em SFM e com DMEM 10% SFB.....	74
Tabela 14 - Concentração de DNA – Co-transfecção com Lipofectamina.	77
Tabela 15 - Lotes de partículas virais produzidas e os métodos de co-tranfecção.	78
Tabela 16 - Títulos virais determinados por qPCR.....	81
Tabela 17 - Concentração de DNA – Co-transfecção com Lipofectamina	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHK-21	Célula de rim de hamster
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
CHO	Célula de ovário de hamster chinês
CMV	Citomegalovírus
CO ₂	Dióxido de carbono
COS	Célula de fibroblasto derivada de tecido de rim de macaco
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EBNA	Antígeno nuclear do vírus Epstein Barr
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
Fase lag	Fase de adaptação celular
Gag	Proteína de cápside do vírus da leucemia murina
GFP	Proteína verde fluorescente da água viva
HCV	Vírus da hepatite C
HEK293	Células de rim de embrião humano
HEK293-T	Células de rim de embrião humano
Huh 7.0	Células de hepatocarcinoma humano
ITS	Insulina, Transferrina e Selênio
mEq	Miliequivalente; peso molecular em mg, dividido pela valência/ peso atômico
MLV	Vírus da leucemia murina
PBS	Solução tampão salina fosfatada
pCMV	Promotor do citomegalovírus
pH	Potencial de hidrogênio
pL	Picolitros
Pol	Transcriptase e integrase do vírus da leucemia murina
Pps	Pseudopartículas virais
ppHCV	Pseudopartículas do vírus da Hepatite C
RNA	Ácido ribonucleico
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RT	Transcriptase reversa
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

RVGP	Glicoproteína do vírus da raiva
SFB	Soro fetal bovino
SFM	<i>Serum Free Medium</i> – Meio Livre de Soro
SV40	Vírus de Símio 40
T _d	Tempo de duplicação
μ	Velocidade específica de crescimento
μm	Micrometros
μ _{max}	Velocidade Máxima de crescimento
Vero	Célula de rim de macaco verde africano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Soro Fetal Bovino – Vantagens e Desvantagens da sua utilização no meio de cultura ...	21
2.2 Meios Livres de Soro Fetal Bovino	23
2.3 Adaptação de células em SFM	26
2.4 Células de mamíferos HEK 293T e Huh 7.0	27
2.5 Fases de Crescimento Celular - Parâmetros Cinéticos Avaliados na Adaptação Celular	29
2.6 Sistema de Expressão em Células de mamíferos.....	30
2.7 Sistema de expressão utilizando pseudopartículas derivadas de MLV e HCV	31
2.8 A Raiva e o Vírus da Raiva.....	33
2.9 Glicoproteína G do Vírus da Raiva.....	35
2.10 Justificativa.....	36
3 OBJETIVOS.....	38
3.1 Objetivo Geral.....	38
3.2 Objetivos Específicos	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Vetores utilizados para produção das partículas virais (ppHCV-RVGP).....	40
4.2 Introdução do DNA Plasmidial em Bactérias	40
4.3 Transformação bacteriana por choque de temperatura (Heat-shock).....	40
4.4 Extração do DNA Plasmidial	41
4.5 Linhagens Celulares.....	41
4.6 Human Embryonic Kidney (HEK 293T) – Células de rim de embrião Humano.	41
4.6.1 Human Hepatocarcinome (Huh 7.0) – Células de Hepatocarcinoma Humano	42
4.7 Meios de Cultura e Soro Fetal Bovino.....	42
4.8 Manutenção das Linhagens Celulares.....	43
4.9 Adaptação Celular	44
4.9.1 Adaptação Sequencial	44
4.9.2 Adaptação Direta.....	45
4.10 Preservação das células.....	45
4.11 Descongelamento de Células	45
4.12 Ensaio de Crescimento Celular	46

4.13	<i>Análise de Densidade e Viabilidade Celular</i>	46
4.14	<i>Determinação da Fase de Crescimento Exponencial (μ_{Max}) e Tempo de Duplicação (Td) das linhagens HEK 293T e Huh7.0 adaptadas em meio livre de Soro Fetal Bovino e em DMEM 10% SFB</i>	47
4.15	<i>Diferença entre Diâmetro e Volume de células HEK 293T e Huh 7.0 em meios livres de SFB e DMEM 10% SFB</i>	47
4.16	<i>Porcentagem de consumo e produção de metabólitos</i>	48
4.17	<i>Comparação em porcentagem do consumo e produção de metabólitos</i>	48
4.18	<i>Análise de Metabólitos</i>	49
4.19	<i>Ensaio de Morfologia das Células, caracterização quanto a Diâmetro e Volume</i>	49
4.20	<i>Cinética de produção de Pseudopartículas ppHCV-RVGP</i>	50
4.21	<i>Transfecções das células HEK 293T</i>	50
4.21.1	<i>Co-transfecção com agente lipossômico (Lipofectamine 2000)</i>	50
4.21.2	<i>Co- transfecção pelo método de Eletroporação</i>	51
4.22	<i>Extração do RNA Viral, Tratamento com DNase e Transcrição Reversa</i>	52
4.23	<i>Reação de Cadeia da Polimerase (PCR)</i>	53
4.24	<i>Construção da curva padrão da qPCR para titulação da RVGP</i>	53
4.25	<i>Quantificação das pseudopartículas ppHCV-RVGP por q-PCR</i>	54
4.26	<i>Infecção de células Huh 7.0 com volume fixo de 800 μL de pseudopartículas (ppHCV-RVGP) produzidas em meio DMEM 10% SFB e Meios Livres de Soro</i>	55
4.27	<i>Ensaio Imunoenzimático (ELISA), para detecção da expressão da RVGP</i>	56
4.28	<i>Ensaio de Dosagem de entrada das Pseudopartículas (ppHCV-RVGP)</i>	57
5	RESULTADOS	58
5.1	<i>Adaptação aos meios livres de Soro Fetal Bovino e Análise morfológica para linhagem HEK 293T</i>	58
5.1.1	<i>Adaptação aos meios livres de Soro Fetal Bovino para a linhagem Huh 7.0</i>	62
5.1.2	<i>Caracterização as células – Diâmetro e Volume das linhagens HEK 293T e Huh 7.0 adaptadas em SFM e em DMEM 10% SFB</i>	64
5.2	<i>Caracterização das Células Adaptadas – Avaliação dos Parâmetros Cinéticos e Análise de Metabólitos</i>	66
5.2.1	<i>Células HEK 293T</i>	66
5.2.2	<i>Células Huh 7.0</i>	72
5.3	<i>Análise da Expressão Gênica nas Células Cultivadas em SFM</i>	77

5.4	<i>Produção de pseudopartículas (ppHCV-RVGP) em células HEK 293T em SFM e em meio DMEM 10% SFB</i>	77
5.5	<i>Cinética de produção de Pseudopartículas ppHCV-RVGP</i>	82
5.6	<i>Infecção Viral com volume fixo</i>	85
5.7	<i>Produção de Pseudopartículas ppHCV-RVGP com concentrações diferentes de glicoproteínas E1E2 do HCV</i>	87
5.8	<i>Ensaio de Dosagem de entrada das Pseudopartículas (ppHCV-RVGP)</i>	91
6	DISCUSSÃO	93
7	CONCLUSÕES	102
	REFERÊNCIAS*	104

1 INTRODUÇÃO

Em (1976) Hayashi e Sato começaram a buscar alternativas para o soro fetal bovino (SFB) em cultivos celulares. Desde então, uma gama de substitutos tornaram-se comercialmente disponíveis ou ainda estão sob investigação, incluindo substitutos quimicamente definidos, extratos de tecidos, fluido ocular (FILIPIC et al., 2002), frações de leite bovino ou colostro bovino (BELFORD et al., 1995), extratos de plantas (soro vegetal) (PAZOS et al., 2004) e lisados de plaquetas (JOHANSSON et al., 2003).

A busca por alternativas para substituir o SFB tornou-se um dos principais objetivos no campo da cultura de células. Os esforços para desenvolver um substituto são principalmente baseados em duas intenções. Por um lado, a coleta e a produção do SFB são dois fatores eticamente problemáticos, por isso uma substituição é necessária (BRUNNER et al., 2010; JOCHEMS et al., 2002; VAN DER VALK et al., 2004). Por outro lado, os campos de rápida expansão de célula *in vitro*, cultura de tecidos, engenharia biomédica e a terapia celular requerem definidas e seguras condições de cultura celular livre de componentes de origem animal (ATALA, 2007; VAN DER VALK et al., 2010). O grande desafio é encontrar substitutos para todos os fatores de crescimento presentes no soro e adaptar cada linhagem em meios livre de soro.

Assim, o processo de adaptação de células é interessante uma vez que se pode reduzir custos e levar a um escalonamento rápido para obtenção de produtos biotecnológicos. Tipicamente, adaptação livre de soro consiste na substituição de componentes do soro, por nutrientes bem definidos. Os protocolos mais comumente usados para adaptar células para meios livres de soro (SFM) incluem adaptação direta e sequencial (SCHRODER et al., 2004; SINACORE et al., 2000). Após o processo de adaptação é essencial a avaliação do desempenho das linhagens nos diferentes meios de cultura, quantificando os nutrientes remanescentes, como a glicose e a glutamina, os metabólitos formados, como o lactato e amônio, além da concentração do produto de interesse, se for o caso (FRESHNEY, 2005).

Por outro lado, estratégias alternativas de expressão gênica têm surgido, algumas se utilizando de diferentes vírus para a produção de partículas semelhantes às partículas virais (TAN, 2006). Essas pseudopartículas (pps) podem conter elementos estruturais de diferentes vírus (PALUCHA et al., 2005), sendo estas utilizadas para diversas aplicações como vacinas (GALARZA; LATHAM; CUPO, 2005), apresentadora de antígenos (WHITACRE et al., 2009) transportadoras de ácidos nucleicos e biomoléculas (KAWANO; MATSUI; HANDA,

2013; KESWANI; POZDOL; PACK, 2013; LUA et al., 2014; PALUCHA et al., 2005; WEN et al., 2013)

Neste sentido, utilizamos um sistema capaz de produzir pseudopartículas virais portadoras de um RNA em células HEK293T, através da expressão da proteína GAG e POL do vírus da Leucemia Murina (MLV) e E1 e E2 do vírus da Hepatite C (HCV). Estas pseudopartículas, denominadas ppHCVs, incorporam um RNA codificante para a glicoproteína do vírus da Raiva. Esta glicoproteína (RVGP) é capaz de conferir resposta imunológica neutralizante contra uma infecção pelo vírus da raiva, o que a torna interessante como vacina viral. Uma vez obtidas as ppHCV-RVGPs estas podem infectar hepatócitos (células Huh 7.0), expressando a RVGP.

Deste modo, neste trabalho foi estudado o comportamento de células (HEK 293T e Huh 7.0) cultivadas em meios de cultura livres de soro fetal bovino, avaliando o crescimento celular e a presença de metabólitos no meio de cultura. Além disso, foi avaliada a eficiência da produção de proteínas recombinantes expressas nessas células através de um sistema de expressão utilizando pseudopartículas derivadas de MLV e HCV (ppHCV) carreando como gene alvo a RVGP.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Células de mamíferos são cultivadas em meios de cultura suplementados com derivados de origem animal (soro de bezerros, humanos ou de cavalos) de forma a aumentar a viabilidade e produtividade destas células. Estes suplementos são capazes de promover o crescimento e proliferação de células em cultura (GOSPODAROWICZ; ILL, 1980).

Por muito tempo, o soro fetal bovino (SFB) tem sido considerado um suplemento padrão essencial à cultura celular. Por isso é classificado como um suplemento universal, pois permite o crescimento de muitos tipos de células humanas, como também de outros animais, eliminando assim a necessidade de desenvolvimento de formulação de um meio específico para cada tipo de célula (GSTRAUNTHALER, 2003).

2.1 *Soro Fetal Bovino – Vantagens e Desvantagens da sua utilização no meio de cultura*

O uso do soro fetal bovino como suplemento do meio de cultura pode trazer algumas desvantagens, como o custo, pois é um dos componentes de maior valor agregado no meio de cultura podendo atingir valores da ordem de 80% do custo total do meio (AUGUSTO; OLIVEIRA, 2001).

Além disso, é conhecido por ser um suplemento quimicamente mal definido, tendo variações qualitativas e quantitativas que exibem uma possível fonte de contaminação microbiana como fungos, bactérias, vírus, micoplasma e príons, além de trazer dificuldades no processo de recuperação e purificação do bioproduto devido à presença de outras proteínas não interessantes (BRUNNER et al., 2010; GSTRAUNTHALER, 2003; VAN DER VALK et al., 2010).

A encefalopatia espongiforme bovina e a febre aftosa revelaram que o uso de componentes de origem animal como o soro fetal bovino (SFB), preferidos por apresentar menores concentrações de imunoglobulinas e elevadas proporções de fatores de crescimento, poderia causar sérios riscos aos pacientes que usassem produtos contaminados com tais componentes. A partir desses achados, a comunidade científica começou a procurar alternativas visando o desenvolvimento de bioprocessos livres de derivados de origem animal (GRILLBERGER et al., 2009).

No entanto, a retirada do soro em cultura celular não é tão simples, uma vez que esse rico suplemento fornece vários nutrientes necessários a sobrevivência das células como fatores de crescimento, hormônios, aminoácidos, lipídeos, minerais, vitaminas, elementos traço, entre outros, agindo tanto no crescimento celular (fatores de crescimento, hormônios e proteases), quanto na proteção biológica (antitoxina, antioxidante, antiprotease, controle de pH) e mecânica (albumina) (BRUNNER et al., 2010; VAN DER VALK et al., 2010). A Tabela 1 apresenta os principais componentes do soro fetal bovino.

Tabela 1- Principais componentes do Soro fetal bovino (FRESNEY, 1992).

	Concentração média por litro
Na ⁺	137 mEq
K ⁺	11 mEq
Fe ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺	µg a ng
Ca ²⁺	136 mg
Compostos fosfatados inorgânicos	100 mg
Glicose	1250 mg
Nitrogênio (uréia)	160 mg
Proteína total	38 g
Albumina	23 g
Fibronectina	35 mg
Creatinina	31 mg
Hemoglobina	113 mg
Insulina	0,4 µg
TSH (hormônio estimulante da tireóide)	1,2 µg
FSH (hormônio estimulante folicular)	9,5 µg
Hormônio de crescimento bovino	39 µg
Prolactina	17 µg
Colesterol	310 µg
Testosterona	0,4 µg
Progesterona	80 ng
Prostaglandina E	6 µg
Prostaglandina F	12 µg
Vitamina A	90 µg
Vitamina E	1 mg
Endotoxinas	3,35 µg

2.2 Meios Livres de Soro Fetal Bovino

Um maior esforço tem sido feito para substituir meios contendo soro para meios livres de soro (SFM - *serum free media*). Alguns meios apesar de livres de SFB podem ser suplementados com proteínas purificadas, muitas vezes ainda proteínas animais, portanto, estes meios ainda apresentam o risco da presença de contaminantes pelo uso de substâncias de origem animal, o que significa que apenas uma substituição completa dessas substâncias por produtos não derivados de animais leva a um meio relativamente seguro (MERTEN et al., 1994).

Com os progressos na compreensão do metabolismo celular e dos fatores necessários para o crescimento foi possível o desenvolvimento de várias formulações livres de soro (FRESHNEY, 2005). Os meios de cultura livres de SFB podem ser divididos em quatro categorias químicas como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Categorias químicas dos meios de cultura livres de Soro fetal bovino (VAN DER VALKS et al., 2010).

Meios	Especificações
1. Meios livres de soro	Não requerem a suplementação de soro, mas em sua formulação podem conter frações de proteínas (extratos animais e vegetais).
2. Meios livres de proteína	Não contêm proteínas ou frações de alto peso molecular, mas podem conter frações de peptídeos (hidrolisados de proteínas).
3. Meios livres de componentes animais	Não contêm nenhum tipo de derivados de animais, mas não precisam ser quimicamente definidos (extratos de plantas, hidrolisados de fungos e bactérias).
4. Meios quimicamente definidos	Não contêm proteínas hidrolisadas ou qualquer outro aditivo sem composição definida.

No entanto, as informações relacionadas às formulações destes meios são limitadas e alguns dos suplementos utilizados não são classificados como quimicamente definidos, portanto, em alguns casos, para se atender as demandas das agências regulatórias, se faz necessário o desenvolvimento de meios livres de soro quimicamente definidos para cada linhagem celular (GRILLBERGER et al., 2009).

Segundo Brunner (2010), algumas formulações podem ser encontradas em um banco de dados criado especificamente para formulações livre de soro. No entanto, ainda não foi possível desenhar uma única formulação livre de soro que funcione para todas as linhagens (VAN DER VALK et al., 2010). Sendo assim, a escolha de uma formulação isenta de SFB para uma determinada linhagem celular e as condições específicas de cultivo, na maioria das vezes são determinadas ou empiricamente ou através de informações obtidas da literatura (SINACORE; DRAPEAU; ADAMSON, 2000). Para a indústria, o desenvolvimento de meios de cultura *serum-free* se tornou uma estratégia de segredo industrial raramente publicado (FRESHNEY, 2005).

Para formulação de um meio livre de soro o primeiro passo é a escolha do meio basal apropriado e os suplementos a serem usados. Após a adição de componentes à formulação basal é então realizado o monitoramento do comportamento das células nessa formulação. O meio basal ideal para cultivo de células de mamíferos deve prover de sais, elementos traços, carboidratos, vitaminas e aminoácidos. Um exemplo de meio basal amplamente utilizado é o *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (HERNANDEZ; PIERA, 2010).

O meio basal na maioria das vezes deve conter um suplemento essencial conhecido por ITS, composto por insulina (hormônio essencial para a cultura celular), transferrina (proteína responsável por internalizar o íon ferro nas células) e selênio (elemento traço fundamental em selenoproteínas no qual evita estresse oxidativo nas células) (VAN DER VALK et al., 2010). Além do ITS, os suplementos mais utilizados estão listados na Tabela 3.

Apesar de muitas linhagens celulares ainda serem propagadas em meio suplementado com soro, muitas indústrias biotecnológicas vêm adaptando seus cultivos em meio *Serum-free* (SFM). Contudo, existe a necessidade de padronizar o meio de cultura para cada tipo de linhagem celular. Portanto, já existem SFM comerciais para diversas linhagens celulares, principalmente as que são frequentemente empregadas na indústria, como CHO, BHK, células Vero e híbridomas. Para células humanas, uma grande variedade de produtos comerciais foram encontrados apenas para células HEK-293. No entanto, as informações relacionadas às formulações destes meios são limitadas e alguns dos suplementos utilizados não são classificados como quimicamente definidos. Portanto, em alguns casos, para se atender as demandas das agências regulatórias, se faz necessário o desenvolvimento de SFM quimicamente definidos para cada linhagem celular (GRILLBERGER et al., 2009).

Tabela 3- Suplementos mais utilizados no meio de cultura basal (VAN DER VALKS et al., 2010).

Suplementos	Descrição
1. Hormônios (Insulina, Glicocorticóides e Triiodotironina).	Regulam funções como proliferação celular e apoptose.
2. Fatores de crescimento (EGF, ECGF, IGF)	Aumentam a proliferação celular e estimulam funções específicas.
3. Carboidratos (Glucose, Frutose e Galactose)	Substrato para a respiração celular.
4. Glutamina	Precursor essencial para síntese de proteínas e ribonucleotídeos. Também funciona como combustível celular no caso de divisão ou ineficiência no catabolismo da glicose.
5. Aminoácidos: São 13 essenciais (Arg, Cis, Gln, His, Ile, Leu, Lis, Met, Phe, Thr, Trp, Tyr e Val)	Estão presentes nas concentrações de 0.5-4 mM no meio basal (ex: DMEM).
6. Elementos Traços (Fe, Se, Zn, Cu, Co, Cr, I, F, Mn, Mo, V, Ni, Sn)	Importantes para funcionamento de enzimas, proteção contra danos oxidativos, dentre outras funções.
7. Lipídeos (Ácidos Graxos essenciais e Etanolamina)	Reserva de energia, constituintes das membranas celulares e atuam no transporte e sinalização celular.
8. Vitaminas (Colina, Ácido fólico, Nicotinamida, Pantotenato, Piridoxal, Riboflavina e Tiamina) ou ácido retinóico, α -tocoferol e ascorbata também podem ser usadas.	São fornecidas pelos meios basais: Sete compostos que são essenciais para o crescimento e proliferação celular.
9. Agente contra estresse mecânico (Pluronic® F68)	Proveniente de agitação mecânica.
10. Inibidores de Proteases (α_1 -antitripsina)	Finalizam a tripsinização e bloqueiam a ação das peptidases lisossomais, protegendo as células.
11. Hidrolisados de proteínas (Aminoácidos e pequenos peptídeos)	Não são quimicamente definidos e não são essenciais, pois estão presentes no meio basal.
12. Proteínas (Albumina)	Funcionam como carreadores, proteção mecânica, dentre outras funções.

2.3 Adaptação de células em SFM

O cultivo de células de mamíferos requer condições mais rigorosas que as células de microorganismos, como meio de cultura especializado, suprimento correto de oxigênio e CO₂, baixas densidades celulares de inóculo, cuidado com estresse mecânico e infecção por vírus ou micoplasma (BIAGGIO et al., 2015).

Há diversas maneiras de se adaptar células para crescimento em SFM. Normalmente, a cultura é submetida a um processo gradual de redução do soro até as condições livres de SFB serem atingidas. Um aspecto muito importante é que as células devem estar na fase de crescimento exponencial e possuir viabilidade superior a 90%. Encontram-se apresentados na Figura 1 alguns protocolos padronizados para realizar a adaptação para SFM (VAN DER VALK et al., 2010).

Figura 1- Comparação dos protocolos mais usados para adaptação de células para SFM. (BIAGGIO et al., 2015 apud VAN DER VALK et al., 2010)

Os SFM já estão sendo utilizados na produção de anticorpos monoclonais, vacinas e outros produtos biológicos (GERIN et al., 1999; HAYTER et al., 1992; MERTEN et al., 1994; PERRIN et al., 1995) ou ainda cultivos de células com outras finalidades (DENK; WUNDERLICH; KNORR, 1998; RUNGE et al., 2000; SAKODA et al., 1998).

No caso do aspecto científico, a substituição do soro conduziria a uma melhor qualidade e reprodutibilidade dos dados experimentais (BALLS et al., 2006; COECKE et al., 2005; HARTUNG et al., 2002). Além disso, o desenvolvimento dos SFM e de proteína animal são de extrema importância não só para aumentar a segurança dos produtos biológicos produzidos para terapia e vacinação, como também para minimizar as etapas *downstream* de extração e purificação dos produtos, barateando o processo.

As principais dificuldades em adaptar células animais aos SFM se resumem em: diminuição da taxa de crescimento e produtividade ao empregar um meio sem suplementação de soro; aumento da sensibilidade ao estresse em função do cisalhamento; formulação com diferentes composições para diferentes linhagens celulares. Desta forma, a adaptação do crescimento em meio sem soro é lenta e nem todas as células são facilmente adaptáveis (LINK et al., 2004).

2.4 Células de mamíferos HEK 293T e Huh 7.0

A célula HEK 293, é uma linhagem derivada de células embrionárias humanas de rim, transformada com adenovírus tipo 5 humano, foi desenvolvida há 37 anos (GRAHAM et al., 1977), mas apenas nos últimos anos tem sido extensivamente usada, sendo a linhagem humana provavelmente mais utilizada para pesquisas relacionadas a expressão de proteínas recombinantes (ADAM et al., 2008; DUMONT et al., 2012; FISCHER et al., 2012; LOIGNON et al., 2008; SUN et al., 2006; SWIECH et al., 2011; WAJIH; OWEN; WALLIN, 2008). Esta linhagem exibe uma morfologia epitelial e uma das razões para sua larga aplicação é o fato destas células crescerem facilmente em suspensão e em SFM disponíveis comercialmente (DUROCHER; BUTLER, 2009; LIU et al., 2006; MEI et al., 2006; ZHU, 2012).

Uma variante importante desta linhagem celular é a HEK 293T, na qual as células são geneticamente modificadas para conter o gene do antígeno T do vírus SV40 (Símio vírus 40) integrado ao seu genoma. Estas células são muito utilizadas para expressão de proteínas

recombinantes, devido a sua facilidade de transfecção e a capacidade de realizar as modificações pós-traducionais necessárias para geração da proteína de interesse (KIM; OH; LEE, 1997). Porém, não há relatos na literatura de adaptação desta linhagem modificada à SFM. Portanto, a adaptação de células HEK 293T é ainda um desafio já que até diferentes variantes da mesma linhagem necessitam de adaptação especial (VAN DER VALKS et al., 2010).

A linhagem Huh 7.0 (células de hepatocarcinoma humano) foi estabelecida em 1982 (NAKABAYASHI et al., 1982). Milhares de investigações de carcinoma hepatocelular foram realizados empregando esta linhagem celular. O extenso corpo de conhecimento produzido atesta a importância e valor desta linhagem celular *in vitro* para estudar as características de hepatomas e o potencial de compostos naturais e sintéticos para prevenir e eliminar cânceres de fígado (KRELLER et al., 2013).

Estudos mostram que esta linhagem já foi cultivada em meio isento de soro suplementado com ITS (insulina, transferrina e selênio). O crescimento das células foi estabelecido após a redução gradual do nível de SFB e finalmente meio de cultura completamente sem soro (AKAZAWA et al., 2011). Porém, não há relatos na literatura de alterações na morfologia para esta linhagem celular durante o processo de adaptação em SFM.

Contudo, durante o processo de adaptação de células em SFM, podem ocorrer diversas alterações como mudanças na morfologia, redução da viabilidade, aberrações fisiológicas e mudanças no metabolismo, portanto pequenas alterações na morfologia celular não devem ser motivo de preocupação, enquanto o tempo de duplicação e viabilidade permanecerem em bons níveis (VAN DER VALK et al., 2004).

Um fator de grande impacto no cultivo de células animais é a composição do meio de cultura, as necessidades nutricionais podem diferir grandemente de uma linhagem para outra e podem influenciar nas alterações morfológicas durante o processo de adaptação de células. Existem também algumas influências das condições ambientais no cultivo de células animais que devemos sempre levar em conta, pois o sistema de cultura deve fornecer as condições fisiológicas fundamentais como pH, temperatura, osmolalidade, concentração de gases (oxigênio e gás carbônico), natureza do suporte e modo como as células são manipuladas no subcultivo para sobrevivência e proliferação celular (FRESHNEY, 2005).

2.5 *Fases de Crescimento Celular - Parâmetros Cinéticos Avaliados na Adaptação Celular*

Células em diferentes fases do ciclo de crescimento comportam-se diferentemente em relação à proliferação, atividade enzimática, glicólise e respiração, síntese de produtos e muitas outras propriedades (FRESHNEY, 2000).

As células normais em cultura mostram um padrão de atividade proliferativa que reflete a adaptação da cultura, como por exemplo; o condicionamento do ambiente; a disponibilidade de nutrientes e no caso de células aderentes, de superfície livre para adesão, necessária para permitir a produção de novas células (FRESHNEY, 2000).

As fases de crescimento celular em cultura são divididas em quatro fases, sendo elas, fase lag, fase exponencial ou logarítmica (log) de crescimento, fase estacionária ou platô e fase de declínio. A fase lag ocorre logo em seguida à inoculação das células. Nessa fase, as células não se dividem ou o fazem em baixas taxas específicas, portanto podemos dizer que esta é uma fase de adaptação celular. A fase exponencial (log) é um período de proliferação ativa durante o qual a concentração de células aumenta exponencialmente. Nesta fase, a porcentagem de células em divisão pode ser de 90 a 100%. Sendo assim, as células estão em seu melhor estado fisiológico e, portanto, ideais para o estudo de função celular (FRESHNEY, 2005).

A cinética de proliferação celular durante a fase log é típica de cada linhagem e é durante essa fase que o tempo de duplicação (t_d) e velocidade máxima de crescimento celular (μ_{max}) das células são determinados. Os fatores que influenciam a duração da fase log são a concentração do inóculo, a velocidade de crescimento celular, a disponibilidade de nutrientes e o acúmulo de metabólitos inibitórios. Na fase estacionária, em razão das baixas concentrações de nutrientes e do acúmulo de metabólitos inibitórios, a taxa de crescimento do cultivo é reduzida e em alguns casos a proliferação celular cessa quase por completo. Nessa fase a divisão celular tende a se equilibrar com a morte e a porcentagem de células em divisão é de apenas 0 a 10% da população. Por fim, após a fase estacionária segue o período de declínio na concentração de células, ocasionado pela morte celular não compensada por células em proliferação. A morte celular pode ser desencadeada por dois mecanismos distintos conhecidos: por necrose ou apoptose (FRESHNEY, 2005).

Em células de animais, o carboidrato mais usualmente consumido é a glicose, que é considerado o mais importante para o crescimento celular (BÉDARD; TOM; KAMEN, 1993;

MENDONÇA; PALOMARES; RAMÍREZ, 1999) e que forma lactato como principal metabólito (DREWS et al., 2000). A glutamina consumida pode ser convertida em glutamato e amônio. O glutamato pode estar envolvido no ciclo do ácido tricarboxílico, na gliconeogênese, síntese proteica, entre outros (ALTAMIRANO et al., 2008; ALTAMIRANO et al., 2013). Em geral, as concentrações de glicose e de aminoácidos podem ser fatores limitantes do crescimento celular. A falta destes nutrientes no cultivo pode ocasionar a interrupção do crescimento ou até mesmo a morte celular. Os principais subprodutos do catabolismo, amônio e lactato, por sua vez, podem ser fatores inibidores do crescimento celular.

Assim, é essencial a avaliação do desempenho celular das linhagens nos diferentes meios de cultura e esta é normalmente laboriosa e dispendiosa, pois requer a determinação das concentrações de células totais e viáveis, do tempo e duplicação celular e do período de duração de cada uma das fases de crescimento, além da quantificação de nutrientes remanescentes, como a glicose e a glutamina e de metabólitos formados, como o lactato e amônio, além naturalmente da concentração do produto de interesse (FRESHNEY, 2005).

2.6 *Sistema de Expressão em Células de mamíferos*

O mercado de produção de proteínas pode ser dividido em dois segmentos: proteínas que não são pós-traducionalmente modificadas e as que necessitam de tais modificações (especialmente a N-glicosilação) para terem atividade biológica (WALSH, 2003).

A glicosilação é umas das mais importantes modificações pós-traducionais realizadas pela célula, estando relacionada com o enovelamento da estrutura proteica, reconhecimento de ligantes, sinalização celular, atividade biológica, solubilidade, estabilidade, tempo de meia-vida e capacidade de produzir resposta imunogênica (ALTAMIRANO et al., 2013; BERLEC; STRUKELJ, 2013; DUROCHER; BUTLER, 2009; PICANCO-CASTRO et al., 2013; WALSH, 2010). A maioria das proteínas de interesse apresenta uma ou mais modificações pós-traducionais que influenciam nas suas propriedades bioquímicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas (WALSH, 2010).

Há mais de 25 anos, células de mamíferos estão sendo utilizadas para produção de proteínas recombinantes, sendo responsáveis por 43% das proteínas aprovadas (BERLEC; STRUKELJ, 2013). Dentre as proteínas recombinantes, temos fatores plasmáticos sanguíneos, anticoagulantes, hormônios, fatores de crescimento, vacinas, anticorpos monoclonais entre outros produtos (WALSH, 2003).

Apesar da capacidade de gerar produtos com propriedades terapêuticas aceitáveis, a plataforma de expressão de proteínas recombinantes em células de mamíferos ainda possui algumas limitações. Enquanto que outros sistemas de expressão como, por exemplo, leveduras e bactérias, permitem a produção da proteína-alvo em grandes quantidades em meios de cultura de baixo custo, células de mamíferos necessitam de meios de cultura complexos e de alto custo para a manutenção de seu crescimento e consequente expressão de proteínas (BERLEC; STRUKELJ, 2013; VAN DER VALK et al., 2010; WALSH, 2010)

Além disso, limitações como baixa densidade celular, velocidade específica de crescimento e elevado consumo de fontes de carbono e energia (usualmente glicose e glutamina) gerando altas concentrações de subprodutos tóxicos (geralmente lactato e amônio) acarreta na limitação do tempo de cultura e pode interferir na qualidade da proteína de interesse (ALTAMIRANO et al., 2013; DIETMAIR; NIELSEN; TIMMINS, 2012; SCHRÖDER, 2008; SUNLEY; BUTLER, 2010).

Portanto, para se ter um processo de produção viável economicamente, a manipulação genética da célula deve resultar em uma expressão eficiente da proteína de interesse; o meio de cultura selecionado deve ser capaz de suportar o crescimento da célula e a produção da proteína em altos níveis com o menor custo possível e, finalmente, as etapas de *upstream e downstream* devem ser desenvolvidas de maneira a se obter altos rendimentos do produto, também com custo reduzido (VAN DER VALK et al., 2010; ZHU, 2012).

Neste sentido, o cultivo de células eucariotas como sistemas de expressão gênica são ideais para a obtenção de proteínas ativas e/ou preparação de vacinas que compreendem proteínas complexas com modificações pós-traducionais (YIN et al., 2007). Por outro lado, o cultivo destas linhagens em SFM pode reduzir o custo da produção de uma proteína, uma vez que reduz o risco de contaminação por vírus, micoplasma, príons e facilita as etapas de extração e purificação. Assim, estudos visando a adaptação de células humanas em cultivo livres de SFB e a análise de expressão de genes heterólogos nessas linhagens, possibilitarão a otimização da obtenção de produtos biotecnológicos.

2.7 Sistema de expressão utilizando pseudopartículas derivadas de MLV e HCV

Pseudopartículas são partículas virais recombinantes modificadas capazes de estimular respostas humorais e celulares eficientes (TAN, 2006). As pseudopartículas denominadas (ppHCV) desenvolvidas por Bartosh et al. (2003), foram utilizadas para compreender o

mecanismo de infecção e para mediar a entrada do vírus da Hepatite C (HCV) na célula hospedeira. Uma grande variedade de proteínas têm sido incorporada com sucesso a essas partículas virais, como é o caso das proteínas de membrana E1 e E2 do Flavivírus da Hepatite C (ANDRAWISS et al., 2003; SANDRIN et al., 2004).

Essas glicoproteínas (E1 e E2) apresentam função fundamental em diferentes etapas do ciclo de replicação do vírus, atuando de forma essencial para entrada, ligação ao receptor e fusão com a membrana da célula hospedeira (BARTENSCHLAGER; LOHMANN, 2000; BARTOSCH et al., 2003).

A proteína E1 (30 kDa) apresenta aproximadamente metade do tamanho da E2 (70 kDa), são altamente glicosiladas e embora sua função não esteja clara, muitos estudos tem mostrado que a E1 coopera com a E2 na formação de um complexo funcional de glicoproteínas que é essencial para o processo de invasão viral (GOFFARD; DUBUISSON, 2003; LAVIE; GOFFARD; DUBUISSON, 2007). Estas pseudopartículas contendo as proteínas estruturais E1 e E2 do HCV são, não só, uma importante ferramenta na compreensão do mecanismo de infecção do HCV, como para possível aplicação como vacina. Para montagem da pseudopartícula é utilizado propriedades bem documentadas de retrovírus, tais como a capacidade de incorporar um número de proteínas nas suas superfícies, integrar e expressar genes (NÈGRE et al., 2002) além de ser seguro para trabalhar, devido ao seu genoma deficiente que não pode replicar dentro da célula infectada (RAFIQUE *et al.*, 2014).

Outra vantagem da sua utilização é que a expressão da proteína de cápside GAG do vírus da leucemia murina (MLV) é suficiente para gerar partículas virais.

As primeiras construções de DNA contendo as proteínas GAG/POL retroviral e glicoproteínas E1 e E2 do HCV foram estudadas para codificar uma proteína repórter como a proteína verde fluorescente de água viva (GFP) ou a luciferase. Através da expressão dessas proteínas, a taxa de infecção pode ser verificada através da medição da fluorescência ou luminescência, respectivamente. Estas partículas foram produzidas em linhagem celular de rim embrionário humano (células HEK 293T) por co-transfecção simultânea dos três vetores de expressão (RAFIQUE et al., 2014).

Portanto, dentro da proposta deste trabalho utilizamos também as pseudopartículas de HCV para verificar a capacidade de células cultivadas em SFM produzirem ppHCV, portadoras do gene da glicoproteína do vírus da raiva e em seguida a expressão desta proteína na células também cultivadas em SFM, infectadas com as ppHCV (BARTOSCH; DUBUISSON; COSSET, 2003).

2.8 A Raiva e o Vírus da Raiva

A raiva é um problema de saúde pública desde tempos remotos, a doença é transmitida ao homem pela inoculação do vírus presente na saliva e secreção do animal infectado, principalmente pela mordedura. A raiva é uma grave doença, pois ataca o sistema nervoso central e pode matar as pessoas que não forem tratadas. A doença causa confusão mental, problemas de respiração e ataques epiléticos. Estes sinais podem demorar até oito semanas após o contágio para se manifestar. Nesse ponto, já não há mais possibilidade de cura. A vacina deve ser administrada o mais rápido possível em todas as pessoas que tiveram contato com o animal doente. A mortalidade em pacientes sintomáticos é de quase 100%. No mundo, apenas 3 casos de sobrevivência humana foram registrados na literatura (BABBONI; MODULO, 2011; MORATO; IKUTA; ITO, 2011; NETO; RODRIGUES; CARVALHO, 2014). Aproximadamente, 60.000 pessoas morrem desta doença anualmente, principalmente na África e na Ásia (WHO, 2014).

No Brasil tem-se uma média de contágio de 76% só na região nordeste. Morcegos, cães e gatos são os animais que apresentam maior risco de contrair raiva. Bovinos, suínos, caprinos e equinos apresentam risco médio (SVS/MS, 2012).

Dados epidemiológicos do Brasil mostram que de 1990 até 2001, foram notificados 455 casos de raiva humana, aproximadamente 74% transmitidos por cães e 11% por morcegos. (BRAZUNA; TEIXEIRA; VAN ONSELEN, 2006).

No ano de 2004 houve a inversão do modo de transmissão da raiva, sendo relatados 22 casos transmitidos por morcegos e apenas 5 por cães (DA ROSA et al., 2006; SCHNEIDER et al., 2005). Em 2005, ocorreram 44 casos de raiva humana, sendo o principal agente de transmissão o morcego. Em 2006 e em 2008 foram relatados 2 casos, em cada ano, transmitidos por morcego (CARNEIRO, 2010). Em 2011 foram registrados dois casos de raiva humana no Maranhão e em 2012 já houveram 3 casos registrados no estado do Ceará, Minas Gerais e Mato Grosso (PORTA DA SAÚDE, 2012; SVS/MS, 2012). No ano de 2013 houve casos de raiva humana registrados no Maranhão e no Piauí. Já em 2015 houve 1 caso registrado no Mato Grosso do Sul de raiva humana como agente de transmissão o cão, seguido de morte, este foi o primeiro caso depois de duas décadas, o ultimo caso da doença em Mato Grosso do Sul havia sido registrado em 1994 (G1, 2015).

A vacina utilizada na tentativa de controle da doença tem apresentado uma crescente evolução desde a primeira tentativa feita por Pasteur no ano de 1885, tendo a sua imunogenicidade e segurança como principais aspectos. Ao longo dessa evolução foram desenvolvidas três tipos de vacinas: de primeira geração, segunda e terceira geração.

O pioneiro das três gerações da vacina, Louis Pasteur, em 1885, produziu a vacina a partir de sucessivas passagens do vírus da raiva em cérebro de coelhos (PÉREZ; PAOLAZZI, 1997). Porém, este tipo de vacina causava acidentes neurológicos em virtude da presença de mielina no cérebro de animais adultos (SELLERS, 1947). Em 1955 Fuenzalida e Palácios desenvolveram uma vacina produzida pela propagação do vírus em cérebro de camundongos recém-nascidos, uma vez que o cérebro ainda não apresenta níveis elevados de mielina, o que reduziu o número de reações secundárias. Estas foram denominadas vacinas de primeira geração. As vacinas de segunda geração foram desenvolvidas paralelamente às de primeira geração, estas são produzidas em culturas celulares, como as células Vero, células diploides humanas e células de embrião de galinha. Vacinas de 2^a geração apresentam-se na forma inativada (FRAZATTI-GALLINA et al., 2004), razão pela qual ainda se tem alto risco de apresentar reações adversas no organismo a ser imunizado, além de apresentar um alto risco na etapa de produção, devido a manipulação de grandes quantidades de material infeccioso (COSTA et al., 2000).

Há ainda vacinas de terceira geração, chamadas de vacinas recombinantes, onde se utiliza a informação genética do antígeno responsável pela ativação imunológica do hospedeiro (DINIZ; FERREIRA, 2010). Desta forma, a vacina não é baseada na partícula viral (inativada) e sim em uma proteína recombinante. No caso do vírus da raiva o antígeno responsável é proteína G, a qual é capaz de estimular a resposta imune, (SAKAMOTO et al., 1999) porém, essas são utilizadas somente em animais para vacinação oral da fauna silvestre (FEHLNER-GARDINER et al., 2012; MAINGUY et al., 2013).

O Brasil requer uma demanda grande de vacina antirrábica, devido à grande população humana e animal, principalmente de caninos e bovinos. A produção da vacina encontra-se principalmente em centros de pesquisa como o Instituto Butantan que destina-se a produção da vacina humana e o Instituto de Tecnologia do Paraná que é o maior produtor da vacina para uso veterinário (SWIECH et al., 2008).

Ambos produzem a vacina a partir da cultura de células, sendo para uso humano produzida em células Vero (Rim de macaco verde africano), cultivadas em meio livre de soro

fetal bovino (SFM) no qual reduz riscos de transmissão de zoonoses incluindo príons e para uso veterinário produzida em células BHK-21 (Célula de rim de hamster), mantendo um alto padrão tecnológico de produção (MENDONÇA et al., 1993).

Apesar desse panorama favorável, ainda se utiliza o vírus inativado como vacina. Portanto o advento de novas tecnologias torna necessária a busca de alternativas de produção mais eficientes, seguras e de baixo custo para a vacina antirrábica.

2.9 Glicoproteína G do Vírus da Raiva

A raiva é causada pela infecção do organismo pelo vírus rábico, pertencente à família Rhabdoviridae ao gênero *Lyssavirus*, sua morfologia é baciliforme, semelhante a uma “bala de revólver” com uma extremidade plana e outra arredondada (KAPLAN, 1977; KING et al., 2012). Seu genoma é um filamento único de RNA negativo não segmentado e já foi completamente sequenciado (TORDO et al., 1986, 1988) codifica 5 proteínas: a nucleoproteína (N), a fosfoproteína (P), a proteína de matriz (M), a RNA polimerase RNA-dependente (RdRp) e a glicoproteína (RVGP) (JACKSON, 2013) (Figura 2).

Figura 2- Vírus da raiva e suas proteínas

O genoma de RNA de cadeia negativa, encapsulado dentro da nucleoproteína (amarelo). A polimerase viral (azul) e fosfoproteína (laranja), que formam o núcleo interno ou cápside. A cápside é englobada pela membrana derivada da célula, que está associada com duas proteínas virais adicionais: a proteína de matriz (verde), que funciona como uma ponte entre a cápside e a membrana do vírion, e a única glicoproteína transmembrana, o qual está organizado como um trímero (roxo). Adaptado de SCHNELL et al. (2010).

A glicoproteína do vírus rábico (RVGP) está presente no envelope viral na quantidade aproximada de 1200 moléculas na forma de 400 espículas triméricas (formadas por

monômeros de 65kDa) responsáveis pela adesão do vírus aos receptores da célula hospedeira (GAUDIN et al., 1992). É o elemento responsável pela indução de anticorpos neutralizantes no organismo exposto ao vírus rábico (PERRIN et al., 1985).

A estrutura da glicoproteína é composta por quatro domínios distintos, o domínio peptídeo sinal que está ausente na proteína madura e os outros três, ectodomínio, o domínio transmembrana e o domínio citoplasmático (GAUDIN et al., 1992; GUPTA et al., 2005). O ectodomínio da RVGP demonstrou possuir a maior representação de epítomos para anticorpos neutralizantes (97%), sendo, portanto, o de maior interesse para o estudo do desenvolvimento de resposta imune contra a doença da raiva (BENMANSOUR et al., 1991).

A ligação da glicoproteína G aos receptores é realizada através da ligação hidrofóbica do vírus com a membrana da célula, mediante a interação de um grande número de moléculas de RVGP em um ambiente de pH ácido. A RVGP apresenta três estados conformacionais possíveis e intercambiáveis: um estado inativo necessário para seu transporte pelo complexo de Golgi, um estado nativo hidrofóbico, presente no vírus circulante e um estado ativo presente no pH ligeiramente ácido a que o vírus é exposto logo após a adesão à célula hospedeira e internalização mediada por endocitose, o que leva à fusão do vírus com a membrana do endossomo (GAUDIN et al., 1991, 1999; LENTZ et al., 1982, 1984; MORIMOTO et al., 1998; THOULOZE et al., 1998).

Por causa da sua atividade protetiva, a RVGP tem sido estudada em diferentes sistemas de expressão como bactérias, leveduras, células de inseto, plantas e células de mamíferos.

2.10 Justificativa

Nosso objetivo neste projeto foi adaptar duas linhagens celulares (HEK 293T e Huh 7.0) para meios livres de soro, afim de avaliar a expressão de proteínas heterólogas através de pseudopartículas virais (ppHCV) que em seu genoma carreguem um RNA. O desenvolvimento dos meios livres de SFB e proteína animal é de extrema importância não só para aumentar a segurança dos produtos biológicos produzidos para terapia e vacinação, como também para minimizar as etapas *downstream* de extração e purificação dos produtos, barateando o processo.

Como proteína alvo do estudo, utilizamos a glicoproteína G do vírus da raiva, o principal antígeno capaz de conferir resposta imunológica neutralizante contra uma infecção

pelo vírus da raiva. Sendo assim, a tecnologia de produção de pseudopartículas virais em células HEK 293T em SFM foi estabelecida e a expressão da RVGP em células Huh 7.0 também cultivadas em SFM foi avaliada.

A importância desta abordagem de expressão de um RNA que codifica para uma proteína viral poderá, com base em trabalhos futuros, possibilitar a imunização com uma proteína viral que compõe a partícula viral (proteínas virais estruturais) e que seja capaz de induzir resposta imunológica humoral e, sobretudo, celular, essencial à proteção à infecção natural. Assim, o desenvolvimento de pseudopartículas virais produzidas em meios livres de soro representa um primeiro passo para um estudo futuro de uma abordagem inovadora e tem centralizado atenções dos projetos mais recentes em vacinologia.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho visa estudar o comportamento de células humanas (HEK 293T e Huh 7.0) cultivadas em SFM. Os critérios avaliados em cultivos livres de SFB foram o crescimento e o metabolismo celular e a expressão de proteína recombinante (RVGP).

3.2 Objetivos Específicos

1. Adaptar células de mamíferos (HEK 293T e Huh 7.0) em diferentes SFM.
2. Avaliar a adaptação, o crescimento e a morfologia celular das culturas mantidas nos diferentes meios bem como a concentração de metabólitos, como glicose, glutamina e lactato.
3. Analisar a produção de vírus recombinante (ppHCV- RVGP) em células HEK 293T cultivadas em SFM.
4. Estabelecer método de titulação/quantificação das pseudopartículas produzidas em HEK 293T.
5. Analisar a expressão da proteína recombinante RVGP em células Huh 7.0 infectadas pelas ppHCV-RVGP em SFM.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho adaptamos células HEK 293T e Huh 7.0 nos SFM VP-SFM (Gibco, Grand Island, NY., U.S.A.), CHO-S-SFMII (Gibco, Grand Island, NY., U.S.A.), Pro 293 a (Lonza, Walkersville, MD., U.S.A) e Hybridoma-SFM (Gibco, Grand Island, NY., U.S.A.). Células HEK293T cultivadas nestas diferentes condições foram co-transfectadas com três vetores de expressão independentes codificando para: proteínas GAG e POL do MLV; Glicoproteínas E1 e E2 do HCV e o gene da RVGP afim de produzir pseudopartículas. O sobrenadante da cultura celular contendo as ppHCV-RVGP foram coletados e utilizados para infectar as células Huh 7.0 para avaliar a expressão da proteína recombinante (RVGP). Abaixo apresentamos uma representação esquemática do plano de trabalho seguido neste projeto (Figura 3).

Figura 3- Representação esquemática do trabalho.

4.1 Vetores utilizados para produção das partículas virais (ppHCV-RVGP)

Os vetores pCMV-Gag/Pol, pCMV-E1E2 e pCMV-GFP foram gentilmente cedidos pelo Dr. François-Loïc Cosset INSERM/França. O pCMV-GFP foi utilizado para a construção do pCMV-RVGP em nosso laboratório (Figura 4). Neste vetor o gene de interesse (RVGP) encontra-se sob controle do promotor do citomegalovírus (CMV). Além disso, o pCMV-RVGP possui o fator ψ de encapsidação.

Figura 4- Representação esquemática dos três vetores para a produção das ppHCV-RVGP

pCMV-Gag/Pol contendo os genes para as proteínas gag e pol do MLV; pCMV-RVGP contendo o gene para a glicoproteína do vírus da raiva; pCMV-E1E2 contendo os genes das glicoproteínas E1 e E2 do HCV. As regiões de origem de replicação bacteriana e o gene de resistência à ampicilina não estão representadas nestes plasmídeos, mas ocorrem nos 3 vetores utilizados. Todos os vetores são circulares.

4.2 Introdução do DNA Plasmidial em Bactérias

O protocolo experimental utilizado para transformação de bactéria foi baseado na técnica descrita por HANAHAN (1983).

4.3 Transformação bacteriana por choque de temperatura (Heat-shock)

Alíquotas de *Escherichia coli* DH5 α competentes seguindo a metodologia de SAMBROOK et al., 2001 foram descongeladas e a cada uma delas foram adicionados os vetores pCMV-Gag/Pol ou pCMV-E1E2 ou pCMV-RVGP (100 ng de DNA plasmidial para 30 μ L de bactérias competentes). As misturas foram mantidas por 30 minutos no gelo e em seguida foram mantidas a temperatura de 42 °C por 2 minutos e imediatamente colocadas novamente no gelo por 5 minutos. Foi realizado o plaqueamento de todo o volume de

preparação bacteriana em meio LB-agar com antibiótico (ampicilina) e incubado 20 horas a 37°C.

4.4 *Extração do DNA Plasmidial*

A extração do DNA plasmidial foi feita usando o kit *Maxiprep Plasmid* (Qiagen®, Valencia, CA., U.S.A), que é baseado na técnica de lise alcalina (BIRNBOIM; DOLY, 1979), seguida pela ligação do DNA a uma resina de troca aniônica. O DNA foi eluído dessa coluna com um tampão com alto conteúdo de sal, e depois concentrado e dessalinizado por precipitação com isopropanol. Finalmente, o DNA foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em tampão para DNA (TE: Tris-EDTA). A quantificação foi feita através do equipamento *Qubit® Fluorometer* (Invitrogen™, Carlsbad, CA., U.S.A) e a presença do plasmídeo esperado foi verificada por análise de padrões de restrição e eletroforese em gel de agarose 0,8%.

4.5 *Linhagens Celulares*

Duas linhagens celulares foram utilizadas. Células de rim de embrião Humano (HEK 293T) e células de Hepatocarcinoma Humano (Huh 7.0). Sendo que ambas crescem aderidas ao substrato e são procedentes do banco de células do laboratório de Imunologia Viral – Instituto Butantan.

4.6 *Human Embryonic Kidney (HEK 293T) – Células de rim de embrião Humano.*

As células HEK 293T foram adaptadas em meios livres de SFB, utilizadas para a produção das partículas virais ppHCV-RVGP, através da co-transfecção dos vetores contendo E1E2 do HCV, GAG e POL do MLV e o vetor de expressão RVGP. Como método de introdução dos vetores foi utilizado o agente lipossômico Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA., U.S.A), e a metodologia de eletroporação testando duas condições já padronizadas em nosso laboratório. As partículas virais obtidas foram então utilizadas para infectar culturas de hepatócitos humanos (Huh-7.0).

4.6.1 Human Hepatocarcinome (Huh 7.0) – Células de Hepatocarcinoma Humano

As células de hepatocarcinoma humano (Huh 7.0) foram adaptadas em meios livres de SFB e inicialmente infectadas com um volume fixo de 800 μ L de partículas virais (ppHCV-RVGP). A RVGP expressa foi analisada por ELISA. Posteriormente a padronização da quantificação das ppHCV-RVGP as células foram infectadas com uma proporção 1:10 (número de células: partículas virais (ppHCV-RVGP)).

4.7 Meios de Cultura e Soro Fetal Bovino

O meio de cultura utilizado para a manutenção e o crescimento celular foi inicialmente o DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's Medium*) (Gibco, Grand Island, NY., U.S.A) composto de sais, elementos traços, carboidratos, vitaminas e aminoácidos suplementado com 10% de soro fetal bovino, preparado em água milli-Q, filtrado em membranas de 0,22 μ m (Milipore, Billerica, MA., U.S.A), sendo armazenado à temperatura de 2 a 8 °C. Posteriormente as duas linhagens celulares foram submetidas a um processo de adaptação a diferentes meios livres de SFB disponíveis no mercado. Os meios utilizados estão apresentados na tabela 4.

Os meios livres de soro citados na tabela 4 foram desenvolvidos para uma determinada linhagem celular, sendo que o meio Pro293 a, foi desenvolvido para células HEK 293 (Rim de embrião humano), meio VP-SFM, para células Vero (Rim de Macaco verde africano), COS-7 (Rim de macaco verde Africano, transformadas), MDCK (Rim canino) e BHK-21 (Rim de hamster), o meio Hybridoma-SFM foi desenvolvido para células de hibridoma e o meio CHO-S-SFM II para células CHO (Ovário de hamster chinês) em suspensão. Já na tabela 5, encontram-se as concentrações de nutrientes nos quatro SFM avaliados e no meio DMEM 10% SFB para as duas linhagens celulares.

Tabela 4- Meios de cultura livres de SFB usados na adaptação de células HEK 293T e Huh 7.0.

MEIO DE CULTURA	FABRICANTE	CARACTERISTICAS
Pro293™ a	Lonza, Walkersville, MD., U.S.A.	Livre de soro animal, baixo conteúdo de IH-r (insulina), livre de componentes de origem animal. Sem L-glutamina, com 0.1% Pluronic F-68.
VP-SFM	Gibco, Grand Island, NY., U.S.A.	Livre de soro, ultra-baixa proteína (5 µg/ml). Com EGF e IH-r (Fator de crescimento e insulina, respectivamente). Sem L-glutamina.
Hybridoma-SFM	Gibco, Grand Island, NY., U.S.A.	Livre de soro, baixa proteína (20 µg/mL como insulina e transferrina). Com surfactante e L-glutamina.
CHO-S-SFM II	Gibco, Grand Island, NY., U.S.A.	Livre de soro, baixa proteína (<100 µg/ml). Com L-glutamina.

Tabela 5- Concentração de Glicose, Lactato, Glutamina e Glutamato nos meios de cultura usados na adaptação.

Meio de cultura	Glutamina (g/L)	Glutamato (g/L)	Glicose (g/L)	Lactato (g/L)
DMEM	0,568	0,0181	5,84	0,223
Pro293a	0,000944	0,0801	7,51	0,001
VP	0,00307	0,0123	4,93	0
CHO	0,689	0,0261	4,64	0,001
Hybridoma	0,671	0,0125	4,67	0,001

4.8 Manutenção das Linhagens Celulares

As células HEK 293T e Huh 7.0 foram cultivadas em condições iguais, ambas em frascos T de 25 cm² com volume de trabalho de 4 mL a 37°C em incubadora contendo 5% de CO₂, sendo subcultivadas 2-3 vezes por semana, sendo necessário para linhagem Huh 7.0 lavagens com PBS para retirada do meio e em seguida adição de Tripsina (Tryple™ Express, Gibco, Grand Island, NY., U.S.A.) para o descolamento das células. As células foram diluídas em 1:2 ou 1:3 e o meio de cultura foi ajustado com as quantidades adequadas de meio correspondente à etapa de adaptação. Após a confirmação da adaptação as células foram passadas para frascos T 75 cm² com 12 mL de meio de cultura.

4.9 Adaptação Celular

Neste trabalho foram usadas duas abordagens para adaptar células em SFM:

4.9.1 Adaptação Sequencial

O processo de adaptação das linhagens HEK 293T e Huh 7.0 aos SFM foi feito de forma sequencial diminuindo gradativamente a quantidade de SFB. As células foram cultivadas na mistura de SFM e meio DMEM contendo soro, até que a condição isenta de soro seja completamente alcançada. Para adaptação da linhagem HEK 293T foi necessário realizar uma passagem intermediária de 95% de SFM para que as células pudessem concluir o processo de adaptação. Duas a três passagens na mistura com 10% DMEM+SFB e 90% contendo SFM antes de mudar completamente para meio isento de soro é recomendado por Invitrogen¹, esta metodologia também já foi citada por alguns autores (SINACORE; DRAPEAU; ADAMSON, 2000; VAN DER VALK et al., 2004). O esquema de adaptação está especificado na tabela 6.

Tabela 6 - Adaptação sequencial em meios livres de soro fetal bovino utilizado para linhagens HEK 293T e Huh 7.0.

Passagem 1
DMEM 10% SFB
Passagem 2
75% DMEM 10% SFB+ 25% SFM
Passagem 3
50% DMEM 10% SFB+ 50% SFM
Passagem 4
25% DMEM com SFB+ 75% SFM
Passagem 5
5% DMEM 10% SFB+ 95% SFM
Passagem 6
100% SFM

¹www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/pdf.Par.2474.File.dat/Adaptation_CC_SFM_Y062810_AdatptiOnOfCell.pdf

4.9.2 Adaptação Direta

Alternativamente, células cultivadas em meio DMEM 10% SFB foram passadas diretamente para SFM, como recomendado por Invitrogen¹ e também descrito por Van Der Valk (2004).

4.10 Preservação das células

Um banco de células HEK 293T e Huh 7.0 foi feito para posterior adaptação. Para a linhagem HEK 293T um banco de células adaptadas nos diferentes SFM foi feito na etapa de 75% SFM, 95% SFM e por fim em 100% SFM. Já para a linhagem Huh 7.0 foi feito um banco somente da etapa de 100% em SFM.

Para o congelamento, as células foram retiradas de culturas na fase de crescimento exponencial e centrifugadas a 715 g por 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em meio de congelamento (50% v/v de meio de cultura fresco; 40% v/v de meio condicionado e 10% v/v de DMSO) a uma densidade de $2-3 \times 10^6$ cel/mL. Os tubos foram congelados primeiramente em *ultrafreezer* utilizando um reservatório específico contendo álcool isopropílico que promove uma taxa de congelamento constante de -1°C por minuto. Depois de 16-24 horas foram transferidos e mantidos em nitrogênio líquido a -196°C até uso.

4.11 Descongelamento de Células

Para o descongelamento das células, o tubo de criogenia foi retirado do nitrogênio líquido e após o descongelamento a 37°C , a suspensão de células foi transferida para um tubo Falcon contendo 9 mL de meio de cultura e centrifugada a 869g por 5 minutos. O meio de cultura foi em seguida descartado para remoção do DMSO (dimetilsulfóxido), o *pellet* de células resuspenso em 1 mL de meio de cultura (DMEM 10% SFB ou Meios Livres de Soro) e transferido para uma garrafa de cultura de T 25 cm^2 contendo 3 mL do meio de cultura respectivo. As células foram mantidas em incubadora a 37°C por 24-48 horas e repicadas normalmente após esse período.

4.12 Ensaio de Crescimento Celular

Os ensaios de cinética das células HEK 293 T e Huh 7.0 foram realizados a 37 °C, em placa de cultura de 6 poços, com um volume de trabalho de 2 mL e uma concentração inicial de 2×10^5 cels/mL em duplicata. O crescimento das duas linhagens celulares nos diferentes meios foi acompanhado por 120 horas e amostras foram retiradas diariamente para determinação da concentração celular e para posterior análise de metabólitos.

4.13 Análise de Densidade e Viabilidade Celular

Para a análise de viabilidade e densidade de células foi utilizado o método de exclusão do corante azul de tripan em hemacitômetro (DOYLE; GRIFFITHS, 1998). Foram contados 16 quadrantes (8 quadrantes/câmara). A média e o desvio padrão das medidas de densidade e viabilidade celular foram determinados considerando 4 eventos de contagem, sendo cada evento representado pela contagem de 4 quadrantes.

A densidade celular foi determinada pela contagem em hemacitômetro. Foram retiradas alíquotas de 90 µL do recipiente em questão e, em seguida, foi acrescentado 10µL de uma solução etílica 0,4% (m/v) azul de Tripan preparado previamente.

A densidade celular total é dada pelo somatório do número de células não coradas (viáveis) somado com o número de células coradas (não viáveis), multiplicado pelo fator de diluição e pelo volume de um quadrante da câmara de *Neubauer*, como mostra a seguinte Equação 1.

$$\text{Equação 1: } (n_v + n_c) \times FD \times V_c = X (\text{células} \cdot \text{mL}^{-1})$$

A densidade de células viáveis é dada pelo número de células viáveis, multiplicado pelo fator de diluição e pelo volume de um quadrante da câmara de *Neubauer*, de acordo com a Equação 2.

$$\text{Equação 2: } n_v \times FD \times V_c = X (\text{células} \cdot \text{mL}^{-1})$$

Já a viabilidade celular é dada pela razão entre o número de células viáveis e o número de células total no meio (células viáveis e inviables), multiplicados por 100, como mostrado na Equação 3.

$$\text{Equação 3: } \frac{n_v}{n_v + n_d} \times 100 = \% \text{ de células viáveis}$$

Onde n_v é o número total de células viáveis, n_d é o número total de células mortas, X é a densidade celular, V_c é o volume de um quadrante da câmara de *Neubauer* e FD é o fator de diluição da suspensão de células. O volume de um quadrante da câmara de contagem é de 10^{-4} mL.

4.14 *Determinação da Fase de Crescimento Exponencial (μ_{Max}) e Tempo de Duplicação (T_d) das linhagens HEK 293T e Huh7.0 adaptadas em meio livre de Soro Fetal Bovino e em DMEM 10% SFB*

Para o cálculo de μ_{Max} , partiremos da equação da velocidade específica de crescimento, calculado pela Equação 4.

$$\text{Equação 4: } \mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

O tempo de duplicação ou geração (t_d) é o tempo levado para que uma célula se torna 2, é calculado pela Equação 5.

$$\text{Equação 5: } t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{Max}}$$

Onde t_d é o tempo de duplicação das células, $\ln 2$ é o logaritmo natural, calculado através das concentrações celulares e μ_{Max} que é a velocidade máxima de crescimento celular.

4.15 *Diferença entre Diâmetro e Volume de células HEK 293T e Huh 7.0 em meios livres de SFB e DMEM 10% SFB*

Para sabermos a diferença entre diâmetro e volume usamos a Equação 6.

$$\text{Equação 6: } \frac{a}{b} = c - 1 = d \times 100 = \%$$

Sendo que a e b são os tamanhos comparados, utilizado tanto para diâmetro quanto para volume. Na equação o resultado c pode mostrar quantas vezes o valor a é maior que o valor de b ou vice-versa. Do valor de c subtraímos 1 parte (-1) para ficarmos apenas com a parte correspondente ao aumento ou diminuição que é o valor de d. Com o valor de d, multiplicamos por 100 para termos o valor em porcentagem de diferença de diâmetro e volume das células avaliadas.

4.16 Porcentagem de consumo e produção de metabólitos

A porcentagem de consumo e/ou produção dos metabólitos foi calculado segundo a Equação 7.

$$\text{Equação 7: } Vi \left(\frac{g}{L} \right) = 100\%$$

$$Vf \left(\frac{g}{L} \right) = x$$

$$x - 100\% = \%$$

Este cálculo é realizado por regra de três, onde Vi é o valor inicial em g/L, ou seja, o valor que começou os metabólitos (Glu/Glut/Gli/Lact), este valor é igual a 100%, portanto para avaliar o consumo ou produção utiliza-se o Vf (valor final) em g/L que vai dar o valor de x, deste valor subtrai-se 100%, onde teremos a porcentagem de consumo ou produção de metabólitos.

4.17 Comparação em porcentagem do consumo e produção de metabólitos

$$\text{Equação 8: } Vf \left(\frac{g}{L} \right) \text{ DMEM } 10\% \text{ SFB } = 100\%$$

$$Vf \left(\frac{g}{L} \right) \text{ CHO} = x$$

$$Valor \text{ } x - 100 = \%$$

Segundo a Equação 8. Este cálculo é realizado por regra de três. Neste caso a comparação de consumo e/ou produção é sempre realizada com o Vf (valor final) do controle em g/L (DMEM 10% SFB), sendo equivalente a 100%. E o outro valor de Vf é equivalente ao valor final de consumo ou produção do metabólito a ser analisado, neste exemplo foi o metabólito no meio CHO-S-SFMII, no qual vai nos resultar um valor x, deste valor x subtraímos 100% para termos o valor em porcentagem do consumo/produção dos metabólitos (Glu/Glut/Gli/Lact).

4.18 *Análise de Metabólitos*

Das cinéticas realizadas, foram retiradas diariamente amostras de 100 µL do sobrenadante e armazenado a -20 °C até o momento da análise. Os substratos glicose, glutamina e glutamato e o metabólito lactato do sobrenadante das diferentes culturas foram analisados enzimaticamente no YSI - *Yellow Spring Instruments* modelo 2700 (Biochemical Analyser, Ohio., U.S.A). Neste sistema há dois eletrodos sensíveis a peróxido de hidrogênio, cada um em contato com uma membrana contendo uma ou mais enzimas imobilizadas. O peróxido de hidrogênio é oxidado no ânodo do eletrodo, gerando um sinal amperométrico proporcional à concentração da espécie que está sendo quantificada, glutamina, glutamato, glicose e lactato.

4.19 *Ensaio de Morfologia das Células, caracterização quanto a Diâmetro e Volume*

As duas linhagens de células utilizadas neste estudo, HEK 293T e Huh 7.0, foram submetidas a análise para caracterização quanto a diâmetro e volume para uma possível comparação da morfologia entre os meios de cultura livres de SFB e células em cultura em DMEM 10% SFB. As células em cultura em frascos T25 cm² foram resuspendidas, HEK 293T através de fluxo e refluxo e as Huh 7.0 foram submetidas a tripsinização. Foram retiradas alíquotas para determinar a concentração de células de cada frasco T 25 cm² para cada meio, foram feitos cálculos para aqueles meios onde a concentração celular estava acima de 5x10⁵ cels/mL. Por fim, foram retiradas alíquotas de 480 µL para contagem no *ScepterTM* 2.0 (Milipore, Darmstadt, HE., Alemanha), para isso foi utilizado ponteiros de 40 µm para as células HEK 293T e ponteiros de 60 µm para células Huh 7.0.

4.20 *Cinética de produção de Pseudopartículas ppHCV-RVGP*

Para o ensaio de cinética de produção das pseudopartículas virais, células HEK 293T cultivadas nos diferentes SFM (CHO-S-SFMII e Hybridoma-SFM) e DMEM 10% SFB foram transfectadas. O sobrenadante foi coletado após 24, 48, 72 e 96 horas da transfecção e submetidas à quantificação por qPCR descrito no item 4.27.

4.21 *Transfecções das células HEK 293T*

Para produção das pseudopartículas virais utilizamos dois métodos de co-transfecção. Um com o agente lipossômico, Lipofectamine 2000 e o método de eletroporação, analisando duas condições de otimização já estabelecidas em nosso laboratório (Tabela 7). A eletroporação foi utilizada como um comparativo ao agente lipossômico para posterior utilização do método mais eficiente para produção das pseudopartículas virais ppHCV-RVGP.

Após a produção das pseudopartículas virais (ppHCV-RVGP) produzidas em células HEK 293T adaptadas em meios livres de SFB e em meio DMEM 10% SFB estas foram submetidas à extração, tratamento com DNase, Transcrição Reversa e a quantificação por qPCR.

4.21.1 *Co-transfecção com agente lipossômico (Lipofectamine 2000)*

Para a produção das pseudopartículas, as células HEK 293T foram cultivadas em frascos T75 cm² em meio DMEM 10% SFB ou SFM (Hibridoma-SFM e CHO-S-SFM II), três horas antes de adicionar a solução de transfecção as células que estavam em meio DMEM 10% SFB foram colocadas em DMEM sem SFB.

A solução de transfecção foi feita adicionando a solução A (contendo os três vetores pCMV-Gag/Pol, pCMV-E1E2 e pCMV-RVGP) diluídos no meio de cultura e a solução B (contendo o volume de lipofectamina + meio de cultura). Em 20 minutos, gotejou-se a solução de transfecção sobre as células e então foram mantidas em agitador à 37 °C por 4 horas, ao final adicionou-se 10 mL de SFM para as células adaptadas e para o controle

DMEM 10% SFB. Após 48h de incubação, o sobrenadante contendo as pseudopartículas virais foram coletados, filtrados (filtro 0,45 μm) (Milipore, Carrigtwohill, CO., Ireland) em alíquotas de 5 mL e armazenados a -80°C .

4.21.2 Co- transfecção pelo método de Eletroporação

O método de eletroporação foi realizado segundo Karlsson e Liljestrom (2003), através do equipamento GenePulser II (Biorad, Hercules, CA., U.S.A) com algumas modificações. As células adaptadas aos diferentes SFM e em DMEM 10% de SFB, foram cultivadas em frasco de cultura T 75 cm^2 , o volume de células correspondente a uma concentração de 8×10^6 cells foi resuspendido com o volume final usado para cada cubeta, sendo que para a cubeta em que a distância entre os eletrodos é de 0,2cm foi usado 400 μL e cubeta em que a distância entre os eletrodos é de 0,4cm foi usado 600 μL , isto permite uma distribuição ideal do pulso elétrico nas células HEK 293T afim de garantir uma melhor produção de ppHCV-RVGP. A quantidade de células foi resuspendida no seu volume final e transferido para cubeta de eletroporação contendo as concentrações de DNA citadas na tabela 7. Depois de eletroporadas nas condições citadas na tabela 7, as células foram cultivadas novamente em frascos T 75 cm^2 e foi adicionado SFM ou DMEM 10% SFB completando o volume para 12 mL e incubadas em estufa de CO_2 a 37°C . Após 48 horas as pseudopartículas foram coletadas e filtradas em membranas de 0,45 μm e então congeladas a -80°C .

Tabela 7 - Condições para produção de pseudopartículas virais (ppHCV-RVGP) pelo método de Eletroporação.

Condições	Cubeta (cm)	Resistência (Ω)	Pulsos	Voltagem (V)	Capacitância (μF)
Condição 2	0,2	∞ ohms	2 pulsos	280 V	75 μF
Condição 4	0,4	∞ ohms	2 pulsos	650V	25 μF

4.22 Extração do RNA Viral, Tratamento com DNase e Transcrição Reversa

Para realizar a titulação da ppHCV-RVGP, o RNA viral foi purificado a partir de 140 µL do sobrenadante contendo as pseudopartículas virais juntamente com 5,6 µg de RNA carregador, utilizando o Kit QIAmp Viral RNA (QIAGEN) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. As partículas virais foram lisadas por adição da solução de lise e o RNA viral foi precipitado com etanol. Posteriormente, essa solução foi passada nas colunas de sílica que possuem alta afinidade por ácidos nucleicos. Após lavagem, o RNA foi eluído utilizando 80 µL de água destilada livre de RNase.

Para eliminar possíveis DNAs contaminantes, para cada 40 µL de amostra de RNA extraído foi tratado com 5 µL (1 u/µL) de enzima DNase I (Promega, Madison, WI, U.S.A) durante 30 minutos a 37 °C, em seguida foi adicionado 5 µL de EGTA (*Stop Solution*) e a reação foi incubada a 65 °C por 10 minutos para inativação enzimática em um volume total de 55 µL.

O RNA tratado foi imediatamente submetido a uma reação de transcrição reversa com a enzima M-MLV *Reverse Transcriptase* (Life Technologies). Para isso, primeiramente, 10 µL de RNA tratados com DNase foram incubados a 65 °C durante 5 minutos, juntamente com 1 µM de iniciador anti-senso (RVGPr3) específico (Tabela 8), 0,5 mM de dNTPs e água livre de DNase e RNase. Em seguida, a mistura foi resfriada rapidamente no gelo e adicionado o tampão, DTT 0,1 M e 200 U de M-MLV, em um volume total de 20 µL. A reação foi incubada a 37 °C durante 50 minutos para a síntese do cDNA da RVGP. A reação foi interrompida pela incubação a 70 °C durante 15 minutos. As amostras foram então armazenadas -20 °C até a análise por PCR convencional e qPCR.

Tabela 8 - Característica do oligonucleotídeo desenhado para Transcrição Reversa

<i>Pimers</i>	Nome	Tamanho (Bases)	GC (%)	Tm (°C)	Sequência
3'---5'	RVGPr3	19	63.1	59.9	AGCCGCAAGTCTCACTCCC

4.23 Reação de Cadeia da Polimerase (PCR)

Uma vez obtido o cDNA, as amostras foram amplificadas por PCR convencional, para verificação da eficiência do tratamento com DNase e da síntese do cDNA. Foram utilizados iniciadores específicos (Tabela 9) para a amplificação da região da RVGP, sendo que o fragmento amplificado contém 503 bp. As reações foram realizadas com volume final de 25 µL nas seguintes condições: 5 µL de amostra, para 1 µL de cada iniciador (RVGP5/RVGPr1 a 5 µM), 1 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 1 µL dNTP (10 mM), 2,5 µL de *Buffer* 10x, 0,2 µL de enzima (1 U) e 13,3 µL água. A reação foi realizada no termociclador PTC-200 (MJ Research, St Bruno, Quebec, Canadá) com o seguinte ciclo de amplificação: 94 °C/3 minutos, (94 °C/30s, 53 °C/30s, 72 °C/30s) x 34, 72 °C/10 minutos.

Os fragmentos amplificados puderam ser visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo 7,5 µL de *Sybr Safe* (Invitrogen, Eugene, OR., U.S.A) e revelação em transiluminador (TFX-20M, Life Technologies) sob luz ultravioleta e captura de imagem através de sistema de fotodocumentador com câmera DC290 (Kodak, Rochester, NY., Estados Unidos) e análise com aplicativo *Alpha DigiDoc*.

Somente após a confirmação da remoção do DNA contaminante, o cDNA de cada amostra viral foi submetido a qPCR simultaneamente com os padrões da curva padrão.

Tabela 9 - Característica dos oligonucleotídeos desenhados para PCR.

<i>Pimers</i>	Nome	Tamanho (Bases)	GC (%)	Tm (°C)	Sequência
5'---3'	RVGP5	19	57.8	57.2	AGACAAGCTTGGTCCCTGG
3'---5'	RVGPr1	21	47.6	54.5	TGTAATCGTGGTTAGTGGAGC

4.24 Construção da curva padrão da qPCR para titulação da RVGP

Para realizar a quantificação viral através da qPCR é necessário construir uma curva padrão, para isto foi utilizado o plasmídeo pCMV-RVGP. Uma quantidade de 1000 ng/µl de plasmídeo foi submetida à digestão com a enzima *Age* I para linearização, que foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Posteriormente, foi quantificado através de método

fluorimétrico (*Qubit*), e diluído em tampão (TE DNase, RNase-free), para a obtenção de diversas quantidades de cópias em um mesmo volume de 3 μ L (6×10^7 , 6×10^6 , 6×10^5 , 6×10^4 , 6×10^3 , 6×10^2 e 60 cópias). A curva de quantificação foi testada em quatro repetições, sendo que cada diluição foi analisada em triplicata. Foi utilizado par de iniciadores RVGP9 e RVGPr1, que foram desenhados com o auxílio do programa *Primer Express 3.0* baseados na região da RVGP.

4.25 Quantificação das pseudopartículas ppHCV-RVGP por q-PCR

A quantificação dos vírus foi feita no equipamento *StepOne Real Time PCR System* (Applied Biosystem, Foster City, CA., U.S.A). Para isso, utilizou-se o kit *Power Sybr Green* (Life Technologies) contendo uma mistura de dNTPs, $MgCl_2$, TaqDNA polimerase e reagente intercalante de bases e fluorescente *Sybr Green*, em tampão próprio para uso. A esse mix foi adicionado o par de iniciadores (RVGP9/RVGPr1 a 5 μ M) descritos na Tabela 10 e posteriormente 12 μ L dessa mistura foram distribuídos em cada poço da placa *MicroAmp™* (Applied Biosystems) juntamente com 3 μ L dos padrões ou amostras de cDNA, todos em triplicatas. A placa foi selada e brevemente centrifugada para unir todo volume no fundo do recipiente. A qPCR foi realizada utilizando o seguinte ciclo de amplificação: 95 °C / 10 minutos, 40 x (95 °C /15 s, 53 °C /10 s, 60 °C /15 s, 80/5 s), sendo a leitura da fluorescência realizada à temperatura de 60 °C. Após a amplificação foi efetuada a análise da curva de dissociação (*Melting*) (70 °C a 90 °C) de todas as amostras para verificar a especificidade da reação.

Tabela 10- Característica dos oligonucleotídeos desenhados para qRT- PCR

<i>Pimers</i>	Nome	Tamanho (Bases)	GC (%)	Tm (°C)	Sequência
5'---3'	RVGP9	19	57.8	55.2	CTGACTACCACTGGCTTCG
3'---5'	RVGPr1	21	47.6	54.5	TGTAATCGTGGTTAGTGGAGC

Para determinação do título viral, foram realizados alguns cálculos com base na equação da curva de quantificação. O número de cópias da ppHCV-RVGP foi determinado multiplicando-se o resultado fornecido pela qPCR por um valor obtido com base nas diluições efetuadas, conforme Equação 9:

Equação 9:

$$\text{ppHCV-RVGP} = A \times B / C \times D / E$$

ppHCV-RVGP = número de cópias de pseudopartículas por μL

A= resultado obtido pela qRT-PCR

B= volume total da RT

C= volume da amostra usada na qRT-PCR

D= volume de eluição da coluna de extração

E= volume utilizado após tratamento com DNase para fazer RT

4.26 *Infecção de células Huh 7.0 com volume fixo de 800 μL de pseudopartículas (ppHCV-RVGP) produzidas em meio DMEM 10% SFB e Meios Livres de Soro*

A linhagem celular Huh 7.0 no meio DMEM 10% SFB e nos SFM, Pro293a, VP-SFM, Hybridoma-SFM e CHO-S-SFM II, foram inoculadas em placas de 6 poços, com $2,0 \times 10^5$ cels/mL utilizando volume final de 2 mL, um dia antes da infecção. No dia seguinte, para o processo de infecção, as placas foram primeiramente lavadas com PBS estéril para células em DMEM 10% SFB (1 mL/ poço), para retirar o meio de cultura contendo soro fetal bovino. Após a retirada do PBS, foi adicionado os vírus, (produzidos em células HEK 293T nos meios livres de soro, Hybridoma-SFM e CHO-S-SFM II) na quantidade de 800 μL (este volume fixo foi utilizado pois ainda não tínhamos a quantificação dos lotes virais por qRT-PCR) e então, adicionados meio DMEM sem soro fetal bovino para as células controle (DMEM 10% SFB) e meio livre de SFB para os meios que não contém SFB para completar o volume de 1 mL. A placa foi centrifugada em 400 g por 1 hora e após foram mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO_2 por 3 horas, em seguida foram adicionados 1 mL de meio DMEM 10% SFB e meios livre de soro para as células adaptadas nos meios Pro293a, VP-SFM, Hybridoma-SFM e CHO-S-SFM II.

Após 48 horas, o sobrenadante de cada poço foi coletado e as células descoladas com PBS-EDTA (5 mM) seguindo-se de incubação a 37 °C durante 5 minutos. Após centrifugação (800 g/ 5 minutos), descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi conservado. As amostras foram

armazenadas a -20 °C para posterior avaliação quanto à presença de RVGP, através de ensaio imunoenzimático (ELISA) específico para a RVGP.

4.27 Ensaio Imunoenzimático (ELISA), para detecção da expressão da RVGP

A produção de RVGP foi avaliada pelo método de ELISA utilizando o kit “*Rabies Glycoprotein Enzyme Immunoassay*” (Instituto Pasteur, Paris) segundo padronizações realizadas anteriormente em nosso laboratório (ASTRAY et al., 2008). Nesse imunensaio foi utilizado o anticorpo IgG monoclonal anti-RVGP (D1-25N°I-1805:Imunoglobulina anti-sítio III da glicoproteína rábica) e anticorpos monoclonais conjugados com peroxidase (IgG-D1-Po):Imunoglobulina idêntica à utilizada para a sensibilização das placas, conjugada com peroxidase).

O anticorpo primário anti-RVGP, de sensibilização da placa, foi diluído na proporção de 1:2000 em tampão carbonato e distribuído 200 µL por poço da placa de 96 poços. Em seguida a placa foi selada e incubada 20 horas a 4 °C. Após o descarte do anticorpo de sensibilização, a placa foi bloqueada com 300 µL por poço de solução de bloqueio a temperatura ambiente por 30 minutos.

No momento da análise, as amostras (foi utilizado somente o *pellet* celular, uma vez que as amostras de sobrenadante não mostraram marcação anti-RVGP) foram descongeladas e ressuspensas com 500 µL de tampão T4 (25 mM Tris, 25 mM NaCl e MgCl 5 mM) e misturadas no vórtex por 10 segundos. Em seguida foi adicionado 500 µL de tampão T4 Lise (25 mM Tris, 25 mM NaCl, MgCl 5 mM e Igepal 0,4%) e misturadas no vórtex por 10 segundos e foram mantidas a 4 °C por 1 hora, sendo homogeneizadas a cada 15 minutos. Após a lise as amostras foram centrifugadas a 10.600 g a 4 °C por 10 minutos para retirada dos debris celulares, sendo analisado apenas o sobrenadante obtido após a centrifugação.

A placa sensibilizada foi lavada 5 vezes em tampão PBS-Tween e invertida em papel absorvente. Para o branco foi utilizado o tampão PBS-Tween-BSA. O antígeno de referência diluído em tampão PBS-Tween-BSA foi distribuído na placa em duplicata (200 µL), assim como as amostras previamente preparadas. A placa foi coberta com filme e incubada por 1 hora a 37 °C. Após incubação a placa foi lavada 5 vezes com tampão PBS-Tween e foram adicionados 200 µL por poço do anticorpo marcado com peroxidase diluído em tampão PBS-Tween-BSA. Após 1 hora a 37 °C a placa foi lavada 6 vezes com PBS-Tween. Foi adicionada

então a solução com substrato cromógeno. Após 30 minutos de incubação em ambiente escuro a reação foi bloqueada com 50 µL de solução de bloqueio. A densidade óptica de cada amostra foi analisada no leitor de ELISA (Multiskan EX, MJLabsystems) a 492 nm. A determinação da concentração de RVGP em cada amostra foi realizada com base na comparação das absorbâncias das amostras com a curva padrão.

4.28 *Ensaio de Dosagem de entrada das Pseudopartículas (ppHCV-RVGP)*

Para este ensaio verificamos a capacidade das ppHCV-RVGP infectar a linhagem celular Huh 7.0 adaptada em meio Hybridoma - SFM e DMEM 10% SFB. No dia da infecção, a linhagem celular Huh 7.0 adaptada em meio Hybridoma-SFM e DMEM 10% SFB receberam a proporção 1:10 (número de células: ppHCV-RVGP).

Os poços com o cultivo celular foram lavados com PBS 1 × estéril e em seguida foi adicionado ppHCV-RVGP juntamente com meio DMEM sem SFB e o meio Hybridoma-SFM para completar o volume de 2,5 mL, as placas foram homogeneizadas a cada 15 minutos por 2 horas e mantidas em estufa à 37 °C contendo 5% de CO₂ por 2 horas, em seguida foram adicionados 2 mL de meio DMEM suplementado com soro fetal bovino e Hybridoma- SFM.

A coleta do sobrenadante da infecção foi feito nos tempos de 4, 6, 8, 10, 12, 24 e 48 horas pós-infecção. As alíquotas foram armazenadas -20 °C para posterior análise das ppHCV-RVGP presentes no sobrenadante por qPCR.

5 RESULTADOS

5.1 *Adaptação aos meios livres de Soro Fetal Bovino e Análise morfológica para linhagem HEK 293T*

Para adaptação da linhagem HEK 293T foram avaliados quatro diferentes SFM disponíveis no mercado (Tabela 4 em Material e Métodos).

O processo de adaptação foi iniciado com as linhagens crescendo em DMEM suplementado com 10% SFB, a partir desses cultivos, foi diminuída gradativamente a quantidade de DMEM 10% SFB como citado na tabela 6 em Material e Métodos.

Inicialmente foram realizados quatro inóculos iguais com a proporção de 25:75 (SFM: DMEM+10%SFB) nos quatro meios de cultura avaliados, sendo eles, VP-SFM, Hybridoma-SFM, CHO-S-SFM II e Pro293a. A linhagem HEK 293T demonstrou ser muito mais sensível a retirada do soro no meio de cultura quando comparada a linhagem Huh 7.0, sendo assim foi necessário a padronização do protocolo de adaptação.

Nas primeiras passagens de 25% (25:75 - SFM: DMEM 10%SFB) e 50% (50:50 - SFM: DMEM 10%SFB) conseguiu-se atingir células adaptadas com confluência superiores a 90% nos meios Pro293a, VP-SFM, Hybridoma-SFM e CHO-S-SFM II.

Já na passagem de 75% (75:25 - SFM: DMEM 10%SFB), as células depois do primeiro repique começavam a formar aglomerados e retardar o crescimento (Figura 6), após 3-4 repiques as células já estavam mais adaptadas à diminuição do SFB. Depois de várias tentativas de passar de 75% para 100% SFM resolvemos fazer uma nova passagem, portanto retornamos para 75% (75:25) e então passamos para 95% (95:5 - SFM: DMEM+10%SFB). Desta maneira a mudança não foi tão drástica e os aglomerados foram diminuindo e então às células voltaram a crescer normalmente (Figura 7). Assim, após três repiques as células foram passadas para 100% SFM e finalmente conseguiu-se obter células 100% adaptadas nos meios Hybridoma-SFM e CHO-S-SFM II (Figura 8). Estas células que terminaram o processo de adaptação foram submetidas a pelo menos 10 repiques para verificar se a viabilidade e a confluência celular se mantinham. A partir delas realizamos o congelamento das células. As células cultivadas nos diferentes SFM foram congeladas por 15 a 20 dias em nitrogênio líquido. Após esse período realizou-se com sucesso o descongelamento, sugerindo que apesar das diferentes condições de cultivo, mantiveram-se boas condições de armazenamento.

Após a etapa de 75% livre de SFB, as células HEK 293T nos meios VP-SFM e Pro293a não conseguiam ter um bom crescimento, havia muita dificuldade em obter uma confluência acima de 70%, além de muitas células crescerem em aglomerados após os repiques. Após muita insistência de troca de meio e repiques (3-5) conseguiu-se adaptação em 100% SFM, mas elas não conseguiram seguir com o crescimento, então foi decidido descartar estes meios dos estudos.

O processo de adaptação em SFM gerou pequenas mudanças na morfologia das células em diferentes etapas da adaptação. Quando cultivadas nos meios CHO-S-SFM II, Hybridoma-SFM, VP-SFM e Pro293a na passagem de 75% SFM, as células começaram a manifestar um encolhimento no tamanho e aparência arredondada. Também foi observada uma perda da fixação ao substrato, ficando grumos em suspensão no meio de cultura, estes grumos em suspensão puderam ser capazes de se aderir novamente à superfície da cultura. Depois da adesão foi utilizada a forma de descolamento de células através fluxo e refluxo e então os grumos se separaram, as células individualizadas aderiam novamente, ficando com uma morfologia arredondada, porém semi-aderida (Figura 6).

Na passagem de 95% de SFM (Figura 7) e 100% livre de SFM (Figura 8) as células estavam no processo final da adaptação. Pode ser observado que em 95% de SFM as células já começaram a se isolar dos aglomerados, embora estes ainda se encontravam presentes de forma mínima. O padrão de crescimento e morfologia são similares para os meios CHO-S-SFM II e Hybridoma-SFM já para os meios VP-SFM e Pro293a as células demoram a crescer na fase de 95% e 100%, como mencionado anteriormente. Sendo assim, as células crescendo na etapa de 100% de SFM em sua maioria apresentaram uma morfologia arredondada, porém já sem presença de aglomerados.

Figura 5 - Células HEK 293T cultivadas em frasco de cultura T-25cm² em meio DMEM 10% SFB.

Células HEK 293T cultivadas em DMEM 10% SFB. Aumento de 10x.

Figura 6 - Células HEK 293T cultivadas em frasco de cultura T-25 cm² durante o processo de adaptação na fase de 75% SFM.

Células HEK 293T no processo de adaptação (75% SFM) nos meios (1) CHO-S-SFMII, (2) Hybridoma-SFM, (3) VP-SFM e (4) Pro293a, respectivamente. Aumento de 10x.

Figura 7- Células HEK 293T cultivadas em frasco de cultura T-25 cm² durante o processo de adaptação na fase de 95% SFM.

Células HEK 293T no processo de adaptação (95% SFM) nos meios (1) CHO-S-SFMII, (2) Hybridoma-SFM, (3) VP-SFM e (4) Pro293a, respectivamente. Aumento de 10x.

Figura 8 - Células HEK 293T cultivadas em frasco de cultura T-25 cm² durante o processo de adaptação na fase de 100% SFM.

Células HEK 293T no processo de adaptação (100% SFM) nos meios (1) CHO-S-SFMII, (2) Hybridoma-SFM, (3) VP-SFM e (4) Pro293a, respectivamente. Aumento de 10x.

5.1.1 Adaptação aos meios livres de Soro Fetal Bovino para a linhagem Huh 7.0

Para adaptação desta linhagem foi utilizado o mesmo processo de adaptação sequencial, onde é diminuído gradativamente o soro no meio de cultura (SINACORE; DRAPEAU; ADAMSON, 2000; VAN DER VALK *et al.*, 2004) (Tabela 6) e pode ser notado que esta linhagem também se adapta facilmente a adaptação direta, ou seja, pode-se passar as células em DMEM 10% SFB diretamente para SFM (VAN DER VALK *et al.*, 2004) .

Para adaptação direta as células que estavam em cultura em meio DMEM 10% SFB foram passadas diretamente para os quatro SFM: Pro293a, VP-SFM, Hybridoma-SFM e CHO-S-SFM II. Para passagem direta não foi observado nenhum tipo de dificuldade. As células demoraram de 2-3 dias para ter uma confluência de 90% e após 10 repiques as células estavam devidamente adaptadas.

Para passagem sequencial, foram realizados quatro inóculos iguais com a proporção de 25:75 (SFM: DMEM+10%SFB) para os quatro meios de cultura Pro293a, VP-SFM, Hybridoma-SFM e CHO-S-SFM II.

Para esta linhagem não foi necessário nenhum tipo de padronização do protocolo de adaptação. Nos meios VP-SFM, Hybridoma-SFM e CHO-S-SFM II as células se comportaram de forma semelhante. Nas primeiras passagens 25% e 50% de SFM elas chegaram a atingir mais de 90% de confluência, a partir da passagem de 75% de SFM (Figura 9) as células formavam aglomerados após a troca do meio, porém após 3 repiques na mesma passagem os grumos se soltavam. Pode-se notar que o uso de tripsina faz com que estas células formem grumos, portanto após os repiques tem que se fazer fluxo e refluxo com meio para que estas células se espalhem. Após a certificação de que não havia mais grumos, as células foram passadas para 100% de SFM, todas as condições mostraram uma forma lenta de crescimento nos dois primeiros repiques em 100% de SFM , onde elas demoraram de (3-5) dias para ter uma confluência de $\pm$ 90%, após (3-4) repiques as células aceleraram seu crescimento e atingiram mais de 90% de confluência em 3 dias (Figura 10).

Após o processo de adaptação as células foram submetidas a pelo menos 10 repiques para verificar se a viabilidade e a confluência celular se mantinham. Após realizamos o congelamento das células Huh 7.0 adaptadas em SFM conforme foi descrito para a linhagem HEK 293T em SFM.

No meio Pro293a, as células se comportaram de forma atípica comparada aos outros SFM (Figura 9 e 10), já que em todas as passagens (25%, 50%, 75% e 100% SFM) chegaram a atingir mais de 90% de confluência e células totalmente adaptadas, formava-se grumos no começo, mas após os repiques elas logo se soltavam.

O processo de adaptação das células Huh 7.0 em meios livres de SFB não gerou mudanças morfológicas durante o processo de adaptação. Após a adaptação (Figura 10) as células se mostraram minimamente maiores, porém parecidas com as células cultivadas em meio DMEM 10% SFB, não perdendo sua morfologia de hepatócios (Figura 9), diferentemente das células HEK 293T que em diferentes etapas da adaptação mostraram mudanças na morfologia nos diferentes SFM.

Figura 9 - Células Huh 7.0 cultivadas em frasco de cultura T-25 cm² durante o processo de adaptação na fase de 75% SFM.

(1) Célula Huh 7.0 s cultivada do meio DMEM 10% SFB e células Huh 7.0 no processo de adaptação (75% SFM) nos meios (2) CHO-S-SFMII, (3) Hybridoma-SFM, (4) VP-SFM e (5) Pro293a, respectivamente. Aumento de 10x.

Figura 10 - Células Huh 7.0 cultivadas em frasco de cultura T-25 cm² durante o processo de adaptação na fase de 100% SFM.

Células Huh 7.0 no processo de adaptação (100% SFM) nos meios (1) CHO-S-SFMII, (2) Hybridoma-SFM, (3) VP-SFM (4) Pro293a, respectivamente. Aumento de 10x.

Na Tabela 11 apresenta-se um resumo das adaptações obtidas em ambas as linhagens celulares estudadas.

Tabela 11 - Obtenção de células HEK 293T e Huh 7.0 adaptadas ou não ao cultivo em SFM.

Células	VP-SFM	CHO-SFM	Hybridoma-SFM	Pro293a
HEK 293T	Não	Sim	Sim	Não
Huh 7.0	Sim	Sim	Sim	Sim

5.1.2 Caracterização das células – Diâmetro e Volume das linhagens HEK 293T e Huh 7.0 adaptadas em SFM e em DMEM 10% SFB

A fim de avaliar as mudanças na morfologia das células adaptadas em meios livres de soro para uma possível comparação da morfologia de células em SFM e células em meio DMEM 10% SFB, realizamos ensaios com um contador de células automático chamado

Scepter™ 2.0 (Milipore, Darmstadt, HE., Alemanha), o qual também analisa o diâmetro e o volume das células avaliadas.

Figura 11 - Diferença entre Diâmetro e Volume de células HEK 293T (A) e Huh 7.0 (B) em meio livre de soro e em DMEM 10% SFB.

Na Figura 11 encontram-se os valores de volume e diâmetro das células adaptadas em SFM e em DMEM 10% SFB. Pode ser observado que para a linhagem HEK 293T houve um discreto aumento do diâmetro e do volume das células adaptadas em meio livre de soro Hybridoma-SFM e CHO-S-SFM II. Células em meio Hybridoma-SFM (13,68 μm 1,32 pL) tem maior diâmetro e volume quando comparadas ao meio CHO-S-SFM II (12,90 μm e 1,12 pL), este aumento é cerca de 6% para diâmetro e 17% para volume. Já para as células em meio DMEM

10% SFB (11,94 μm e 0,81pL) comparadas ao meio Hybridoma-SFM a diferença foi de 1,7 μm e 0,4 pL, mostrando que o diâmetro é 14% maior e o volume 48% maior quando comparadas as células em SFB.

Em contrapartida, para linhagem Huh 7.0 pode ser observado que as células em meio livre de SFB Pro293a apresentam maior diâmetro e volume (19,04 μm e 3,61pL), quando comparadas às células cultivadas em meio DMEM 10% SFB (16,02 μm e 2,15pL). A diferença entre diâmetro e volume das células cultivadas em meio Pro293a e DMEM 10% SFB foram de 18% maior para diâmetro e 67% maior para volume. Através destes resultados pode ser confirmado que houve mudanças na morfologia das células quando analisada pelo contador de células *ScepterTM 2.0*.

Para a linhagem HEK 293T adaptadas em meios livres de soro os resultados corroboram com aqueles apresentados após adaptação celular mediante a visualização por microscopia. Assim, através de imagens obtidas após o processo, foi possível observar claramente que houve a perda da morfologia original (morfologia epitelial - células espalhadas), já que na fase de adaptação elas se mostram menores e arredondadas e após continuaram com o aspecto esférico, porém maiores.

Já na linhagem Huh 7.0 adaptadas em SFM, quando vistas por microscópio, não foi possível observar com nitidez a mudança na morfologia durante o processo de adaptação celular, porém após o processo de adaptação foi possível visualizar uma pequena mudança no tamanho das células SFM comparadas às em DMEM 10% SFB. As células se mostram minimamente maiores, porém não perdem sua forma original (Hepatócitos).

Sendo assim, estes ensaios para análise de diâmetro e volume das células em SFM e meio DMEM 10% SFB comprovam que após o processo de adaptação as células tendem a alterar sua morfologia original, porém esses valores de volume e diâmetro podem ser considerados dentro do padrão normal para morfologia das linhagens avaliadas, já que estão muito próximos do controle, DMEM 10% SFB.

5.2 Caracterização das Células Adaptadas – Avaliação dos Parâmetros Cinéticos e Análise de Metabólitos

5.2.1 Células HEK 293T

Após a adaptação das células, estas foram submetidas a diferentes cultivos a fim de avaliar a concentração celular, viabilidade e alguns parâmetros cinéticos como: velocidade máxima de

crescimento celular (μ_{MAX}) e tempo de duplicação das células (t_d) além de medir a concentração de alguns metabólitos importantes no crescimento e manutenção celular como glutamina, glutamato, glicose e concentração do metabólito lactato.

Neste experimento pode-se observar um comportamento distinto entre os meios livre de soro CHO-S-SFMII e Hybridoma-SFM (Figura 12), ambos atingiram concentrações celulares parecidas, porém as células em meio CHO-S-SFM II obtiveram crescimento contínuo e lento e em 96 horas atingiram sua concentração celular máxima de $1,0 \times 10^6$ cel/mL. No meio Hybridoma-SFM as células tiveram um crescimento mais rápido comparado ao meio CHO-S-SFM II, a concentração celular máxima atingida pelas células foi de $1,4 \times 10^6$ cel/mL com 72 horas de cultivo.

Figura 12 - Células HEK 293T, cultivadas em SFM, Hybridoma-SFM e CHO-S-SFM II. O controle usado foi DMEM + 10%SFB.

O experimento foi realizado em duplicata. Linha tracejada indicando a viabilidade celular em porcentagem. Linha contínua indicando a concentração celular por células/mL. A análise da dispersão das amostras foi tratada com Desvio Padrão.

Embora as células em meio Hybridoma-SFM tenham tido um crescimento mais acelerado que o meio CHO-S-SFM II também pode-se notar uma morte mais acentuada em comparação com o outro meio SFM. No meio de cultivo DMEM 10% SFB utilizado como controle para as células adaptadas, pode ser observado uma curva de crescimento celular acentuada até o final do experimento, 120 horas, com concentração celular máxima de $2,6 \times 10^6$ cel/mL.

As viabilidades celulares foram mantidas acima de 90% até 96 horas para o meio CHO-S-SFM II e 80% até 96 horas para o meio Hybridoma-SFM. Apesar de observarmos uma viabilidade acima de 90 % até 120 horas para o meio DMEM 10% SFB, ainda assim podemos concluir que as células HEK 293T têm boas condições de cultivo nos SFM estudados. É interessante notar que a viabilidade diminui rapidamente com 120 horas de cultivo no meio CHO-S-SFM II e após 72 horas para Hybridoma -SFM. As células no meio de cultivo DMEM 10% SFB se mantêm até o final do experimento (120 horas). É importante ressaltar que nos meios VP-SFM e Pro293a as células não conseguiram se manter, portanto estes meios foram excluídos dos experimentos.

Além da viabilidade celular um parâmetro importante de ser analisado é o tempo de duplicação (t_d) das células. Portanto foram calculados a velocidade máxima de crescimento (μ_{Max}) na fase exponencial e o tempo de duplicação t_d em horas das células HEK 293T nos três meios, DMEM 10% SFB, utilizado como controle, CHO-S-SFM II e Hybridoma-SFM (Figura 13).

Os valores de μ_{Max} foram de 0,031 para células em meio Hybridoma-SFM, 0,025 para células em meio DMEM 10% SFB e 0,015 para células em meio CHO-S-SFM II. Para células em meio CHO-S-SFM II e Hybridoma-SFM, o começo da fase de crescimento exponencial foi em 0 horas, ou seja, as células começaram a se dividir no mesmo momento do subcultivo, indicando assim que não houve uma fase de adaptação ao novo substrato como parece acontecer com as células em meio DMEM 10% SFB, onde a fase de crescimento exponencial começa em 24 horas. Assim como para células em meio DMEM 10% SFB a fase de crescimento exponencial acaba em 96 horas também para células em meio CHO-S-SFM II. Já para células em meio Hybridoma-SFM esta fase de crescimento exponencial termina em 48 horas.

O tempo de duplicação (t_d) para as células nos três meios avaliados foram de 22 horas para células no meio Hybridoma-SFM, 27 horas para células no meio DMEM 10% SFB e 45 horas para células no meio CHO-S-SFMII. Apesar do tempo de duplicação 1,6 x maior para células em meio CHO-S-SFM II comparada às células em meio DMEM 10% SFB, obtivemos viabilidade de 90% até às 96 horas de cultivo, o que nos permitiu dar continuidade aos experimentos seguintes. Na Tabela 12 está um resumo dos principais parâmetros cinéticos para linhagem HEK 293T adaptadas em SFM e em meio DMEM 10% SFB.

Figura 13- Análise da velocidade máxima de crescimento celular da linhagem HEK 293T nos meios DMEM 10% SFB, CHO-S-SFM II e Hybridoma-SFM.

Linha vertical (preta), indica a inclinação da curva (R^2) e fase exponencial de crescimento celular.

Tabela 12- Parâmetros cinéticos de HEK 293T em SFM e DMEM 10% SFB.

	Hybridoma-SFM	CHO-S-SFMII	DMEM 10% SFB
Máx. concentração celular atingida (cels/mL)	$1,4 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$
$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	0,031	0,015	0,025
Td (h)	22	45	27
Viabilidade (%) 96hrs	80%	90%	97%

Em relação à análise de metabólitos, na Figura 14 (A, C e E) nota-se que o consumo de glutamina foi diferenciado entre as células crescendo nos meios Hybridoma-SFM, CHO-S-SFM II e DMEM 10% SFB sendo mais rapidamente consumida nas células em meio DMEM 10% SFB. Pode ser observado que células em meio Hybridoma-SFM o nível de glutamina inicial de 0,6 g/L manteve-se até 48 horas, chegando em 120 horas com 0,5 g/L, portanto estas células

consumiram 16% de glutamina do começo ao final do experimento. Nas células cultivadas em meio CHO-S-SFMII o nível inicial de glutamina também foi de 0,6 g/L, porém, estas células consumiram mais substrato (50%) em comparação com o meio Hybridoma-SFM, chegando em 120 horas com 0,3 g/L, não sendo totalmente consumida assim como para as células no meio Hybridoma-SFM. Já as células no meio DMEM 10% SFB foram as que mais consumiram glutamina (83%), com concentração inicial de 0,6 g/L, até 48 horas, chegando em 0,5 g/L e em 120 horas não foi totalmente consumido, chegando em 0,1 g/L, o que pode ser explicado devido a sua velocidade de crescimento. Portanto células em meio Hybridoma-SFM consomem 67% menos glutamina comparada a células em meio DMEM 10% SFB e células em meio CHO-S-SFM II consomem 33% menos glutamina comparada a células em meio DMEM 10% SFB.

Em relação ao glutamato, Figura 14 (A, C e E) para as células cultivadas no meio Hybridoma-SFM este metabólito continuou com seu valor inicial de 0,01 g/L até 72 horas, a partir deste momento houve uma discreta produção de glutamato que se manteve até o final do experimento 120 horas com 0,03 g/L. Para as células cultivadas no meio CHO-S-SFMII também houve uma discreta produção de glutamato no início do crescimento celular entre 24 e 72 horas, começando com 0,03g/L em 24/48 horas 0,04 g/L e 72 horas 0,03 g/L, chegando no final do experimento, (120 horas) com 0,02 g/L de glutamato. Em células no meio DMEM 10% SFB pode ser notado que não houve produção mais sim consumo de glutamato do começo do experimento (0,003 g/L) até 48 horas (0,00 g/L), momento no qual o nível de glutamato se manteve até o final do experimento 120 horas.

Quando se analisa os consumos de glicose Figura 14 (B, D e F) e produção de lactato, nota-se um consumo de glicose até 72 horas para as células em meios Hybridoma-SFM, CHO-S-SFMII e DMEM 10% SFB, logo depois se estabiliza, chegando ao final do experimento, 120 horas, com 0,8g/L para Hybridoma-SFM, 1,47 g/L para meio CHO-S-SFMII e 0,9 g/L para o meio DMEM 10% SFB, não sendo totalmente consumida por nenhum dos meios avaliados. O consumo de substrato do começo ao final do experimento foi de 79% para células nos meios Hybridoma-SFM e DMEM 10% SFB e 62% para células em meio CHO-S-SFMII. Quando comparados o consumo entre os meios SFM e DMEM 10% SFB, células em meio CHO-S-SFMII consumiram 55% menos substrato e células em meio Hybridoma-SFM consumiram 11% mais substrato em relação ao meio DMEM 10% SFB.

A produção de lactato para as células nos três meios avaliados foi aumentando conforme a glicose foi sendo consumida. Para células nos meios Hybridoma-SFM e CHO-S-SFMII a produção de lactato foi semelhante, chegando ao final do experimento, 120 horas com 2,72g/L

para células em meio Hybridoma-SFM e 2,13 g/L para células em meio CHO-S-SFMII . Para células em meio DMEM 10% SFB a produção de lactato foi maior, comparado com os outros meios, chegando no final do experimento, 120 horas com 4 g/L de lactato. Portanto células nos meios SFM produziram menos lactato quando comparadas as células em meio DMEM 10% SFB, estes valores são cerca de 46% para células em meio CHO-S-SFM II e 32% para células em meio Hybridoma-SFM.

Figura 14 - Consumo e produção de nutrientes de células HEK 293T, cultivadas em SFM: Hybridoma-SFM e CHO-S-SFM II. O controle usado foi DMEM + 10%SFB.

O experimento foi realizado em duplicata. Estão representados em **A**, **C** e **E** Perfis de Glutamina/Glutamato, linhas tracejadas representam Gutamato e linhas contínuas representam Glutamina e **B**, **D** e **F** Perfis de Glicose/Lactato, linhas tracejadas representam Lactato e linhas contínuas representam Glicose. Linha vertical indica o instante no qual ocorreu o final da fase de crescimento exponencial. A análise da dispersão das amostras foi tratada com Desvio Padrão.

5.2.2 Células Huh 7.0

Neste experimento pode ser observado o crescimento celular em todos os meios sugeridos (Figura 15). Nos meios de cultivo CHO-S-SFMII, Hybridoma-SFM e VP-SFM as células adaptadas tem um comportamento similar às células em meio DMEM 10% SFB. Já as células em meio Pro293a atingiram concentrações celulares superiores até mesmo quando comparadas às células cultivadas no meio DMEM10% SFB utilizadas como meio controle.

Figura 15 - Células Huh 7.0, cultivadas em meio SFM: Hybridoma- SFM, CHO-S-SFM II, Pro293a e VP-SFM. O controle usado foi DMEM + 10%SFB.

O experimento foi realizado em duplicata. Linha tracejada indicando a viabilidade celular em porcentagem. Linha contínua indicando a concentração celular por células/mL. A análise da dispersão das amostras foi tratada com Desvio Padrão.

A concentração celular máxima atingida pelas células em meio CHO-S-SFMII foi de $1,2 \times 10^6$ cel/mL às 120 horas de cultivo, as células cultivadas no meio de cultura Hybridoma-SFM atingiram uma concentração máxima de $1,0 \times 10^6$ cel/mL às 120 horas de cultivo, as células cultivadas em meio de cultura VP-SFM atingiram uma concentração máxima de $1,0 \times 10^6$ cel/mL com 120 horas de cultivo, as células cultivadas no meio DMEM 10% SFB não obtiveram resultado diferente, atingindo concentração celular máxima de $1,2 \times 10^6$ cel/mL às 120 horas de cultivo.

As células cultivadas no meio Pro293a foram as que obtiveram melhor crescimento celular, superando até mesmo o meio controle (DMEM 10% SFB). Pode ser observado uma curva

de crescimento contínua, em 72 horas de cultivo as células neste meio já estão na concentração celular de $1,0 \times 10^6$ cel/mL e em 120 horas de cultivo a concentração celular máxima atinge $2,0 \times 10^6$ cel/mL. Por fim é importante notar que as viabilidades são mantidas acima de 85% até 120 horas de cultivo para todas as células avaliadas, indicando uma boa adaptação. A velocidade máxima de crescimento (μ_{Max}) na fase exponencial e o tempo de duplicação t_d em horas das células Huh 7.0 nos meios livre de soro Hybridoma-SFM, CHO-S-SFMII, Pro293a, VP-SFM e DMEM 10% SFB também foram avaliados (Figura 16).

Os valores de μ_{Max} foram de 0,030 para células em meio Hybridoma-SFM, 0,028 para células em meio CHO-S-SFMII, 0,021 para células em meio Pro293a, 0,017 para células em meio VP-SFM e 0,020 para células em meio DMEM 10% SFB. Para células em meio DMEM 10% SFB e Hybridoma-SFM, o começo da fase de crescimento exponencial foi em 0 horas, ou seja, as células começaram a se dividir no mesmo momento do subcultivo, indicando assim que não houve uma fase de adaptação ao novo substrato como parece acontecer com as células nos outros SFM, a fase de crescimento exponencial para células em meio Hybridoma-SFM acabou em 48 horas de cultivo, sendo que para células em meio DMEM 10% SFB terminou em 96 horas. Já para os SFM VP-SFM, CHO-S-SFMII e Pro293a a fase de crescimento exponencial começou em 24 horas e acabou em 72 horas para células nos meios VP-SFM e para células nos meios CHO-S-SFMII e Pro293a terminou em 120 horas de cultivo.

O tempo de duplicação (t_d) para as células nos cinco meios avaliados foram de 23 horas para células no meio Hybridoma-SFM, 24 horas para células no meio CHO-S-SFMII, 33 horas para células no meio Pro293a, 34 horas para células no meio VP-SFM e 39 horas para células no meio DMEM 10% SFB. Portanto, podemos dizer que os tempos de duplicação para linhagem Huh 7.0 em SFM estão todos abaixo dos valores de t_d das células em meio DMEM 10% SFB.

Na Tabela 13 se encontra um resumo dos principais parâmetros cinéticos com a linhagem Huh 7.0 adaptada em SFM e em DMEM 10% SFB.

Tabela 13 - Parâmetros cinéticos com Huh 7.0 em SFM e com DMEM 10% SFB.

	Hybridoma-SFM	CHO-S-SFMII	Pro293a	VP-SFM	DMEM 10% SFB
Máx.concentração celular atingida (cels/mL)	$1,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,32 \times 10^6$
$\mu_{\text{máx}}$ (h⁻¹)	0,030	0,028	0,021	0,017	0,020
Td (h)	23	24	33	34	39
Viabilidade 120h (%)	92	93	98	95	86

Figura 16 - Análise da velocidade máxima de crescimento celular da linhagem Huh 7.0 nos meios Hybridoma-SFM, CHO-S-SFMII, Pro293a, VP-SFM e DMEM 10% SFB.

Linha vertical (preta), indica a inclinação da curva (R^2) e fase exponencial de crescimento celular.

Figura 17 - Consumo e produção de nutrientes em células Huh 7.0 cultivadas em SFM: Híbrido-SFM, CHO-S-SFM II, Pro293a e VP-SFM. O controle usado foi DMEM 10% SFB.

O experimento foi realizado em duplicata. Estão representados em A, C, E, G e I Perfis de Glutamina/Glutamato e B, D, F, H e J Perfis de Glicose/Lactato. As barras representam o Desvio Padrão. Linha vertical indica o instante no qual ocorre o final da fase de crescimento exponencial

Na Figura 17 (A, C, E, G e I) pode ser observado consumo de glutamina e produção de glutamato. Em células cultivadas nos meios CHO-S-SFMII, Pro293a, VP-SFM e DMEM 10% SFB houve 100% de consumo do substrato (glutamina). As células crescendo no meio Hybridoma-SFM chegaram com 120 horas de cultivo com 0,1 g/L de glutamina, não sendo totalmente consumida neste meio (80% de consumo). As células no meio VP-SFM foram as que mais rapidamente consumiram o substrato, seguido dos cultivos nos meios Pro293a, CHO-S-SFMII, DMEM 10% SFB e Hybridoma-SFM, respectivamente. A quantidade de glutamina nos meios avaliados são bem próximas, sendo que para as células em meio Hybridoma-SFM a concentração inicial era de 0,5 g/L e após 96 horas de cultivo chegou a 0,1g/L. Células no meio CHO-S-SFMII obtinham inicialmente 0,6 g/L, consumiram glutamina até 96 horas de cultivo chegando em 120 horas com 0g/L. Células no meio VP-SFM consumiram glutamina de forma constante e rápida, a concentração de glutamina inicial era 0,5 g/L, sendo consumida em até 48 horas com 0,1g/L e a partir de 72 horas o nível de glutamina já estava esgotado. No meio Pro293a começou com 0,6 g/L, sendo consumido em até 72 horas com 0,1g/L e se esgotando em 96 horas. Células no meio DMEM 10% SFB foram as que tinham mais glutamina inicialmente, 0,7 g/L sendo esta consumida em até 96 horas de cultivo chegando em 0,1 g/L e em 120 horas esse nível de glutamina se esgotou. A produção de glutamato ocorreu a partir do momento em que a glutamina foi sendo consumida para os SFM, já para as células em meio DMEM 10% SFB podemos observar que não houve produção de glutamato, mantendo-se em 0g/L até as 120 horas de cultivo. Assim como para linhagem HEK 293T, o glutamato não foi produzido para linhagem Huh 7.0 em meio DMEM 10% SFB.

Quando se analisa o consumo de glicose e produção de lactato Figura 17 (B, D, F, H e J), pode ser observado o consumo de glicose para os meios Hybridoma-SFM de 92%, CHO-S-SFMII (76%), Pro293a (56%) e DMEM 10% SFB (47%) não sendo totalmente consumida chegando em 120 horas de cultivo com 0,3 g/L para Hybridoma-SFM, 0,9 g/L para CHO-S-SFMII, 2,6 g/L para o meio Pro293a e 2,3 g/L para DMEM 10% SFB. O consumo de glicose em células no meio VP-SFM foi total (100%) e pode ter sido um dos fatores limitantes para o crescimento destas células já que a partir de 72 horas (0,8 g/L) este substrato já estava se esgotando, em 96 horas seu nível de glicose estava em 0,4 g/L e em 120 horas se esgotou totalmente. Em comparação com células em meio DMEM 10% SFB temos que células em meio Hybridoma-SFM consumiram 86% mais glicose, células em meio CHO-S-SFMII 60% mais e células em meio Pro293a consumiram 13% menos. Na Figura 17 (B, D, F, H e J) pode ser observada a produção de lactato conforme se tem o consumo de glicose. Para as células no meio Hybridoma-SFM a produção de

lactato foi maior quando comparada aos outros meios, chegando em 120 horas de cultivo com 3,69 g/L, seguidos por CHO-S-SFMII com 2,09 g/L, VP-SFM com 1,88 g/L, Pro293a 1,84 g/L e DMEM 10% SFB com 1,42 g/L. Ao comparar a produção de lactato em células em meio DMEM 10% SFB e em SFM temos que células em meio SFM produzem mais lactato. Sendo assim, células em meio Hybridoma-SFM produziram 61% mais subproduto, seguidos dos meios CHO-S-SFMII com 32%, VP-SFM com 24% e Pro293a com 22%.

5.3 *Análise da Expressão Gênica nas Células Cultivadas em SFM*

Uma vez obtida às linhagens celulares adaptadas em SFM, resolvemos verificar como estas se comportavam em relação à expressão gênica. Para isso, utilizamos o sistema de expressão de pseudopartículas virais, onde as células HEK 293T são utilizadas para produzir a partículas virais (ppHCV-RVGP) e as células Huh 7.0 são infectadas por essas pps e utilizadas para avaliar a expressão de proteína recombinante. Como alvo, utilizamos o gene da RVGP, uma vez que em nosso laboratório já temos métodos padronizados para análise da expressão de glicoproteína do vírus da raiva.

5.4 *Produção de pseudopartículas (ppHCV-RVGP) em células HEK 293T em SFM e em meio DMEM 10% SFB*

A fim de estabelecer a melhor estratégia de produção das ppHCV-RVGP em células cultivadas em SFM, foram testados dois métodos de co-transfecção: lipofecção e eletroporação.

Experimentos paralelos realizados pela Mestranda Thaissa Bernardino (dados não publicados) mostram que dentre os vários experimentos para padronização no laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan - LIV em relação DNA/Agente de transfecção foi visto que as concentrações de DNA/Agente de transfecção listadas na tabela 14 são as melhores para esse tipo de co-transfecção.

Tabela 14 - Concentração de DNA – Co-transfecção com Lipofectamina.

	pCMVE1E2	pCMVag/Pol	pCMVRVGP	Lipofectamina
Concentração de DNA	2,1 µg	4 µg	4 µg	15 µL

Portanto, três vetores foram utilizados e a co-transfecção foi realizada em células HEK 293T nos meios Hybridoma-SFM, CHO-S-SFM II e DMEM 10% SFB. Nove lotes de partículas virais ppHCV-RVGP foram produzidos para posterior quantificação através de qRT-PCR, onde foi obtido o valor de cópias de RNA contendo a sequência de RVGP/ μ L. Na tabela 15 estão especificados os lotes de partículas virais produzidos e os métodos de co-transfecção utilizados.

Tabela 15 - Lotes de partículas virais produzidas e os métodos de co-transfecção.

Lotes	Métodos de co-transfecção
1. Hybridoma C2 Lote 1	Eletroporação
2. Hybridoma C4 Lote 1	Eletroporação
3. Hybridoma Lote 1	Lipofectamina
4. CHO C2 Lote 1	Eletroporação
5. CHO C4 Lote 1	Eletroporação
6. CHO Lote 1	Lipofectamina
7. DMEM 10% SFB C2 Lote 1	Eletroporação
8. DMEM 10% SFB C4 Lote 1	Eletroporação
9. DMEM 10% SFB Lote 1	Lipofectamina

Após as co-transfecções, foram extraídos os materiais genéticos contido no sobrenadante das culturas, em seguida, essas amostras foram tratadas com DNase e então submetida à síntese de cDNA por transcrição reversa. Após a síntese do cDNA, foi realizada a amplificação por PCR das amostras da extração, do tratamento com DNase e da RT, com os lotes apresentados na Tabela 15, foram utilizados o par de iniciadores RVGP 5 e RVGPr1 (Tabela 9). Foi realizada, então, uma eletroforese em gel de agarose 1,5% (Figura 18) para analisar as amplificações obtidas das partículas e de seus tratamentos.

A partir da observação dos fragmentos obtidos por PCR das amostras dos diferentes lotes (Tabela 15), pode ser sugerido que houve eficiência no tratamento com DNase e que pode ser encontrado as partículas virais nos sobrenadantes das células co-transfectadas com tamanho de 503 pb (Figura 18).

Figura 18 - Gel de agarose 1,5 %. Análise em eletroforese dos fragmentos gerados por PCR convencional das amostras das pseudopartículas virais.

M- Marcador 100 bp; RNA extraído das partículas virais (1 – Hy C2; 2 –Hy C4; 3- CHO C2; 4 – CHO C4; 5- DMEM C2; 6- DMEM C4; 7- Hy Lipo; 8- CHO Lipo 9- DMEM Lipo); RNA extraído tratado com DNase (10 – Hy C2; 11 –Hy C4; 12- CHO C2; 13 – CHO C4; 14- DMEM C2; 15- DMEM C4; 16- Hy Lipo; 17- CHO Lipo 18- DMEM Lipo); Amplificação da RT-PCR (19 – Hy C2; 20 –Hy C4; 21- CHO C2; 22 – CHO C4; 23- DMEM C2; 24- DMEM C4; 25- Hy Lipo; 26- CHO Lipo 27- DMEM Lipo); 28 - Controle positivo; 29 e 30- Controle Negativo; M – Marcador 100bp.

Após a detecção do material genético (cDNA) das partículas virais e da eficiência do tratamento com DNase foi feita a titulação viral por PCR quantitativa, onde é obtido o valor de cópias de RNA de RVGP/ μ L. Para realização dos ensaios de quantificações das ppHCV-RVGP, é necessário obter uma curva padrão na qPCR. Para isso, após a linearização do pCMV-RVGP confirmamos a digestão enzimática em gel de agarose 0,8% (Figura 19). No qual foi obtido um fragmento com o tamanho de 7.687 bp como era esperado.

Figura 19 - Gel de agarose 0,8% linearização do pTGRVGP

1- Marcador de peso Molecular Lambda Hind III; 2- pTG-RVGP circular; 3- pTG-RVGP linear.

Com a confirmação da digestão, o DNA foi quantificado (443 ng/μl) por fluorímetro (Qubit- Invitrogen) e então foram feitas sete diluições do plasmídeo linearizado, para a construção da curva padrão da qPCR. Foi utilizado o par de iniciadores RVGP9 e RVGPr1 (Tabela 10) descritos por ASTRAY (2008), com algumas alterações no protocolo. Esse par de iniciadores apresentou uma boa curva padrão (Figura 20), com um valor elevado de R^2 e uma eficiência de 93% e o primeiro ponto, contendo 6×10^7 cópias, foi detectado já no 10º ciclo, sendo então os iniciadores escolhidos para desenvolver os procedimentos seguintes. Além disso, foi efetuada a análise da curva de dissociação (*Melting*) de todas as amostras para verificar a especificidade da reação, sendo que o fragmento amplificado (177 pb) apresentou à temperatura de ± 81 °C.

Figura 20 - Curva Padrão e Curva de Melting obtidas por qRT-PCR.

A -Curva padrão obtida por qRT-PCR pelo par de iniciadores RVGP9 e RVGP1 e **B**-Curva de *Melting* utilizada para verificar a especificidade da reação.

A partir da obtenção da curva padrão, pudemos quantificar as ppHCV-RVGP produzidas nas diferentes condições. Na tabela 16 estão especificados os lotes virais, os títulos e os métodos de co-transfecção utilizado para produção das partículas virais ppHCV-RVGP.

Tabela 16 - Títulos virais determinados por qPCR.

Lote	Título (cópias RNA/ μ L)	Métodos de tranfecção
Hibridoma C2 Lote 1	$1,95 \times 10^3$	Eletroporação
Hibridoma C4 Lote 1	$1,18 \times 10^3$	Eletroporação
Hibridoma Lote 1 *	$5,30 \times 10^3$	Lipofectamina
CHO C2 Lote 1	$0,21 \times 10^3$	Eletroporação
CHO C4 Lote 1	$1,08 \times 10^3$	Eletroporação
CHO Lote 1	$2,30 \times 10^3$	Lipofectamina
DMEM C2 Lote 1	$0,47 \times 10^3$	Eletroporação
DMEM C4 Lote 1	$0,11 \times 10^3$	Eletroporação
DMEM Lote 1	$1,71 \times 10^3$	Lipofectamina

* Lote 1 produziu mais partículas virais ppHCV-RVGP

Com base nesta quantificação pode ser sugerido que o método que melhor produz partículas virais ppHCV-RVGP é o método de lipofecção com títulos de $5,30 \times 10^3$ cópias de RNA/ μ L em células cultivadas em meio Hibridoma-SFM, $2,30 \times 10^3$ cópias de RNA/ μ L em células cultivadas em meio CHO-S-SFM II e $1,71 \times 10^3$ cópias de RNA/ μ L em células

cultivadas em meio DMEM 10% SFB. Portanto partículas virais (ppHCV-RVGP) produzidas em meio Hybridoma-SFM tem maiores títulos comparados aos outros meios analisados.

5.5 *Cinética de produção de Pseudopartículas ppHCV-RVGP.*

Através da qPCR, também pudemos analisar o melhor tempo de produção de ppHCV-RVGP. Para isso, os três vetores (pCMV- Gag/Pol, pCMV- E1E2, pCMV- RVGP) foram utilizados e a co-transfecção foi realizada em células HEK 293T nos meios Hybridoma-SFM, CHO-S-SFM II e DMEM 10% SFB, utilizando o agente de co-transfecção lipofecção. As proporções entre os vetores foram as especificadas na tabela 14 no item 5.2.1 em resultados e já havia sido padronizado em nosso laboratório pela Mestranda Thaissa C. Bernardino.

Após as co-transfecções, foram coletadas as partículas virais do sobrenadante das culturas co-transfectadas em diferentes tempos (24, 48, 72 e 96 horas), foram extraídos os materiais genéticos, em seguida, essas amostras foram tratadas com DNase e então submetida à síntese de cDNA por transcrição reversa.

Após a síntese do cDNA, foi realizada a amplificação por PCR das amostras da extração, do tratamento com DNase e da RT, foram utilizados o par de iniciadores RVGP 5 e RVGPPr1 (Tabela 9). Foi realizada, então, uma eletroforese em gel de agarose 1,5% para analisar as amplificações obtidas das partículas e de seus tratamentos (Figura 21).

Figura 21 - Gel de agarose 1,5 %. Análise em eletroforese dos fragmentos gerados por PCR convencional das amostras de cinética de produção de pseudopartículas virais nos meios DMEM 10% SFB, CHO-S-SFM e Hybridoma-SFM em 24, 48, 72 e 96 horas pós-transfecção.

A - M- Marcador 100 bp; **A** - RNA extraído das partículas virais produzidas no meio DMEM 10% SFB (1, 2, 3 e 4); **A** - RNA extraído tratado com DNase (5, 6, 7 e 8); **A** - Amplificação da RT-PCR (9, 10, 11 e 12) e C+ (Controle positivo- RVGP). **B** - M- Marcador 100 bp; **B** - RNA extraído das partículas virais produzidas no meio CHO-S-SFM II (1, 2, 3 e 4); **B** - RNA extraído tratado com DNase (5, 6, 7 e 8); **B** - Amplificação da RT-PCR (9, 10, 11 e 12) e C+ (Controle positivo- RVGP). **C** - M- Marcador 100 bp; **C** - RNA extraído das partículas virais produzidas no meio Hybridoma-SFM (1, 2, 3 e 4); **C** - RNA extraído tratado com DNase (5, 6, 7 e 8); **C** - Amplificação da RT-PCR (9, 10, 11 e 12) e C+ (Controle positivo- RVGP).

Após a detecção do material genético (cDNA) das partículas virais e da eficiência do tratamento com DNase por PCR convencional foi feita a titulação viral por PCR quantitativa, onde é obtido o valor de cópias de RNA de RVGP/ μ L. Na Figura 22 estão especificados os títulos da cinética de produção de partículas virais ppHCV- RVGP nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas pós-transfecção.

Figura 22 - Cinética de produção de partículas virais ppHCV-RVGP. Nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas pós-transfecção.

Titulação viral (cópias RNA/μL) nos meios Hybridoma-SFM, CHO-S-SFM II e DMEM 10% SFB (controle).

A análise de produção das partículas virais se mostrou semelhante entre os meios avaliados. Partículas virais (ppHCV-RVGP) em meio Hybridoma-SFM tendem a produzir maiores títulos virais comparadas aos outros meios, sendo que o pico máximo de produção de partículas virais foi em 48 horas, às 72 a produção de partículas virais cai rapidamente chegando a quase metade do valor de partículas virais produzidas em 48 horas, às 96 horas pode ser observado o declínio de produção, portanto podemos sugerir que houve degradação das partículas virais.

Já a produção de partículas virais (ppHCV-RVGP) nos meios CHO-S- SFM II e DMEM 10% SFB mostraram uma tendência de produção parecidas, ou seja, nas primeiras 24 e 48 horas, produziram quantidades de partículas virais com titulações muito próximas, porém a produção em meio CHO-S-SFM II nas 72 horas manteve sua titulação e somente em 96 horas houve a diminuição (titulação viral) de partículas virais, o que indica também a degradação das mesmas no meio de cultura. Para partículas virais produzidas em meio DMEM 10% SFB nota-se que o declínio aconteceu já às 72 horas e se intensificou nas 96 horas de experimento.

Portanto, a cinética de produção de partículas viras (ppHCV-RVGP) mostrou uma tendência elevada de produção em 48 horas para todos os meios avaliados, tendo títulos mais

elevados em partículas virais produzidas no meio Hybridoma-SFM com $4,83 \times 10^3$ cópias de RNA/ μL , seguidas dos meios CHO-S-SFM II $3,07 \times 10^3$ cópias de RNA/ μL e DMEM 10% SFB com $2,14 \times 10^3$ cópias de RNA/ μL .

Sendo assim, podemos sugerir que o melhor momento para coleta das partículas virais (ppHCV-RVGP) foi em 48 horas, pois neste tempo houve uma maior produção (titulação viral) de partículas virais em todos os meios avaliados e após este momento as mesmas tendem a sofrer degradação, onde ocorre a diminuição da titulação viral.

5.6 Infecção Viral com volume fixo

A linhagem Huh 7.0 foi utilizada para o estudo da expressão do gene da RVGP. Para isso, foi realizada a infecção da linhagem Huh 7.0 nos meios VP- SFM, Hybridoma- SFM, CHO-S-SFM II, Pro293 a e DMEM 10 % SFB, utilizando as partículas ppHCV-RVGP oriundas das transfecções em células HEK 293T adaptadas em meios livres de soro Hybridoma-SFM, CHO-S-SFM II e no meio DMEM 10% SFB, por dois métodos de transfecção (Lipofectamina e Eletroporação).

No momento deste experimento, ainda não havíamos titulado as ppHCV-RVGP. Portanto, para sabermos como os lotes de partículas virais infectam as células Huh 7.0 adaptadas nos SFM, primeiramente foram feitas as infecções com um volume fixo de 800 μL . Através destas infecções foi analisada qual condição celular permite expressar mais proteína RVGP. Para isso as amostras de células Huh 7.0 infectadas foram submetidas a análises pelo método de ELISA.

A Figura 23 mostra a expressão da RVGP em células Huh 7.0 adaptadas em meios livres de soro, 48 horas pós-infecção. Sendo que células Huh 7.0 em meio Pro 293a, infectadas com ppHCV-RVGP produzidas em meio Hybridoma-SFM pelo método de lipofecção tiveram um valor de $9 \text{ ng}/10^6$ cels de expressão de RVGP, células Huh 7.0 em meio Pro 293a, infectadas com ppHCV- RVGP produzidas em meio Hybridoma-SFM pelo método de eletroporação (condição 2) produziram $17 \text{ ng}/10^6$ cels de expressão de RVGP e células Huh 7.0 em meio CHO-S-SFM II, infectadas com ppHCV-RVGP produzidas em meio Hybridoma-SFM pelo método de eletroporação (condição 4) apresentaram $5 \text{ ng}/10^6$ cels de expressão de RVGP. Neste experimento é importante ressaltar que as células Huh 7.0 nos quatro SFM, foram infectadas com as ppHCV-RVGP produzidas nos meios Hybridoma-SFM,

CHO-S-SFM II e no meio DMEM 10% SFB (utilizada como controle), porém na figura 23 mostramos somente as condições que houve expressão da proteína RVGP.

Figura 23 - Expressão da RVGP (ng/10⁶ cels) em células Huh 7.0 adaptadas em SFM.

Infecção com as ppHCV-RVGP produzidas em células HEK 293T adaptadas em meios livres de soro Hybridoma-SFM, CHO-S-SFM e DMEM 10% SFB, pelos dois métodos de transfecção (Lipofectamina e Eletroporação).

Estes resultados nos mostram que as células que produziram mais proteína recombinante, neste caso específico de infecção com volume fixo de 800 μ L, foram as células Huh 7.0 no meio Pro 293a e as partículas virais (ppHCV-RVGP) que melhor infectam foram as produzidas no meio Hybridoma-SFM. Mesmo após a realização deste experimento, quantificamos os lotes virais e calculamos a relação de vírus: célula utilizada neste experimento que foi de 10 ppHCV-RVGP produzidas em meio Hybridoma-SFM pelo método de lipofecção por células Huh 7.0 em meio Pro 293a, 4 ppHCV-RVGP produzidas em meio Hybridoma-SFM pelo método de eletroporação (condição 2) por célula Huh 7.0 em meio Pro 293a e 2,5 ppHCV-RVGP produzidas em meio Hybridoma-SFM pelo método de eletroporação (condição 4) por célula Huh 7.0 em meio CHO-S-SFM II (esses valores (10, 4 e 2,5) são ordenados de acordo com a disposição dos resultados da figura 23). Uma vez que existem variações intrínsecas do próprio teste de ELISA e que nossos dados de expressão foram entre 5 e 17 ng/ 10⁶ células (valores muito baixos), os dados encontrados neste trabalho, sugerem que não houve diferenças entre as relações ppHCV-RVGP: números de células Huh 7.0 nos meios livres de soro que utilizamos.

Assim, nossos dados sugerem que não há praticamente expressão de RVGP nas células Huh 7.0. Esta dificuldade pode estar relacionada à dificuldade das ppHCV-RVGP infectarem as células Huh 7.0 ou a dificuldade da própria célula em expressar a proteína heteróloga. Para compreender esta questão as ppHCV-RVGP encontradas no sobrenadante celular foram quantificadas em diferentes tempos após a infecção e observamos que a quantidade de ppHCV-RVGP não se alterou (Dados não mostrados), indicando que apesar das células HEK 293T produzirem ppHCV-RVGP, estas eram incapazes de infectar células Huh 7.0.

5.7 *Produção de Pseudopartículas ppHCV-RVGP com concentrações diferentes de glicoproteínas E1E2 do HCV*

Assim, é provável que em nossos experimentos de infecção, estejamos tendo o mesmo problema técnico, onde a proteína de envelope E2 do HCV não esteja sendo expressa e processada corretamente, impedindo a entrada das ppHCV-RVGP nas células Huh 7.0. A aluna de mestrado Thaissa Bernardino realizou em paralelo estudos de padronizações com o sistema de expressão de pseudopartículas (ppHCV) e observou também pouca expressão de RVGP. Para isso ela avaliou por *Western Blot* se as proteínas para formação das ppHCV estavam sendo expressas corretamente. Com este experimento foi possível confirmar a expressão da glicoproteína E1 do HCV tanto no extrato celular quanto nas pps purificadas. Já a glicoproteína E2 foi detectada com muito mais intensidade no extrato celular do que nas pps purificadas (Dados não publicados).

Quando comparada a expressão de E1 e E2 nas pps purificadas foi possível notar que a marcação da glicoproteína E1 foi mais intensa que E2, mostrando que a glicoproteína E2 não foi incorporada as pps. Além disso, foi visto que a marcação da banda, tanto da glicoproteína E1 quanto da E2 foi mais intensa nos extratos celulares, sugerindo que estas glicoproteínas não formaram o complexo heterodímero e ambas ficaram retidas no interior celular. Já a proteína de cápside GAG foi detectada nas pps purificadas, o que mostra que houve formação e brotamento das pps a partir dessa proteína (Dados não publicados).

Pensando nisto, optamos por realizar a produção de pseudopartículas (ppHCV-RVGP) com concentrações diferentes do vetor contendo E1 e E2 em células HEK 293T adaptadas em Hybridoma-SFM e DMEM 10% SFB, afim de avaliar quantitativamente a produção das mesmas com concentrações 2x e 3x mais do vetor pCMV-E1E2. As concentrações do vetor

pCMV-E1E2 utilizadas estão especificadas na Tabela 17. Tomamos como base as mesmas concentrações que já havíamos padronizado em nosso laboratório para aumentar 2x e 3x mais as concentrações do vetor pCMV-E1E2.

Tabela 17 - Concentração de DNA – Co-transfecção com Lipofectamina

	pCMV-E1E2	pCMV-Gag/Pol	pCMV-RVGP	Lipofectamina
Concentração de DNA 1 x	2,1 µg	4 µg	4 µg	15 µL
Concentração de DNA 2 x	4,2 µg	4 µg	4 µg	15 µL
Concentração de DNA 3 x	6,3 µg	4 µg	4 µg	15 µL

Após as co-transfecções com os três vetores (pCMV- Gag/Pol, pCMV- E1E2, pCMV- RVGP), foram extraídos os materiais genéticos contido no sobrenadante das culturas, em seguida, essas amostras foram tratadas com DNase e então submetida à síntese de cDNA por transcrição reversa. Após a síntese do cDNA, foi realizada a amplificação por PCR das amostras da extração, do tratamento com DNase e da RT, foram utilizados o par de iniciadores RVGP5 e RVGPr1 (Tabela 9). Foi realizada, então, uma eletroforese em gel de agarose 1,5% (Figura 24) para analisar as amplificações obtidas das partículas e de seus tratamentos.

Figura 24 - Gel de agarose 1,5 %. Análise em eletroforese dos fragmentos gerados por PCR convencional das amostras das pseudopartículas virais produzidas com concentrações diferentes de glicoproteínas E1E2 nos meios DMEM 10% SFB e Hybridoma-SFM.

A - M- Marcador 100 bp; **A** - RNA extraído das partículas virais produzidas no meio DMEM 10% SFB 1 ([] de E1E2 1x - Padrão), 2 ([] de E1E2 2x) e 3 ([] de E1E2 3x); **A** - RNA extraído tratado com DNase 4 (Padrão), 5 (2x) e 6 (3x); **A** - Amplificação da RT-PCR 7 (Padrão), 8 (2x) e 9 (3x) e C+ (Controle positivo- RVGP). **B** - M- Marcador 100 bp; **B** - RNA extraído das partículas virais produzidas no meio Hybridoma-SFM 1 ([] de E1E2 1x - Padrão), 2 ([] de E1E2 2x) e 3 ([] de E1E2 3x); **B** - RNA extraído tratado com DNase 4 (Padrão), 5 (2x) e 6 (3x); **B** - Amplificação da RT-PCR 7 (Padrão), 8 (2x) e 9 (3x) e C+ (Controle positivo- RVGP).

Após a detecção do material genético (cDNA) das partículas virais e da eficiência do tratamento com DNase foi feita a titulação viral por PCR quantitativa, onde é obtido o valor de cópias de RNA de RVGP/ μ L. Na Figura 25 estão especificados os títulos virais da produção de ppHCV- RVGP com concentrações padrão 1x, 2x e 3x do vetor pCMV-E1E2, 48 pós-transfecção.

Figura 25 - Produção de pseudopartículas ppHCV-RVGP com concentrações diferentes do vetor pCMV-E1E2 nos meios Hybridoma-SFM e DMEM 10% SFB.

Para produção das partículas virais com concentrações de duas vezes e três vezes mais o vetor pCMV-E1E2 as concentrações do vetor pCMV foram alteradas. Os três vetores pCMV-Gag/Pol, pCMV-RVGP e pCMV-E1E2 foram utilizados e as co-transfecções foram realizadas.

Na figura 25 podemos observar a produção das partículas virais (ppHCV-RVGP) com concentrações diferentes de glicoproteínas E1E2. Para produção das partículas virais no meio Hybridoma-SFM, nota-se que partículas virais com concentração padrão (1x) do vetor pCMV-E1E2 produzem títulos mais elevados com $4,20 \times 10^3$ cópias de RNA/μL comparados com aqueles produzidos com concentrações de 2x e 3x mais do vetor pCMV-E1E2 para montagem das ppHCV-RVGP. Já para produção das partículas virais em meio DMEM 10% SFB podemos observar que houve uma maior titulação com $3,95 \times 10^3$ cópias de RNA/μL em partículas virais produzidas com concentrações 3x mais do vetor pCMV-E1E2 para montagem das ppHCV-RVGP.

Esses resultados mostram que mesmo aumentando as concentrações do vetor pCMV-E1E2 para partículas virais produzidas em meio Hybridoma-SFM as titulações de ppHCV-RVGP não aumentaram, porém para partículas virais produzidas em meio DMEM 10% SFB houve uma maior produção de ppHCV-RVGP utilizando concentrações 3x mais do vetor pCMV-E1E2.

5.8 *Ensaio de Dosagem de entrada das Pseudopartículas (ppHCV-RVGP)*

Afim de analisar a qualidade das partículas virais (ppHCV-RVGP) produzidas com concentrações diferentes do vetor pCMV-E1E2, realizamos um ensaio de entrada das pseudopartículas (ppHCV-RVGP), com o objetivo de avaliar se as mesmas conseguiam infectar células Huh 7.0 adaptadas em Hybridoma-SFM e DMEM 10% SFB mesmo quando se aumentava as concentrações do vetor pCMV-E1E2 para montagem das ppHCV-RVGP.

Para isso, células Huh 7.0 nos meios Hybridoma-SFM e DMEM 10% SFB foram infectadas com partículas virais (ppHCV-RVGP) também produzidas nos meios Hybridoma-SFM e DMEM 10% SFB pelo método de co-transfecção por lipofectamina por ter uma padronização bem estabelecida no laboratório, com concentrações padrão 1x, 2x e 3x do vetor pCMV-E1E2, após foram avaliados diferentes tempos de infecção e a presença das ppHCV-RVGP no sobrenadante.

Na figura 26 podemos observar que independente do meio de cultura e das concentrações do vetor pCMV-E1E2 para montagem das partículas virais as quantificações de ppHCV-RVGP no sobrenadante das infecções foram bem semelhantes. Neste ensaio, partículas virais (ppHCV-RVGP) produzidas nos dois meios avaliados (Hybridoma-SFM e DMEM 10% SFB) com as diferentes concentrações do vetor pCMV-E1E2 (1x, 2x e 3x) tem quantificações de $\approx 10^3$ cópias de RNA-RVGP/ μL , o que podemos presumir que as ppHCV-RVGP não foram capazes de aderir e entrar nas células Huh 7.0 adaptadas em meio livre de soro Hybridoma-SFM e DMEM 10% SFB. Podemos notar também que as ppHCV-RVGP não degradaram depois de armazenadas $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e nem durante o tempo de infecção, o que pode indicar que essas mantem as características do vírus em preservar o RNA, porém, perderam a capacidade infectante.

Figura 26 - Ensaio de detecção da entrada das pseudopartículas ppHCV-RVGP com concentrações diferentes do vetor pCMV-E1E2 nos meios Hybridoma-SFM e DMEM 10% SFB.

Gráfico de detecção da entrada das ppHCV-RVGP com concentrações padrão, 2x e 3x glicoproteínas E1E2, utilizadas para infecção em células Huh 7.0 adaptadas nos meios Hybridoma-SFM e DMEM 10% SFB.

Com estes resultados podemos sugerir que mesmo aumentando as concentrações do vetor pCMV-E1E2, as partículas virais ainda assim têm dificuldades em infectar a célula hospedeira, isso nos mostra que realmente este sistema pode ter uma certa dificuldade em incorporar as glicoproteínas E1E2 de envelope quando estão sendo formadas as ppHCV-RVGP. Assim, estes resultados sugerem que esta dificuldade está relacionada ao sistema de expressão escolhido e não a adaptação das células em cultivos em SFM.

6 DISCUSSÃO

A utilização de células adaptadas em SFM é interessante uma vez que se podem reduzir custos e levar a um escalonamento rápido para produção de produtos biotecnológicos. Como dito anteriormente, os SFM estão sendo utilizada para várias finalidades, entre elas produção de vacinas (GERIN et al., 1999; HAYTER et al., 1992; MERTEN et al., 1994; PERRIN et al., 1995). Tipicamente, adaptação livre de soro consiste na substituição de componentes do soro, por nutrientes bem definidos. Os protocolos mais comumente usados para adaptar células para meios livres de soro (SFM) incluem adaptação direta e sequencial (SCHRODER et al., 2004; SINACORE et al., 2000).

Neste trabalho conseguimos adaptar duas linhagens celulares (HEK293T e Huh 7.0) em meios livres de soro (SFM). Para linhagem HEK 293T, a adaptação foi realizada gradualmente e foram adaptadas em dois meios SFM, sendo eles, Hybridoma-SFM e CHO-S-SFM. Uma passagem intermediária de 95% foi realizada para se chegar ao processo final da adaptação, este procedimento já foi citado anteriormente por Van Der Valk et al. (2010) e foi visto que é importante para as células se adaptarem antes de serem passadas diretamente de 75% para 100% SFM. As células adaptadas nos meios VP-SFM e Pro293a foram descartadas do estudo, pois após o processo de adaptação das células, as mesmas chegaram à etapa final de 100% livre de soro, porém após cultivá-las, não conseguiram seguir em cultura para realização dos experimentos seguintes.

O SFM Pro293a é considerado um meio quimicamente definido (Tabela 2), portanto não contém em sua formulação nenhum componente de origem animal, este meio foi desenvolvido especificamente para células HEK293, porém neste estudo não conseguimos manter a linhagem HEK 293T em cultura após o processo de adaptação, sendo assim, a adaptação de células HEK 293T continua sendo um desafio neste SFM, já que até diferentes clones da mesma linhagem necessitam de adaptação especial (VAN DER VALKS et al., 2010). Já os outros três meios SFM, VP-SFM, CHO-S-SFMII e Hybridoma-SFM, não requerem a suplementação de soro, porém em sua formulação podem conter frações de proteínas.

Apesar de estarem descritos na literatura diversos protocolos para adaptação de células a condições livre de SFB (SCHRÖDER; MATISCHAK; FRIEDL, 2004; SINACORE; DRAPEAU; ADAMSON, 2000; VAN DER VALK et al., 2010), nem todas as linhagens

conseguem se adaptar utilizando os métodos convencionais, geralmente baseados na progressiva retirada de soro (JALURIA et al., 2008). Mesmo as células adaptadas demandam tempo e esforços consideráveis para concluir o processo de adaptação (passagens livres de soro) (VAN DER VALK *et al.*, 2004).

As células HEK 293T adaptadas em meio VP-SFM, também não seguiram com um bom crescimento quando cultivadas após o processo de adaptação. Este meio foi desenvolvido para linhagens Vero (Rim de Macaco verde africano), COS-7 (Rim de macaco verde Africano, transformadas), MDCK (Rim canino) e BHK-21 (Rim de hamster). Portanto, podemos sugerir que estes meios (Pro293a e VP-SFM) não contêm em sua formulação os requisitos nutricionais exigidos para estas células em nossas condições (as culturas podem mudar suas necessidades dependendo das condições de trabalho). Estudos mostram ainda que apenas 10-20% das tentativas de adaptação são bem sucedidas (PAZOS et al., 2004), já que a composição do meio de cultura tem papel determinante, uma vez que deve fornecer as condições fisiológicas adequadas para o cultivo celular como crescimento, proliferação celular, produtividade e qualidade do produto (ZHU, 2012).

Além disso, na Tabela 5 (Materias e Métodos) podem ser notadas diferenças nas concentrações de nutrientes nos diferentes meios de cultura usados na adaptação das linhagens celulares. Pode-se ressaltar que os meios Pro293a e VP-SFM não contém glutamina na sua formulação, porém foram suplementados com 4 mM de L-Glutamine (Sigma, St. Louis, MO., U.S.A) como recomendado pelo fabricante. Já a quantidade de lactato é mais alta no meio DMEM 10% SFB, pois o é suplementado com 10% SFB.

Já o processo de adaptação para linhagem Huh 7.0 foi realizado com sucesso em todos os SFM propostos, conseguimos células 100% adaptadas nos quatro meios sugeridos, sendo eles, Hybridoma-SFM, CHO-S-SFMII, VP-SFM e Pro293a. O processo de adaptação para esta linhagem foi tanto por adaptação gradual como por adaptação direta, sendo que células cultivadas em meio DMEM 10% SFB foram passadas diretamente para SFM. Estudos mostram que esta linhagem (Huh 7.0) já foi cultivada em meio isento de soro suplementado com ITS (insulina, tranferrina e selênio) e o crescimento das células foi estabelecido após a redução gradual do nível de SFB e finalmente meio de cultura completamente sem soro (AKAZAWA et al., 2011).

Portanto esta linhagem pode ser propagada em meio quimicamente definido contendo quantidades vestigiais de selênio no lugar do SFB (NAKABAYASHI et al., 1982) ao contrário

de outras linhagens de células humanas estabelecidas com funções diferenciadas do fígado que requerem a adição de soro. Além disso, foi verificado que as células Huh 7.0 secretam fator de crescimento derivado de hepatoma mitogénio que promove o crescimento celular, permitindo-lhes que não dependa de fatores de crescimento encontrados no soro (NAKAMURA et al., 1994). Sendo assim, podemos inferir que células Huh 7.0 tem maior resistência no processo de adaptação quando comparada as células HEK 293T e que esta linhagem pode ser adaptada diretamente ou de forma gradual em SFM sem grandes problemas.

Neste trabalho, pode ser confirmado que as diferenças mais marcantes da cultura em meio DMEM contendo 10% SFB (controle) e culturas isentas de soro são presenças de aglomerado, células mais esféricas e perda de adesão ao substrato nas culturas em processo de adaptação. Alterações morfológicas durante a adaptação das células para concentrações decrescentes de SFB já foram relatadas anteriormente, para linhagem HEK 293 em meio contendo 2% de SFB, ou seja, na etapa de 90% SFM, as células haviam se tornado mais esféricas e compactas, além de se soltarem da superfície e se agregarem com outras células formando aglomerados (JALURIA et al., 2008).

Alguns autores já relataram anteriormente que a presença de aglomerados e a perda da capacidade de adesão das células são considerados eventos comuns no processo de adaptação de células para meio isento de soro (HESSE; WAGNER, 2000; KALLEL et al., 2002), sendo que a formação de grumos é uma medida de proteção celular que ocorre naturalmente no processo de adaptação (HALDANKAR; KOPCHICK; RIDGWAY, 1999; HU; AUNINS, 1997), e a perda da capacidade de adesão ao substrato se dá pelo fato da composição do SFB que contém proteínas da matriz extracelular, fundamentais para o ancoramento de linhagens celulares aderentes e componentes que conferem as células proteção biológicas (antitoxinas, antioxidantes, antiproteases) (MORAES; MENDONÇA; SUAZO, 2008). Assim, nossos resultados corroboram com os já descritos na literatura.

Os ensaios realizados para análise de diâmetro e volume das células em SFM e meio DMEM 10% SFB reforçam e comprovam que após o processo de adaptação as células tendem a alterar de forma mínima sua morfologia original. Células adaptadas em SFM tendem a ter diâmetro e volume maiores comparados às células em meio contendo SFB, porém não há relatos na literatura sobre o volume, sendo que o valor aproximado para o diâmetro de células HEK 293T é de 11- 18 μ m (MARIGLIANI, 2013). Já para linhagem Huh

7.0 não há relatos sobre valores correspondentes a diâmetro e volume destas células, porém, com os resultados obtidos podemos inferir que os valores são muito próximos do controle (DMEM 10% SFB). Sendo assim, podemos sugerir que as células em meio com soro e SFM estão dentro do padrão para morfologia das duas linhagens avaliadas. Segundo Van Der Valk et al. (2004) pequenas alterações na morfologia celular não devem ser motivo de preocupação enquanto o tempo de duplicação e viabilidade permanecem boas.

Através da cinética de crescimento celular pudemos avaliar a concentração celular máxima atingida para linhagem HEK 293T, sendo que as células em DMEM 10% SFB atingiram concentração celular mais elevada chegando a $2,6 \times 10^6$ cel/mL em 120 horas de cultivo quando comparadas as células cultivadas em SFM. Já a linhagem Huh 7.0 cultivadas no meio Pro293a obtiveram maior crescimento comparado às cultivadas em outros meios, chegando a $2,0 \times 10^6$ cel/mL em 120 horas de cultivo superando até mesmo o meio DMEM 10% SFB.

Assim como a viabilidade celular, um parâmetro importante de ser analisado é o tempo de duplicação (t_d) das células, pois quando são obtidos baixos valores de viabilidade e elevados tempos de duplicação é necessário realizar mais passagens intermediárias como, por exemplo, 60%, 87,5 % e 95% de meio livre de SFB, afim de obter uma adaptação mais gradual (BIAGGIO et al., 2015). Sendo assim, as viabilidades foram mantidas acima de 80% para as duas linhagens avaliadas e os valores do tempo de duplicação foram mantidos próximos aos valores das células cultivadas em meio DMEM 10% SFB para cada linhagem. Portanto, foram obtidos valores altos de viabilidade até as 96 e 120 horas de cultivo e valores baixos para o tempo de duplicação para a linhagens avaliadas, exceto para linhagem HEK 293T no meio CHO-S-SFMII onde houve um tempo de duplicação 1,6x maior comparado ao t_d das células em meio DMEM 10% SFB, porém como houve uma boa viabilidade celular (90%, até às 96 horas de cultivo) optamos por não realizar o processo de readaptação com passagens intermediárias e dar continuidade aos experimentos.

Com a análise dos metabólitos para linhagem HEK 293T, temos que células no meio DMEM 10% SFB consomem mais glutamina comparado às células em SFM (Hybridoma-SFM e CHO-S-SFMII), porém a glutamina não foi consumida totalmente em nenhum dos meios avaliados, não sendo então um fator limitante para o crescimento destas células. A glutamina em sistemas de cultura celular suporta o crescimento de células que têm altas exigências de energia sendo uma fonte de energia alternativa para as células que se dividem rapidamente ou células que usam a glicose de forma ineficiente (ALTAMIRANO et al., 2008; ALTAMIRANO et al., 2013).

Para o metabólito glutamato, notamos que não houve produção mais sim consumo em células no meio DMEM 10% SFB. Sendo assim, a glutamina é um aminoácido não essencial que é degradado para formação do glutamato e amônia, com o decorrer do metabolismo a concentração de glutamina decai, uma vez que este aminoácido é utilizado nas reações do ciclo do ácido tricarbóxico, transformando-se em glutamato pela perda da amônia. Em sua forma desaminada, o glutamato pode estar envolvido no ciclo do ácido tricarbóxico, na gliconeogênese, síntese proteica, entre outros (ALTAMIRANO et al., 2008; ALTAMIRANO et al., 2013). Portanto, neste caso onde o glutamato não está sendo produzido este pode estar sendo utilizado para produção de energia para estas células.

Já a glicose também não foi totalmente consumida por nenhum dos meios avaliados, sugerindo então que células em meio DMEM 10% SFB, use de forma ineficiente a glicose, o carboidrato mais usualmente consumido, considerado o mais importante para o crescimento celular, ou que estas células tenham altas exigências de energia, portanto utiliza a glutamina como uma fonte de energia alternativa para as células (ALTAMIRANO et al., 2008; ALTAMIRANO et al., 2013). A produção de lactato foi maior em células no meio DMEM 10% SFB, chegando a 4g/L. Embora este valor possa ser devido à alta quantidade de lactato existente neste meio, já que ele é suplementando com SFB, um dos maiores problemas em cultura *in vitro* é a formação de lactato e amônio decorrente do metabolismo celular. Quando excedem determinada concentração, possuem efeitos tóxicos e inibitórios para as células. De maneira geral, concentrações menores que 20–40 mM (1,78 – 3,56 g/L) atrapalham a produtividade e acima deste valor, inibem o crescimento celular (ALTAMIRANO et al., 2008; ALTAMIRANO et al., 2013).

Para linhagem Huh 7.0 houve um consumo muito maior de glutamina quando comparadas com as células HEK 293T. O consumo de substrato (glutamina) foi de 100 % em células nos meios CHO-S-SFMII, Pro293a, VP-SFM e DMEM 10% SFB, exceto no meio Hybridoma-SFM.

Assim como para linhagem HEK 293 T o glutamato não foi produzido na linhagem Huh 7.0 em meio DMEM 10% SFB. A glicose assim como a glutamina foi totalmente consumida no meio VP-SFM, portanto, a falta desses substratos pode ter afetado o crescimento celular neste meio SFM. Já nas células cultivadas nos meios CHO-S-SFMII, Pro293a, Hybridoma-SFM e DMEM 10% SFB a glicose não foi totalmente consumida, sugerindo que estas células tenham altas exigências de energia, uma vez que a glutamina é uma fonte de energia alternativa para as células (ALTAMIRANO et al., 2008; ALTAMIRANO et al., 2013). Com relação à produção de lactato, este subproduto pode ter afetado o crescimento da linhagem Huh 7.0 no meio Hybridoma-SFM já que houve uma produção com valores acima de 3,56 g/L e que não existem outros fatores

como falta de substrato (glutamina, glicose) que poderiam ser limitantes para o crescimento destas células.

Atualmente, o uso de partículas semelhantes a vírus tem mostrado ser um potente candidato à vacina e tem centralizado atenções dos projetos mais recentes em vacinologia, pois a imunização realizada com pseudopartículas virais tem mostrado induzir uma resposta imune forte e rápida (BACHMANN; ZINKERNAGEL, 1996).

Portanto, após avaliar o comportamento de células de mamíferos (HEK 293T e Huh 7.0) em SFM avaliando critérios como crescimento e metabolismo celular, partimos para a produção de pseudopartículas virais em células HEK 293T em SFM, com as proteínas GAG e POL do MLV (vetor – pCMV-Gag/Pol) as glicoproteínas E1 e E2 (vetor – pCMV-E1E2) do HCV carregando o RNA da glicoproteína do vírus da raiva (vetor- pCMV-RVGP), dando origem então as pseudopartículas (ppHCV-RVGP) utilizadas para avaliar a expressão da proteína recombinante (RVGP) através da infecção em células Huh 7.0 cultivadas em SFM. A proteína de cápside GAG do MLV (SATTERFIELD et al., 2011) é suficiente para a montagem e liberação de pseudopartículas virais semelhantes aos retrovírus a partir da cultura celular de eucariotos superiores, mesmo quando expressa na ausência de todas as outras proteínas do vírus (GHEYSEN et al., 1989; MURIAUX et al., 2001). Portanto, esta estratégia vem sendo muito utilizada para produção de partículas virais e uma variedade de proteínas tem sido incorporadas com êxito as pps, como por exemplo, as glicoproteínas E1 e E2 do vírus HCV (BARTOSCH; DUBUISSON; COSSET, 2003).

Dois métodos de transfecção para formação das partículas virais foram testados neste trabalho, o agente lipossômico (Lipofectamina- 2000) e o método de eletroporação, a fim de avaliar qual é o mais eficiente para produção das partículas virais (ppHCV-RVGP).

Poucos métodos de quantificação de pseudopartículas virais são padronizados. Neste sentido, Sharma et al. (2011) obtiveram uma quantificação de $\approx 1,5 \times 10^4$ ppHCV/ μ L e Ashfaq et al. (2011) $\approx 10^5$ ppHCV/ mL, porém esses trabalhos realizaram a quantificação por estimativa, dificultando a comparação com os nossos resultados onde quantificamos as pps por qRT-PCR. Subramanian et al. (2012) quantificaram pseudopartículas virais baseadas da febre aftosa pelo método de ELISA, no qual obtiveram 30 μ g pseudopartícula da febre aftosa/ mL. Métodos baseados em antígenos são rotineiramente utilizados para a quantificação de pseudopartículas virais purificadas, contudo a quantificação de pseudopartículas virais por qRT-PCR não pode ser utilizada para esse tipo de pseudopartículas virais devido à ausência de um material genético (THOMPSON et al., 2013). Desta forma, nosso projeto tem o

diferencial na quantificação das pseudopartículas virais, uma vez que elas transportam o RNA-RVGP, tornando ensaios de infecção mais precisos. A partir do momento que obtivemos sucesso na padronização da qRT-PCR quantificamos as partículas virais produzidas nos meios SFM e meio com 10% SFB, utilizando o gene da RVGP como alvo da amplificação. Essa metodologia nos possibilitou a titulação mais precisa das ppHCV-RVGP.

Os nossos dados obtidos na cinética de produção de partículas virais (ppHCV-RVGP) sugerem que o melhor momento para coleta das ppHCV-RVGP seja em 48 horas após a transfecção em todos os meios avaliados. Em estudos anteriores realizados por Bartosch, Dubuisson e Cosset (2003) para produção de ppHCV em linhagem HEK 293T o tempo de coleta das ppHCVs utilizado foi de 24 horas, porém neste estudo, o objetivo foi de estudar o mecanismo de infecção do HCV. Dessa forma, o tempo de coleta das pps no sobrenadante das células co-transfectadas era de certa forma irrelevante, uma vez que os autores não tinham como objetivo produzir as partículas virais para avaliar expressão proteica, mas sim avaliar o mecanismo de infecção da célula hospedeira (Huh 7.0).

O resultado da produção dos nove lotes de pseudopartículas (ppHCV-RVGP) em células HEK 293T nos meios Hybridoma-SFM, CHO-S-SFMII e DMEM 10% SFB, mostrou que o método que melhor produz partículas virais ppHCV-RVGP é o método de lipofecção com títulos de $5,30 \times 10^3$ cópias de RNA/ μ L em células cultivadas em meio Hybridoma-SFM. Portanto, partículas virais (ppHCV-RVGP) produzidas em meio SFM pelo método de lipofecção tem maiores títulos comparados a produção em meio DMEM 10% SFB e pelo método de eletroporação. Segundo Benmaamar et al. (2009) e Karlsson e Liljestrom (2003) o método de co-transfecção por eletroporação é a forma de transfecção mais eficiente, porém podemos constatar que para a linhagem HEK 293T este método não foi o mais adequado para produção de partículas virais em meios SFM.

Para analisar a expressão da proteína de interesse (RVGP) em células Huh 7.0 adaptadas nos SFM com as ppHCV-RVGP produzidas em SFM, utilizamos a técnica de ELISA, um método já estabelecido pelo laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan (ASTRAY et al., 2008). Os resultados de expressão de proteínas nos mostram que as células que expressaram mais RVGP foram as células Huh 7.0 no meio Pro 293a. Por outro lado, as partículas virais (ppHCV-RVGP) que melhor infectaram foram as produzidas no meio Hybridoma-SFM. Apesar de usarmos diferentes relações ppHCV-RVGP: células nossos

dados de expressão sugerem que não houve diferenças entre as relações ppHCV-RVGP: números de células Huh 7.0 que utilizamos.

Devido ao baixo valor de RVGP encontrado em nossas culturas de Huh 7.0 infectadas e utilizando o método de qRT-PCR foi possível detectar que durante o processo de infecção, as ppHCV-RVGP não eram capazes de infectar efetivamente as células Huh 7.0 cultivadas nos Hybridoma-SFM e DMEM 10% SFB. É provável que a má formação das glicoproteínas E1 e E2 do HCV, nas ppHCV-RVGP impeçam estas de infectar as células hepáticas, uma vez que estas têm funções importantes na adesão e infecção do vírus na célula-hospedeira (BRAZZOLI et al., 2005; DELEERSNYDER et al., 1997; PATEL et al., 2000; WAKITA et al., 2005). Neste sentido, vale lembrar que a glicosilação é uma modificação pós-traducional, necessária para a funcionalidade das glicoproteínas E1 e E2 do HCV, portanto mudanças nos padrões de glicosilação tem um grande impacto sobre a formação das partículas virais, entrada e imunogenicidade, afetando assim a patogênese e virulência do vírus (GOFFARD et al., 2005; HUNDT; LI; LIU, 2013; SLATER-HANDSHY et al., 2004). Assim, é possível que, mudanças pós-traducionais das glicoproteínas do HCV, por glicosilação e pela formação de pontes de dissulfeto, possam ter um forte impacto na fusão da membrana viral com a membrana endossomal da célula hospedeira e no brotamento, explicando a incapacidade das ppHCV-RVGPs de infectar as células Huh7.0 (HUNDT; LI; LIU, 2013).

É sabido também, que diferentes condições de cultura celular, como meio de cultura, nutrientes, agitação, podem alterar a eficiência da glicosilação em proteínas recombinantes (AL-RUBEAI, 2014). Estudos realizados para avaliar a expressão das proteínas que compõe a partícula viral (ppHCV-RVGP) pelo método de *Western Blot*, mostrou que houve expressão de glicoproteína E1 do HCV tanto no extrato celular quanto nas partículas virais purificadas, já a E2 teve maior expressão no extrato celular (BERNARDINO, comunicação pessoal, 2015). Deste modo, a dificuldade em expressar a E2 nas ppHCV, pode ser devido ao seu número elevado de sítios de glicosilação, sendo que há relatos de que a E1 tenha de 4 a 5 sítios de N-glicosilação e a E2 mais de 11 sítios de N-glicosilação (GOFFARD et al., 2005; GOFFARD; DUBUISSON, 2003; HELLE et al., 2007; POPESCU; DUBUISSON, 2010; SLATER-HANDSHY et al., 2004), o que nos sugere que a mesma pode ficar retida no interior celular ou no retículo endoplasmático e, assim não consiga migrar para a membrana celular, nas nossas condições de cultura.

Outra hipótese é que possa haver dificuldade na clivagem da E1E2, já que durante o ciclo replicativo do vírus selvagem este codifica uma poliproteína precursora que é clivada

por proteases endógenas e virais que produzem as proteínas estruturais (fazem parte da estrutura do capsídeo e glicoproteínas de envelope) e não estruturais (participam da replicação), no caso do nosso plasmídeo de transfecção as glicoproteínas E1 e E2 estão sob ação do mesmo promotor CMV o que poderia dificultar a clivagem destas glicoproteínas e fazer com que estas não fossem processadas de forma correta para serem glicosiladas, uma alternativa seria a construção de dois vetores independentes. Neste sentido, alguns autores também relataram a mesma dificuldade para incorporar as glicoproteínas E1 e E2 do HCV nas pseudopartículas virais. Eles demonstraram que o complexo heterodímero formado pelas glicoproteínas E1 e E2 do HCV no retículo endoplasmático ficavam retidos neste, sugerindo que há um sinal específico nesse complexo que é responsável por essa retenção (BEECK; COCQUEREL; DUBUISSON 2001). Entretanto, Bartosch, Dubuisson e Cosset (2003) mostraram que a expressão transiente das glicoproteínas E1 e E2 do HCV em células HEK293 T a partir de um único plasmídeo levou a incorporação específica e eficiente destas glicoproteínas em pseudopartículas geradas a partir de retrovírus. Porém, os resultados de citometria de fluxo (FACs), deste grupo, mostraram que uma pequena fração das glicoproteínas E1 e E2 alcançaram a superfície celular, provavelmente devido à saturação da retenção no retículo endoplasmático em uma superexpressão, o que não foi observado em nosso trabalho.

7 CONCLUSÕES

Adaptamos duas linhagens celulares ao cultivo em SFM. Essas foram capazes de crescer de forma semelhante às cultivadas com SFB e também de produzir ppHCV-RVGP de forma até mais eficiente que as cultivadas em meio com SFB, sendo alternativas promissoras para produção de proteínas e/ou vírus recombinantes.

Assim, a partir dos dados obtidos podemos concluir que:

- A linhagem HEK 293T foi adaptada com sucesso nos meios livre de soro fetal bovino Hybridoma-SFM e CHO-S-SFM II em processo de adaptação gradual.
- A linhagem Huh 7.0 foi adaptada com sucesso nos quatro SFM sugeridos, sendo eles Hybridoma-SFM e CHO-S-SFM II, Pro293a, VP-SFM. Em processo de adaptação sequencial e direta.
- Através da cinética de crescimento celular pudemos avaliar a concentração celular máxima atingida para linhagem HEK 293T, sendo que as células em DMEM 10% SFB atingiram concentração celular mais elevada chegando a $2,6 \times 10^6$ cel/mL em 120 horas de cultivo quando comparadas as células cultivadas em SFM.
- A linhagem Huh 7.0 cultivadas no meio Pro293a obtiveram maior crescimento comparado às cultivadas em outros meios.
- A morfologia das duas linhagens celulares (HEK 293T e Huh 7.0) demonstraram ter valores de diâmetro e volume aproximados às células em meio com 10% SFB, porém não afetou na produção das ppHCV-RVGP.
- O consumo de glicose e glutamina para cada linhagem foi diferente nos SFM. Estes substratos não foram totalmente consumidos na linhagem HEK 293T em meios livres de soro e meio DMEM 10% SFB.
- Para linhagem Huh 7.0 houve um consumo muito maior de glutamina quando comparadas com as células HEK 293T, já a glicose foi totalmente consumida na linhagem Huh 7.0 no meio VP-SFM.
- Com relação à produção de lactato, este subproduto pode ter afetado o crescimento da linhagem Huh 7.0 no meio Hybridoma-SFM.

- A análise de metabólitos mostrou algumas diferenças no consumo de nutrientes e produção de metabólitos entre as linhagens adaptadas nos diferentes SFM, estas diferenças devem estar associadas principalmente à composição química dos SFM utilizados.
- Através do ensaio de cinética de produção de partículas virais em todos os meios avaliados, temos que a coleta das ppHCV-RVGP deve ser feita 48 horas pós-transfecção.
- A análise da quantificação mostrou que o método de co-transfecção por lipofectamina produz mais cópias de RNA/ μL , comparado ao método de eletroporação, sendo que quantificações de $5,30 \times 10^3$ cópias RNA/ μL foram encontradas para vírus produzidos em células adaptadas em Hybridoma- SFM.
- Aumentando as concentrações do vetor pCMV-E1E2 para partículas virais produzidas em meio Hybridoma-SFM as titulações de ppHCV-RVGP não aumentaram, porém para partículas virais produzidas em meio DMEM 10% SFB houve uma maior produção de ppHCV-RVGP utilizando concentrações 3x mais do vetor pCMV-E1E2.
- Independente do meio de cultura e das concentrações do vetor pCMV-E1E2 para montagem das partículas virais as quantificações de ppHCV-RVGP no sobrenadante das infecções foram bem semelhantes, sugerindo que não houve infecção nas células Huh 7.0 em meio livre de soro e meio DMEM 10% SFB.

REFERÊNCIAS*

- ADAM, E. et al. Efficient long-term and high-yielded production of a recombinant proteoglycan in eukaryotic HEK293 cells using a membrane-based bioreactor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 369, n. 2, p. 297–302, 2 maio 2008.
- AKAZAWA, D. et al. Production and characterization of HCV particles from serum-free culture. **Vaccine**, v. 29, n. 29-30, p. 4821–4828, 24 jun. 2011.
- AL-RUBEAI, M. **Animal cell culture**. Dublin, Ireland: Springer, 2014. v. 9
- ALTAMIRANO, C.; BERRIOS, J.; VERGARA, M.; BECERRA, S. Advances in improving mammalian cells metabolism for recombinant protein production. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 1-14, 2013.
- ALTAMIRANO, C.; GÒDIA, F.; CAIRÓ, J. J. Metabolismo de células de mamíferos cultivadas *In Vitro*. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia de cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica**. São Paulo: Roca, 2008. cap. 4, p. 81-104.
- ANDRAWISS, M. et al. Murine leukemia virus particle assembly quantitated by fluorescence microscopy: role of Gag-Gag interactions and membrane association. **Journal of Virology**, v. 77, n. 21, p. 11651–11660, nov. 2003.
- ASHFAQ, U. A. et al. In-vitro model systems to study Hepatitis C Virus. **Genet Vaccines Ther**, v. 9, p. 7, 2011.
- ASTRAY, R. M. et al. Analytical approach for the extraction of recombinant membrane viral glycoprotein from stably transfected *Drosophila melanogaster* cells. **Biotechnol. J.**, v. 3, n. 1, p. 98–103, 2008.
- ATALA, A. Engineering tissues, organs and cells. **Journal of Tissue engineering and Regenerative Medicine**, v. 1, n. 2, p. 83–96, abr. 2007.
- AUGUSTO, E.F.P; OLIVEIRA, M.S. **Processos com Células Animais. In: Biotecnologia Industrial**. [s.l.]: Edgard Blucher, 2001. v. 3
- BABBONI, S. D.; MODOLO, J. R. Raiva: origem, importância e aspectos históricos. **UNOPAR Cient., Ciênc. Biol. Saude**, v. 13, nesp., dez. 2011.
- BACHMANN, M. F.; ZINKERNAGEL, R. M. The influence of virus structure on antibody responses and virus serotype formation. **Immunology Today**, v. 17, n. 12, p. 553–558, dez. 1996.

*De acordo com:

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

BALLS, M. et al. The principles of weight of evidence validation of test methods and testing strategies. The report and recommendations of ECVAM workshop 58. **Alternatives to Laboratory Animals: ATLA**, v. 34, n. 6, p. 603–620, dez. 2006.

BARTENSCHLAGER, R.; LOHMANN, V. Replication of the hepatitis C virus. **Baillière's Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology**, v. 14, n. 2, p. 241–254, abr. 2000.

BARTOSCH, B. et al. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 43, p. 41624–41630, 24 out. 2003.

BARTOSCH, B.; DUBUISSON, J.; COSSET, F. L. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1–E2 envelope protein complexes. **J. Exp. Med.**, v. 197, n. 5, p. 633–642, 2003.

BÉDARD, C.; TOM, R.; KAMEN, A. Growth, nutrient consumption, and end-product accumulation in Sf-9 and BTI-EAA insect cell cultures: insights into growth limitation and metabolism. **Biotechnology Progress**, v. 9, n. 6, p. 615–624, dez. 1993.

BEECK, A. O. D.; COCQUEREL, L.; DUBUISSON, J. Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. **Journal of General Virology**, v. 82, n. 11, p. 2589–2595, 1 nov. 2001.

BELFORD, D. A. et al. Milk-derived growth factors as serum supplements for the growth of fibroblast and epithelial cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal**, v. 31, n. 10, p. 752–760, nov. 1995.

BENMAAMAR, R. et al. High-level expression of rabies virus glycoprotein with the RNA-based Semliki Forest Virus expression vector. **Journal of Biotechnology**, v. 139, n. 4, p. 283–290, 23 fev. 2009.

BENMANSOUR, A. et al. Antigenicity of rabies virus glycoprotein. **Journal of Virology**, v. 65, n. 8, p. 4198–4203, ago. 1991.

BERLEC, A.; STRUKELJ, B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 40, n. 3–4, p. 257–274, abr. 2013.

BIAGGIO, R. T. et al. Serum-free suspension culturing of human cells: adaptation, growth, and cryopreservation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 8, p. 1495–1507, ago. 2015.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, n. 6, p. 1513–1523, 24 nov. 1979.

BRAZUNA, J. C. M.; TEIXEIRA, M. A.; VAN ONSELEN, V. J. An epidemiological description of human-hazardous incidents caused by nonhematophagous bats in Brazil, 2002–2003. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 77, n. 1–2, p. 137–144, 17 nov. 2006.

BRAZZOLI, M. et al. Folding and dimerization of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins in stably transfected CHO cells. **Virology**, v. 332, n. 1, p. 438–453, 5 fev. 2005.

BRUNNER, D. et al. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. **ALTEX**, v. 27, n. 1, p. 53–62, 2010.

CARNEIRO, A. J. B. **Deteção molecular, filogenia e quantificação do vírus da raiva em quirópteros do estado da Bahia, Brasil**. 2010. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2010.

COECKE, S. et al. Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. **Alternatives to Laboratory Animals: ATLA**, v. 33, n. 3, p. 261–287, jun. 2005.

COSTA, W. A. et al. **Manual técnico do Instituto Pasteur: profilaxia da raiva humana**. 2. ed. São Paulo: Instituto Pasteur, 2000. 33 p.

DA ROSA, E. S. T. et al. Bat-transmitted human rabies outbreaks, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 8, p. 1197–1202, ago. 2006.

DELEERSNYDER, V. et al. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. **J. Virol.**, v. 71, n. 1, p. 697–704, jan. 1997.

DENK, P. O.; WUNDERLICH, K.; KNORR, M. [Serum-free cultivation of bovine stromal fibroblasts]. **Der Ophthalmologe: Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft**, v. 95, n. 3, p. 148–152, mar. 1998.

DIETMAIR, S.; NIELSEN, L. K.; TIMMINS, N. E. Mammalian cells as biopharmaceutical production hosts in the age of omics. **Biotechnology Journal**, v. 7, n. 1, p. 75–89, jan. 2012.

DINIZ, M.; FERREIRA, L. C. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. **Estudos Avançados**, v. 24, n.70, p. 19-30, 2010

DOYLE, A.; GRIFFITHS, J. B. Cell and tissue culture: **Laboratory Procedures in Biotechnology**. Canadá: John Wiley & Sons , 1998.

DREWS, M. et al. Pathways of glutamine metabolism in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells: evidence for the presence of the nitrogen assimilation system, and a metabolic switch by ¹H/¹⁵N NMR. **Journal of Biotechnology**, v. 78, n. 1, p. 23–37, 28 fev. 2000.

DUMONT, J. A. et al. Prolonged activity of a recombinant factor VIII-Fc fusion protein in hemophilia A mice and dogs. **Blood**, v. 119, n. 13, p. 3024–3030, 29 mar. 2012.

DUROCHER, Y.; BUTLER, M. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 700–707, dez. 2009.

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

FILIPIC, B. et al. Novel serum replacement based on bovine ocular fluid: a useful tool for cultivation of different animal cells in vitro. **ALTEX**, v. 19, n. 1, p. 15–20, 2002.

FRAZATTI-GALLINA, N. M. et al. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. **Vaccine**, v. 23, n. 4, p. 511–517, 9 dez. 2004.

FRESHNEY, R.I. **Animal cell culture**: a practical approach. IRL Press, 1992.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells**: a manual of basic technique. 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 2000.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells**: a manual of basic technique. 5th ed. New York: John Wiley & Sons, 2005.

FISCHER, S. et al. Transient recombinant protein expression in a human amniocyte cell line: the CAP-T® cell system. **Biotechnology and bioengineering**, v. 109, n. 9, p. 2250–2261, set. 2012.

G1. Globo. Disponível em: <<http://g1.globo.com/mato-grosso-do-sul/noticia/2015/05/paciente-com-raiva-humana-morre-apos-um-mes-internado-em-ms.html>>. Acesso em: 16 nov. 2015

GALARZA, J. M.; LATHAM, T.; CUPO, A. Virus-like particle vaccine conferred complete protection against a lethal influenza virus challenge. **Viral Immunology**, v. 18, n. 2, p. 365–372, 2005.

GAUDIN, Y. et al. Reversible conformational changes and fusion activity of rabies virus glycoprotein. **Journal of Virology**, v. 65, n. 9, p. 4853–4859, set. 1991.

GAUDIN, Y. et al. Rabies virus glycoprotein is a trimer. **Virology**, v. 187, n. 2, p. 627–632, 1992.

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

GERIN, P. A. et al. Improved titers of retroviral vectors from the human FLYRD18 packaging cell line in serum- and protein-free medium. **Human Gene Therapy**, v. 10, n. 12, p. 1965–1974, 10 ago. 1999.

GHEYSEN, D. et al. Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. **Cell**, v. 59, n. 1, p. 103–112, 6 out. 1989.

GOFFARD, A. et al. Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins. **Journal of Virology**, v. 79, n. 13, p. 8400–8409, jul. 2005.

GOFFARD, A.; DUBUISSON, J. Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins. **Biochimie**, v. 85, n. 3-4, p. 295–301, abr. 2003.

GOSPODAROWICZ, D.; ILL, C. R. Do plasma and serum have different abilities to promote cell growth? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 5, p. 2726–2730, maio 1980.

GRAHAM, F. L. et al. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **The Journal of General Virology**, v. 36, n. 1, p. 59–74, jul. 1977.

GRILLBERGER, L. et al. Emerging trends in plasma-free manufacturing of recombinant protein therapeutics expressed in mammalian cells. **Biotechnology Journal**, v. 4, n. 2, p. 186–201, fev. 2009.

GSTRAUNTHALER, G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. **ALTEX**, v. 20, n. 4, p. 275–281, 2003.

GUPTA, P. K. et al. Immunogenic and antigenic properties of recombinant soluble glycoprotein of rabies virus. **Vet Microbiol**, v. 108, n. 3-4, p. 207–214, 2005.

HALDANKAR, R.; KOPCHICK, J. J.; RIDGWAY, D. Stable production of a human growth hormone antagonist from CHO cells adapted to serum-free suspension culture. **Biotechnology Progress**, v. 15, n. 3, p. 336–346, jun. 1999.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, n. 4, p. 557–580, 5 jun. 1983.

HARTUNG, T. et al. Good Cell Culture Practice. ECVAM Good Cell Culture Practice Task Force Report 1. **Alternatives to Laboratory Animals: ATLA**, v. 30, n. 4, p. 407–414, ago. 2002.

HAYASHI, I.; SATO, G. H. Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium. **Nature**, v. 259, n. 5539, p. 132–134, 15 jan. 1976.

HAYTER, P. M. et al. Glucose-limited chemostat culture of Chinese hamster ovary cells producing recombinant human interferon-gamma. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, n. 3, p. 327–335, 5 fev. 1992.

HELLE, F. et al. The neutralizing activity of anti-hepatitis C virus antibodies is modulated by specific glycans on the E2 envelope protein. **Journal of Virology**, v. 81, n. 15, p. 8101–8111, ago. 2007.

HERNANDEZ, J. C.; PIERA, C. M. Ares Trading S.A. **Serum -Free Cell Culture Medium for Mammalian Cells**. US 7,709,229 B2, 04 maio 2010.

HESSE, F.; WAGNER, R. Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures. **Trends in Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 173-180, 2000.

HU, W. S.; AUNINS, J. G. Large-scale mammalian cell culture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 148–153, abr. 1997.

HUNDT, J.; LI, Z.; LIU, Q. Post-translational modifications of hepatitis C viral proteins and their biological significance. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 19, n. 47, p. 8929–8939, 21 dez. 2013.

JACKSON, A. C. **Rabies: scientific basis of the disease and its management**. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 2013.

JALURIA, P. et al. Egr1 and Gas6 facilitate the adaptation of HEK-293 cells to serum-free media by conferring enhanced viability and higher growth rates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, n. 6, p. 1443–1452, 15 abr. 2008.

JOCHEMS, C. E. A. et al. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? **Alternatives to Laboratory Animals: ATLA**, v. 30, n. 2, p. 219–227, abr. 2002.

JOHANSSON, L. et al. Platelet lysate: a replacement for fetal bovine serum in animal cell culture? **Cytotechnology**, v. 42, n. 2, p. 67–74, jul. 2003.

KALLEL, H. et al. Evaluation of various serum and animal protein free media for the production of a veterinary rabies vaccine in BHK-21 cells. **J. Biotechnol.**, v. 95, n. 3, p. 195–204, 2002.

KAPLAN, C. **Rabies**: the facts. 1977. p. 116.

KARLSSON, G. B.; LILJESTRÖM, P. Live viral vectors: Semliki Forest virus. **Methods in Molecular Medicine**, v. 87, p. 69–82, 2003.

KAWANO, M.; MATSUI, M.; HANDA, H. SV40 virus-like particles as an effective delivery system and its application to a vaccine carrier. **Expert Review of Vaccines**, v. 12, n. 2, p. 199–210, fev. 2013.

KESWANI, R. K.; POZDOL, I. M.; PACK, D. W. Design of hybrid lipid/retroviral-like particle gene delivery vectors. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 5, p. 1725–1735, 6 maio 2013.

KIM, C. H.; OH, Y.; LEE, T. H. Codon optimization for high-level expression of human erythropoietin (EPO) in mammalian cells. **Gene**, v. 199, n. 1-2, p. 293–301, 15 out. 1997.

KING, A. M. Q. et al. **Virus taxonomy**: classification and nomenclature of viruses : ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. [s.l.]: Elsevier, 2012.

KRELLER, A. C; OKOLI, A.S; MENDEZ, L. G. Huh- 7 human liver cancer cells: a model system to understand hepatocellular carcinoma and therapy. **Journal of Cancer Therapy**, v 4, p. 606-631, Abr. 2013.

LAVIE, M.; GOFFARD, A.; DUBUISSON, J. Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 9, n. 2, p. 71–86, 2007.

LENTZ, T. L. et al. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? **Science (New York, N.Y.)**, v. 215, n. 4529, p. 182–184, 8 jan. 1982.

LENTZ, T. L. et al. Amino acid sequence similarity between rabies virus glycoprotein and snake venom curaremimetic neurotoxins. **Science (New York, N.Y.)**, v. 226, n. 4676, p. 847–848, 16 nov. 1984.

LINK, T.; BACKSTROM, M.; GRAHAM, R.; ESSERS, R.; ZONER, K.; GATGENS, J.; BURCHELL, J.; TAYLOR-PAPADIMITIOU, J.; HANSSON, G. C.; NOLL, T. Bioprocess

development for the production of a recombinant MUC1 fusion protein expressed by CHO-K1 cells in protein-free medium. **Journal of Biotechnology**, v. 110, p. 51-62, 2004.

LIU, X. M. et al. Suspended aggregates as an immobilization mode for high-density perfusion culture of HEK 293 cells in a stirred tank bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 6, p. 1144–1151, out. 2006.

LOIGNON, M. et al. Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFN α 2b in HEK293 cells. **BMC Biotechnology**, v. 8, p. 65, 2008.

LUA, L. H. L. et al. Bioengineering virus-like particles as vaccines. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 3, p. 425–440, mar. 2014.

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

MARIGLIANI, B. **Caracterização de partículas semelhantes ao vírus HPV16 produzidas em células HEK293T**. 2013. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Internidades em Biotecnologia, USP/ Instituto Butantan/IPT, 2013.

MEI, B. et al. Expression of human coagulation factor VIII in a human hybrid cell line, HKB11. **Molecular Biotechnology**, v. 34, n. 2, p. 165–178, out. 2006.

MENDONÇA, R. Z. et al. Preparation of human rabies vaccine in VERO cell culture using a microcarrier system. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica**, v. 26, n. 12, p. 1305–1317, dez. 1993.

MENDONÇA, R. Z.; PALOMARES, L. A.; RAMÍREZ, O. T. An insight into insect cell metabolism through selective nutrient manipulation. **Journal of Biotechnology**, v. 72, n. 1–2, p. 61–75, 11 jun. 1999.

MERTEN, O. W. et al. Evaluation of the new serum-free medium (MDSS2) for the production of different biologicals: use of various cell lines. **Cytotechnology**, v. 14, n. 1, p. 47–59, 1994.

MORAES, A. M.; MENDONÇA, R. Z.; SUAZO, C. A. T. Culture media for animal cells. In: CASTILHO, L. R. et al. (Ed.). **Animal technology: from biopharmaceuticals to gene therapy**. London: Taylor & Francis Group, 2008. v. 5, p. 11-128.

MORATO, F.; IKUTA, C. Y.; ITO, F. H. Raiva: uma doença antiga, mas ainda atual. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 9, n. 3, p. 20–29, 2011.

MORIMOTO, K. et al. Rabies virus quasispecies: implications for pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 6, p. 3152–3156, 17 mar. 1998.

MURIAUX, D. et al. RNA is a structural element in retrovirus particles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 9, p. 5246–5251, 24 abr. 2001.

NAKABAYASHI, H. et al. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. **Cancer Research**, v. 42, n. 9, p. 3858–3863, Sep. 1982.

NAKAMURA, H. et al. Molecular cloning of complementary DNA for a novel human hepatoma-derived growth factor. Its homology with high mobility group-1 protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 40, p. 25143–25149, 7 out. 1994.

NÈGRE, D. et al. Lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 261, p. 53–74, 2002.

NETO, A. M. S.; RODRIGUES, A. R.; CARVALHO, K. C. N. DE. Caracterização da raiva humana no Brasil no período de 2001 H 2011. **Revista Educação em Saúde**, v. 1, n. 1, 24 jul. 2014.

PALUCHA, A. et al. Virus-Like Particles: Models for Assembly Studies and Foreign Epitope Carriers. In: KIVIE MOLDAVE (Ed.) . **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**. [S.l.]: Academic Press, 2005. p. 135–168.

PATEL, A. H. et al. Construction and characterization of chimeric hepatitis C virus E2 glycoproteins: analysis of regions critical for glycoprotein aggregation and CD81 binding. **The Journal of General Virology**, v. 81, pt. 12, p. 2873–2883, dez. 2000.

PAZOS, P. et al. Culturing cells without serum: lessons learnt using molecules of plant origin. **ALTEX**, v. 21, n. 2, p. 67–72, 2004.

PÉREZ, O.; PAOLAZZI, C. C. Production methods for rabies vaccine. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 340–347, 1 maio 1997.

PERRIN, P. et al. An experimental rabies vaccine produced with a new BHK-21 suspension cell culture process: use of serum-free medium and perfusion-reactor system. **Vaccine**, v. 13, n. 13, p. 1244–1250, set. 1995.

PERRIN, P.; THIBODEAU, L.; SUREAU, P. Rabies immunosome (subunit vaccine) structure and immunogenicity. Pre- and post-exposure protection studies. **Vaccine**, v. 3, n. 3, p. 325–332, set. 1985.

PICANCO-CASTRO, V. et al. Production of recombinant therapeutic proteins in human cells: current achievements and future perspectives. **Protein and Peptide Letters**, v. 20, n. 12, p. 1373–1381, dez. 2013.

POPESCU, C.-I.; DUBUISSON, J. Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. **Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization**, v. 102, n. 1, p. 63–74, jan. 2010.

PORTAL DA SAÚDE. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/mapa_raiva_final_2011.pdf>. Acesso em: 18 ago. 2012.

RAFIQUE, S. et al. Generation of infectious HCV pseudo typed particles and its utilization for studying the role of CD81 & SRBI receptors in HCV infection. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 6, p. 3813–3819, jun. 2014.

RUNGE, D. et al. Serum-free, long-term cultures of human hepatocytes: maintenance of cell morphology, transcription factors, and liver-specific functions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, n. 1, p. 46–53, 5 mar. 2000.

SAKAMOTO, S. et al. Studies on the structures and antigenic properties of rabies virus glycoprotein analogues produced in yeast cells. **Vaccine**, v. 17, n. 3, p. 205–218, 1999.

SAKODA, Y. et al. Establishment of a serum-free culture cell line, CPK-NS, which is useful for assays of classical swine fever virus. **Journal of Virological Methods**, v. 75, n. 1, p. 59–68, nov. 1998.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001

SANDRIN, V. et al. Intracellular trafficking of Gag and Env proteins and their interactions modulate pseudotyping of retroviruses. **Journal of Virology**, v. 78, n. 13, p. 7153–7164, jul. 2004.

SATTERFIELD, B. C. et al. Serologic and PCR testing of persons with chronic fatigue syndrome in the United States shows no association with xenotropic or polytropic murine leukemia virus-related viruses. **Retrovirology**, Short Report, v. 8, n. 12, p. 1–7, 2011.

SCHNEIDER, M. et al. **Epidemiologic situation of human rabies in Latin America in 2004**. 2005.

SCHRÖDER, M. Engineering eukaryotic protein factories. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 2, p. 187–196, fev. 2008.

SCHRÖDER, M.; MATISCHAK, K.; FRIEDL, P. Serum- and protein-free media formulations for the Chinese hamster ovary cell line DUKXB11. **Journal of Biotechnology**, v. 108, n. 3, p. 279–292, 18 mar. 2004.

SELLERS, T. F. Complications of antirabic treatment. **Journal of the Medical Association of Georgia**, v. 36, n. 1, p. 30–35, jan. 1947.

SHARMA, N. R. et al. Hepatitis C virus is primed by CD81 protein for low pH-dependent fusion. **J Biol Chem**, v. 286, n. 35, p. 30361–30376, 2 set. 2011.

SINACORE, M. S.; DRAPEAU, D.; ADAMSON, S. R. Adaptation of mammalian cells to growth in serum-free media. **Molecular Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 249–257, jul. 2000.

SLATER-HANDSHY, T. et al. HCV E2 glycoprotein: mutagenesis of N-linked glycosylation sites and its effects on E2 expression and processing. **Virology**, v. 319, n. 1, p. 36–48, 5 fev. 2004.

SUBRAMANIAN, M. B. et al. Development of foot-and-mouth disease virus (FMDV) serotype O virus-like-particles (VLPs) vaccine and evaluation of its potency. **Antiviral Research**, v. 96, n. 3, p. 288–295, dez. 2012.

SUNLEY, K.; BUTLER, M. Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 385–394, jun. 2010.

SUN, X. et al. Enhancement of transient gene expression by fed-batch culture of HEK 293 EBNA1 cells in suspension. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 11, p. 843–848, jun. 2006.

SWIECH, K. et al. Characterization of growth and metabolism of *Drosophila melanogaster* cells transfected with the rabies-virus glycoprotein gene. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 49, pt. 1, p. 41–49, 2008.

SWIECH, K. et al. Transient transfection of serum-free suspension HEK 293 cell culture for efficient production of human rFVIII. **BMC Biotechnology**, v. 11, p. 114, 2011.

SVS/MS. Secretária de vigilância em saúde, Ministério da Saúde. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tab_casos_raiva_2012.pdf>. Acesso em: 18 ago. 2012.

TAN, S.-L. (Ed.). **Hepatitis C viruses: genomes and molecular biology**. Norfolk (UK): Horizon Bioscience, 2006.

THOMPSON, C. M. et al. Analytical technologies for influenza virus-like particle candidate vaccines: challenges and emerging approaches. **Virology Journal**, v. 10, p. 141, 2013.

THOULOZE, M. I. et al. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. **Journal of Virology**, v. 72, n. 9, p. 7181–7190, set. 1998.

TORDO, N. et al. Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 11, p. 3914–3918, jun. 1986.

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

VAN DER VALK, J. et al. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. **Toxicology in Vitro: an International Journal Published in Association with BIBRA**, v. 18, n. 1, p. 1–12, fev. 2004.

VAN DER VALK, J. et al. Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. **Toxicology in vitro: an International Journal Published in Association with BIBRA**, v. 24, n. 4, p. 1053–1063, jun. 2010.

WAJIH, N.; OWEN, J.; WALLIN, R. Enhanced functional recombinant factor VII production by HEK 293 cells stably transfected with VKORC1 where the gamma-carboxylase inhibitor

calumenin is stably suppressed by shRNA transfection. **Thrombosis Research**, v. 122, n. 3, p. 405–410, 2008.

WAKITA, T. et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. **Nature Medicine**, v. 11, n. 7, p. 791–796, jul. 2005.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks--2003. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 8, p. 865–870, ago. 2003.

WALSH, G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 17-18, p. 773–780, set. 2010.

WEN, B. et al. The novel replication-defective vaccinia virus (Tiantan strain)-based hepatitis C virus vaccine induces robust immunity in macaques. **Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 21, n. 9, p. 1787–1795, set. 2013.

WHITACRE, D. C.; LEE, B. O.; MILICH, D. R. Use of hepadnavirus core proteins as vaccine platforms. **Expert Review of Vaccines**, v. 8, n. 11, p. 1565–1573, nov. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Rabies is a zoonotic viral disease which infects domestic and wild animals.** Disponível em: <<http://www.who.int/immunization/diseases/rabies/en/>>. Acesso em: 11 set. 2014.

YIN, J. et al. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. **Journal of Biotechnology**, v. 127, n. 3, p. 335–347, 10 jan. 2007.

ZHU, J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 5, p. 1158–1170, out. 2012.