SANDRA FERNANDA SUÁREZ PATIÑO

PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM CÉLULAS BHK-21 CULTIVADAS EM MEIO LIVRE DE SORO FETAL BOVINO

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

São Paulo
2016

SANDRA FERNANDA SUÁREZ PATIÑO

PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM CÉLULAS BHK-21 CULTIVADAS EM MEIO LIVRE DE SORO FETAL BOVINO

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 Dissertações 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

Suárez Patiño, Sandra Fernanda.
Produção de proteínas recombinantes em células BHK-21 cultivadas em meio livre de soro fetal bovino / Sandra Fernanda Suárez Patiño. -- 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 proteínas recombinantes.

Versão do título para o inglês: Production of recombinant proteins in BHK-21 cells cultured in serum free media.

1. Meios livres de soro 2. Soro fetal bovino 3. Vírus da Floresta Semliki 4. Proteína verde fluorescente 5. Proteína não estrutural 3 do vírus do HCV 6. Células de rim 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/SBIB027/2016

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

---

Candidato(a): Sandra Fernanda Suárez Patiño.

Título da Tese: Produção de proteínas recombinantes em células BHK-21 cultivadas em meio livre de soro fetal bovino.

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 produção das proteínas recombinantes RVGP e NS3 em células de mamíferos BHK-21 cultivadas em meio livre de soro fetal bovino", **protocolo nº 907/12**, sob a responsabilidade de Soraia Attie Calil Jorge, Carlos Augusto Pereira e Sandra Fernanda Suárez Patiño – 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 "Study of the production of recombinant proteins RVGP and NS3 in mammalian cells BHK-21 grow in a medium free of bovines fetal serum", **protocol number 907/12**, under the responsibility of Soraia Attie Calil Jorge, Carlos Augusto Pereira and Sandra Fernanda Suárez Patiño – 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 - 03/2016	**N° 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 Família:

Se eu enxerguei mais longe, foi porque estava sobre ombros de gigantes." (Isaac Newton).

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos são só uma ínfima parte do que realmente desejo expressar, porque toda a ajuda recebida no poderia ser calculada simplesmente com palavras…

Deus: Quem se encontra presente em cada coisa que eu faço, aquele que ilumina a minha vida e os meus pensamentos, esse único ser que conhece o motivo da minha presença neste mundo. Porque meu caminho é teu, não tem nada do meu destino oculto e toda conquista só pode ser possível porque o Senhor tem conquistado primeiro.

Brasil: País maravilhoso, onde tenho passado anos inesquecíveis e conhecido pessoas maravilhosas.

Mis padres: Por ser ejemplo de pareja, de dedicación y de entrega total. Mis conquistas son también de ustedes, porque represento una parte de cada uno. Han sido 7 años en la distancia, pero no ha pasado un día en el que me haya sentido sola, porque su espíritu me acompaña, porque su amor ha sido tan grande que han superado el sacrificio de mi ausencia para verme feliz.

Jackson: Meu companheiro e amigo incondicional. Obrigada por estes 16 anos juntos, obrigada pela paciência e amor constante, por fazer parte da minha vida e por me convidar a percorrer o mesmo rio e compartilhar os mesmos sonhos. Hoje tuas palavras são uma realidade: El camino y el tiempo compartidos son el pilar de nuestros triunfos.

Minha irmã Yaneth: Porque sem dar conta faz que cada dia eu queira me esforçar mais para ser melhor para conseguir meus propósitos. Obrigada por esse sobrinho lindo, Sebastián.

Minha orientadora Soraia Jorge: obrigada pela confiança depositada em mim, pelos ensinamentos, pela força e pelo exemplo como pessoa.

Renato Astray: pelo exemplo, não só como cientista, mas também como pessoa e sua particular forma de viver a vida.

Doutor Carlos Augusto Pereira, por acreditar em mim, pela oportunidade de ser parte do seu laboratório, pelas tantas contribuições e pelo exemplo como pesquisador.

Minhas segundas Mães: Mara e Joaquina, por tantos mimos, pela companhia e por tantos ensinamentos da vida.

Mi segunda família: Doña Rosita, Don Fredy, Leonardo, Paola, Alejandro, Adriana, Laura, por creer en mí, por hacerme sentir como una más de la família y porque cuando estoy con ustedes las risas y las historias nunca acaban.

Pessoal do iBET laboratório dos Vírus: Ana Sofia, Hugo, Helio, Ana Isabel, Ana, Miguel, por me adotar no outro continente! Fizeram que minha experiência europeia fosse maravilhosa, com certeza lembrarei de vocês para sempre.

Amigos do LATECC: Ana Carolina, Camilo, Amanda. Ao Camilo por ser meu mestre no laboratório. E as meninas por estarem sempre dispostas a me ajudar de forma desinteressada quando fiquei órfã em lugares desconhecidos, obrigada por fazer esse momento muito fácil!

Minhas companheiras de moradia: Camila, Aline, Caroline, por todos os momentos de descontração, de risadas, de carinho e de mudanças.

Meus amigos Colombianos em Brasil: Ana Maria, Galia, Sandra, Aymer, Carolina, Jennifer, por cada conversa, pelas alegrias e tristezas divididas, pelos momentos que só nós podemos entender nesta experiência de ser colombianos no Brasil...

Time do laboratório de Imunologia Viral: Aos que estão: Vera, Mayra, Daniella, Rose, Nayara, Livia, Flavia, Juliana, Alexandre, Denny, Lúcia, Silvana, Julia e aos que passaram: Marcos, Luciana, Mariza, Polyana, Mari, Fernanda, Alessandra, Aline... (em 5 anos se conhece muita gente), obrigada pela ótima convivência, ensinamentos, diversão, carinho e palavras de apoio em momentos de dificuldade. No fim, obrigada porque foram vocês que me aguentaram pelos últimos 5 anos.

Agradeço a Monize pelas análises de aminoácidos, ao Gustavo pelo apoio para as análise estatísticas e a Marilena pela ajuda com análise de metabólitos e ajuda na revisão da qualificação.

As minhas amigas Thaissa Bernardino, pelo apoio e companhia incondicional, pela ajuda em inúmeros momentos, pelos ensinamentos, por ser minha magrinha preferida, obrigada por não me abandonar nunca! e Ana Lia Pradella Puglia, por estes 5 anos de confidencias, de amizade, de companhia, chegaremos nos 8!!! Ando me sentindo sua irmã!!

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

Ao Jorge Mario Da Costa Ferreira Junior do Laboratório de Imunoquímica pelas análises de citometria de fluxo.

A FAPESP pela bolsa concedida, pelo apoio financeiro que faz possível que o conhecimento de pessoas com sonhos se tornem realidade. Obrigada por ser exemplo de qualidade e garantir de forma equitativa o desenvolvimento da ciência a pessoas do mundo todo.

"Cada persona que pasa por nuestra vida es única. Siempre deja un poco de sí y se lleva un poco de nosotros. Habrán los que se llevan mucho pero, no habrá quien no deje nada. Esta es la prueba evidente de que dos almas no se encuentran por casualidad". Anónimo

La capacidad es de poca importancia, sin una oportunidad.

Napoleon bonaparte

“A grandeza de um ser humano não está no quanto ele sabe, mas no quanto ele tem consciência que não sabe”.

Augusto Cury

Sejam quais forem os resultados com êxito ou não, o importante é que no final cada um possa dizer: 'fiz o que pude'.

Louis Pasteur

RESUMO

SUÁREZ-PATIÑO, S. F. **Produção de proteínas recombinantes em células BHK-21 cultivadas em meio livre de soro fetal bovino** 2016. 125 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Vetores virais e células eucariotas têm sido reconhecidos como a abordagem mais eficiente na obtenção de proteínas recombinantes, uma vez que elas permitem a obtenção de uma proteína com as devidas alterações pós traducionais necessárias para sua atividade. Células eucariotas são geralmente cultivadas com soro, principalmente o soro fetal bovino (SFB), porém, abordagens biotecnológicas atuais sobre cultura de células devem evitar o uso deste suplemento, devido a problemas de custo, variações entre os lotes e risco de contaminação. Assim, foi nosso objetivo adaptar células BHK-21 a cultivos em meios livres de SFB (SFM-*serum free media*) e avaliar suas características de crescimento, bem como a expressão de proteínas recombinantes usando o sistema SFV (*Semliki Forest Virus*). Três proteínas foram analisadas: GFP (proteína verde fluorescente), NS3 (proteína não estrutural 3 do vírus da hepatite C) e RVGP (glicoproteína do vírus da raiva). Duas linhagens de células BHK-21 foram utilizadas, uma com crescimento aderente e outra em suspensão. A adaptação das células BHK-21-aderentes foi realizada em quatro SFM comerciais, enquanto a adaptação das células BHK-21-C13-suspensão em 2 SFM. Os parâmetros cinéticos analisados foram crescimento e viabilidade celular, bem como a concentração de glicose, glutamina e lactato. Em relação a esses parâmetros apenas um dos meios estudados (VP-SFM) apresentou resultados inferiores ao controle (meio suplementado com SFB). Em seguida, avaliamos a produção de VRPs (*virus replicon particles*) de SFV carregando diferentes RNAs: SFV-GFP; SFV-NS3 e SFV-RVGP em células BHK-21-aderentes estabelecidas em SFM. A quantificação das VRPs de SFV, realizada pela técnica de qRT-PCR, mostrou que células adaptadas em meio CHO-S-SFMII apresentaram 7 vezes mais VRPs quando comparado com o valor obtido em células crescendo em DMEM com 10% de SFB (para todos os SFVs). Em seguida, foi avaliada a capacidade infecciosa das VRPs e consequente expressão da proteína de interesse em células crescendo em SFM. Três diferentes proteínas foram expressas: GFP, NS3 e RVGP. A porcentagem de células fluorescentes quando infectadas com SFV-GFP esteve entre 80-90% em células cultivadas em SFM frente a 98% em células cultivadas com SFB. A atividade protease da NS3 obtida em células infectadas com SFV-NS3 cultivadas em SFM (Hybridoma-SFM e CHO-SFMII) foi superior quando comparada a células suplementadas com SFB. A expressão específica da RVGP em células infectadas com SFV-RVGP e cultivadas em SFM foi de 1 a 2 μg /10^6cel enquanto células suplementadas com SFB atingiram 1,5 μg /10^6cel. O padrão de amplificação do mRNA-NS3 e do mRNA-RVGP mostraram que células estabelecidas em SFM processaram corretamente o SFV, mostrando um pico de mRNA entre 12-24 horas pós-infecção. Finalmente, um experimento de infecção foi realizado com as células BHK-21-C13 cultivadas em *spinner*, atingindo uma expressão de RVGP de 150 ng/mL em células em SFM e 300 ng/mL em células com SFB. O ensaio de *Western Blot* mostrou que a RVGP expressa tanto em células BHK-21 aderentes quanto BHK-21-C13 em suspensão possui uma conformação e tamanho esperados para esta proteína. Assim, de maneira geral, células BHK-21 cultivadas em SFM se mostraram promissoras em relação ao seu crescimento, geração de VRPs e expressão de proteínas recombinantes em comparação às células cultivadas em meio suplementado com SFB.

Palavras chave: Células BHK-21. Meio Livre de Soro. Soro Fetal Bovino-SFB. *Semliki Forest Virus*. Proteína Verde Fluorescente. Proteína Não Estrutural 3 do Vírus da Hepatite C. Glicoproteína do Vírus da Raiva.

ABSTRACT

SUÁREZ-PATIÑO, S. F. **Production of recombinant proteins in BHK-21 cells cultured in serum free media.** 2016. 125 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Viral vectors and eukaryotic cells have been recognized as the most efficient tool for the production of recombinant proteins since they allow a high efficiency and the obtained protein conserve the properly fold, and yield native-like post-translational modifications. Eukaryotic cells are cultured with serum, however current biotechnological approaches of cell culture need to avoid the use of serum due to the high costs, lot-to-lot variation and risk of contamination. Thus, our aim was to adapt BHK-21 cells to serum free culture and to assess their growth characteristics as well as the recombinant protein expression based on Semliki Forest Virus system. Three proteins were analyzed: GFP (green fluorescent protein); NS3 (Hepatitis C virus non-structural protein 3) and RVGP (rabies virus glycoprotein). Two BHK-21 cell lines were used, adherent and suspension lines. BHK-21 (adherent) cells were adapted to 5 different SFM, while BHK-21 C13 (suspension) cells were adapted to 2 SFM. The main kinetic parameters to be analyzed were: the cell growth, cell viability and glucose, glutamine and lactato concentration. Only the VP-SFM results in kinetic parameters lower when compared to control (with SFB). Then we evaluate the VRPs-SFV (virus replicon particles) production carrying different RNAs: SFV-GFP; SFV-NS3 and SFV-RVGP in BHK-21-adherent cells established in SFM. The quantification of VRPs SFV was carried out by qRT-PCR and showed that BHK-21-CHO cells generated seven times more VRPs in relation to cells growing in DMEM with 10% FBS. Then we assessed the infectious ability of VRPs and protein expression in cells growing in SFM. Three different proteins were expressed: GFP, NS3 and RVGP. Cells cultured in SFM infected with SFV-GFP showed 80-90% of fluorescent cells in comparison with 98% in cells grown with FBS. The NS3 protease activity obtained in cells infected with SFV-NS3 cultured in SFM (Hybridoma-SFM and CHO-SFMII) was greater when compared to cells supplemented with FBS. The RVGP specific expression in cells infected with SFV-RVGP and cultured in SFM was 1 a 2 μg /10^6cel while cells supplemented with FBS reached 1,5 μg /10^6cell. The pattern of amplification of mRNA-NS3 and mRNA-RVGP in infected cells cultured in SFM has showed a correct virus processing, displaying a peak of mRNA between 12-24 hours post-infection. Finally, BHK-21 C13 cells grown in spinner were infected with SFV-RVGP. The RVGP expression was 150 ng /mL in cells cultured in SFM and 300 ng/mL in cells supplemented with FBS. The Western Blot assay showed that RVGP expression both BHK-21 cells (adherent) and BHK-21-C13 (suspension) has a conformation and size expected for this protein. Thus, in general, BHK-21 cells cultured in SFM were promising with regard to their growth, VRPs production and recombinant protein expression when compared with cells cultured in SFB.

Keywords: BHK-21 cells. Serum-free medium. Fetal Bovine Serum. Semliki Forest Virus. Green Fluorescent Protein. Hepatitis C virus Non-structural Protein 3. Rabies Virus Glycoprotein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pirâmide para o desenvolvimento de um meio de cultura livre de soro e quimicamente definido. 23
Figura 2. Estrutura e genoma do SFV 27
Figura 3. Ciclo de vida dos alfavírus 28
Figura 4. Geração de VRPs de SFV recombinantes 30
Figura 5. Estrutura e Genoma do HCV 34
Figura 6. Brasil-Raiva humana por espécies animais de transmissão, 1986 -2015. 37
Figura 7. Estrutura e genoma do vírus da Raiva 39
Figura 8. Esquema do trabalho para expressão de proteínas recombinantes em células BHK-21 adaptadas em SFM 43
Figura 9. Representação esquemática do procedimento de adaptação em SFM. 45
Figura 10. Mapa dos vetores plasmidiais. 48
Figura 11. Células BHK-21 aderentes durante processo de adaptação. 60
Figura 12. Células BHK-21 aderentes adaptadas pós-descongelamento. 61
Figura 13 – Composição de aminoácidos essenciais nos meios de cultura usados na adaptação. 63
Figura 14. Cinética de células BHK-21 adaptadas em SFM 66
Figura 15. Células BHK-21 C13 em suspensão adaptadas em SFM 69
Figura 16. Células BHK-21 C13 em suspensão cultivadas em frasco *spinner* 71
Figura 17. Curva padrão e de dissociação obtidas da qRT-PCR. 74
Figura 18. Expressão de GFP em células BHK-21 cultivadas em SFM 78
Figura 19. Expressão de GFP em células BHK-21 usando diferentes SFV-GFP 80
Figura 20. Expressão mRNA-NS3 através da técnica de qRT-PCR 82
Figura 21. Atividade protease de NS3 expressa em células BHK-21 84
Figura 22. Expressão de RVGP em células BHK-21 cultivadas em SFM 86
Figura 23. Média da expressão de GFP em células infectadas com SFV-GFP 88
Figura 24. Expressão de RVGP em células BHK-21 usando diferentes SFV-RVGP 88
Figura 25. Expressão relativa de mRNA-RVGP através da técnica de qRT-PCR 91
Figura 26. Expressão de RVGP em células BHK-21-C13 cultivadas em *spinner* 92
Figura 27. Análise da expressão de RVGP através da técnica de *Western Blot* 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Meios de cultura livres de SFB usados na adaptação. 44
Tabela 2 - Condições de eletroporação 49
Tabela 3- Características dos oligonucleotídeos usados como *primers* para quantificação das VRPs 51
Tabela 4 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados como *primers* para quantificação do mRNA-NS3 e mRNA-RVGP 57
Tabela 5 - Resultado da adaptação nos meios de cultura livres de SFB. 58
Tabela 6- Concentração de Glicose, Lactato, Glutamina e Glutamato nos meios de cultura usados na adaptação. 62
Tabela 7 - Resumo dos principais parâmetros cinéticos de células BHK-21 adaptadas em SFM. 68
Tabela 8 - Resumo dos principais parâmetros cinéticos de células BHK-21-C13 adaptadas em SFM. 70
Tabela 9 - Resumo dos principais parâmetros cinéticos de células BHK-21 C13 adaptadas em SFM cultivadas em frasco *spinn*er. 72
Tabela 10- Títulos virais de SFV determinados por qRT-PCR. 76
Tabela 11- Análise estatística de TUKEY das médias de expressão de RVGP das células BHK-21 adaptadas em diferentes meios de cultura (nível de significância de 95%). 87
Tabela 12- Análise estatística de TUKEY das médias de expressão de RVGP células BHK-21 infectadas com os vírus SFV-RVGP-Hyb; SFV-RVGP-CHO e SFV-RVGP-DMEM (nível de significância de 95%) 89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHK-21	*Baby Hamster Kidney cells*
CHO	*Chinese Hamster Ovary cells*
HEK-293	*Human Embryonic Kidney 293 cells*
VERO	*Green Monkey Kidney cells*
HUH 7.0	*Human Hepato Cellular Carcinoma*
DH5α	Cepa da bactéria *Escherichia coli*
SFV	*Semliki Forest Virus*
VRPS	*Viral Replicon Particle*
HCV	Vírus da Heptite C
SFB	Soro Fetal Bovino
SFM	*Serum-free médium*
ITS	Suplemento Insulina, Transferrina, Selênio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RT	*Reverse Transcription*
qRT-PCR	PCR quantitativa em tempo real
GFP	*Green Fluorescent Protein*
RVGP	*Rabies Virus Glycoprotein*
NS3	Proteína não estructural do vírus HCV
DMSO	Dimetilsulfoxido
EDTA	*Ethylenediaminetetraacetic acid*
FACS	*Fluorescence activated cell sorting*
FDA	*Food and Drug Administration*
WHO	*World Health Organization*
GFP	*Green Fluorescent Protein*
Meio LB	Meio de cultura de bactérias Luria Bertani
PBS	Tampão fosfato-salino
dNTPs	*Deoxyribonucleotide Triphosphates*
Mabs	Anticorpo Monoclonal
ORF	O*pen Reading Frames*
MS	Ministerio de Saúde
SVS	Sistema de Vigilância em Saúde
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium*

IMDM	*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*
TM	*Melting temperature*
CT	*Cycle Treshold*
ELISA	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19

2.1 Expressão de Proteínas Recombinantes 19

2.2 Sistemas livres de Soro Fetal Bovino (SFB) 20

2.3 Sistema de expressão usando o Semliki Forest Virus (SFV) 25

2.4 Proteína GFP como repórter de sistemas recombinantes 31

2.5 Trajetória e relevância de uma vacina para HCV 32

2.5.1 Vírus do HCV *33*

2.5.2 Proteína não estrutural NS3 do vírus da hepatite C *35*

2.6 Trajetória e relevância da vacina contra a raiva 36

2.6.1 Vírus da Raiva *38*

2.6.2 Glicoproteína do Vírus da Raiva (RVGP) *39*

3 OBJETIVOS 42

3.1 Objetivo Geral 42

3.2 Objetivos Específicos 42

4 MATERIAL E METODOS 43

4.1 Linhagens celulares 43

4.2 Meios de cultura 43

4.3 Manutenção das células 44

4.4 Adaptação celular em meios livres de SFB 45

4.5 Preservação das células 45

4.6 Análise de densidade e viabilidade celular 46

4.7 Ensaios de crescimento 46

4.8 Análise de metabólitos 46

4.9 Obtenção de VRP baseadas no sistema Semliki Forest Virus- SFV (SFV-GFP; SFV-RVGP e SFV-NS3) 47

4.9.1 Amplificação dos vetores *48*

4.9.2 Transcrição in vitro *48*

4.9.3 Transfecção por eletroporação *49*

4.10 Detecção e quantificação viral 49

4.10.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR) *50*

4.10.2 qRT-PCR para titulação das VRPs de SFV *51*

4.11 Infecção com VRPs de SFV 52

4.12 Análise de proteína *53*
4.12.1 Citometria de fluxo *53*
4.12.2 ELISA *53*
4.12.3 Western Blotting *54*
4.12.4 Teste de detecção da atividade protease da NS3 ..... *55*
4.12.5 Análise mRNA de NS3 e RVGP por qRT-PCR *56*
4.13 Análise de resultados *57*
5 RESULTADOS **58**
5.1 Adaptação em meios livres de soro fetal bovino *58*
5.1.1 Células BHK-21 aderentes 58
5.1.2 Células BHK-21 C13 Suspensão 59
5.2 Análise da morfologia *59*
5.3 Cinética de crescimento e consumo/produção de metabólitos *62*
5.3.1 BHK-21 aderentes 64
5.3.2 BHK-21 C13 em suspensão 68
5.3.3 BHK-21-C13 em suspensão adaptadas em SFM cultivadas em frasco spinner 70
5.4 Produção de VRPs de SFV *73*
5.5 Expressão de proteínas recombinantes em células cultivadas em SFM *76*
5.5.1 Expressão de GFP 76
5.5.2 Expressão de NS3-HCV dominio protease 81
5.5.3 Expressão de RVGP 84
6 DISCUSSÃO **94**
7 CONCLUSÕES **111**
REFERÊNCIAS* **112**

1 INTRODUÇÃO

O crescimento substancial realizado na área de produtos biológicos criou uma demanda contínua por plataformas de expressão novas e aprimoradas. Já faz alguns anos que as células de mamíferos têm sido as preferidas pela indústria, devido à necessidade de produtos mais complexos e devidamente processados, assim se tornaram a base para 43% das proteínas aprovadas (BERLEC; STRUKELJ, 2013). O cultivo de células animais em larga escala é amplamente usado por laboratórios de investigação básica e por indústrias para a obtenção de uma grande variedade de produtos destinados à investigação, diagnóstico, uso terapêutico e também controle biológico na agricultura. Um considerável esforço tem sido despendido no sentido de se desenvolver metodologias que possam permitir uma alta produção em larga escala com alto grau de controle, reprodutibilidade e qualidade.

Os meios de cultura utilizados na manutenção destes sistemas tradicionalmente precisam ser suplementados com Soro Fetal Bovino (SFB), para atingir altas taxas de proliferação, viabilidade e produção. Entretanto, o uso do SFB não é aconselhável devido às variações encontradas entre os lotes, o alto grau de proteína animal e a possibilidade da presença de agentes infecciosos. Assim, hoje em dia há uma forte recomendação por parte das agências controladoras da qualidade de bioprodutos para uso em humanos para evitar o uso deste suplemento, devido ao risco de contaminação. Avanços tecnológicos resultaram em meios de cultura sintéticos prontos livres de soro, padronizados e capazes de suprir as necessidades de células animais, porém sendo requerido um processo, muitas vezes longo, de adaptação dessas células.

Um segmento muito importante da área biofarmacêutica trata da produção de vacinas, área que também tem evoluído bastante graças aos avanços em virologia molecular, esses avanços permitiram que fosse possível obter vacinas mais seguras a partir de vírus atenuados, e ainda obter a purificação de antígenos virais a partir de sistemas de expressão altamente eficientes. As vacinas baseadas no uso das proteínas antigênicas do vírus têm sido testadas em modelos experimentais, onde mostraram prover proteção frente ao desafio viral (RAMYA et al., 2011; WOJCZYK et al., 1998; YOKOMIZO et al., 2007). Desta forma, as vacinas recombinantes baseadas no uso de antígenos virais oferecem num mesmo produto biológico a eficácia das vacinas convencionais e a segurança de vacinas inativadas.

A expressão recombinante de antígenos virais e outras proteínas tornou-se possível graças à tecnologia do DNA recombinante que permite a transferência de genes exógenos dentro de células hospedeiras. Esta transferência é feita usando vetores que carregam o gene

de interesse e facilitam sua entrada na célula. Assim, foram desenvolvidos vetores de expressão virais e não virais (plasmidiais) para exercer esta função. A seleção do vetor depende da aplicação, da célula hospedeira, do nível de produto desejado e da segurança desejada (BALDI et al., 2007).

Os vetores virais possuem fortes promotores gênicos que garantem altos níveis de expressão do transgene, além disso, possuem uma alta eficiência de infecção e, portanto, de introdução do gene na linhagem celular desejada (TWYMAN, 2004). Desta forma, se tornam ferramentas poderosas na produção de vacinas e no uso como terapia gênica. Entre diversos vírus usados como vetores, os alfavírus se destacam por possuir uma organização genômica simples e uma eficiente propagação em diferentes linhagens celulares, o que tem promovido seu uso em diferentes aplicações biotecnológicas, usado como vacina de DNA e RNA, assim como para terapia anticâncer. O *Semliki Forest Virus* (SFV) é um alfavírus bastante usado como plataforma para expressão de proteínas recombinantes. O sistema SFV caracteriza-se pela capacidade de produzir uma grande quantidade de RNA mensageiro de interesse nas células infectadas, levando a um alto nível de expressão em culturas celulares ou *in vivo* da proteína recombinante.

Diante deste cenário, utilizamos o sistema de expressão gênica derivado do SFV para avaliarmos a expressão das proteínas recombinantes GFP (proteína verde fluorescente), RVGP (glicoproteína do vírus da raiva) e NS3 (proteína não estrutural 3 do vírus da hepatite C) em células BHK-21 cultivadas em diferentes meios de cultura livres de SFB. A importância desta abordagem de cultivo visa à melhoria na expressão de proteínas heterólogas, utilizando meios de cultura que permitam a otimização da transfecção de material genético, seja através de DNA ou RNA ou ainda vírus e, posteriormente, da purificação da proteína ou vírus recombinante. Este trabalho ainda se torna importante dentro da linha de pesquisa do laboratório, pois confirma a eficiência de técnicas já padronizadas e ainda garante avanços no estudo da proteína RVGP, que vem sendo estudada através de diferentes sistemas de expressão.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Expressão de Proteínas Recombinantes

Nas últimas décadas as proteínas recombinantes usadas como terapêuticos tem revolucionado o semblante da medicina contemporânea e diversas terapias tem se iniciado para diferentes doenças, representando um importante segmento do mercado de biofarmacêuticos. Desde a década de 80, quando a insulina recombinante se tornou a primeira proteína a ser aprovada, o mercado global de fármacos gerados a partir da biotecnologia tem mostrado um crescimento de aproximadamente 31%, indicando um futuro sólido dentro da indústria biofarmacêutica (DABHOLE, 2014). A produção de proteínas recombinantes pela indústria biofarmacêutica atendeu um mercado global de US$ 99 bilhões em 2009 (WALSH, 2010). Em 2012, esta indústria faturou US$ 165 bilhões, sendo $110 bilhões relativos à anticorpos e outras r-proteínas (com uma taxa de crescimento anual de 15%). Existem mais de 425 produtos biofarmacêuticos aprovados nos Estados Unidos e na União Europeia, sendo 140 proteínas recombinantes. Destas, 40 têm receitas superiores a $1 bilhão/ano (RADER, 2013).

Dentro do mercado biofarmacéutico o segmento de vacinas, ainda representando uma pequena faixa, tem um rápido crescimento, que impulsionado pela tecnologia do DNA recombinante abriu várias perspectivas para inovação de vacinas. 75% do mercado global da produção de vacinas se encontra liderado por multinacionais, porém, diferentes economias emergentes, assim como o Brasil, têm se esforçado para incrementar sua participação no mercado global de vacinas (HOMMA et al., 2013).

O desenvolvimento de vacinas para doenças infecciosas no Brasil tem sido conduzido principalmente por institutos de pesquisa públicos e universidades, através de transferência de tecnologia ou acordos com empresas multinacionais (HOMMA et al., 2013), este fato torna sumamente importante nossa participação dentro do Instituto Butantan no adiantamento de pesquisas na área de biotecnologia.

A produção de proteínas recombinantes em grande escala, já abrange os substitutos de hormônios ou mediadores intercelulares humanos e proteínas virais potencialmente usadas na vacinação ou imunomodulação em humanos e animais. A produção de proteínas recombinantes heterólogas envolve uma série de passos, iniciando-se com a identificação e caracterização genética da proteína e das suas propriedades bioquímicas, seguido da definição

dos requisitos estruturais para a sua atividade funcional, como as modificações pós-traducionais, entre elas a glicosilação, a formação de heterodímeros, etc. A produção propriamente dita envolve a escolha do vetor de expressão e das células, em função da complexidade de processamento molecular necessário para a obtenção da proteína funcional, o aperfeiçoamento do bioprocesso de produção e a separação, purificação e preparo para o uso da proteína (BOROJEVIC, 2009).

Enquanto plataformas de expressão usando *Escherichia coli*, leveduras e células de inseto continuam sendo preferidas por muitos grupos de pesquisa, a expressão de proteínas humanas ou de mamíferos muitas vezes necessitam ser produzidas em células de mamíferos para uma correta atividade. Desta forma, a maior parte dos produtos biológicos disponíveis tem sido produzidos em linhagens celulares de mamíferos, devido às exigências de modificações pós-traducionais e a complexidade biosintética das proteínas alvo (ZHU, 2012).

Dentre as células de mamífero a maioria dos produtos biofarmacêuticos aprovados, têm sido produzidos em células CHO, NS0-Sp2/0-Ag14, HEK293, VERO e BHK-21 (BIRCH; RACHER, 2006; MEYER et al., 2008; WALSH, 2006; ZHANG, 2010). Células BHK-21 fazem parte importante do cenário biotecnológico na produção de biofarmacéuticos, sendo usadas para a produção do Fator VIII comercializado pela Bayer (Helixate NexGen e Kogenate/Helixate) e Fator VIIa comercializado pelo Novo Nordisk (NovoSeven) (PIPE, 2008; WALSH, 2014) e ainda sendo empregadas como plataforma para produção das vacinas veterinárias contra Aftosa (CAPSTICK et al., 1965; MOWAT; CHAPMAN, 1962) e Raiva (GALLEGOS GALLEGOS et al., 1995; PERRIN et al., 1995). Além disso, estas células têm sido utilizadas para a produção e detecção de diferentes vírus, e produção de proteínas recombinantes em diferentes laboratórios de pesquisa. Para o nosso caso particular é importante ressaltar que esta linhagem tem sido largamente usada para titulação de diferentes arbovírus (BERGOLD; MAZZALI, 1968), sendo as células BHK-21 a principal plataforma para análise e produção de *Semliki Forest* recombinantes, baseados no arbovírus SFV (LUNDSTROM, 2014).

2.2 Sistemas livres de Soro Fetal Bovino (SFB)

Como dito em parágrafos anteriores a produção de proteínas terapêuticas é realizada principalmente em células animais em cultura, porém o cultivo de células de mamífero requer condições mais rigorosas que as células de microrganismos, como meios de cultura mais complexos, controle de CO_2, suprimento de oxigênio, cuidados com estresse mecânico e

maior atenção em relação à esterilidade e manipulação. De igual forma, a suplementação com soro animal de diferentes fontes (adulto, recém-nascido ou fetal) é essencial para o crescimento celular, metabolismo adequado e para estimular a proliferação celular e para garantir a obtenção de altas densidades de células animais para a expressão de antígenos virais (CULP; MURRAY; ROLLINS, 1979). O soro fetal bovino (SFB) é uma mistura complexa que fornece fatores hormonais que estimulam o crescimento, a proliferação e favorecem a diferenciação celular; proteínas de transporte para hormônios minerais e elementos traço (transferrina) e lipídeos (lipoproteínas); fatores necessários para adesão celular e espalhamento, agindo como pontos de germinação para adesão das células; fatores de estabilização e desintoxicantes necessários para manter o pH e para inibir as proteases que agem de forma direta como a α-antitripsina ou α-macroglobulina, ou indireta atuando como um dissipador para proteases e outras moléculas (tóxicas) (BRUNNER et al., 2010). Recentes estudos de proteômica e metabolômica revelaram que o soro contem aproximadamente 1800 proteínas (ANDERSON; ANDERSON, 2002; ANDERSON et al., 2004) e mais de 4000 metabólitos (PSYCHOGIOS et al., 2011). Estes aspectos fazem que o SFB seja considerado um suplemento universal, já que favorece o crescimento de todas as linhagens celulares incluindo as células de inseto (GSTRAUNTHALER; LINDL; VAN DER VALK, 2013; GSTRAUNTHALER, 2003), e desta maneira foram diminuídos o tempo e esforço gastos para o desenvolvimento de um meio de cultura para uma linhagem celular específica (GSTRAUNTHALER, 2003).

Porém, o uso do SFB é polêmico por algumas razões. A primeira delas é a científica, já que do ponto de vista da biologia celular, o SFB não é completamente definido, contendo uma mistura de diferentes componentes com variações qualitativas e quantitativas, variações entre diferentes lotes e variações na origem geográfica do soro, estas diferenças trazem variabilidade nos resultados obtidos em diferentes experimentos; em seguida se encontram os aspectos de biossegurança, pois o SFB pode introduzir diferentes contaminantes (vírus, bactérias, fungos e príons). Não menos importante, dentro de uma perspectiva ética em termos de proteção animal, devido à forma de extração e coleta do soro a partir de fetos bovinos e, finalmente existe uma grande preocupação sobre a capacidade da oferta mundial em relação a grande demanda por SFB (GSTRAUNTHALER; LINDL; VAN DER VALK, 2013).

Assim, uma vez que os métodos *in vitro* são o mecanismo mais fácil para substituir o uso de métodos com animais, têm-se buscado o desenvolvimento de técnicas melhor definidas de cultivo celular e tecidual, visando à ética e a garantia de qualidade (GUPTA et al., 2005; HARTUNG et al., 2002). Neste sentido, tem sido recomendado implementar as diretrizes para

boas práticas de cultura de células (GCCP- *Guidelines for good cell culture practice)* como parte das Boas Práticas de Laboratório (BPL) e boas práticas de manufatura (BPM) (VAN DER VALK et al., 2010). Estas diretrizes incluem recomendações sobre o uso dos meios livres de soro (COECKE et al., 2005; HARTUNG et al., 2002). Além disso, A ESAC[1] (ECVAM *Scientific Advisory Committee*) também publicou um comunicado que recomenda o uso de meios e substitutos livres de soro para atuais e novos métodos *in vitro* (ESAC, 2008).

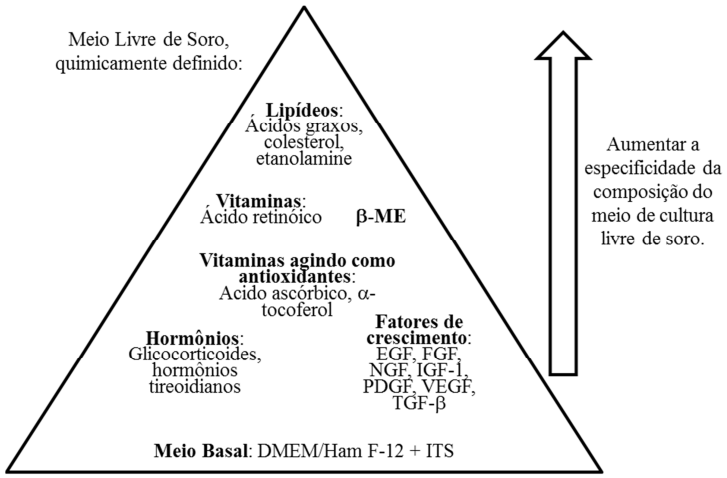
Em decorrência disto, meios de cultura têm sido formulados e testados em células animais, estes meios de cultura que não necessitam de suplementação com soro são conhecidos como meios *serum-free* (SFM) (FROUD, 1999). SFM podem ser classificados de acordo com os suplementos presentes no meio basal. No SFM (*Serum-Free Media*) não há a suplementação com soro, porém ainda podem conter outros suplementos como frações de proteínas (extratos animais e vegetais). Os meios PFM (*Protein-Free Media*) são desprovidos de proteínas, contendo apenas hidrolisados de proteínas (frações de peptídeos). Os meios ACF (*Animal-Component Free*), cuja composição não contém nenhum produto de origem animal (extratos de plantas, hidrolisados de bactérias e fungos). E os meios CDM (*Chemically Defined Media*), os quais usam uma mistura complexa de componentes não derivados de animais (metais, sais, aminoácidos) para substituir as funções exercidas pelas proteínas presentes no soro (KEENAN; PEARSON; CLYNES, 2006; VAN DER VALK et al., 2010).

Quando se deseja omitir o soro para iniciar um cultivo, substitutos apropriados devem ser encontrados para garantir todas as funções exercidas por ele. Desta forma, o desenvolvimento de um SFM (Figura 1) inicia com a suplementação de um meio basal como o DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium Ham´sNutrient mixture F12*) ou RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*), entre outros (VAN DER VALK et al., 2010). Os suplementos adicionais necessários podem variar de acordo com a linhagem cultivada, porém é mandatório que componentes conhecidos como ITS (insulina, transferrina e selênio) sejam adicionados no meio a ser desenvolvido, um componente adicional (etalonamina) foi requerido para diferentes tipos celulares em condições livres de soro (MURAKAMI et al., 1982). A insulina é adicionada aos meios de cultivo livres de soro devido à sua habilidade em promover a obtenção de energia e metabolismo anabólico, através da captação e oxidação de glicose, síntese de glicogênio, transporte de aminoácidos, a transferrina é responsável por solubilizar o ferro, prevenindo a toxicidade provocada por este íon livre e facilitando o transporte do mesmo para dentro das

[1] ECVAM disponível em: <http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam>.

células (BURGENER; BUTLER, 2006). A transferrina humana pode ser produzida na forma recombinante em *Saccharomyces cerevisiae*, especificamente desenvolvida para fornecer uma alternativa à transferrina de origem humana ou animal (FINNIS et al., 2010). O selênio é um elemento traço que auxilia na detoxificação de radicais livres, pois o elemento químico selênio é um componente essencial do grupo prostético da enzima glutationa peroxidase. Esta catalisa a reação de oxidação da glutationa, responsável pela redução de peróxidos tóxicos produzidos pelo metabolismo celular sob condições aeróbicas (CASTILHO et al., 2006). A etanolamina é requerida para a síntese de fosfolipídios em várias linhagens celulares (GLASSY; THARAKAN; CHAU, 1988; MURAKAMI et al., 1982).

Figura 1. Pirâmide para o desenvolvimento de um meio de cultura livre de soro e quimicamente definido.



Abreviações: ADH-Hormônio antidiurético; EGF-fator de crescimento epidérmico; FGF-fator de crescimento de fibroblastos; IGF-1-fator de crescimento similiar a insulina; ITS-suplemento de insulina-tranferrrina-selênio; β-ME-mercaptoetanol; NGF.fator de crescimento de nervos; PDGF-fator de crescimento derivado de plaquetas; PGE2-prostaglandina E2; PTH- Hormônio da paratireóide; TGF-b- Fator de transformação do crescimento b; VGEF- fator de crescimento endotelial vascular. Fonte: Adaptado de Van Der Valk et al. (2010).

Outros componentes que devem ser adicionados consistem de hormônios (glicocorticoides,triiodotironina); fatores de crescimento (EGF-fator de crescimento epidermal, ECGF-fator de crescimento epidérmico, IGF-fator de crescimento similar a insulina); vitaminas (tocoferol, ácido ascórbico e ácido retinóico); fatores de adesão para células aderentes (fibronectina, colágeno) e agentes surfactantes para células em suspensão (Pluronic); aminoácidos e elementos traço. Hidrolisados proteicos e extrato de levedura também podem ser utilizados como alternativa para substituição total ou parcial de soro. Além

disso, a disponibilidade de precursores de nucleotídeos nos meios de cultivo, como a hipoxantina e timidina, tem mostrados serem elementos importantes para a multiplicação celular e aumento na expressão de anticorpos monoclonais (CHEN et al., 2012). Revisões mais completas sobre o desenvolvimento de um SFM e os diferentes suplementos usados se encontram disponíveis na literatura (FRESHNEY, 2005; VAN DER VALK et al., 2010).

Assim, algumas células de mamíferos são passíveis de se desenvolverem em meios livres de soro, desde que devidamente adaptadas. A facilidade para adaptar uma célula em um meio novo se dá em função de fatores intrínsecos associados à linhagem celular, ao grau de similaridade na composição dos meios usados e aos protocolos de manipulação usados durante o processo de adaptação. Diferentes estratégias têm sido sugeridas para adaptar células a um meio livre de SFB. A adaptação direta consiste no cultivo direto das células desde um meio suplementado com soro a um SFM. A adaptação sequencial que consiste na passagem das células crescendo no meio com soro ao SFM através de várias etapas, isso pode envolver a redução dos níveis de soro (por exemplo, de 10% para 5% a 2,5% a 1%, em seguida, a 0%), ou aumentando a proporção do novo SFM de forma gradativa (0: 100, 25:75, 50:50, 75:25, 100: 0), ou alterar ambos soro e meios de cultura em passagens sequenciais até que as células estejam completamente adaptadas às condições isentas de soro. A adaptação com meio condicionado se baseia na passagem de células numa mistura de meio condicionado com SFM, onde é reduzida gradativamente a quantidade de meio condicionado até atingir células que crescem apenas no SFM (VAN DER VALK et al., 2010).

Os meios livres de soro já estão sendo utilizados na produção de anticorpos monoclonais, vacinas e outros produtos biológicos (CASTRO et al., 2015; COSTA et al., 2013; JÄGER et al., 2013; KLUGE et al., 2013; SERRATO et al., 2007; SINACORE; DRAPEAU; ADAMSON, 2000) ou cultivos de células com outras finalidades, como a estabilização de células ou modelos celulares para estudos metabólicos e fármaco-toxicológicos (BEGUM et al., 2010; SAKODA et al., 1998) e como plataforma para células tronco que serão usadas como tratamento (CHASE et al., 2010; OIKONOMOPOULOS et al., 2015).

No sentido mais restrito de produção de vacinas, a preparação do produto viral, da massa celular ou do sobrenadante das culturas infectadas ou de células transfectadas deve passar por processos de concentração e purificação, chamados processos *downstream*, que constituem etapas importantes nas quais ocorre inevitavelmente uma perda da produtividade obtida. É de todo interesse, portanto, um exaustivo trabalho de otimização das condições do cultivo, da multiplicação celular e, se for o caso, da infecção viral para a obtenção de grandes

concentrações de produto durante a fase de síntese, que deverão ser submetidas aos processos de concentração e purificação e deverão guardar propriedades de alta infectividade e/ou imunogenicidade (SCHATZMAYR, 2001).

A adaptação de uma linhagem celular a um SFM e seu impacto sobre a produção de vacinas ainda não é completamente entendido. A adaptação das células a novas condições de cultivo envolve não somente mudanças nas propriedades de crescimento e na dinâmica de replicação dos vírus, mas também na expressão de proteínas e as características do produto (glicosilação do antígeno) (KLUGE et al., 2013). Desta forma, diferentes parâmetros devem ser analisados com a finalidade de identificar o melhor meio a ser utilizado em determinada célula e para determinado produto.

2.3 Sistema de expressão usando o Semliki Forest Virus (SFV)

A expressão de genes heterólogos em células animais foi possível graças ao desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante. Para este fim, o desenvolvimento de diferentes vetores de expressão foi necessário, dando origem a distintos vetores virais e plasmidiais, apresentando cada um deles vantagens e desvantagens próprias do sistema. A escolha do vetor de expressão depende da aplicação, da célula hospedeira, da quantidade ou qualidade do produto pretendido, e segurança.

Vetores virais têm sido reconhecidos como a ferramenta mais eficiente para a produção de proteínas em células eucariotas já que partículas virais, por natureza, são agentes infecciosos capazes de expressar sua informação genética nas células infectadas. Um vírus para ser caracterizado como um vetor de expressão, geralmente sofre uma manipulação genética, alterando, por exemplo, seus riscos frente ao desenvolvimento de doenças, e possibilitando a inserção de genes de interesse, mas de modo que não perca sua capacidade inata de infectar células e liberar seu material genético (EL-ANEED, 2004).

Os vetores virais podem ser classificados pela composição do seu material genético, desta forma, dentre os vírus de DNA temos o SV-40 e o poliomavírus, o adenovírus, os vírus adeno-associados (VAA), o vírus Epstein-Barr (EBV), o vírus do herpes simplex (HSV), o vírus da varíola atenuado (vaccinia) e os poxvírus recombinantes. Entre os vetores virais derivados de vírus de RNA se encontram os retrovírus, lentivirus, os coronavírus e os alfavírus.

Os alfavírus possuem algumas características que os tornam vantajosos no seu uso como vetores. Eles têm uma organização genômica simples; garantem uma eficiente

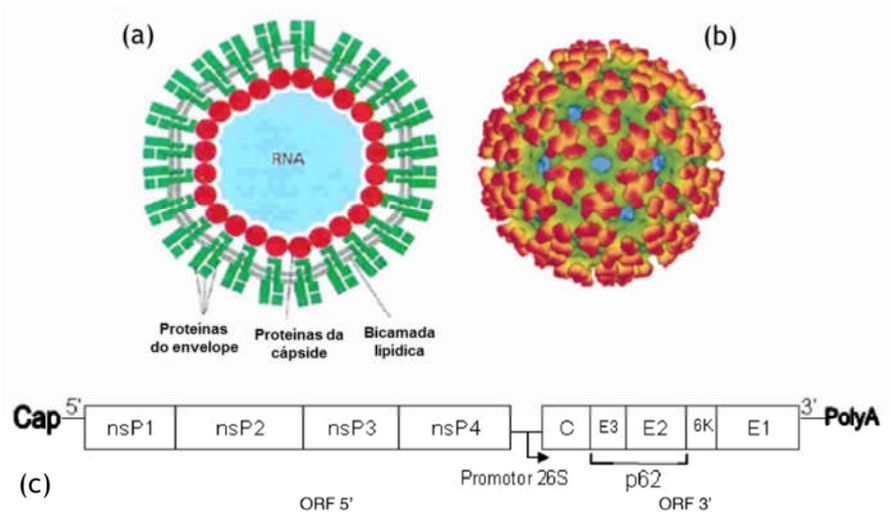
propagação em diferentes células cultivadas *in vitro*; a expressão é transiente, porém com grande geração de proteína heteróloga; sua replicação acontece só no citoplasma garantindo uma segurança inerente (elimina a possibilidade de integração no genoma do hospedeiro); o processo de apoptose gerado por alfavírus pode promover uma resposta imune em processos de *cross-priming*. Estas características somadas a uma inexistência de imunidade preexistente na população humana fizeram que vetores baseados em alfavírus se tornassem interessantes como vetores virais, sendo uma ferramenta promissora para uso em terapia gênica, assim como para o desenvolvimento de vacinas de DNA ou RNA (SOUZA et al., 2005).

A aplicação dos alfavírus como vetores para geração de vacinas inclui o uso do SFV, Sindbis vírus e VEE vírus (*Venezuelan equine encephalitis*) administrados como partículas não replicativas (VRPs-*viral replicon particles*), RNA "*naked*", ou como vetores contendo DNA-RNA (ZIMMER, 2010). A principal aplicação tem sido para o desenvolvimento de vacinas virais, onde a vacinação é feita através da expressão de antígenos virais de superfície que resultam em uma resposta imunológica e de proteção contra doses letais do vírus patogênico em modelos animais (LUNDSTROM, 2009).

O SFV tem sido usado como vetor de expressão de uma ampla variedade de genes em células eucarióticas. Sua eficiente replicação genômica, no citosol, mediada por polimerases tornou-o uma alternativa atrativa para a rápida e eficiente entrega de genes, permitindo a expressão de diferentes proteínas em uma ampla gama de células hospedeiras de mamíferos **(**LUNDSTROM, 2003).

O SFV possui um genoma de RNA positivo simples fita não segmentado, que funciona como um RNA mensageiro. A fita de RNA positivo é encapsidada pelas proteínas da cápside viral (C), arranjadas em configuração icosaédrica. O nucleocapsídeo é envelopado por uma bicamada lipídica derivada da membrana plasmática da célula hospedeira. Projetadas para o exterior do envelope estão as glicoproteínas virais E1 e E2 (SCHLESINGER, 1987). O genoma possui um tamanho de cerca de 12kb, e está dividido em duas ORF´s (*open reading frames*), seu genoma codifica 9 proteínas (quatro não estruturais, nsP1 - 4, e cinco estruturais, cápside, p62 – E2 e E3, 6K e E1). O primeiro quadro codifica as proteínas não estruturais que formam o complexo replicase (nsP-1-4). O segundo quadro codifica as proteínas estruturais: proteína do capsídeo e as proteínas do envelope viral E2 e E3 (precursor P62), 6K e E1 (Figura 2). (HENAO; CORTÉS; NAVAS, 2007; RIEZEBOS-BRILMAN et al., 2006).

Figura 2. Estrutura e genoma do SFV



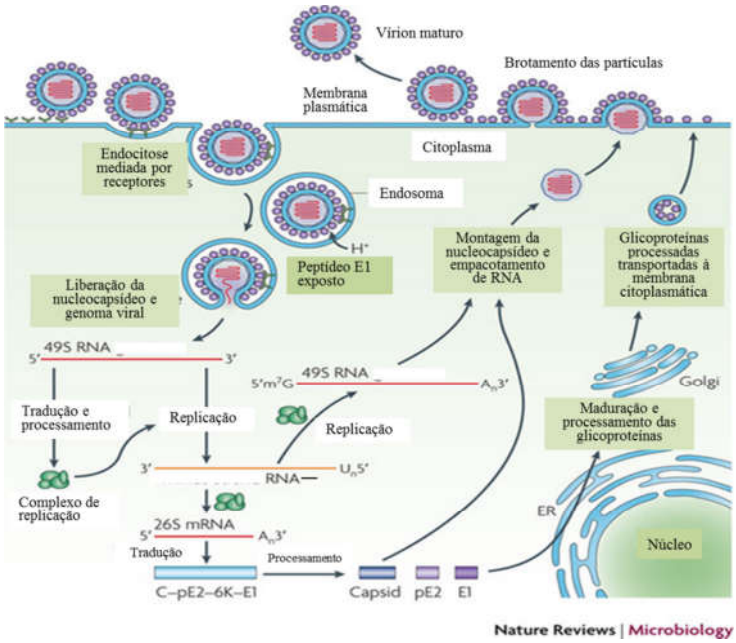
(a) Vírion do SFV, composto pelo nucleocapsídeo (RNA e cápside) envolto por uma camada bilipídica e pelas proteínas do envelope que formam espículas virais projetadas para a superfície do vírus. (b) Estrutura viral icosaédrica reproduzida por crio-eletromicroscopia. (c) Genoma do SFV: a primeira ORF codifica as proteínas não estruturais que formam o complexo replicase e a segunda ORF codifica as proteínas estruturais. Fonte: Adaptado de Riezebos-Brilman et al. (2006).

O processo de infecção do alfavírus se inicia com a ligação das proteínas do envelope viral (E2) às proteínas de superfície da célula, que atuam como receptor na membrana plasmática da célula do hospedeiro. Após a ligação, o vírus invade a célula por endocitose mediada por clatrina e é transportado para o endossomo. O pH ácido endossomal promove a fusão das espículas virais do envelope (E1) com as membranas do endossoma. Em seguida, o nucleocapsídeo é liberado no citosol onde é desfeito liberando o genoma viral no citoplasma (LILJESTRÖM; GAROFF, 2001; WAHLBERG et al., 1992).

No citoplasma, o RNA genômico do SFV serve como um RNAm, iniciando-se a tradução da primeira ORF (2/3 do RNA viral) e gerando assim uma poliproteína que posteriormente é clivada em 4 proteínas não estruturais (NSP1-4), estas proteínas formam o complexo replicase (Rep). Este complexo tem a função de iniciar a replicação de fitas completas de RNA negativo, estas fitas anti-senso servem de molde para gerar múltiplas copias de RNA positivo do genoma completo (42S), assim como permitem a síntese do RNA subgenômico (26S), que corresponde ao último terço do genoma e contém a sequência das proteínas estruturais. As proteínas estruturais são geradas a partir do promotor 26S localizado imediatamente antes do gene das proteínas estruturais, o qual é ativado pela Rep. O RNA subgenômico, será gerado até 10 vezes mais que o RNA genômico, graças ao forte promotor subgenômico 26S. O RNA 26S é traduzido para produzir uma poliproteína estrutural

precursora (C-p62-6K-E1), que é clivada co-traducionalmente pela função de protease da proteína C, gerando a proteína C (capsídeo) e o complexo das glicoproteínas do envelope viral (p62, 6K e E1). A proteína C reconhece um sinal de encapsidação que esta na região codificadora para nsP2 e junto com o RNA positivo completo (42S) forma o nucleocapsídeo. Ao mesmo tempo, o complexo (p62, 6K e E1) é translocado cotraducionalmente ao retículo endoplasmático rugoso e as glicoproteínas são dirigidas à membrana plasmática pelo complexo de Golgi, onde a p62 é clivada em sua forma madura E2 e E3 no Golgi tardio. A interação da proteína C do nucleocapsídeo com a cauda da E2 forma uma espícula contendo as proteínas do envelope na camada lipídica da célula do hospedeiro e finalmente a partícula viral é liberada no meio extracelular. A agregação das proteínas do envelope excluem as proteínas de membrana da célula do hospedeiro (KUJALA et al., 2001; LOPEZ et al., 1994; LU; KIELIAN, 2000; SKOGING et al., 1996; SUOMALAINEN; LILJESTRÖM; GAROFF, 1992; ZHAO; GAROFF, 1992). A Figura 3 esquematiza a replicação do SFV.

Figura 3. Ciclo de vida dos alfavírus



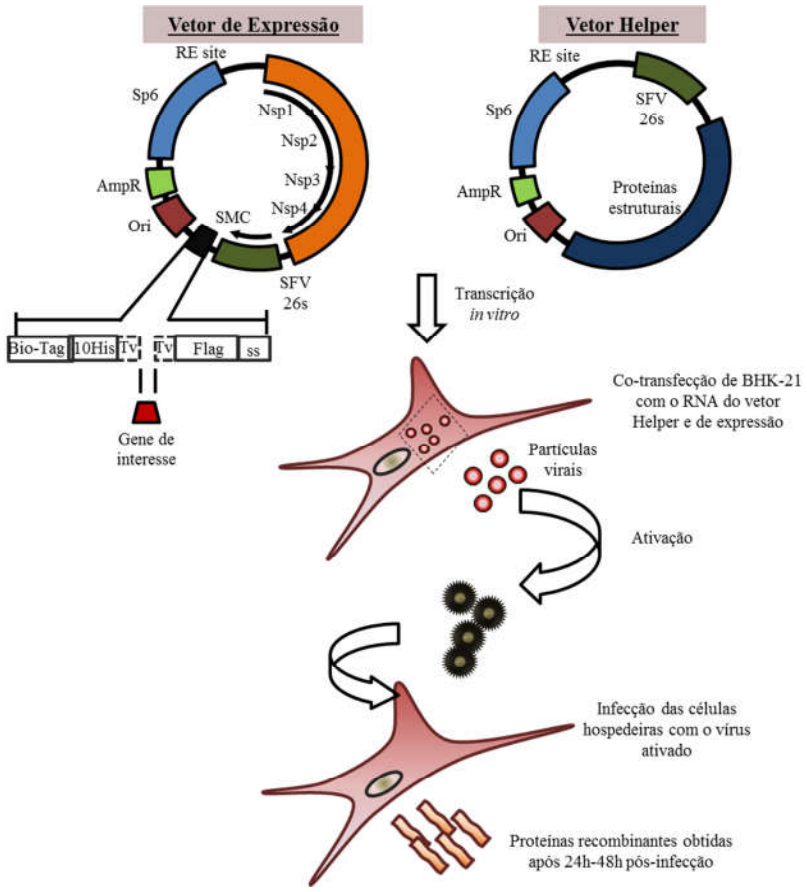
Fonte: Adaptado de Schwartz; Albert (2010).

Para transformar o SFV num sistema de expressão, o cDNA correspondente ao genoma do SFV foi dividido em dois plasmídeos diferentes. Um plasmídeo de expressão onde foi realizada a substituição do gene que codifica as proteínas virais estruturais por um local de policlonagem, onde o gene que codifica a proteína heteróloga poderá ser inserido,

conservando o promotor subgenômico 26S será possível uma alta expressão da proteína heteróloga. As proteínas estruturais são fornecidas por um segundo plasmídeo denominado de auxiliar ou "helper" contendo os genes que codificam as proteínas da cápside e o envelope. Para a produção das partículas virais, os vetores são transcritos in vitro (graças à presença do promotor SP6 em ambos os plasmídeos) e são cotransfectados por eletroporação ou lipofecção em células de mamíferos (geralmente células BHK-21). Isto gera um forte título de VRPs de SFV recombinantes. Essas partículas são capazes de infectar uma ampla gama de células animais, notadamente as células de mamíferos. No entanto, uma vez que o sinal de encapsidação do RNA só estará presente no RNA de expressão (na proteína nsP2), nenhum RNA auxiliar será empacotado, o que torna as partículas geradas incapazes de se replicar, isto significa, que após a infecção de uma célula hospedeira haverá uma forte e rápida expressão do transgene (gerando até um milhão de cópias da proteína de interesse por ciclo), porém sem geração de novos vírus. A Figura 4 ilustra o processo de geração das VRPs de SFV recombinantes. O uso do RNA auxiliar oferece biossegurança para este sistema de expressão. A expressão é transiente, pois as células infectadas entram em morte por apoptose. Todo esse processo resulta na formação de aproximadamente 10^9 a 10^{10} partículas infecciosas por mililitro (LILJESTRÖM et al., 1991; LILJESTRÖM; GAROFF, 1991).

Em uma abordagem de engenharia genética posterior, visando aumentar a segurança do sistema, a proteína do envelope viral E2 foi mutada de forma que o vírus apenas pode realizar a fusão com a membrana plasmática da célula a ser infectada, quando previamente tratado com α-quimiotripsina (BERGLUND et al., 1993). Mais recentemente, foi desenvolvido um sistema SFV que não necessita de ativação enzimática, porém apresenta sensibilidade à temperatura como método de contenção (LUNDSTROM et al., 2003). Há também um sistema que utiliza dois plasmídeos *helpers*, um que contém o gene da proteína C e o outro das glicoproteínas virais (SMERDOU; LILJESTRÖM, 1999).

Figura 4. Geração de VRPs de SFV recombinantes



Os plasmídeos correspondentes ao vetor de expressão e ao vetor auxiliar, são submetidos a um processo de transcrição *in vitro*, em seguida são co-transfectados em células BHK-21, e as VRPs serão produzidas e exportadas para o sobrenadante da cultura. Estas VRPs poderão ser usadas após um processo de ativação para infecção de novas células para expressão da proteína de interesse ou diretamente para imunização. Fonte: Adaptado de Lundstrom (2005).

Diversas proteínas já foram expressas utilizando o sistema SFV. De maneira geral, qualquer molécula que já tenha sido expressa por um determinado tipo celular que possa ser infectado por SFV, pode também ser expressa pela utilização desse sistema. Em relação a proteínas de membrana (receptores complexos), pelo menos 28 já haviam sido expressas até o ano de 2003, pelo sistema SFV (LUNDSTROM, 2003). Quando comparado a outros sistemas eucarióticos de expressão (*Saccharomyces cervisiae, Pichia pastoris,* Baculovírus/Sf9), quanto aos níveis de expressão, à qualidade, à atividade biológica, à localização e à solubilidade de todas as proteínas expressas a fim de identificar as vantagens de um sistema em relação ao outro, o sistema SFV apresentou em geral um bom desempenho (EIFLER et al., 2007).

Em larga escala, o SFV foi utilizado para a produção de receptores recombinantes, em células de mamíferos cultivadas em biorreatores e em frascos *spinner* (BLASEY et al., 2000). Esta abordagem foi bem sucedida na produção de mais de 10 mg/L de proteínas para aplicação em biologia estrutural (LUNDSTROM, 2007).

Partículas virais de SFV também têm sido usadas como plataforma para geração de vacinas de RNA baseadas no uso de VRPs (GEALL; MANDL; ULMER, 2013; LJUNGBERG; LILJESTRÖM, 2015). Sua utilização como sistema viral de replicação defectiva para uso em humanos é apoiada por diversas características como: produção de altos níveis da proteína de interesse; indutor de resposta imune via estímulo indireto; ativação do sistema imune inato e adaptativo; produção de intermediários dsRNA conhecidos imunopotencializadores; tem tropismo por células dendríticas; permite a construção de vacinas multivalentes; já existem plataformas comercias para produção de estas vacinas e finalmente o fato de que humanos geralmente não carregam anticorpos neutralizantes contra o vírus SFV (RIEZEBOS-BRILMAN et al., 2006; VANDER VEEN; HARRIS; KAMRUD, 2012). Desta forma, diversos candidatos vacinais baseados no uso de VRPs de SFV estão sendo estudados atualmente. Testes animais têm sido realizados com ratos, coelhos, porcos, bezerros, ovelhas, primatas não humanos e até mesmo peixes. Os resultados indicam que esta abordagem gera respostas de tipo celular e humoral e em muitos casos, a proteção contra o desafio com doses letais de vírus e outros agentes não virais (LJUNGBERG; LILJESTRÖM, 2015).

2.4 Proteína GFP como repórter de sistemas recombinantes

Para identificar eficiências de transfecção e/ou infecção e ainda caracterizar o funcionamento de um sistema, pode ser recomendável o uso de uma proteína repórter que possa ser avaliada de forma simples. Neste sentido, a proteína GFP (Green Fluorescent Protein) tem sido amplamente usada. Devido ao seu amplo impacto em pesquisa básica, a GFP tem sido aplicada desde a determinação da localização de proteínas, movimento e interações moleculares até o desenvolvimento e avaliação de vetores virais em terapia gênica (WARD; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, 2006).

A proteína verde fluorescente na forma selvagem (GFP), extraída da *Aequorea victoria*, tem como característica a produção de uma luz verde brilhante fluorescente quando estimulada com a luz ultravioleta (UV) (WARD, 2005). Sua utilidade como marcador biológico deriva da constatação de que ela não requer um co-fator, o que a torna uma

molécula usada como um indicador de localização da proteína dentro da célula, permitindo o estudo da dinâmica celular e o processo de desenvolvimento em tecidos intactos.

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

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

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

2.5 Proteína não estrutural NS3 do vírus da hepatite C

2.5.1 Trajetória e relevância de uma vacina para HCV

Embora em alguns casos possa ser curada, a hepatite C, causada pelo vírus da Hepatite C (HCV), tem sido descrita pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma “bomba viral de tempo” devido a sua prevalência e seu potencial em causar sérias complicações até o grau de colocar em risco a vida (BUTT, 2005). Estima-se que 3% da população mundial, isto é 130-200 milhões de pessoas apresentam infecção crônica por HCV, sendo que aproximadamente 350 mil pessoas morrem cada ano por doença associada a infecção por HCV (GRAVITZ, 2011).

Os estudos que avaliam a prevalência do HCV no Brasil são escassos e pouco precisos, englobando, no geral, áreas geográficas restritas ou populações específicas, como os doadores de sangue (MARTINS; NARCISO-SCHIAVON; SCHIAVON, 2011). Segundo o inquérito nacional de Hepatitis Virais em 2010 a prevalência de casos de HCV era de 2,1 milhões de pessoas com uma incidência de 65 mil casos/ano. No Brasil, estudos de base populacional e com doadores de sangue revelam prevalências baixas, classificando o Brasil como de baixa

endemia (ROSA et al., 2012). O custo do tratamento associado a esta doença é bastante alto para o sistema público de saúde (Relatório Técnico – Conitec, 2015)

Atualmente não existe uma vacina ou drogas 100% eficientes para o tratamento de pacientes com HCV. No entanto, nas últimas décadas, aconteceram avanços significativos no entendimento da virologia molecular do vírus da hepatite C, assim como no tratamento de hepatite C crônica (WENDT et al., 2014). Os tratamentos atuais, baseados na combinação de interferon pegilado (Peg-INF) e ribavirina por 3-18 meses, proporcionam uma terapia eficaz em mais da metade dos pacientes (LIANG; GHANY, 2013). Porém, vários efeitos colaterais são associados com este tratamento (MUNIR et al., 2010).

A falta de um sistema de cultura celular adequado ou pequenos modelos animais para HCV tem dificultado o desenvolvimento de drogas e vacinas. Melhoras na área de conhecimento do funcionamento do genoma viral, intermediários de replicação, proteínas codificadas e sua interação com sistema imune do hospedeiro têm ajudado na identificação de alvos potenciais para futuras terapias (MCHUTCHISON; PATEL, 2002).

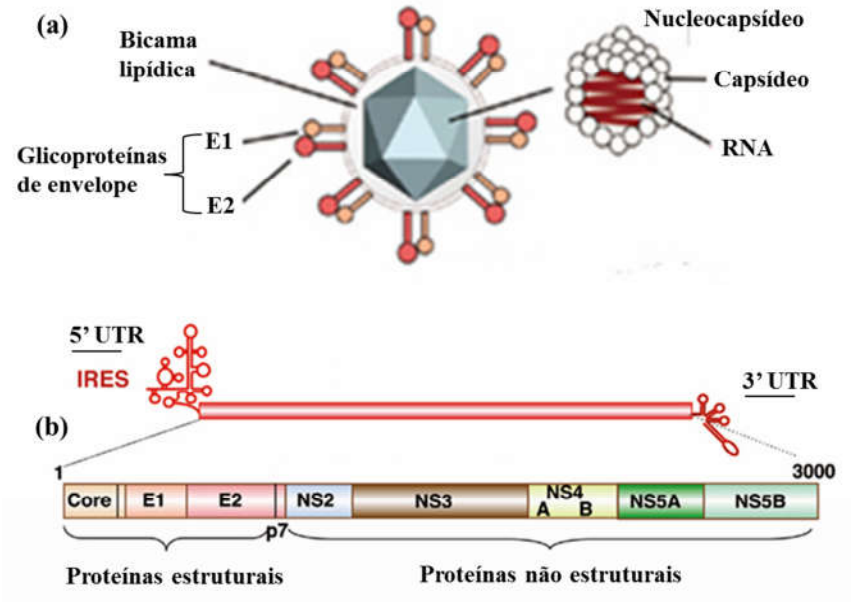
Desta forma, na atualidade, estão em desenvolvimento drogas que inibem diferentes etapas do ciclo do HCV, evitando assim a reprodução do vírus (mesmo princípio usado no tratamento do HIV). Terapias para estimular a resposta imune frente ao HCV, e drogas que inibem, por exemplo, a entrada do HCV na célula hospedeira estão em fase clínica (WENDT et al., 2014). Um panorama atual de compostos para tratamento do HCV é descrito por Pawlotsky et al., 2015.

2.5.2 Vírus do HCV

O vírus da hepatite C pertence à família *Flaviviridae* e constitui um gênero isolado (*Hepacivirus*) (SHUKLA; HOYNE; WARD, 1995), uma vez que sua sequência genômica não se aproxima de nenhum dos outros gêneros pertencentes à família *Flaviviridae*. A partícula viral do HCV mede entre 55 e 65 nm de diâmetro, se encontra formada por um envelope lipídico, onde se encontram as glicoproteínas virais E1 e E2, um capsídeo proteíco formado pela proteína viral Core (Figura 5 (a)). O genoma viral constituído por um ácido ribonucleico (RNA) linear, de fita simples, com polaridade positiva. Este RNA viral possui cerca de 9600 nucleotídeos com uma única fase de leitura aberta (ORF “open reading frame”), a qual inclui quase todo o genoma e codifica uma poliproteína com pouco mais de 3000 aminoácidos. Esta poliproteína é clivada posteriormente por proteases celulares e virais, dando origem a três proteínas estruturais e sete não estruturais (Figura 5 (b)). As proteínas estruturais são: Core

(C) e as glicoproteínas de envelope (E1 e E2). As sete proteínas não estruturais chamadas NS (NS1, 2, 3, 4A, 4B, 5A e 5B) estão envolvidas principalmente nos processos de clivagem da poliproteína e na replicação viral (CHAMBERS et al., 1990; CHEVALIEZ; PAWLOTSKY, 2006). As glicoproteínas do envelope E1 e E2 são caracterizadas como proteínas trans-membrânicas do tipo I e parecem ser essenciais para a entrada da partícula viral na célula hospedeira (BARTOSCH et al., 2003; DELEERSNYDER et al., 1997; PLOSS; EVANS, 2012).

Figura 5. Estrutura e Genoma do HCV



(a) Vírion do HCV, composto pelo nucleocapsídeo (RNA e cápsideo) envolto por uma camada bilipídica e pelas proteínas do envelope E1 e E2. (b) O genoma do HCV possui uma única ORF que codifica uma poliproteína que será depois processada dando origem às proteínas não estruturais e as proteínas estruturais do vírus. Fonte: Adaptado de Moriishi; Matsuura (2012).

O HCV possui uma ampla heterogeneidade genética, apresentando pelo menos seis grupos geneticamente diferentes. A variação de nucleotídeos do genoma completo está entre 30 e 35% (SIMMONDS, 2004), sendo as regiões E1, E2 e V3 da proteína NS5A as que possuem maiores taxas de mutação, enquanto a região da proteína core e da proteína NS3 são as mais conservadas. Cada um desses grupos de HCV ainda possui subtipos, com uma variabilidade nucleotídica de 20 a 25%, entre eles (MELLO et al., 2009; SIMMONDS, 2004).

As proteínas do HCV que apresentam possibilidade de direcionar o sistema imune a uma resposta celular adequada são as proteínas não estruturais. Dentro destas, a proteína não estrutural 3 (NS3) é uma das proteínas que tem boas possibilidades de apresentar esse resultado devido à sua conservação genotípica dentro do genótipo 1 (MELLO et al., 2009; MEHTA et al., 2014; PERES-DA-SILVA; ALMEIDA; LAMPE, 2012; SILLANPÄÄ et al., 2009).

2.5.3 Proteína NS3

A proteína NS3 possui várias funções, com um domínio N terminal, constituído de 181 aminoácidos, cuja função é de uma serino-protease, e um C terminal, contendo 450 aminoácidos, que exerce função helicase. Já foi demonstrado que a NS3, embora não estrutural é essencial para a replicação viral, estando também envolvida com a carcinogênese, já que altera a proliferação e a morte celular, através de interações com proteínas relacionadas com apoptose, como p53 e p21 (VALLET et al., 2005). Além disso, a NS3 interage com as proteínas não estruturais do HCV, como a NS2 e a NS4. A interação das proteínas NS2 e da porção N terminal da NS3 constituem uma auto-protease altamente hidrofóbica responsável pela clivagem de polipetídeos não estruturais entre NS2 e NS3. No entanto, muitos aspectos da função da proteína NS2/3 são desconhecidos, sendo propostas funções como cisteínas ou metaloproteases (GRAKOUI et al., 1993; WELBOURN; PAUSE, 2006). Já a interação da subunidade N-terminal da NS3 (domínio catalítico) com a NS4A (cofator ativador) forma um heterodímero não covalente, juntas estas proteínas são responsáveis pela clivagem de 4 sítios da poliproteína precursora: NS3/NS4A (auto clivagem), NS4A/NS4B, NS4B/NS5A, e NS5A/NS5B (BARTENSCHLAGER; LOHMANN; PENIN, 2013; LIN, 2006; TOMEI et al., 1993). A proteína NS3 tem sido um dos mais interessantes alvos para o desenvolvimento de terapias anti-HCV, uma vez que ela atua no ciclo replicativo e na infectividade do HCV (KOLYKHALOV et al., 2000). Assim, a diminuição ou até eliminação da replicação viral constituem importantes respostas no controle da infecção e na evolução da patogenia. O sucesso da utilização de inibidores de proteases na patogenia do HIV demonstrou que proteases virais, como a NS3/4A, podem ser excelentes alvos para a imunização e terapia.

Neste sentido, novas abordagens terapêuticas sobre o HCV estão sob estudo e recentes ensaios clínicos em fase II e III estão sendo focados sobre inibidores das proteínas NS3 e NS5a RNA polimerase do HCV (MUNIR et al., 2010).

Recentemente dois medicamentos orais inibidores de proteases atingiram o mercado, depois de ser aprovados pela FDA: o boceprevir da Merck, que se liga ao sítio ativo da NS3 e o telaprevir da Vertex, que inibe a enzima NS3/NS4A serino protease. Ambos são ativos para o genótipo 1. Ambas as drogas devem ser usadas em combinação com o padrão atual de tratamento PEG-IFN e ribavirina (GHANY et al., 2011; Relatório Técnico – Conitec, 2015).

Mesmo com este cenário, a terapia anti-HCV oferecida atualmente, frequentemente não é tolerada e ainda é ineficiente para muitos pacientes, de tal forma novas abordagens de tratamento são necessárias, garantindo mais segurança e eficácia (ROMANO et al., 2012; ZEMINIAN et al., 2013).

Nossa proposta consistiu da expressão da região da protease da NS3 entre os aminoácidos 1027 e 1287 do HCV, uma vez que esta região da protease apresenta mais de dez epítopos para reconhecimento de células T citotóxicas (CLT) e apresenta grande conservação perante estudos filogenéticos (MELLO et al., 2009).

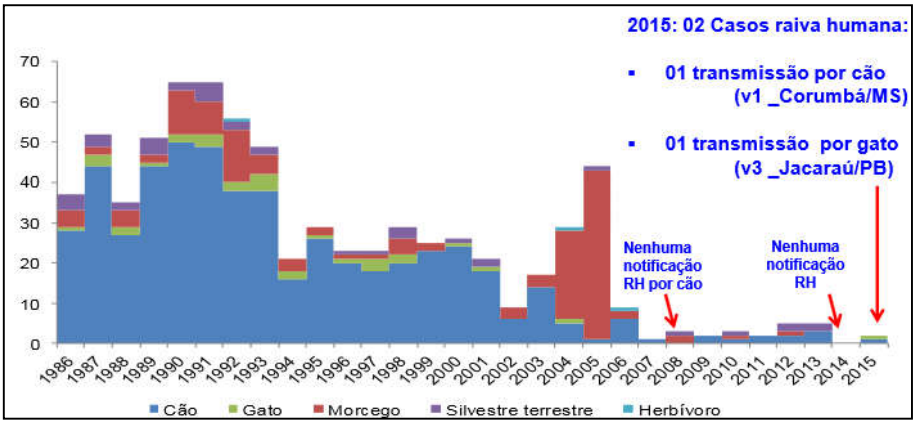
2.6 Glicoproteína do Vírus da Raiva (RVGP)

2.6.1 Trajetória e relevância da vacina contra a raiva

A raiva é uma doença difundida mundialmente que representa um sério problema de saúde pública em países em desenvolvimento. Ela apresenta um alto custo social com uma letalidade de praticamente 100% (poucos casos humanos de sobrevivência à raiva foram relatados) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; WILLOUGHBY et al., 2005). Animais domésticos, principalmente cachorros, gatos e agora com maior seriedade animais silvestres são importantes reservatórios do vírus e transmitem a doença para humanos e animais de grande interesse econômico, como gado, cavalos, entre outros (SVS, 2013). Aproximadamente, 60.000 pessoas morrem desta doença anualmente, principalmente na África e na Ásia (FOOKS et al., 2014). No Brasil, a raiva é endêmica, em grau diferenciado de acordo com a região geopolítica. No período de 1986 até final de 2009, ocorreram 763 óbitos por raiva humana, sendo os cães responsáveis por transmitir 75%, os morcegos por 12%, os felinos por 3% e os 10% restantes por outras espécies (MINISTÉRIO DE SAÚDE, 2010). Na Figura 6 é apresentada a situação da raiva humana no Brasil desde 1986-2015, chamando atenção que no corrido deste ano já foram encontrados dois casos de raiva humana (com óbito) e 70 casos de raiva canina (DE CALDAS, 2015). O custo anual estimado associado à raiva no mundo é de US$ 6 bilhões, com US$ 2 bilhões devidos à falta de

produtividade por mortes prematuras e US$ 1,6 bilhões pertinentes ao tratamento pós-exposição (WHO, 2013). No Brasil este custo está estimado em R$ 80 milhões/ano com uma média de 592 mil de atendimentos/ano (DE CALDAS, 2015). Esta doença não tem um tratamento específico, e sua fácil propagação em animais silvestres dificulta a sua eliminação através da vacinação.

Figura 6. Brasil-Raiva humana por espécies animais de transmissão, 1986 -2015.



Fonte: SVS/MS (2015).

As vacinas contra a raiva são classificadas em três gerações. As vacinas de primeira geração são produzidas utilizando substrato do tecido nervoso do animal infectado com o vírus da raiva para obtenção da massa viral, apresentando sérias reações adversas como meningoencefalite, meningoencefalomielite e paralisia, devido à produção de anticorpos frente à mielina e outras sustâncias do tecido nervoso presentes na vacina (FRAZATTI-GALLINA et al., 2004; PÉREZ; PAOLAZZI, 1997). As vacinas de segunda geração consistem de um vírus inativado após a propagação em ovos embrionados ou em células de mamíferos cultivadas *in vitro* (MENDONÇA et al., 1993). Estas vacinas, embora sejam mais seguras, ainda são baseadas na inativação do vírus, razão pela qual ainda tem alto risco de apresentar reações adversas no organismo a ser imunizado. Também apresentam alto risco na etapa de produção devido à manipulação de grandes quantidades de material infeccioso (COSTA et al., 2000).

As vacinas de terceira geração partem de um conceito inovador que as diferencia de uma forma radical das outras gerações vacinais. Nessas vacinas, emprega-se a informação genética do patógeno responsável pela codificação de proteínas que representem antígenos

relevantes para a proteção (DINIZ; FERREIRA, 2010). Desta forma, a vacina é baseada em proteínas recombinantes e não na partícula viral, fundamentada no fato de que apenas uma única proteína viral, no caso do vírus da raiva a proteína G, seja suficiente para produzir resposta imune (SAKAMOTO et al., 1999). As vacinas recombinantes tendem a não causar patogenicidade residual causada pela raiva, porque elas contêm apenas produtos gênicos não virulentos. O laboratório Merial já possui no mercado 1 vacina recombinante: Purevax para gatos (usando o canaripox vírus como vetor do gene da glicoproteína do vírus da raiva) (EMA, 2010). Outras duas vacinas contendo o gene da glicoproteína da cepa ERA (*Evelyn-Rotkitniki-Abelseth*) do vírus da raiva se encontram em testes preliminares em animais silvestres. Uma é chamada de Raboral V-RGH também da Merial (usa como vetor o vírus vivo da vaccínia) (FOLLMANN et al., 2011), e a outra é ONRABH da Artemis Technologies Inc., Guelph, Ontário, Canadá (usa como vetor o adenovírus humano tipo 5) (FEHLNER-GARDINER et al., 2012).

No Brasil, são usadas as vacinas de segunda geração, sendo que a produção encontra-se principalmente em centros de pesquisa como o Instituto Butantan que tem a seu cargo a vacina humana e o Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar) que é o maior produtor da vacina para uso veterinário, com uma produção anual de mais de 30 milhões de doses distribuídas pelo Programa Nacional de Profilaxia da Raiva, do Ministério de Saúde (VOSS, 2008). Os dois institutos produzem a vacina a partir de cultura de células, mantendo um alto padrão tecnológico de produção (MENDONÇA et al., 1993). Apesar desse panorama favorável, o advento de novas tecnologias torna necessária uma busca por alternativas de produção eficientes e de baixo custo da vacina anti-raiva.

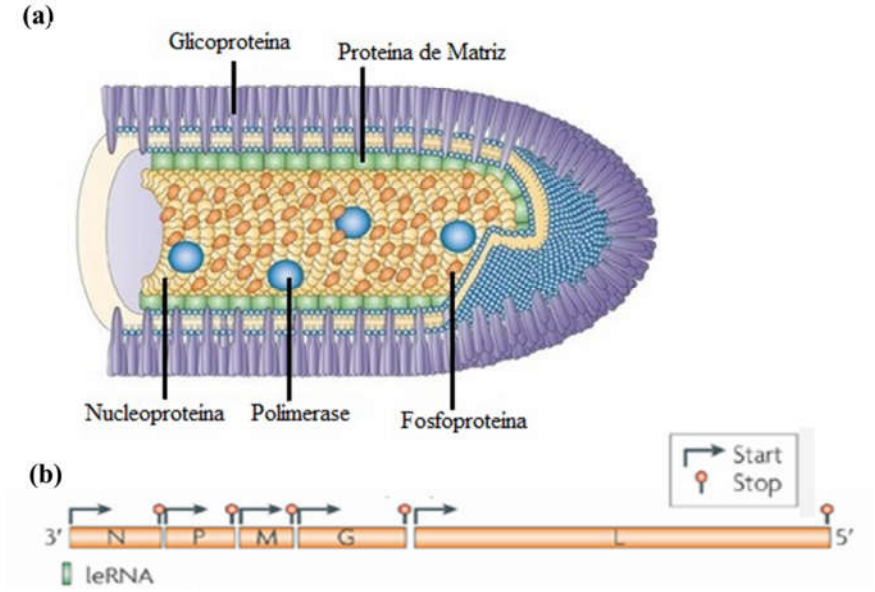
2.6.2 Vírus da Raiva

O vírus da raiva pertence ao gênero *Lyssavirus*, família *Rhabidoviridae*, que afeta o sistema nervoso central. O genótipo 1 do gênero Lyssavirus, RABV, apresenta distribuição mundial e foi o único já identificado no Brasil. Atualmente são descritos 20 membros do gênero Lyssavirus e são distribuídos pela Europa, África, Austrália, Ásia Central, Cáucaso e Sibéria (KING et al., 2011).

O vírus da raiva é envelopado, possui RNA negativo, linear e não segmentado de cerca de 12kb (*GenBank: M13215*), apresenta 75 nm de diâmetro e de 100 a 300 nm de comprimento (Figura 7 (a)). É um vírus não-lítico, que não produz efeitos citopáticos, tendo tropismo por neurônios (DEBRÉ; CELLERS, 1971). Seu genoma foi completamente

sequenciado, e codifica para cinco proteínas: uma nucleoproteína (N), uma fosfoproteína (NS), uma RNA polimerase (L), a proteína de matriz (M) e a glicoproteína de superfície (G) ou RVGP (do inglês: *rabies virus glycoprotein*) como será chamada neste trabalho (Figura 7 (b)) (REGENMORTEL et al., 2000; TORDO et al., 1986, 1988; YANG et al., 1998).

Figura 7. Estrutura e genoma do vírus da Raiva



(a) O genoma de RNA do vírus da Raiva está encapsulado dentro da nucleoproteína (amarelo). A polimerase viral (azul) e fosfoproteína (laranja) 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). (b) O genoma de cadeia negativa serve como template para a transcrição pelo complexo polimerase, que começa a partir de sequência *leader* (leRNA) e depois continua com o *start* códon de cada proteína, gerando assim a transcrição sequencial dos mRNAs das cinco proteínas codificadas pelo vírus. Adaptado de Schnell et al. (2010).

2.6.3 Glicoproteína do Vírus da Raiva (RVGP)

A RVGP, em sua forma trimérica, possui peso molecular de 140 kDa, e está presente no envelope viral como 1200 moléculas agrupadas na forma de 400 espículas triméricas, sendo responsáveis pela adesão do vírus aos receptores da célula hospedeira, e pela indução de anticorpos neutralizantes no organismo exposto ao vírus (GAUDIN et al., 1992; PERRIN et al., 1995). A RVGP é uma proteína N-glicosilada classe I, que se encontra ancorada na membrana viral através do domínio transmembrânico, está composta por 524 aminoácidos, sendo que os primeiros 19 aminoácidos do N-terminal correspondem ao peptídeo sinal e estão ausentes na proteína madura. Os demais se encontram organizados em três domínios:

ectodomínio N-terminal glicosilado (aminoácidos de 1 a 439), um domínio hidrofóbico transmembranar (aminoácidos 440 a 461) e o domínio hidrofílico citoplasmático carboxiterminal (aminoácidos de 462 a 524) (GAUDIN et al., 1999). O ectodomínio da RVGP possui 8 sítios antigênicos estabelecidos (I – VI, "a" e G1). Desses, os sítios II e III, demonstraram possuir a maior representação de epítopos para anticorpos neutralizantes (97%), sendo, portanto, os de maior interesse para o estudo do desenvolvimento de resposta imune contra essa molécula (BENMANSOUR et al., 1991).

O sítio antigênico III está presente exclusivamente na forma trimérica da proteína, apontada como essencial para a ligação da mesma aos receptores celulares (GAUDIN et al., 1991, 1999). As características apresentadas fazem que a RVGP tenha sido objeto de diferentes estudos onde ela mostrou ser responsável pela indução da formação de anticorpos neutralizantes do vírus e pela proteção dos animais contra o desafio subsequente com vírus da raiva (RAMYA et al., 2011; WIKTOR et al., 1984; YOKOMIZO et al., 2007), tornando-a uma forte candidata na produção de uma vacina recombinante e sendo de grande interesse a sua produção em sistemas de expressão heterólogos (ERTL, 2009).

2.7 Justificativa

Há um grande número de trabalhos na literatura envolvendo o estabelecimento de sistemas livres de SFB visando principalmente, sua utilização na obtenção de produtos para fins terapêuticos, sejam, células, vírus recombinantes ou proteínas recombinantes. Os estudos de cultivos *in vitro* em condições livres de soro têm realizado enormes avanços desde os primeiros trabalhos publicados (BARNES; SATO, 1979, 1980) e, atualmente, são uma opção viável e recomendável para o cultivo de diversos tipos celulares.

Para tornar estes sistemas adequados e eficientes, se faz necessário o entendimento dos processos de adaptação celular, das mudanças no aspecto morfológico e metabólico em meios de cultura (SFM) e desta forma determinar a eficácia de um determinado meio de cultivo, em base a taxa de proliferação celular e a sua capacidade para suportar a síntese de títulos substanciais do produto desejado numa pureza razoavelmente elevada (JAYME; BLACKMAN, 1985).

Vetores virais são ferramentas eficientes na transferência de genes, seja para terapia gênica, geração de resposta imune (vacinas) ou expressão *in vitro* de proteínas recombinantes. Neste sentido, o sistema do SFV (alfavírus) tem sido bastante utilizado, e numerosos artigos têm sido publicados mostrando resultados promissores. Sendo que o sistema de VRPs de

alfavírus é um produto já comercializado pela empresa Alphavax[2], confirmando a importância de desenvolver e estudar a obtenção destes vetores virais em sistemas livres de SFB.

Assim, neste trabalho, nós adaptamos células BHK-21 e BHK-21 C13 em diferentes SFM. Para avaliar a adaptação, realizamos ensaios cinéticos de crescimento e análise de consumo de nutrientes, além disso, células adaptadas foram usadas para produção e infecção por vírus recombinantes de SFV, com a finalidade de avaliar sua capacidade de expressar proteínas estruturais ou não, como a GFP a NS3p do HCV e a RVGP.

[2] http://www.alphavax.com/Alphavaccine-Platform.html

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estabelecer e caracterizar células de mamíferos BHK-21 adaptadas em diferentes meios livres de soro fetal bovino para produção de vírus e proteínas recombinantes.

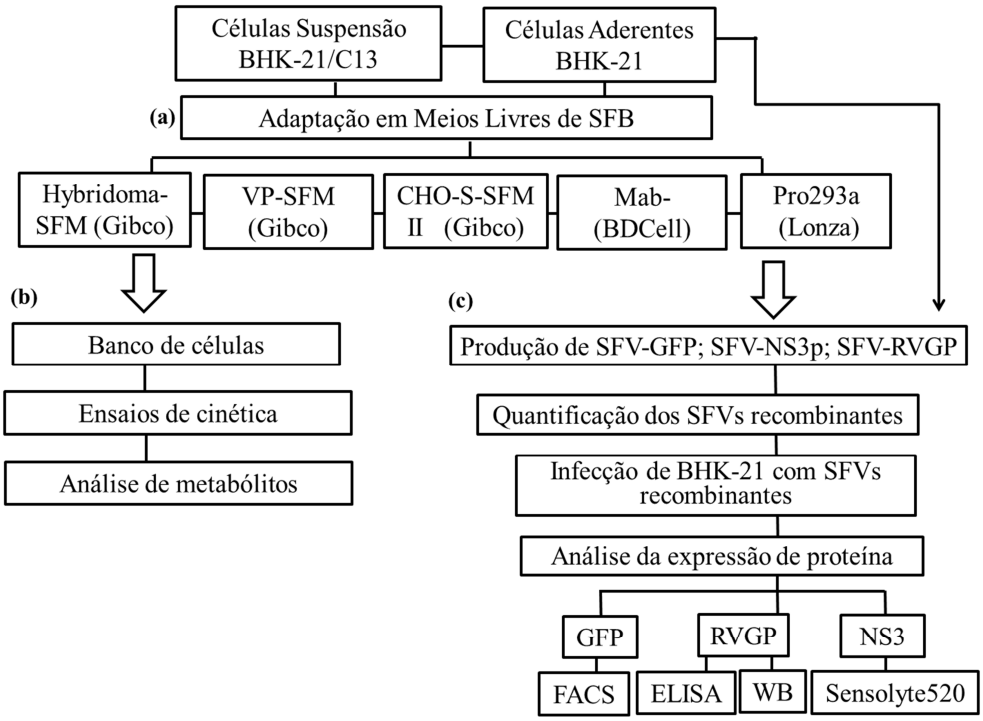
3.2 Objetivos Específicos

1. Determinar as melhores condições para adaptação das células BHK-21 e BHK-21 C13 em meios de cultura livres de SFB.
2. Avaliar o crescimento e a morfologia celular das culturas mantidas nos diferentes meios livres de soro, bem como a concentração de metabólitos, como glicose, glutamina e lactato.
3. Analisar e comparar a produção de vírus recombinantes de SFV em células adaptadas em diferentes meios livres de SFB.
4. Avaliar a capacidade dos vírus recombinantes de SFV em expressar diferentes proteínas recombinantes em células mantidas em diferentes meios de cultura livres de SFB.
5. Determinar as melhores condições de cultivo celular e infecção viral para expressão das diferentes proteínas heterólogas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Na Figura 8 há uma representação esquemática do plano de trabalho seguido neste projeto.

Figura 8. Esquema do trabalho para expressão de proteínas recombinantes em células BHK-21 adaptadas em SFM



(a) Células BHK-21 e BHK-21 C13 foram submetidas a um processo de adaptação em cinco SFM comerciais. (b) Após adaptação, ensaios de cinética e análise de metabólitos foram realizados. (c) Células BHK.-21 adaptadas foram usadas para produção e infecção com os SFVs recombinantes SFV-GFP; SFV-NS3p e SFV-RVGP, e a expressão foi analisada de acordo com a proteína obtida.

4.1 Linhagens celulares

Duas linhagens celulares foram utilizadas. A linhagem BHK-21 (aderente) procedente de um banco de nosso laboratório e a BHK-21 C-13 adaptada ao crescimento em suspensão fornecida gentilmente por Renaud Wagner (Universidade de Estrasburgo).

4.2 Meios de cultura

O meio de cultura utilizado para manutenção e crescimento das células BHK-21 aderentes foi inicialmente o *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM - Gibco, Grand Island, NY., U.S.A.) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco). O meio de cultura usado nas células BHK-21 C13 em suspensão consiste de uma mistura de 50% IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (Gibco) + 50% DMEM suplementado com glutamina (4 mM) e 5% de SFB.

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 1.

Tabela 1 - Meios de cultura livres de SFB usados na adaptação.

Meio de cultura	Fabricante	Características
Hybridoma-SFM	Gibco	Livre de soro, baixa proteína (20 µg/mL como insulina e transferrina). Com surfactante e L-glutamina.
MAb Medium	BD Cell -Animal Component Free	Livre de componentes de origem animal. Com L-glutamina, 0.3% de soytone. Sem pluronic, surfactantes ou fatores de adesão.
VP-SFM	Gibco	Livre de soro, ultra-baixa proteína (5 µg/ml). Com EFG e IH-r. Sem L-glutamina.
CHO-S-SFM II	Gibco	Livre de soro, baixa proteína (<100 µg/ml). Com L-glutamina.
Pro293a™	Lonza	Livre de soro, baixo conteúdo de IH-r, livre de componentes de origem animal. Sem L-glutamina, com 0.1% Pluronic F-68.

4.3 Manutenção das células

As células BHK-21 aderentes foram cultivadas em frascos T de 25 cm^2 com volume de trabalho de 4 mL a 37 °C em incubadora contendo 5% de CO_2, sendo subcultivadas 2-3 vezes por semana.

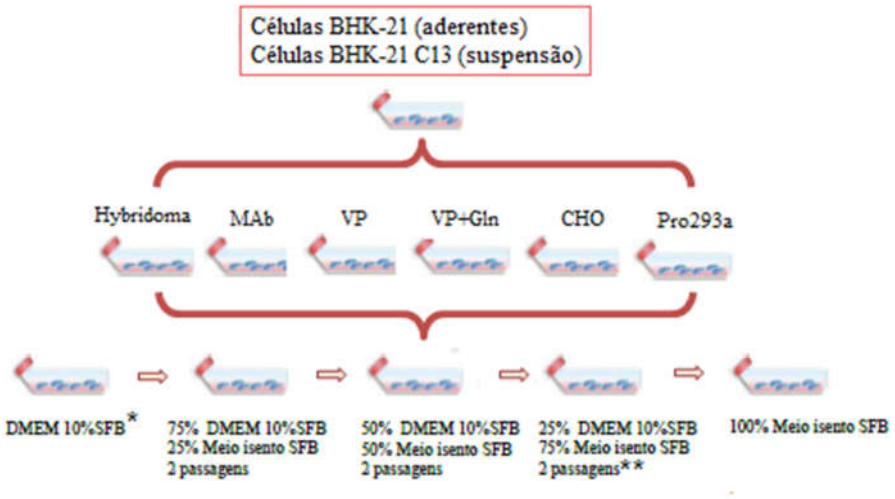
As células BHK-21 C13 em suspensão foram cultivadas de acordo com as recomendações de Renaud Wagner (comunicação pessoal) em frascos T de 25 cm^2 com

volume de trabalho de 10 mL mantidas na vertical em incubadora contendo 5% CO_2 a 37 °C, sendo subcultivadas 2 vezes por semana.

4.4 Adaptação celular em meios livres de SFB

O processo de adaptação aos meios livres de soro fetal bovino foi feito de forma sequencial diminuindo gradativamente a quantidade de SFB, como recomendado por Invitrogen[3], esta metodologia também já foi citada por Sinacore et al. (2000). O esquema geral de adaptação está ilustrado na Figura 9.

Figura 9. Representação esquemática do procedimento de adaptação em SFM.



(*) Controle: O meio de cultura basal para BHK-21 aderentes foi DMEM+10%SFB e o meio de cultura basal para BHK-21 C13 em suspensão foi IMDM+DMEM+Gln (4mM)+5%SFB.

(**) Foi necessária uma passagem adicional com 10% DMEM (10% de SFB) + 90% meio isento de SFB em células BHK-21 (aderentes) em algumas adaptações.

4.5 Preservação das células

Bancos das células adaptadas nos diferentes meios livres de SFB foram feitos em diferentes etapas de adaptação. Para o congelamento, células em fase de crescimento exponencial foram centrifugadas a 700 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;

[3]www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/pdf.Par.2474.File.dat/Adaptation_CC_SFM_Y062810_AdatptionOfCell.pdf

40% v/v de meio condicionado[4] e 10% v/v de DMSO) a uma densidade de 2-3×10^6 cel/mL. As células foram primeiramente mantidas a -80 ºC e posteriormente foram transferidas e mantidas em nitrogênio líquido a -196 °C até uso.

4.6 Análise de densidade e viabilidade celular

Para a análise de viabilidade e densidade celular foi utilizado o método de exclusão do corante azul de tripan em hemacitômetro (DOYLE; GRIFFITHS, 1998).

4.7 Ensaios de crescimento

Os ensaios de cinética em células BHK-21 aderentes adaptadas em diferentes meios foram realizados a 37 °C, em placas de cultura de 6 poços, com um volume de trabalho de 2 mL e uma concentração inicial de 2×10^5 cels/mL (usaram-se 2 poços para a contagem de cada tempo, isto é foram necessários 10 poços para realizar o ensaio de cinética de cada célula).

Os ensaios de cinética em células BHK-21 C13 em suspensão foram realizados a 37°C, em frascos de cultura de 25 cm^2, com um volume de trabalho de 10 mL e uma concentração inicial de 2,5×10^5 cels/mL.O crescimento destas células também foi avaliado em frasco de cultura tipo *spinner* de 100 mL com um volume de trabalho de 50 mL, um inóculo inicial de 2,5×10^5 cels/mL e uma agitação de 50 rpm.

O crescimento das duas linhagens celulares foi acompanhado por 120 horas, e amostras foram retiradas diariamente para determinação da concentração celular (determinação da velocidade específica de crescimento ($\mu_{máx}$) e tempo de duplicação (Td)) e posterior análise de metabólitos. Os ensaios foram desenhados em duplicata e/ou triplicata, com exceção do frasco tipo *spinner* (1 *spinner* para cada meio).

Para a determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular, foi consideraa a fase de crescimento exponencial.

4.8 Análise de metabólitos

[4] Meio condicionado: Corresponde ao meio obtido a partir de um cultivo de 2 dias.

Foram retiradas diariamente amostras de 100 µL e após centrifugação a 715 g por 5 minutos, o sobrenadande foi coletado e armazenado a -20 °C até o momento da análise. Os substratos glicose, glutamina e glutamato e o metabólito lactato das diferentes culturas foram analisados enzimaticamente no *Biochemistry Analyser Model 2700 Select* (YSI Inc., Yellow Springs, Ohio, EUA).

O coeficiente de rendimento de células a partir de glicose/glutamina, que corresponde à quantidade de células produzidas por uma unidade de glicose/glutamina consumida, foi calculado de acordo com a equação a seguir:

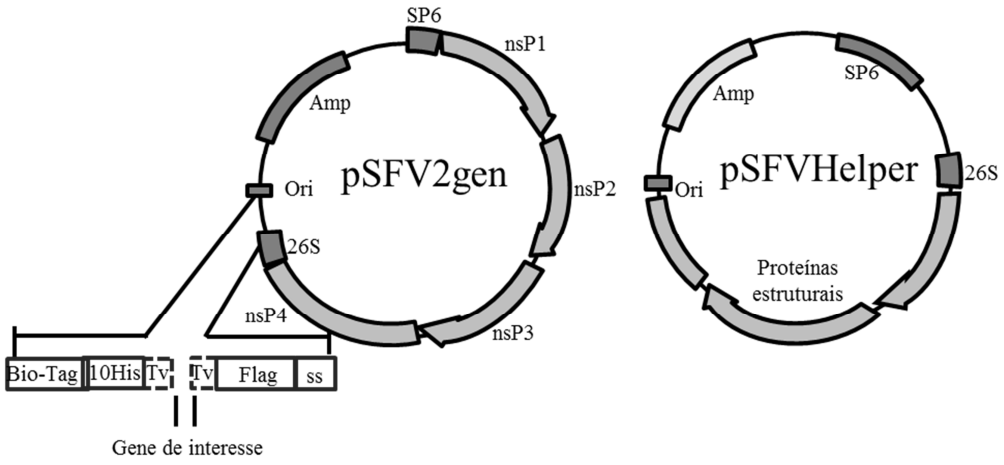
$$Y_{X/Gl} = \left(\frac{X_t - X_0}{Gl_t - Gl_0}\right) \qquad \text{Equação 1}$$

Onde Gl_t é a concentração de glicose ou glutamina no instante t, Gl_0 é a concentração de glicose ou glutamina no instante inicial, X_t é a concentração de células viáveis no instante t e X_0 é a concentração de células viáveis no instante inicial.

4.9 Obtenção de VRP baseadas no sistema Semliki Forest Virus- SFV (SFV-GFP; SFV-RVGP e SFV-NS3p)

O sistema de expressão gênica derivado do vírus *Semliki Forest* consiste do uso de dois plasmídeos (gerados a partir do genoma do SFV). O plasmídeo de expressão (pSFV-GFP; pSFV-RVGP e pSFV-NS3p) contêm os genes não estruturais do SFV (nsP1-nsP4) e o promotor subgenômico SFV26S, além de uma região de policlonagem para inserção do gene de interesse (GFP ou RVGP ou NS3p). O outro plasmídeo, denominado como "auxiliar" ou Helper (pSFV-Helper), contém a informação genética para as proteínas estruturais do vírus (Figura 10). Ambos os plasmídeos possuem como sinais de seleção bacteriana, o gene de resistência à ampicilina. O plasmídeo de expressão possui ainda um sinal de encapsidação, ausente no plasmídeo "auxiliar", tendo essa sequência, a função de permitir que o plasmídeo/RNA que a possui seja incorporado pela partícula viral recém-gerada. Os vetores pFSV-GFP e pSFV-RVGP foram gentilmente cedidos pelo laboratório de Receptores de Proteínas Membranárias da Universidade *Louis Pasteur* em Estrasburgo, França. O vetor pSFV-NS3p foi obtido em nosso laboratório no trabalho de doutorado do Lemos (2015).

Figura 10. Mapa dos vetores plasmidiais.



SP6 – Promotor para RNA polimerase; nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4 – Proteínas não estruturais do SFV; Amp – Gene de resistência à ampicilina; 26S – Promotor subgenômico viral; OriC – Origem de replicação bacteriana; RVGP – Glicoproteína do vírus da raiva.

4.9.1 Amplificação dos vetores

Os vetores foram amplificados mediante a transformação de bactérias competentes da cepa *Escherichia coli* DH5α crescidas em meio LB com antibiótico (Ampicilina 100 μg/mL).

O DNA plasmidial foi extraído e purificado com o kit *Maxiprep Plasmid* (Qiagen, Valencia, CA., U.S.A.), conforme instruções do fabricante, este método é baseado na técnica de lise alcalina (BIRNBOIM; DOLY, 1979). A quantificação do DNA foi determinada por fluorimetria através do equipamento Qubit (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A), e a presença do plasmídeo foi confirmada por análise de padrões de restrição e eletroforese em gel de agarose.

4.9.2 Transcrição *in vitro*

Primeiramente, os plasmídeos pSFV-GFP; pSFV-RVGP; pSFV-NS3p foram linearizados com a enzima *Nru* I e o plasmídeo pSFV-Helper com a enzima *Spe* I,. Uma eletroforese em gel de agarose 0,8% foi realizada para confirmar a linearização. Após esse passo, os DNAs linearizados foram usados como molde para geração de RNA, através de um processo de transcrição *in vitro* (sendo necessários 5 μg do DNA de expressão e 2,5 μg do DNA helper para uma reação), usando o kit *MAXIScript SP6* (Life Technologies, Carlsbad, U.S.A.), conforme instruções do fabricante com algumas modificações, como a temperatura de incubação de 40 °C, além da adição dos reagentes *CAPanalog* (Invitrogen, Carlsbad, CA,

USA.) e *Ribolock* (Thermo Scientific, Vilnius, Lituânia). A eficiência da transcrição foi verificada usando eletroforese em gel de agarose 0,8%.

4.9.3 Transfecção por eletroporação

O protocolo de eletroporação foi baseado em Lundstrom (2003), com algumas modificações. Assim, células BHK-21 aderentes crescendo em diferentes meios livres de SFB, foram coletadas na fase exponencial e foi calculada a concentração celular. O volume de células correspondente a uma concentração de 8×10^6 cels, foi submetido a centrifugação a 700 g por 5 minutos, o pellet foi então ressuspenso em 600 μL de meio de cultura livre de SFB. Esta suspensão foi transferida para um tubo contendo os RNAs obtidos a partir da transcrição, sempre na proporção de 2:1 (RNA-recombinante: RNA-Helper), a mistura foi então transferida para uma cubeta de eletroporação (0,4 cm). A eletroporação foi feita utilizando o aparelho GenePulser II (Biorad, Hercules, CA., U.S.A.). As condições de eletroporação se encontram resumidas na Tabela 2. As células recém eletroporadas foram distribuídas em placa de cultura de 6 poços com 2 mL de meio fresco por cada poço, e incubadas a 37 °C, com 5% de CO_2 por 24 horas. Após esse período, o sobrenadante das células foi coletado e centrifugado a 12000 g (4 °C), por 30 minutos. O sobrenadante da centrifugação, contendo os vírus foi então aliquotado e armazenado a -80 °C.

Tabela 2 - Condições de eletroporação

Parâmetro	Valor
Voltagem (V)	850
Capacitância (μF)	25
Pulsos	2
Intervalo entre pulsos (seg)	1
Cuveta (cm)	0,4

4.10 Detecção e quantificação viral

Para a determinação da quantidade de copias das VRPs presentes no sobrenadante coletado, utilizou-se um protocolo de extração do RNA viral seguido de uma etapa de

transcrição reversa, de forma que o cDNA obtido fosse então quantificado por qRT-PCR (PUGLIA et al, 2013).

a) *Extração de RNA:* O sobrenadante contendo as partículas virais foi submetido a um processo de extração do RNA viral, através do kit QIAmp Viral RNA (Qiagen), conforme instruções do fabricante.

b) *Tratamento com DNase*: O RNA obtido foi submetido a uma etapa de tratamento com a enzima DNase I (Promega, Madison, WI., U.S.A), para eliminar possíveis DNAs contaminantes que possam existir na solução. Após a adição de 3 unidades da enzima para cada 3 microgramas do material, a solução é incubada a 37 °C por 30 minutos. Terminado esse período, adicionou-se 2 µL de um inibidor enzimático à base de EGTA (*Stop Solution* - Promega), e a reação foi incubada por 10 minutos a 65 °C. Este passo visa à inativação da enzima, para que não haja ação da mesma no cDNA viral que será obtido posteriormente. O RNA tratado foi imediatamente submetido a uma reação de transcrição reversa.

c) *Síntese do cDNA*: A síntese do cDNA necessária para posterior quantificação no aparelho de qRT-PCR é feita por um processo de transcrição reversa *in vitro* (RT). Para essa etapa, foi utilizado o *primer* R-E-2 (Tabela 3), específico para a região nsP3 do vírus do SFV. Cada amostra de RNA extraído foi submetida à reação de transcrição reversa com a enzima M-MLV (Life Technologies). Primeiramente, o RNA tratado com DNase foi incubado a 65ºC durante 5 minutos, juntamente com 1 µM do *primer* anti-senso específico, 0,5 mM de dNTPs e água livre de DNase e RNase. Em seguida, a mistura foi resfriada rapidamente no gelo e adicionados o tampão, o DTT 0,1M e 200 U de M-MLV, em um volume total de 20 µL. A reação foi incubada a 37 ºC durante 50 min para a síntese do cDNA. A reação foi interrompida pela incubação a 70 ºC durante 15 minutos. As amostras foram então armazenadas a –20 ºC até a análise.

4.10.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Amostras correspondentes a extração de RNA, tratamento com DNase e cDNA obtido, foram submetidas a uma reação de PCR para verificação de ausência de contaminantes e amplificação da região de interesse. Para este processo foram utilizados os pares de *primers* R-I-2 / F-I-2 (Tabela 3). A PCR foi desenvolvida com o kit comercial *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A), seguindo recomendações do fabricante. Foram adicionados 5 µL de amostra, para 1 µL de cada *primer* com uma concentração de 5 µM, 1 µL

de $MgCl_2$ (1,5 mM), 0,5 µL dNTP (10 mM), 2,5 µL de Buffer 10x, 0,2 µL de enzima (1 U) e água para um volume final de 20 µL. A reação foi realizada no termociclador PTC-200 (MJ Research, St Bruno, Quebec, Canada) com o seguinte ciclo de amplificação: 94 °C / 3 minutos, 34 ciclos de 94 °C/ 15s, 53 °C/ 30s, 72 °C/ 30s, a reação foi finalizada com 72 °C/ 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Tabela 3- Características dos oligonucleotídeos usados como *primers* para quantificação das VRPs

Nome	Uso	Sequencia	TM (°C)	%GC
F-I-2	qRT-PCR	ACA GAC TGT CAC TGA GCA G	52	53
R-I-2	qRT-PCR	TCT CTG CAG TAG ATG GTC AC	54	50
R-E-2	RT	CTC AAT GAT GAC GTG GAG CT	54	50

4.10.2 qRT-PCR para titulação das VRPs de SFV

Para realizar a quantificação do RNA genômico das VRPs, foi construída uma curva-padrão, a partir do vetor de expressão (pSFV-RVGP) que contém a região em comum (nsP3 originária do genoma do SFV) para todas as VRPs usadas neste trabalho. O vetor foi submetido à linearização usando a enzima *Nru* I (Thermo Scientific), a qual foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. Posteriormente, o produto da linearização foi quantificado através de método de fluorimetria (Qubit – Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A) e diluído em TE pH 8 (1 mM), para a obtenção de diversas quantidades de cópias (6×10^7, 6×10^6, 6×10^5, 6×10^4, 6×10^3, 6×10^2 e 60 cópias). Os padrões diluídos e aliquotados foram armazenados a -20 °C até o momento do uso. Diversas amplificações da curva padrão foram realizadas por qRT-PCR para determinar sua reprodutibilidade, os experimentos foram realizados em triplicatas para cada padrão. O par de *primers* usados para a quantificação por qRT-PCR foram os mesmos usados para a PCR convencional (R-I-2 / F-I-2).

A qRT-PCR foi realizada no equipamento *StepOne Real Time PCR System* (Applied Biosystem, Foster City, CA, U.S.A.). Utilizou-se o kit *Power Sybr Green* (Life Technologies), que contém uma mistura de dNTPs, $MgCl_2$, Taq DNA polimerase e reagente intercalante de bases fluorescente (*Sybr Green*) em tampão próprio. Na solução contendo o mix, foram adicionados 0,65 µL de cada *primer* (R-I-2 / F-I-2, a 5 µM) e água para um volume final de 12 µL. A solução foi distribuída na placa *MicroAmp* (Applied Biosystems), adicionando-se

posteriormente 3 µL de amostra, totalizando 15 µL de volume final. A placa era então vedada e brevemente centrifugada (300 g/ 5s).

O ciclo de amplificação utilizado foi: 95 °C/10 min, 40 ciclos de 95 °C/ 15s, 53 °C/ 15s, 60 °C/ 15s. A curva de dissociação foi lida entre 63-90 °C com leitura a cada 0,3 ºC de elevação, para verificar a especificidade da reação, sendo que o fragmento amplificado (145 bp) apresentou dissociação à temperatura de 83 ºC ± 0,3 ºC.

O aplicativo *StepOne Software v2.2.2* (Applied Biosystems) foi utilizado para realizar a análise de dados obtidos durante a reação de qRT-PCR. Para determinação do número de cópias de SFV, foram realizados alguns cálculos com base na equação da curva de quantificação. Sendo que, o número de cópias do RNA-SFV foi determinado multiplicando-se o resultado fornecido pela qRT-PCR por um fator de correção, obtido com base nas diluições efetuadas durante o processo de extração e tratamento do material genético (Equação 2)

$$(A \times B \times C \times D)/(E \times F \times G \times H) = \text{SFV (VRPs/µl)} \qquad \text{Equação 2}$$

Em que:

A = valor gerado pelo software a partir da amplificação do cDNA

B = volume total da RT (µL)

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

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

E = volume de cDNA usado para reação de qRT-PCR (µL)

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

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

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

4.11 Infecção com VRPs de SFV

Uma vez quantificados, os vírus recombinantes foram utilizados para infecção de células BHK-21 aderentes. Os vírus são obtidos na forma inativa devido a uma mutação na proteína estrutural E1, necessitando para a ativação viral de uma incubação com α-quimiotripsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) usando uma concentração de 1,6 mg /

mL de vírus por 30 minutos à temperatura ambiente (TA). Posteriormente, um tratamento com aprotinina (Thermo Scientific, Vantaa, Finlândia) (1 mg/ mL de vírus) por 5 minutos à TA foi realizado para inativar a α-quimiotripsina.

Após esse processo, as VRPs ativadas foram utilizadas para infecção. As células cultivadas em diferentes meios livres de SFB foram inoculadas em placas de 6 poços, com $2{,}5\times10^5$ células/poço, um dia antes da infecção. Para o processo de infecção foi retirado o meio de cultura de cada poço, após foi adicionado o vírus na quantidade desejada, previamente diluído em 0,5 mL de meio fresco sem SFB. As placas permaneceram com este volume durante uma hora, em estufa à 37 ºC, sendo agitadas a cada 15 minutos. Após esse tempo, foi adicionado meio novo para um volume final de 1,5 mL/poço e os cultivos foram colocados novamente a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO_2.

Após 24 horas, as células foram coletadas por fluxo-refluxo, após centrifugação a 700 g por 5 minutos, o sobrenadante de cada poço e o pellet foram coletados e armazenados a -20 °C para posterior avaliação quanto à presença da proteína correspondente.

4.12 Análise de proteína

4.12.1 Citometria de fluxo

Células infectadas com SFV-GFP foram analisadas para expressão de GFP no setor de citometria de fluxo do Instituto Butantan no laboratório de Imunoquímica em um aparelho FACSCALIBUR da Becton Dickinson. Para isso, as células foram descoladas da placa de 6 poços e submetidas a centrifugação (750 g por 5 minutos), em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em PBS 1x e centrifugado novamente. As células foram finalmente ressuspensas em 200 μL de PBS 1x e levadas para análise. A GFP foi excitada a 480 nm e a emissão medida com filtro de 530 nm. A aquisição (10000 eventos para cada amostra) foi configurada a cada análise, com base em uma suspensão de células não transfectadas que foram tratadas igualmente às células transfectadas, sendo esta a fluorescência controle negativo. Somente valores acima desses foram considerados como positivos na expressão de GFP.

4.12.2 ELISA

A produção de RVGP foi avaliada pelo método de ELISA utilizando o kit *Rabies Glycoprotein Enzyme Immunoassay* (Instituto Pasteur, Paris) (ASTRAY et al. 2008).

No dia anterior ao procedimento, as placas foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal (mAb-D1, Instituto Pasteur, Paris, França) e armazenadas a 4°C. No momento do uso, as placas foram bloqueadas com solução de bloqueio e incubadas por 30 minutos a 37°C, sendo então lavadas 5x com tampão de lavagem. O antígeno de referência foi diluído em tampão de diluição nas concentrações 7,8 ng/mL, 14,6 ng/mL, 31,2 ng/mL, 62,5 ng/mL, 125 ng/mL, 250 ng/mL e 500 ng/mL, para definição da curva padrão do experimento. As amostras de lisado celular e sobrenadante foram primeiramente descongeladas, adicionou-se 500 µL de tampão de lise (50 mM Tris, 150 mM NaCl e 1% Nonidet P-40), e foi feita homogeneização por vortex. Em seguida, foram colocados 500 µL de tampão de lise e nova homogeneização foi realizada, incubando em seguida as amostras a 4 °C durante uma hora, homogeneizando a cada 15 minutos. Após esse período, foi feita centrifugação a 12000 g durante 10 minutos para separar os *debris* celulares. O sobrenadante e os padrões foram então aplicados na placa no volume de 200 µL em duplicatas e incubados por 1 h a 37 °C, para permitir a ligação da RVGP aos anticorpos aderidos na placa. Após esse período, as placas foram novamente lavadas 5 vezes e o anticorpo monoclonal anti-RVGP conjugado com peroxidase foi adicionado, permitindo-se uma incubação por 1 h a 37 °C. Após esse período, as placas foram lavadas 6 vezes e a solução de cromógeno foi adicionada e a reação incubada no escuro por 30 minutos a 22 °C, recebendo após esse tempo a solução de parada. A absorbância foi lida no comprimento de onda de 492 nm em leitor de microplacas (Multiskan MJ-Labsystems-Thermo Scientific). A determinação da concentração de RVGP em cada amostra é realizada com base na comparação das absorbâncias das amostras com a curva padrão.

4.12.3 Western Blotting

A presença de proteína RVGP foi detectada através de ensaio de Western Blotting, após separação por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Para isto, o pellet de células BHK-21 infectadas com SFV-RVGP foi ressuspendido em tampão de lise RIPAA 1x, a solução foi incubada por 30 minutos no gelo, após este período o lisado foi centrifugado a 11000 g por 10 minutos. Em seguida, 45 µL do sobrenadante foram tratados com 15 µL de tampão não redutor 4x (Thermo Scientific). Esta solução foi então tratada a 90 °C por 10 minutos e posteriormente cada amostra foi carregada no gel de poliacrilamida (12%). A corrida do gel

foi realizada a uma voltagem de 110 V por 2 h. Posteriormente o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose Amersham Hybond – ECL de 0,45 um (GE Healthcare, Piscataway, NJ, U.S.A.) em sistema de transferência semi-seco (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) nas condições de 400 mA por 40 min. Após este tempo, a membrana foi incubada O/N a 4 °C em solução de bloqueio (leite 3%). No dia seguinte, a membrana para Western blot foi lavada 3x por 10 minutos com TBS + Tween 20 (0,05%). Logo após, foi adicionado o anticorpo primário (*Anti-rabies Virus Glycoprotein Antibody* - LS-C75309 – LSBio, Seattle, WA, USA), diluído 1:2000 em 15 mL de tampão de bloqueio, sendo incubado por 1 h sob agitação. Três novos procedimentos de lavagem com TBS + Tween 20 (0,05%) foram realizados, e em seguida adicionou-se o anticorpo secundário conjugado a HRP (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A) diluído 1:5000 em 15 mL de tampão bloqueio, sendo novamente incubado por 1 h sob agitação. O mesmo procedimento de lavagem já descrito foi realizado novamente. Para o processo de revelação foi adicionado sobre a membrana o reagente Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, U.S.A.), deixando agir por 5 minutos. Em seguida, as imagens foram registradas e analisadas no fotodocumentador Alliance 2.7 (Uvitec, Cambridge, Reino Unido).

4.12.4 Teste de detecção da atividade protease da NS3

A detecção da proteína NS3 expressa em nosso sistema, foi realizada no laboratório do iBET (Oeiras-Portugal) como parte de uma parceria estabelecida com este instituto. Desta forma, a presença da NS3 foi detectada através da sua função proteolítica usando o kit SensoLyte520 HCV (Anaspec, Fremont, CA, U.S.A.). Para isto, células BHK-21 com 24 h de infecção com SFV-NS3 e células sem infectar (controle negativo) foram coletadas e centrifugadas a 300 g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em PBS, uma amostra foi retirada para contagem e cálculo da concentração celular, após uma nova centrifugação a 300 g por 5 minutos as células foram ressuspendidas em tampão hipotônico (10mM Tris-HCL, pH 7.8, 10mM NaCl) a uma proporção de 100 µL de tampão para cada 2×10^6 células. Posteriormente, as células foram lisadas através de ciclos de congelamento e descongelamento e em seguida o lisado foi colocado para centrifugação a 900 g por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e usado para análise seguindo as recomendações do fabricante do kit.

O sinal de fluorescência foi detectado usando o equipamento Infinite M200 Pro Nanoquant – Tecan, dados foram tomados cada 10 min usando uma onda de excitação de 490 nm e uma onda de emissão de 520 nm durante 120 minutos.

Um ensaio adicional foi realizado nas mesmas condições na presença do inibidor (AnaSpec Cat#25346). As amostras foram incubadas 15 minutos antes de adicionar o substrato.

4.12.5 Análise mRNA de NS3 e RVGP por qRT-PCR

Para analisar a presença do mRNA da NS3 ou da RVGP, amostras de células infectadas tiveram seu RNA extraído usando o Kit Pure Link RNA Mini Kit da Ambion - Life Technologies, seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, o RNA foi quantificado usando o kit Quant-it RNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A) e a leitura foi realizada no fluorímetro Qubit (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A). Foi calculado o volume contendo 3 µg de RNA, o qual foi tratado com DNase da Promega com uma incubação a 37 °C por 30 min. Terminado esse período, adicionou-se 2 µL de um inibidor enzimático à base de EGTA (*Stop Solution*), e a reação foi incubada a 65 °C, 10 min. O RNA tratado foi imediatamente submetido a uma reação de transcrição reversa com a enzima SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA., U.S.A) usando o iniciador NS3p1a-521R (Tabela 4) para amplificação da região da NS3 e o iniciador RVGP3 para amplificação da região da RVGP. Uma vez obtido o cDNA, as amostras foram amplificadas por PCR no termociclador PTC-200 (MJ Research, St Bruno, Quebec, Canada). Os iniciadores para amplificação da região NS3 foram NS3p1a-198F e NS3p1a-295R (Tabela 2) e, para identificação da região da RVGP RVGP r1 e RVGP 9. As condições utilizadas para amplificação da NS3 foram: 94 °C por 30 segundos, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, de 58 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos com uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. A reação para amplificação da RVGP foi realizada com o seguinte ciclo de amplificação: 94 °C/3 minutos, 34 ciclos de 94 °C/ 30s, 53 °C/30s, 72 °C/ 30s, 72 °C/ 10 minutos.

Após verificação do tratamento com DNase e da síntese do cDNA de interesse, o cDNA das amostras foi submetido a qRT-PCR. Para RVGP foi utilizado o seguinte ciclo de amplificação: 95 ºC/10 minutos, 40 ciclos de 95 ºC /15 s, 53 ºC /10 s, 60 ºC /15 s, sendo a leitura da fluorescência realizada à temperatura de 60 ºC. Após a amplificação foi efetuada a análise da curva de dissociação (70 ºC a 95 ºC) de todas as amostras para verificar a especificidade da reação. Para NS3 foram usadas as seguintes condições de amplificação: 95

°C/10 min, 40 ciclos de 95 ºC /15 s, 58 ºC /5 s, 60 ºC /25s. A curva de dissociação foi lida entre 70 °C a 90 °C, a cada 0,3 s.

O cálculo da produção de mRNA correspondente aos genes de interesse foi feito de acordo com a metodologia descrita por Pfaffl (2001).

Tabela 4 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados como *primers* para quantificação do mRNA-NS3 e mRNA-RVGP

Nome	Sequência	TM (°C)
NS3p1a-152F	TGGCCACCTGTATCAACG	50
NS3p1a-295R	GTGCAAGGGGTCAGGCTTCT	56
NS3p1a-521R	TTCCACGGGGATGAAGTCCA	54
RVGP 3	AGCCGCAAGTCTCACTCCC	59,9
RVGP r1	TGTAATCGTGGTTAGTGGAGC	54,5
RVGP9	CTGACTACCACTGGCTTCG	55,2

4.13 Análise de resultados

A avaliação quantitativa da expressão de GFP em células adaptadas em diferentes meios livres de soro, foi realizada através de citômetro de fluxo usando como ferramenta de análise o software FACSDiva Version 6.1.3, a partir do qual é possível extrair os valores da mediana (% de células fluorescentes) e a intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias). A proteína NS3 foi avaliada de forma qualitativa, medida em unidades de fluorescência geradas pela clivagem de um substrato específico para HCV dada pela ação da protease (NS3) expressa em células crescendo em SFM. Finalmente, a análise da RVGP foi obtida através do ensaio de ELISA e foi comparada em termos de produtividade específica (proteína expressa por célula) e produtividade volumétrica (ng/mL) e a integridade da proteína foi avaliada por imunoensaio *Western Blot* com anticorpos específicos para RVGP.

A análise estatística dos resultados das cinéticas de crescimento e da expressão de RVGP foi feita através da análise de variância das médias (ANOVA), e para analisar a existência ou ausência de diferenças entre os diferentes meios de cultura e condições de infecção avaliados foi aplicado o teste de TUKEY (Teste de comparações múltiplas), com um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Adaptação em meios livres de soro fetal bovino

A escolha de uma formulação livre de soro para uma determinada linhagem celular e condições específicas de cultivo na maioria das vezes deve ser determinada empiricamente ou através de informações obtidas da literatura (SINACORE; DRAPEAU; ADAMSON, 2000). Neste sentido, no presente trabalho foram avaliados 5 diferentes meios livres de soro disponíveis no mercado (Tabela 1 do item 3.2). O processo de adaptação celular foi realizado de forma independente em células BHK-21 (aderentes) e em células BHK-21 C13 (suspensão). A Tabela 5 apresenta um resumo do resultado do processo de adaptação obtido em ambas as linhagens celulares estudadas.

Tabela 5 - Resultado da adaptação nos meios de cultura livres de SFB.

Células	Hybridoma-SFM	MAb	VP-SFM	CHO-S-SFM II	Pro293a
BHK-21 Aderentes	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
BHK-21 C13 Suspensão	Sim	Não	Não	Sim	Sim

Para facilitar o tratamento destas células ao longo do trabalho elas serão chamadas pelo seu nome acrescido do meio em que foram adaptadas.

5.1.1 Células BHK-21 aderentes

O processo de adaptação foi iniciado com células crescendo em DMEM suplementado com 10% de SFB, a partir desses cultivos, foi sequencialmente reduzida a quantidade de SFB como mostrado na Figura 9. Representação esquemática do procedimento de adaptação em SFM.

No processo de adaptação, conseguimos atingir facilmente a proporção de SFM:DMEM+10% SFB de 75:25 nos diferentes meios, observamos a presença de alguns aglomerados, porém as células apresentavam viabilidades superiores a 90%, com aproximadamente 85% de confluência. Depois dessa etapa foram encontradas dificuldades

para passar diretamente ao meio livre de SFB, onde as células morriam, formavam muitos aglomerados e dessa forma não era atingida boa confluência, impedindo de repicá-las. Desta forma, uma etapa adicional de 90:10 foi necessária, reduzindo o impacto das alterações observadas nas diferentes células. Assim, após 3 a 4 repiques nestas condições, as células foram cultivadas em meio 100% livre de SFB. Em alguns casos foi necessário passar a uma etapa intermediária de 95:5 antes de transferir para 100% de meio livre de SFB. Estas células foram ainda submetidas a pelo menos 10 repiques com viabilidade e confluência celular satisfatórias e então utilizadas para o estabelecimento de um banco de células congeladas.

5.1.2 Células BHK-21 C13 Suspensão

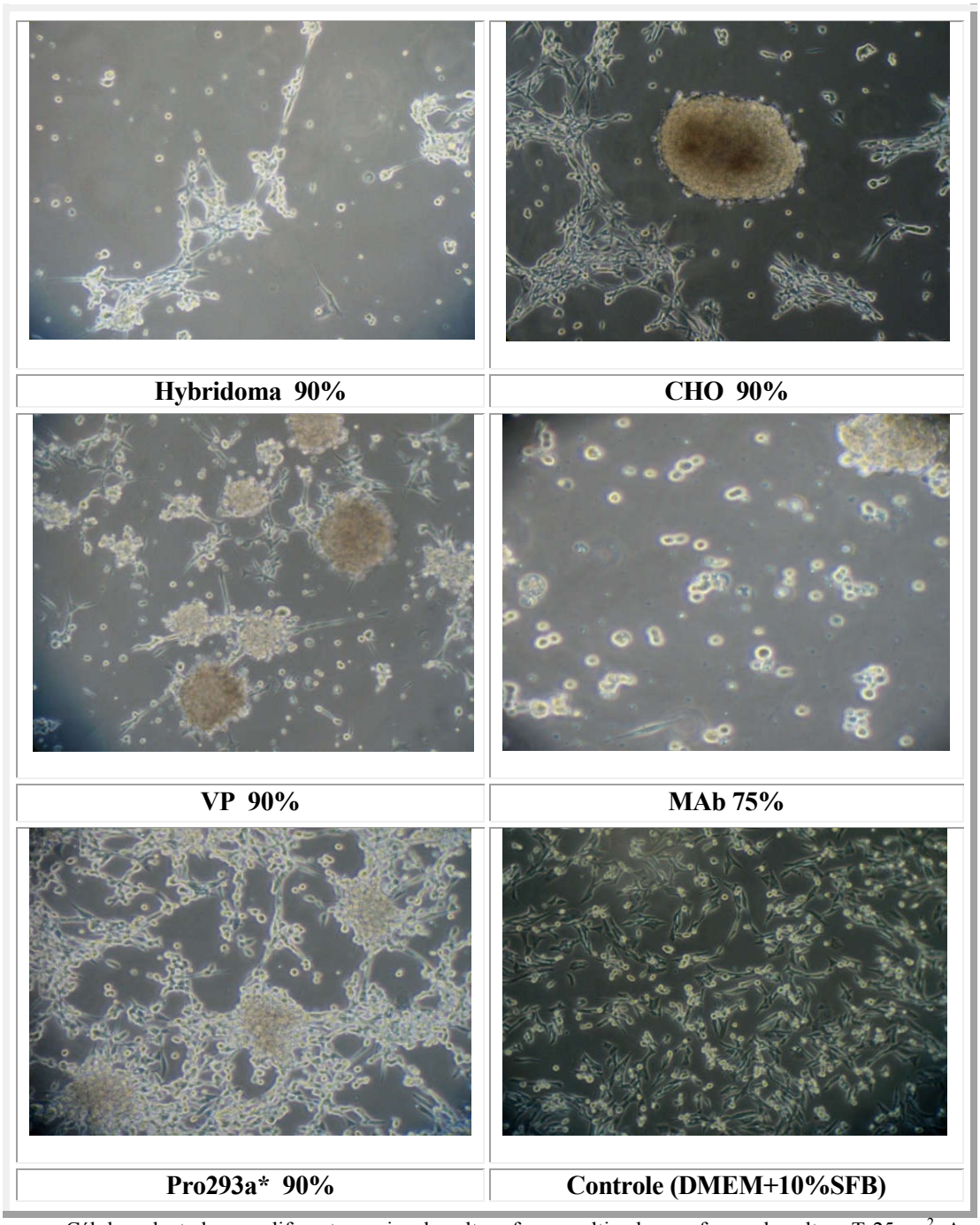
O processo de adaptação sequencial nesta linhagem foi iniciado com células crescendo em IMDM+DMEM+Glutamina (4 mM) suplementado com 5% de SFB. Da mesma forma que para as células aderentes, foi feito um inóculo inicial em todos os meios livres de SFB escolhidos para este estudo (Hybridoma, MAb, VP, CHO e Pro293). Foi atingida a adaptação completa nos meios de cultura Hybridoma, CHO e Pro293a. Com estas células foi atingida uma adaptação completa em menor tempo e sem necessidade de passar pela etapa 90:10, descrita acima para as células aderentes. As células em meio CHO depois de alguns repiques em 100% começaram a apresentar dificuldades para crescer e a viabilidade foi decrescendo rapidamente até elas morrerem completamente, o banco celular foi avaliado e não foi obtido sucesso no crescimento delas, motivo pelo qual este meio não foi mais usado na linhagem em suspensão.

5.2 Análise da morfologia

As células BHK-21 (aderentes) cresceram em forma típica de fibroblasto no meio basal DMEM + 10% SFB (Figura 11). Quando cultivadas nos meios livres de SFB: Hybridoma, CHO e VP na proporção 75:25 as células começaram a manifestar uma aparência mais arredondada, também foi observada uma perda da fixação ao substrato, ficando células suspensas no meio de cultura. Além disso, também foi observada durante o processo de adaptação a formação de aglomerados tanto aderidos como no sobrenadante da cultura (Figura 11) Nas células BHK-21-MAb já na proporção 75:25 foram observadas uma maioria de células crescendo em suspensão e com uma grande formação de aglomerados (Figura 11)

Esta morfologia arredondada foi conservada até o final do processo de adaptação como pode ser observado na Figura 12, mas a formação de aglomerados já não foi mais observada.

Figura 11. Células BHK-21 aderentes durante processo de adaptação.

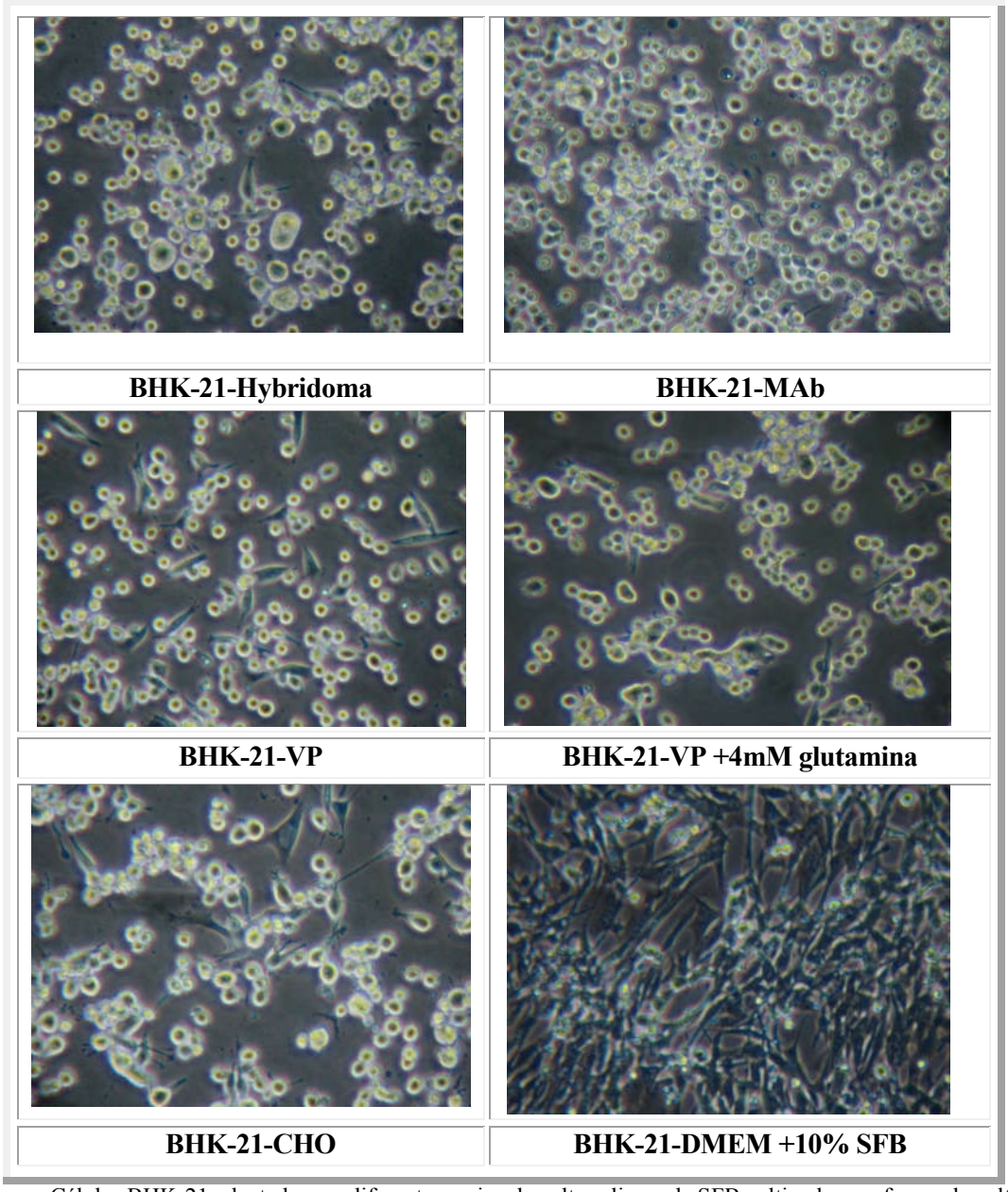


Células adaptadas nos diferentes meios de cultura foram cultivadas em frasco de cultura T-25 cm^2. As fotos foram tomadas na objetiva 10x em microscópio invertido.

* Células cultivadas no meio Pro293a bem aderidas e com pouca formação de aglomerados. Apesar disso, não se obteve sucesso na adaptação das células neste meio de cultura.

Na Figura 12 são mostradas as células adaptadas depois do descongelamento dos bancos gerados (3-5 meses após congelamento). Pode-se observar que o processo de adaptação foi concluído com sucesso, já que as células conseguem crescer de forma satisfatória e cabe ressaltar ainda que os meios de congelamento não contem soro fetal bovino.

Figura 12. Células BHK-21 aderentes adaptadas pós-descongelamento.



Células BHK-21 adaptadas em diferentes meios de cultura livres de SFB cultivadas em frasco de cultura T-25cm^2. As imagens foram tomadas na objetiva de 10x, em microscópio invertido.

Nas células BHK-21 C13 (suspensão), o processo de adaptação nos meios livres de SFB não gerou mudanças visíveis na morfologia celular.

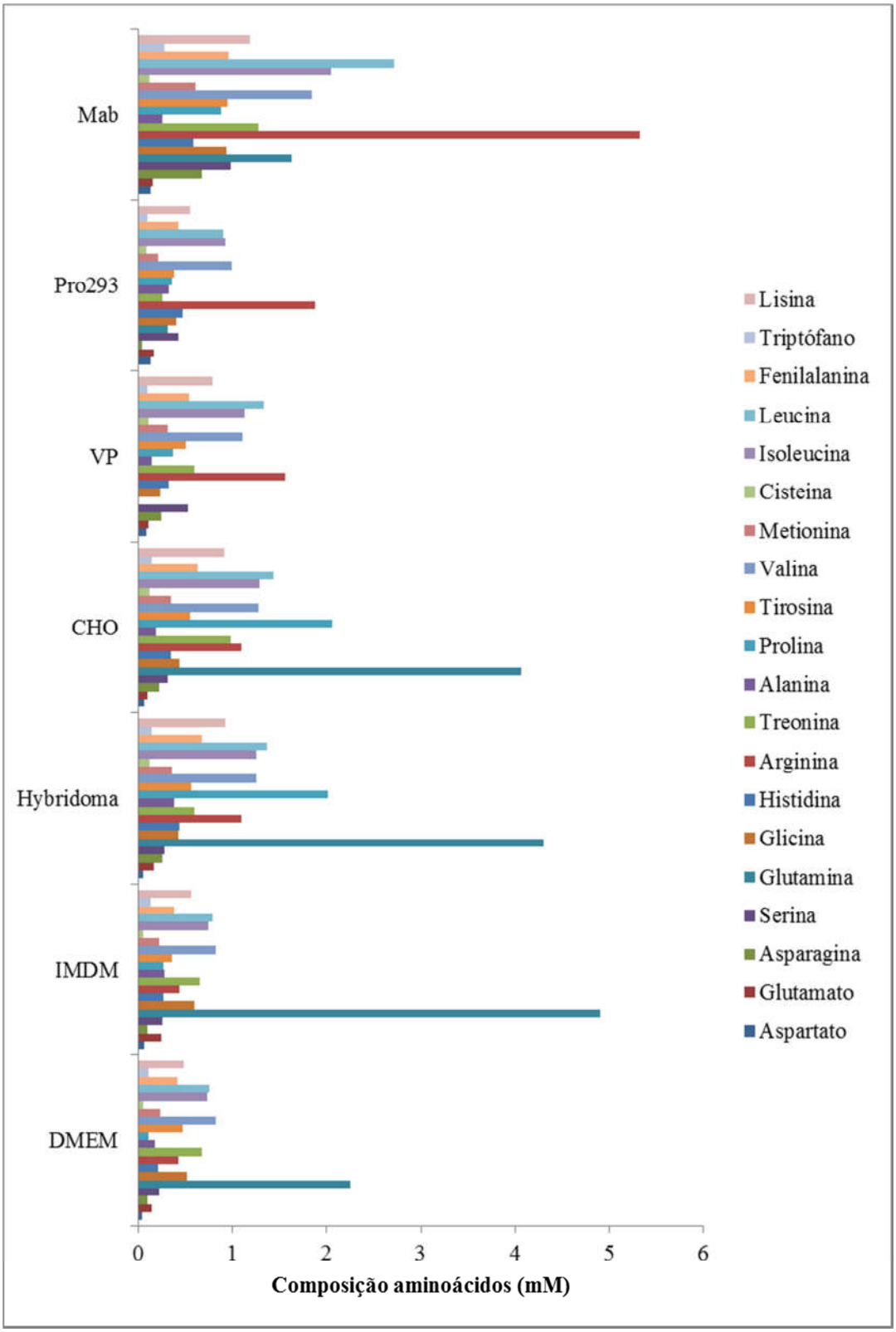
5.3 Cinética de crescimento e consumo/produção de metabólitos

Os meios de cultura SFM usados no presente trabalho foram adquiridos de diferentes empresas (Gibco, Lonza e BD), razão pela qual, a sua composição é fechada. Com o intuito de identificar diferenças ou semelhanças com o meio basal, amostras de meio de cultura foram passadas no analisador bioquímico YSI, para conhecer sua composição referente à glicose, glutamina, glutamato e lactato (Tabela 6). Pode se observar em relação a esses compostos, que os meios de cultura Hybridoma e CHO da Gibco apresentam uma formulação similar entre eles e com os meios basais. Os meios VP e Pro293a não possuem glutamina na sua formulação, sendo necessária a suplementação na hora de cultivar as células, entretanto, observamos que as células cultivadas nestes meios, apresentaram crescimento na ausência de glutamina, fato interessante que decidimos levar para frente, com a finalidade de analisar o comportamento das células adaptadas nestes meios livres de glutamina. Por último, podemos observar que o meio de cultura MAb (livre de produtos de origem animal) apresenta uma composição diferente em relação a todos os metabólitos analisados, possuindo um valor superior (1,6 vezes) em relação aos outros meios empregados.

Tabela 6- Concentração de Glicose, Lactato, Glutamina e Glutamato nos meios de cultura usados na adaptação.

Meio de cultura	DMEM	IMDM	Hybridoma	CHO	VP	Pro293a	Mab
Glutamina (g/L)	0,568	0,556	0,671	0,689	0,003	0,001	0,850
Glutamato (g/L)	0,018	0,044	0,013	0,026	0,012	0,080	0,082
Glicose (g/L)	5,840	4,910	4,670	4,640	4,930	7,510	9,130
Lactato (g/L)	0,223	0,084	0,001	0,001	0,000	0,001	0,137

Figura 13 – Composição de aminoácidos essenciais nos meios de cultura usados na adaptação.



Amostras de meio foram analisadas por HPLC para identificar a concentração de aminoácidos presentes nestes meios (Figura 13). Podemos ver que igualmente ao observado na Tabela 6, os meios com a mesma origem (Gibco), apresentam uma formulação similar em quase todos os aminoácidos. Podemos notar que o meio de cultura MAb possui novamente valores superiores na concentração de vários dos aminoácidos. O fato deste meio possuir estes valores pode se dever a que ele além de ser *serum-free* é livre de componentes de origem animal, assim, é possível que os fabricantes tentem suprir isto colocando uma concentração maior de vários componentes no meio, para garantir que seja suficiente para comportar as necessidades das células. Pode se concluir que meios livres de soro possuem uma concentração superior de vários dos aminoácidos essenciais, esta diferença foi de pelo menos 2 vezes para quase todos os casos, este fato é fácil de entender sabendo da importância que tem eles no metabolismo de células animais.

Após conhecer as informações fornecidas nas tabelas anteriores, foi realizada a caracterização cinética das células BHK-21 aderentes e BHK-21-C13 suspensão. Para isto, as células adaptadas em diferentes meios de cultura foram cultivadas acompanhando o crescimento celular durante 5 dias, avaliando diariamente a concentração e viabilidade celular e o consumo/produção de glutamina, glicose e lactato. Cada linhagem (aderente e suspensão) será descrita nas seções seguintes.

5.3.1 BHK-21 aderentes

Os cultivos para a caracterização cinética destas células foram realizados em placa de 6 poços em duplicata e em diferentes passagens, com o intuito de avaliar a reprodutibilidade e estabilidade da adaptação em meios livres de soro.

Na Figura 14 (A) observamos o comportamento das células BHK-21 adaptadas em diferentes meios em relação ao seu crescimento e viabilidade. Podemos observar uma concentração celular máxima em células BHK-21-Hyb de 2×10^6 cel/mL as 72 horas de cultivo. As células BHK-21-MAb apresentaram altas concentrações celulares, atingindo uma concentração celular de $2{,}13\times10^6$ cel/mL em 96 horas. As células cultivadas no meio CHO atingiram sua concentração celular máxima às 96 horas de cultivo com $2{,}16\times10^6$ cel/mL. A concentração celular encontrada nestas células se apresentou similar à encontrada em células BHK-21 suplementadas com SFB ($2{,}5\times10^6$ cel/mL em 72 horas de cultivo). Observamos o desempenho mais baixo em relação ao crescimento celular em células BHK-21-VP, cuja concentração celular máxima foi de $1{,}13 \times 10^6$ cel/mL em 96 horas de cultura, valor 2,2 vezes

inferior em relação às células BHK-21-DMEM. Acreditávamos que o fato de não ter suplementado este meio com glutamina, fosse o motivo de uma menor taxa de crescimento celular, porém, a adaptação de células BHK-21 em meio VP suplementado com glutamina (4 mM) não aumentou consideravelmente a concentração celular máxima atingida que foi de $1,42\times 10^6$ cel/mL em 72 horas de cultivo, este valor significou um aumento de 1,2 vezes em relação às células não suplementadas, porém se compararmos com as células BHK-21-DMEM a concentração celular ainda é quase 2 vezes menor.

A fase de crescimento exponencial de células adaptadas em SFM foi igual à encontrada para células suplementadas com SFB , observada entre 24-48 horas de cultivo.

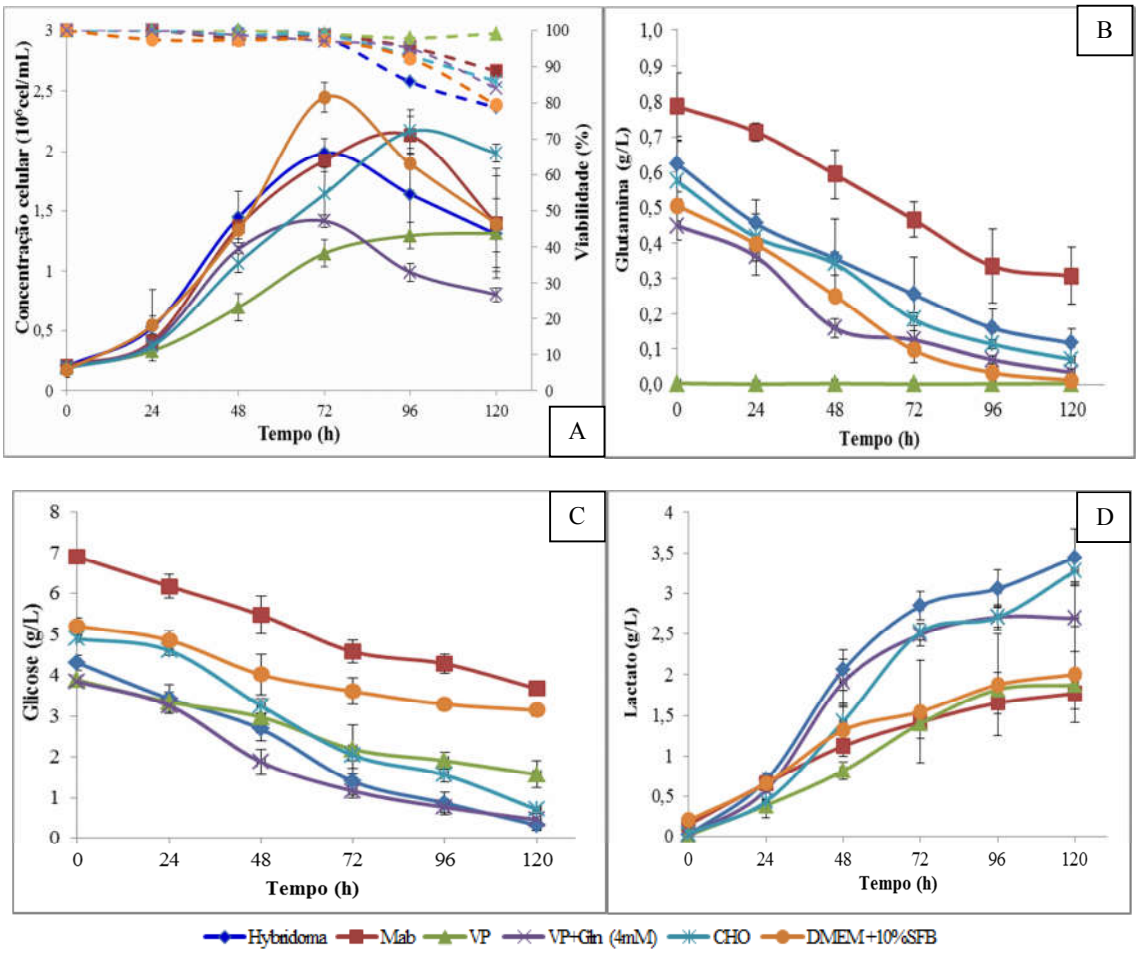
A viabilidade foi mantida acima de 90% até 72 horas de cultivo em todas as células. A partir deste momento, ela cai de forma similar em células BHK-21-Hyb e BHK-21-DMEM, seguida de células BHK-21-CHO; BHK-21-VP+Gln e BHK-21-MAb. Já as células BHK-21-VP se mantiveram bem aderidas até o fim do experimento e com uma viabilidade ainda perto de 100%.

Na Figura 14 (B) estão apresentados os dados relativos ao estado metabólico em relação ao consumo de glutamina pelas células BHK-21 adaptadas em diferentes meios. Células BHK-21-Hyb terminaram o cultivo com 0,1 g/L, consumindo 82% de glutamina até o fim do experimento. Observamos que o meio de cultura MAb como foi dito anteriormente possui uma concentração maior de glutamina em relação ao meio basal, porém o consumo de glutamina nestas células foi de apenas 62%, com concentração inicial de 0,8 g/L e finalizando o experimento ainda com 0,3 g/L. Células BHK-21-CHO consumiram 88% de glutamina. Nas células BHK-21-VP não existe uma curva de consumo de glutamina devido à ausência deste nutriente no meio de cultura. Já nas células BHK-21-VP+Gln (suplementadas com 4 mM de glutamina) observamos um consumo de glutamina de 91%. As células BHK-21-DMEM consumiram 97% de glutamina chegando a ser consumida totalmente nas 120 horas de cultivo.

Na Figura 14 (C) e (D) estão apresentados os dados obtidos em relação ao consumo de glicose e produção de lactato. Observamos que a glicose foi consumida quase totalmente pelas células BHK-21-Hyb (91%), levando a uma alta produção de lactato (3,54 g/L), valor 2 vezes maior que o apresentado em células BHK-21-DMEM, que consumiram 40 % da glicose e geraram 1,84 g/L de lactato. Podemos notar que células BHK-21-Hyb (contém mais glicose na sua formulação) consumiram apenas 46% de glicose, finalizando o experimento com 3,7 g/L, igual às células BHK-21-DMEM. Células em meio MAb também apresentaram uma baixa produção de lactato (1,77 g/L). O consumo de glicose em células BHK-21-CHO foi de 84% até o final do experimento e a produção de lactato foi 2 vezes maior que em células

BHK-21-DMEM, terminando o experimento com 3,31 g/L. Em relação ao consumo de glicose e produção de lactato observamos no caso das células BHK-21-VP, observamos 58% de consumo de glicose, valor similar ao encontrado em células BHK-21-DMEM (40%), entretanto, observamos um aumento significativo (88%) no consumo do mesmo nutriente em células em meio VP suplementado com glutamina, mostrando que a presença de glutamina alterou o metabolismo da glicose. Da mesma forma, observamos que o aumento no consumo de glicose resultou numa maior produção de lactato em células BHK-21-VP+Gln (2,7 g/L) em relação ás células sem suplementar (2 g/L).

Figura 14. Cinética de células BHK-21 aderentes adaptadas em SFM



Células BHK-21 crescendo em meio Hybridoma-SFM; MAb; VP-SFM; VP-SFM+Gln (4mM); CHO-S-SFM II e DMEM + 10% SFB. O experimento foi realizado em triplicata em placa de cultura de 6 poços. Estão representados em (A) Concentração de células viáveis (linha inteira) e % de viabilidade (linha tracejada). (B) Perfis de glutamina. (C) Consumo de glicose e (D) Produção de lactato. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas de 3 experimentos independentes.

Na Tabela 7 presenta-se um quadro resumo dos principais parâmetros cinéticos avaliados no final da adaptação da linhagem BHK-21 aderente, também são apresentados do lado de cada valor com letras os resultados da análise estatística, onde letras iguais representam ausência de diferenças significativas e valores com letras diferentes mostram diferenças estatísticas. Em primeiro lugar, analisando os valores de concentração celular máxima (Xmáx), encontramos que células BHK-21-VP e BHK-21-VP+Gln com valores de 1,3 e $1,41\times10^6$ cel/mL respectivamente, apresentaram diferenças significativas em relação às células cultivadas nos outros meios usados cujos valores de Xmáx se encontram na faixa de 2 a $2,4\times10^6$ cel/mL.

Observando os valores das velocidades máximas de crescimento, observam-se valores similares entre células cultivadas nos meios Hybridoma-SFM, MAb, CHO-S-SFMII e VP-SFM+Gln e DMEM. Já as células em meio VP-SFM sem suplementar apresentaram uma velocidade máxima de crescimento 2 vezes menor em relação às células no meio basal. O tempo de duplicação (Td) também foi similar em todos os meios avaliados com exceção das células BHK-21-VP que precisam 1,7 vezes mais tempo para se duplicar em relação às células BHK-21-DMEM.

Os fatores de conversão da glicose ($Y_{X/GLC}$ (cel/g)) mostraram um rendimento similar em células BHK-21-Hyb e BHK-21-CHO que foi 2,5 vezes menor em relação às células em meio basal. Em células BHK-21-VP este valor foi 2,7 vezes menor e este valor sobe para 3,2 vezes em células BHK-21-VP+Gln (menor aproveitamento), finalmente, em células BHK-21-MAb a diferença foi de 2 vezes, mostrando este último o melhor aproveitamento de todos os meios livres de soro em relação ao consumo de glicose. Já as células BHK-21-DMEM apresentaram-se como as mais eficientes na conversão de glicose em células, mostrando diferenças significativas em relação a todos os meios livres de SFB.

Os fatores de conversão da glutamina ($Y_{X/GLN}$ (cel/g)) se mostraram similares em todas as células, excetuando novamente nas células BHK-21-VP que por não possuir glutamina na sua composição apresenta um valor elevado mostrando diferenças significativas frente aos outros meios.

A produção de lactato em relação à quantidade de glicose consumida não apresentou diferenças significativas em células adaptadas em SFM, em relação às células em meio basal. Sendo que as células BHK-21-Hyb as que tiveram maior produção de lactato e células BHK-21-MAb as que tiveram a menor produção.

Tabela 7 - Resumo dos principais parâmetros cinéticos de células BHK-21 adaptadas em SFM.

Parâmetro	Hybridoma	MAb	VP	VP+Gl	CHO	DMEM
SFB (%)	0	0	0	0	0	10
X Máx. (10^6cel/mL)	2^{b}	$2,13^{bc}$	$1,38^{a}$	$1,41^{a}$	$2,1^{bc}$	$2,44^{c}$
µmáx (h^{-1})	$0,041^{b}$	$0,039^{b}$	$0,026^{a}$	$0,038^{ab}$	$0,036^{ab}$	$0,043^{b}$
Td (h)	17	17	26	18	19	15
Viabilidade (%)	98	98	99	98	98	97
$Y_{X/Glc}$ (10^6cel/g)	$0,62^{a}$	$0,73^{a}$	$0,56^{a}$	$0,46^{a}$	$0,59^{a}$	$1,56^{b}$
$Y_{X/Gln}$ (10^6cel/g)	$4,85^{a}$	$5,45^{a}$	$74,3^{b}$	$3,8^{a}$	$4,3^{a}$	$5,56^{a}$
$Y_{Lac/Glc}$ (mol/mol)	$2,05^{b}$	$1,10^{a}$	$1,82^{ab}$	$1,88^{ab}$	$1,59^{ab}$	$1,68^{ab}$

Os dados da cinética e estado metabólico de células BHK-21 adaptadas em diferentes SFM, mostraram que conseguimos células completamente adaptadas que mantiveram uma reprodutibilidade ao longo de muitas passagens (pelo menos 30). Estas cinéticas mostraram que o único meio no qual as células apresentaram baixos crescimentos em relação às células crescendo na presença de SFB foi o VP-SFM, sendo que os outros meios de cultura não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) quanto ao µmáx e Td frente às células em meios basal com suplementação de SFB.

5.3.2 BHK-21 C13 em suspensão

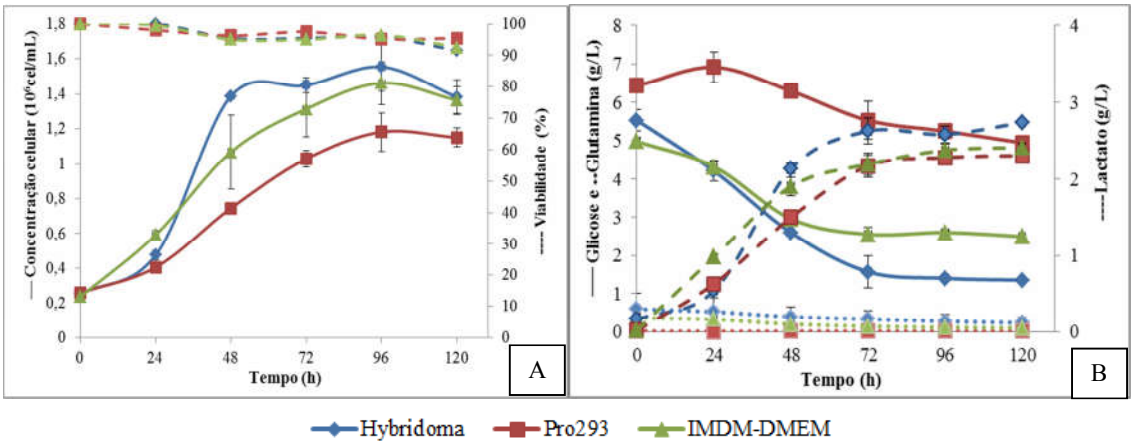
Nesta linhagem os experimentos foram desenvolvidos em frasco de cultura de 25 cm^2 mantido em pé. Na Figura 15 (A) e (B) apresentamos os resultados para a cinética e estado metabólico das células adaptadas (2 meios) e como controle positivo as células cultivadas em meio basal (IMDM-DMEM-5% SFB).

Células BHK-21-C13-Hyb e células em meio basal atingiram uma concentração celular máxima de $1,5\times10^6$ e $1,4\times10^6$ cel/mL respectivamente em 96 horas de cultivo (Figura 15 (A)). Células BHK-21-C13-Pro, atingiram uma concentração celular mais baixa de $1,2\times10^6$ cel/mL em 96 horas de cultivo (Figura 15 (A)). Ainda nesta figura podem ser verificadas as viabilidades celulares acima de 90% até o final do experimento.

Células BHK-21-C13-Hyb e células em meio basal apresentaram um consumo de glutamina de 55 e 68% finalizando o experimento com 0,2 e 0,1 g/L respectivamente (Figura 15 (B)). Para células BHK-21-C13-Pro é observado o mesmo comportamento que em células BHK-21-VP em cultivo aderente, isto devido à ausência de glutamina na sua formulação.

Na Figura 15 (B) observamos que células BHK-21-C13-Hyb consumiram 76% da glicose, este valor é 1,4 vezes maior que o encontrado em células em meio basal (55%). O consumo de glicose nas células BHK-21-C13-Pro (22%) foi baixo em relação aos outros meios (2,5 vezes menor em relação às células em meio basal) terminando o experimento ainda com 5 g/L, esse baixo consumo de glicose provavelmente pode ser atribuído a baixa densidade celular atingida. O valor de lactato produzido no final do cultivo foi de aproximadamente 2,5 g/L nas células cultivadas em todos os meios, valor alto para células BHK-21-C13-Pro em relação ao baixo consumo de glicose observado nestas células, mostrando que a glicose consumida não está sendo metabolizada eficientemente.

Figura 15. Células BHK-21 C13 em suspensão adaptadas em SFM



Células BHK-21-C13 crescendo em meio Hybridoma; Pro293a e DMEM + IMDM+ 5%SFB. O experimento foi realizado em triplicata em frasco de cultura T-25cm^2. Estão representados em (A) Concentração de células viáveis (linha inteira) e % de viabilidade (linha tracejada). (B) Perfis de glutamina (linha pontilhada); glicose (linha inteira) e produção de lactato (linha tracejada). As barras correspondem ao desvio padrão das medidas de 3 experimentos independentes.

Na Tabela 8 apresenta-se um quadro resumo dos principais parâmetros medidos no final da adaptação da linhagem BHK-21 C13 em suspensão. Igualmente são apresentados os resultados da análise estatística. No primeiro item avaliado (Xmáx) podemos observar diferenças significativas entre células BHK-21-C13-Pro e BHK-21-C13-Hyb, porém células adaptadas em SFM não apresentam diferenças significativas em relação às células em meio basal suplementado com SFB. Em relação ao μmáx, pode ser observado que células BHK-21-C13-Pro mostraram o menor valor, apresentando diferenças significativas em relação às células em meio Hybridoma e meio basal.

Os rendimentos de produção de células em relação ao consumo de glutamina não apresentaram diferenças significativas entre células BHK-21-C13-Hyb e células em meio basal. Como já relatado, para as células BHK-21-VP a ausência de glutamina na formulação do meio faz com que o valor de $Y_{X/Gln}$ em células BHK-21-C13-Pro também seja muito alto em relação às outras células. Já os valores dos rendimentos do consumo de glicose foram similares para todas as células, não apresentando diferenças significativas.

Finalmente, observamos que o fator de conversão de glicose em lactato apresentou diferenças significativas para as células BHK-21-C13-Pro, que apresentaram um valor alto em relação às outras células. Já entre as células BHK-21-C13-Hyb e células em meio basal não se observaram diferenças significativas, mostrando uma relação similar de produção de lactato por cada unidade de glicose consumida.

Tabela 8 - Resumo dos principais parâmetros cinéticos de células BHK-21-C13 adaptadas em SFM.

Parâmetro	Hybridoma	Pro293a	IMDM+DMEM
SFB (%)	0	0	5
X Máx. (10^6cel/mL)	$1,56^b$	$1,20^a$	$1,46^{ab}$
µmáx (h^{-1})	$0,04^b$	$0,02^a$	$0,03^b$
Td (h)	17,3|	34,6	23,1
Viabilidade (%)	95	97	95
$Y_{X/Glc}$ (10^6cel/g)	0,45	0,46	0,42
$Y_{X/Gln}$ (10^6cel/g)	$5,34^b$	$40,7^a$	$4,51^b$
$Y_{Lac/Glc}$ (mol/mol)	$1,58^a$	$2,64^b$	$1,71^a$

5.3.3 BHK-21-C13 em suspensão adaptadas em SFM cultivadas em frasco *spinner*

Células BHK-21-C13 em suspensão adaptadas em SFM foram usadas para realizar um experimento de cinética de crescimento celular em frasco de cultura tipo *spinner*, onde o crescimento celular foi acompanhado por 120 horas. Na Figura 16 (A) se observa uma fase de adaptação (*lag*) nas primeiras 24 horas em células cultivadas em meio Hybridoma e basal, a partir desse ponto começa a fase exponencial que vai até às 72 horas de cultivo atingindo uma concentração celular de 5×10^6 cel/mL e $4,5\times10^6$ cel/mL, respectivamente. É possível que esta etapa *lag* possa ser evitada colocando uma concentração inicial maior de células, uma vez que foi usada a mesma concentração celular utilizada em frascos de cultura de 25 cm^2. Já em

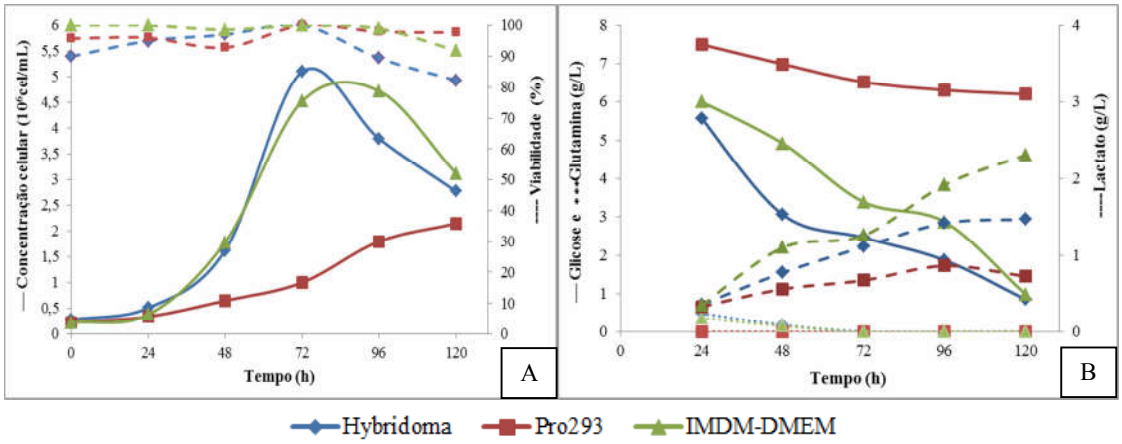
células BHK-21-C13-Pro, a concentração celular máxima atingida (2×10^6 cel/mL) foi 2,5 vezes menor que em meio Hybridoma, indicando uma menor eficiência de crescimento celular neste meio, fato já observado no frasco T-25. Elevadas concentrações celulares foram atingidas no *spinner* como reflexo de condições mais adequadas para o cultivo em suspensão (a agitação e o volume do meio no *spinner* garantem uma melhor oxigenação das células).

Os perfis de consumo de glutamina observados na Figura 16 (B) mostram que a glutamina foi consumida totalmente nas primeiras 72 horas do cultivo nos meios basal e Hybridoma-SFM, após esse momento observamos também o final da fase exponencial e uma queda rápida da concentração celular, devido provavelmente ao esgotamento da glutamina.

A glicose, entretanto, não foi consumida totalmente apresentando um valor final de 0,9 g/L tanto nas células BHK-21-C13-Hyb quanto nas células em meio basal (Figura 16 (B)). Células BHK-21-C13-Pro consumiram apenas 17% de glicose, finalizando o experimento com 6,2 g/L. Os valores de produção de lactato (Figura 16 (B)) foram de 0,7 g/L em células BHK-21-C13-Pro; 1,47 g/L em células BHK-21-C13-Hyb e de 2,31 g/L em células no meio basal. Estes valores são baixos em relação às concentrações celulares atingidas neste experimento, verificando um melhor desempenho no cultivo em *spinner* devido provavelmente a uma maior disponibilidade de oxigênio. Podemos ressaltar nesta figura que as células BHK-21-C13-Pro em cultivo em *spinner* produziram 3,1 vezes menos lactato quando comparado ao cultivo em frasco T-25, mesmo apresentando maiores concentrações celulares, sugerindo um melhor aproveitamento de nutrientes nestas condições.

Através do experimento realizado em *spinner*, foi demonstrado que as células BHK-21-C13-Hyb apresentaram uma velocidade máxima de crescimento similar às células em meio basal suplementado com SFB, porém com menor geração de lactato (1,2 vezes). Também é possível observar que as concentrações celulares por volume de meio de cultura (cel/mL) são 2,5 vezes maiores que em experimentos realizados em linhagem aderente, e este valor passa a ser 30 vezes maior quando considerado o valor total de células. Este fato sugere que este sistema possa ser vantajoso no estabelecimento de plataformas de expressão com células BHK-21-C13.

Figura 16. Células BHK-21 C13 em suspensão cultivadas em frasco *spinner*



Células BHK-21-C13 crescendo em meio Hybridoma; Pro293a e DMEM + IMDM+ 5%SFB. Estão representados em (A) Concentração de células viáveis (linha inteira) e % de viabilidade (linha tracejada). (B) Perfis de glutamina (linha pontilhada); glicose (linha inteira) e produção de lactato (linha tracejada). Não tem barra de desvio padrão, porque o experimento foi realizado uma única vez.

Na Tabela 9 observamos um resumo dos principais parâmetros medidos no em células BHK-21 C13 em suspensão cultivadas em frasco *spinner*. Observa-se que as concentrações celulares foram maiores em relação ao cultivo em frasco de cultura de 25 cm^2, porém as variáveis cinéticas de *µmáx* e Td são mantidas, sugerindo um comportamento reprodutível ao aumentar a escala do cultivo. O fator de conversão de glicose em células foi similar em células BHK-21-C13-Hyb e células em meio basal, porém foi 2 vezes inferior em células BHK-21-C13-Pro, indicando pouca eficiência na conversão de glicose nestas células. Em relação à conversão de glutamina, podemos observar o mesmo comportamento registrado no cultivo em frascos de cultura T-25, onde novamente as células BHK-21-C13-Pro, por não possuir glutamina na composição do meio, apresentam este valor elevado.

Tabela 9 - Resumo dos principais parâmetros cinéticos de células BHK-21 C13 adaptadas em SFM cultivadas em frasco *spinn*er.

Parâmetro	Hybridoma	Pro293a	IMDM+DMEM
SFB (%)	0	0	5
Máx. concentração celular (cel/mL)	$5{,}10\times10^6$	$2{,}20\times10^6$	$4{,}78\times10^6$
µmáx (h^{-1})	0,035	0,021	0,043
Td (h)	19,5	31,8	15,6
Viabilidade dia 3 (%)	99	100	100
$Y_{X/Glc}$ (10^6cel/g)	1,55	0,6	1,65
$Y_{X/Gln}$ (10^6cel/g)	10,1	119	11,8
$Y_{Lac/Glc}$ (mol/mol)	0,71	0,31	1,5

Os resultados obtidos a partir da adaptação de células BHK-21-C13 mostraram que o meio de cultivo Hybridoma-SFM possui uma formulação compatível para o crescimento destas células, apresentando variáveis de eficiência no crescimento e aproveitamento de nutrientes semelhantes às encontradas em células crescendo na presença de SFB.

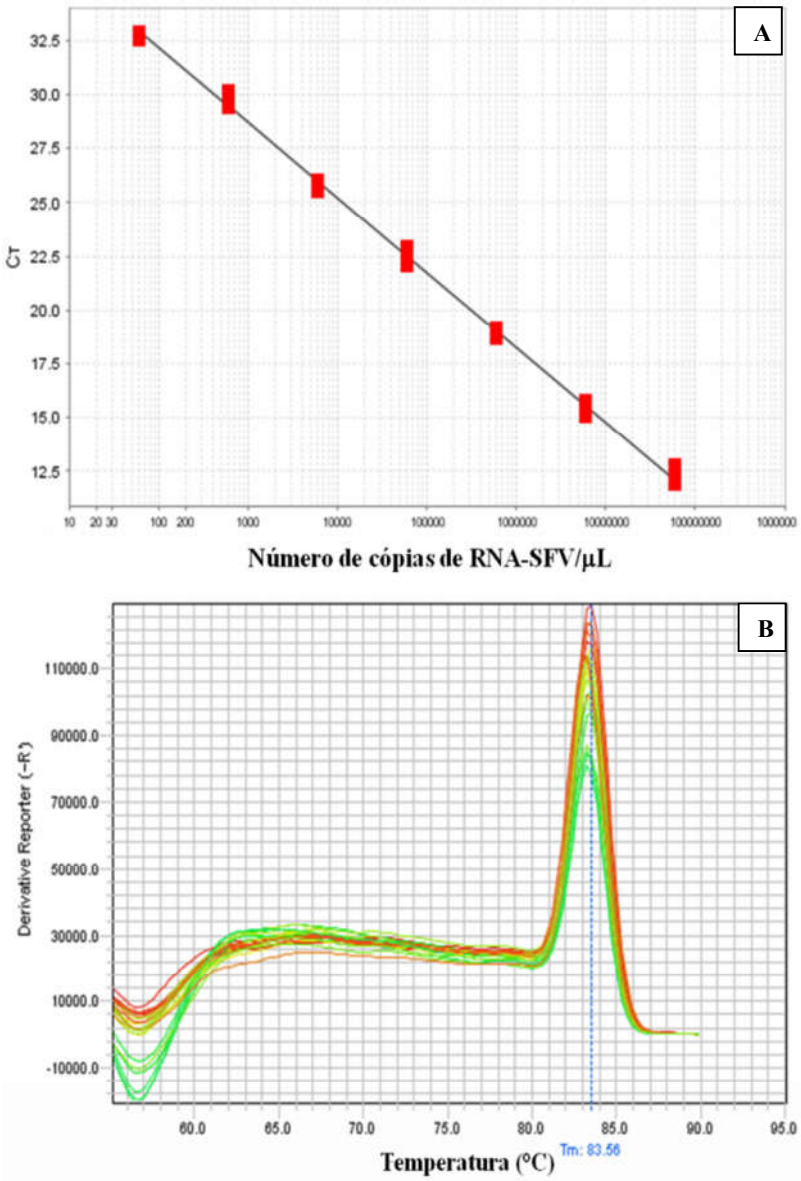
5.4 Produção de VRPs de SFV

Foi avaliada a capacidade de produção de partículas virais de SFV em células BHK-21 (aderentes) adaptadas em SFM. Neste sentido, estudamos a obtenção de VRPS de SFV carregando diferentes genes (GFP, RVGP e NS3). Para isto, inicialmente foram obtidos os RNAs correspondentes a cada gene de interesse e transfectados por eletroporação em células BHK-21 cultivadas nos meios Hybridoma-SFM, MAb, CHO-S-SFMII, VP-SFM, VP-SFM+Gln e DMEM. Os vírus produzidos foram submetidos à quantificação pelo método de qRT-PCR, usando uma metodologia desenvolvida em nosso laboratório (PUGLIA et al., 2013). Esta técnica consiste na quantificação do RNA correspondente a região nsP3 do SFV (região mais conservada do SFV), possibilitando desta forma a quantificação de diferentes construções baseadas neste vetor viral, como é o caso do presente trabalho. Assim foi possível usarmos esta metodologia para quantificar SFVs carregando diferentes genes de interesse.

Para realizar a quantificação viral através da qRT-PCR foi necessário inicialmente construir uma curva padrão. Para isto o plasmídeo pSFV-RVGP foi linearizado e quantificado por fluorimetria. A partir desta quantificação foi feita uma diluição seriada para obter: 6×10^7, 6×10^6, 6×10^5, 6×10^4, 6×10^3, 6×10^2, e 60 cópias de DNA.

A Figura 17 apresenta a curva padrão e curva de dissociação obtida no equipamento. Podemos observar um *slope* de -3,4, uma eficiência de 93% e um valor de R^2 de 0.99, condições necessárias para ela ser usada na quantificação dos SFV recombinantes (PUGLIA et al., 2013). Podemos verificar na curva de dissociação que todos os fragmentos são dissociados na mesma temperatura (83,5 °C), confirmando a especificidade da reação.

Figura 17. Curva padrão e de dissociação obtidas da qRT-PCR.



Figuras geradas pelo Software StepOne v2.2.2. Em (A) se encontra a curva padrão obtida a partir das diferentes diluições, *Slope:* -3,47, R^2: 0,99 e eficiência: 93%. Em (B) a temperatura de dissociação dos fragmentos amplificados.

Esta curva padrão foi utilizada para quantificação de todas as VRPs de SFV produzidas neste trabalho. Para facilitar a análise dos resultados é apresentado na Tabela 10 um resumo com a média das quantificações obtidas para cada SFV gerado, esclarecendo que eles foram obtidos em momentos diferentes do desenvolvimento do projeto.

A produção das VRPs de SFV-NS3 foi realizada apenas com células BHK-21-Hyb; BHK-21-CHO e BHK-21-DMEM. Células em meio Hybridoma-SFM e CHO-S-SFMII foram selecionadas por ter apresentado valores semelhantes às células em meio basal com SFB, em relação a vários parâmetros cinéticos, quantificação na produção de SFV-GFP e intensidades de fluorescência.

O título viral (VRP/μL) para SFV-Hyb apresentado na Tabela 10 mostra que as VRPs geradas em células BHK-21-Hyb foram 2 vezes maiores em relação ao título obtido para os SFVs-DMEM, isto quando o gene de interesse foi o GFP e o RVGP. No caso do SFV-NS3 observamos um aumento no título obtido em células em meio basal, porém vale a pena ressaltar que os valores obtidos em células BHK-21-Hyb para os três genes foram similares. No caso dos SFVs obtidos em células BHK-21-MAb, estes também foram superiores aos obtidos em células em meio basal na razão de 1,4 e 2 vezes para o SFV-GFP e SFV-RVGP respectivamente, observamos igualmente que os valores foram similares para os dois genes avaliados. Os títulos para os SFVs obtidos em células BHK-21-CHO foram muito superiores em relação a todos os outros. Sendo que para o caso de SFV-GFP e SFV-RVGP o valor foi 5 e 6 vezes maior em relação aos SFVs obtidos em células em meio basal, para o caso do SFV-NS3 a diferença foi de 2,3 vezes. Compete ressaltar que a quantificação viral dos SFVs gerados em células adaptadas em meio CHO, foi similar para todos os vírus ($42\text{-}47\times10^5$ VRPs/μL), estes valores foram notadamente superiores aos obtidos em todos os meios avaliados, indicando que este meio possui características que promovem a produção de partículas virais pelas células BHK-21.

Finalmente, em relação aos SFVs obtidos em células adaptadas em meio VP-SFM, observamos que os valores para os vírus SFV-GFP-VP gerados em células sem suplementação com glutamina foram muito similares aos obtidos em células em meio MAb e meio basal, por sua parte os SFV-RVGP-VP produzidos nas mesmas células foram inferiores 2,3 vezes comparados com o SFV-RVGP-DMEM. Os SFVs obtidos em células suplementadas com glutamina apresentaram um aumento no título de quase 2 vezes em relação as não suplementadas tanto para o SFV-GFP quanto o SFV-RVGP. Assim, o SFV-GFP-VP+Gln foi 2 vezes superior ao SFV-GFP-DMEM, enquanto o SFV-RVGP-VP+Gln ficou quase no mesmo valor que o SFV-RVGP-DMEM, significando que a presença da glutamina favoreceu a produção das partículas virais.

A análise dos dados da Tabela 10 sugerem que células cultivadas em SFM geram VRPs de SFVs recombinantes em quantidade igual ou superior à encontrada em células cultivadas com suplementação com SFB. Uma diferença foi observada na quantificação obtida a partir

das VRPs produzidas em células em meio CHO-SFM II, conferindo a importância de testar diferentes meios disponíveis, e assim determinar o mais eficiente para um determinado sistema de expressão.

Tabela 10- Títulos virais de SFV determinados por qRT-PCR.

VIRUS	SFV-GFP (10^6 VRP/µL)	SFV-RVGP (10^6 VRP/µL)	SFV-NS3 (10^6 VRP/µL)
SFV-Hybridoma	1,9	1,5	1,2
SFV-MAb	1,3	1,4	nt*
SFV-VP	1,3	0,3	nt
SFV-VP+Gln	2,1	0,8	nt
SFV-CHO	**4,8**	**4,5**	**4,2**
SFV-DMEM+10%SFB	**0,9**	**0,7**	**1,8**

* nt- não testado

5.5 Expressão de proteínas recombinantes em células cultivadas em SFM

Verificada a eficiência na obtenção de VRPs de SFVs em condições livres de soro, prosseguimos com a etapa de expressão de diferentes proteínas. Neste sentido, em primeiro lugar foi realizada uma prévia caracterização do sistema usando uma proteína de fácil e rápida detecção, como é o caso da proteína repórter-GFP. Em seguida, foi avaliada a expressão da porção protease da proteína NS3 do vírus do HCV e por último foi expressa a glicoproteína de membrana do vírus da Raiva (RVGP). Desta forma descreveremos a seguir os resultados obtidos para cada proteína.

5.5.1 Expressão de GFP

A proteína GFP foi usada com a finalidade de determinar algumas condições para infecção e expressão da proteína usando o sistema SFV. Neste sentido, após a obtenção dos SFV-GFP, foi realizada a infecção de células BHK-21 aderentes cultivadas em placa de 6 poços, usando diferentes concentrações de vírus (VRP:Célula) e avaliando a expressão de GFP em diferentes tempos. As células foram infectadas com os lotes virais produzidos nas mesmas condições, ou seja, as células BHK-21-Hyb foram infectadas com os SFV produzidos nessas mesmas células (SFV-GFP-Hyb) e assim por diante.

Na Figura 18 estão ilustrados os resultados obtidos a partir da leitura no citômetro de fluxo, são apresentadas duas figuras para cada célula, indicando a porcentagem e a intensidade de fluorescência avaliada em 3, 6, 12 e 24 horas pós-infecção. Em primeiro lugar, encontrou-se um aumento na porcentagem de células fluorescentes na medida em que foi aumentada a quantidade de vírus, indicando um aumento de células infectadas. Entretanto a intensidade de fluorescência, que representa a quantidade de proteína expressa, não mostrou diferença entre as células cultivadas nos diferentes meios de cultura avaliados.

Podemos observar que células cultivadas em meios Hybridoma-SFM, MAb e CHO-S-SFMII atingiram um máximo de 90% de células fluorescentes em 24 horas pós-infecção usando uma relação de VRP:Cel de 500:1 (Figura 18 (A) (C) (I)). Já as células em meio VP-SFM sem e com suplementação com glutamina (Figura 18 (E) (G)) mostraram 80% de células fluorescentes também em 24 horas pós-infecção, usando a relação de 500:1.

No caso das células em meio basal (Figura 18 (K)), tivemos algumas dificuldades técnicas na realização dos experimentos, por isto, são apenas apresentados os resultados no tempo de 12 horas pós-infecção. Observamos que estas células apresentaram um valor superior a 90% de células fluorescentes no tempo de 12 horas e com uma relação de VRP:Cel de 50:1, em comparação às células crescendo em SFM que apresentaram o pico de células fluorescentes em 24 horas e precisaram de quantidades maiores de partículas virais.

Em relação à intensidade de fluorescência, observamos que ela se manteve quase constante em relação à quantidade de VRP empregada na infecção, foram observadas diferenças referentes ao tempo avaliado (3, 6, 12 e 14h) e ao tipo de meio no qual a célula foi adaptada. Desta forma, observamos que células BHK-21-Hyb apresentaram uma intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias) de 10×10^3 no tempo de 6 h, passando por aproximadamente 25×10^3 no tempo de 12 h e finalizando com 37×10^3 com 24 h de infecção (Figura 18 (B)). Em seguida, pode-se observar que células BHK-21-MAb apresentaram uma intensidade de fluorescência baixa, que começou com $1{,}5\times10^3$ em 6 h, aumentou para 30×10^3 em 12 h (valor similar ao observado em BHK-21-Hyb), porém diminuiu consideravelmente (6 vezes) para 5×10^3 em 24 h (Figura 18 (D)). Este fenômeno sugere diferenças no metabolismo celular destas células ou diferenças no processamento viral.

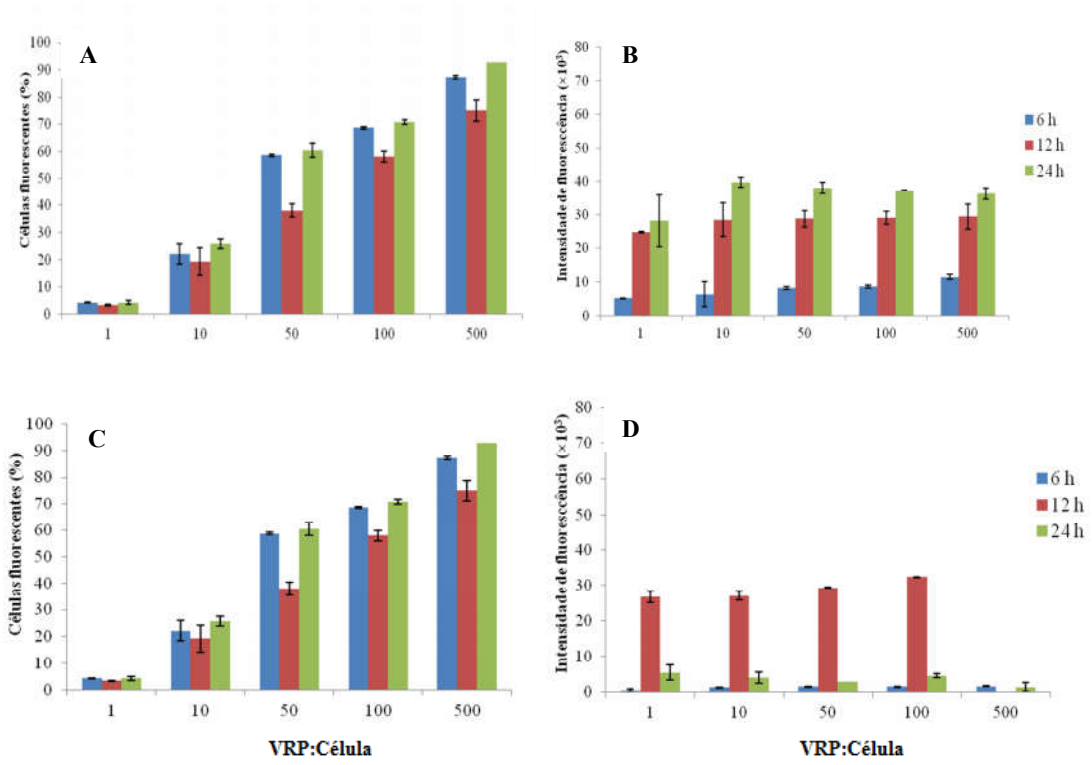
Em células cultivadas em meio VP-SFM, foram observados valores de $3\text{-}4\times10^3$ em 6 horas de infecção, tanto em células BHK-21-VP como em BHK-21-VP+Gln, este valor aumentou 10 vezes no tempo de 12 horas, ficando entre 30×10^3 e 40×10^3 para BHK-21-VP e BHK-21-VP+Gln respectivamente, valores que aumentaram de novo para 40×10^3 e 50×10^3 em 24 horas pós- infecção (Figura 18 (F) (G)). Juntos estes valores mostram que a

suplementação com glutamina gerou valores de expressão ligeiramente superiores, porém sem diferenças significativas em relação às células em meio VP-SFM sem suplementação.

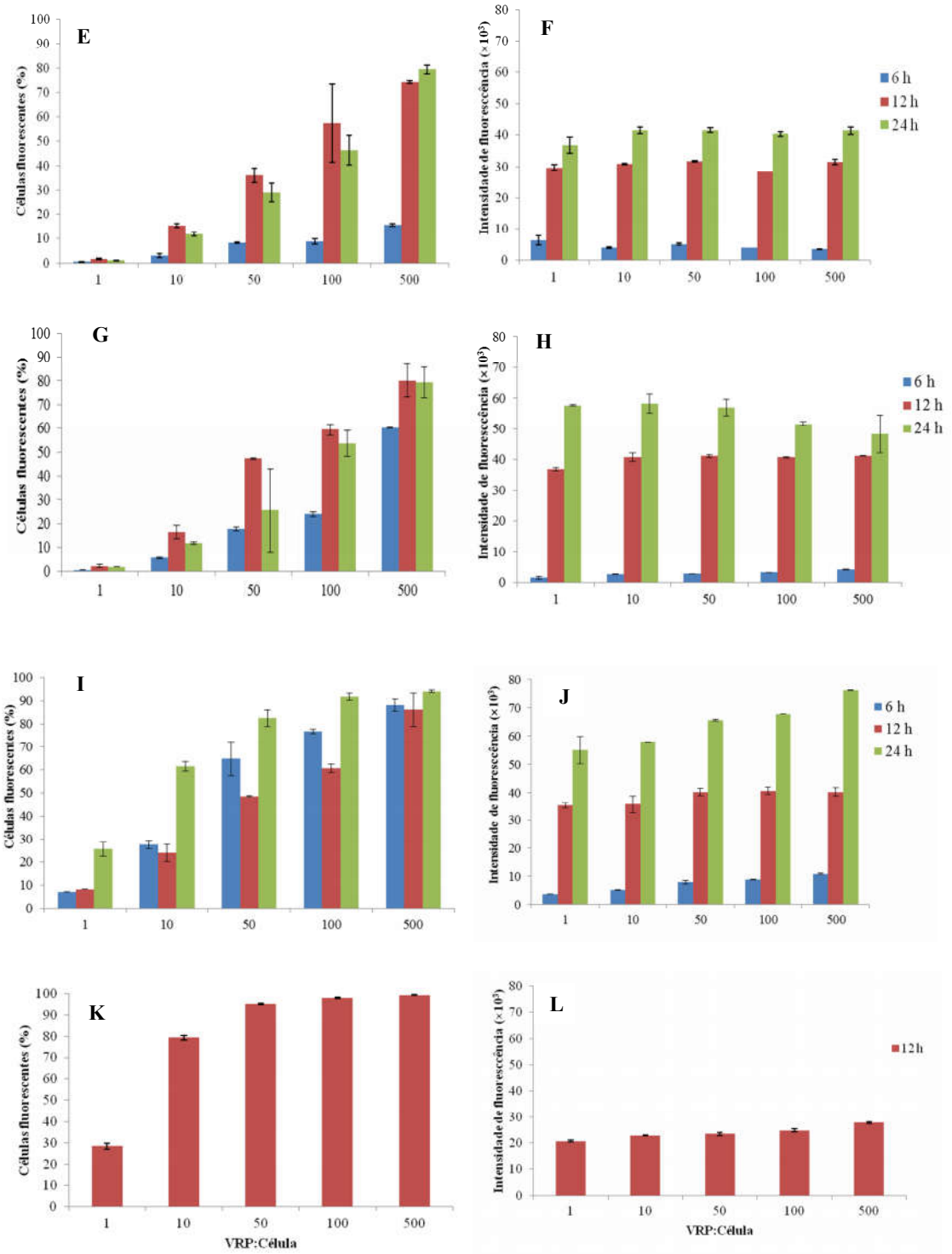
Valores entre 4-10×10^3 foram encontrados em células BHK-21-CHO em 6 horas de infecção, passando para 40×10^3 em 12 horas e finalizando com valores entre 55 e 76×10^3 após 24 horas de infecção (Figura 18 (J)), estes últimos foram os valores mais altos de intensidade de fluorescência encontrados nas condições avaliadas.

Finalmente as células cultivadas em meio basal mostraram um valor máximo de 27,8×10^3 de intensidade de fluorescência na máxima relação de VRP:Cel (Figura 18 (L)). Este valor foi semelhante aos encontrados em células em meios Hybridoma, MAb e VP, e 2 vezes menor em relação às células em meios CHO e VP+Gln.

Figura 18. Expressão de GFP em células BHK-21 cultivadas em SFM



Células BHK-21 adaptadas em meios livres de SFB foram infectadas com SFV-GFP em diferentes relações VRP: Célula (1; 10; 50; 100; 500) e avaliadas após 3; 6; 12 e 24 horas através de citometria de fluxo. À esquerda % de células fluorescentes e a direita intensidade de fluorescência. A e B células BHK-21-Hyb; C e D células BHK-21-MAb.

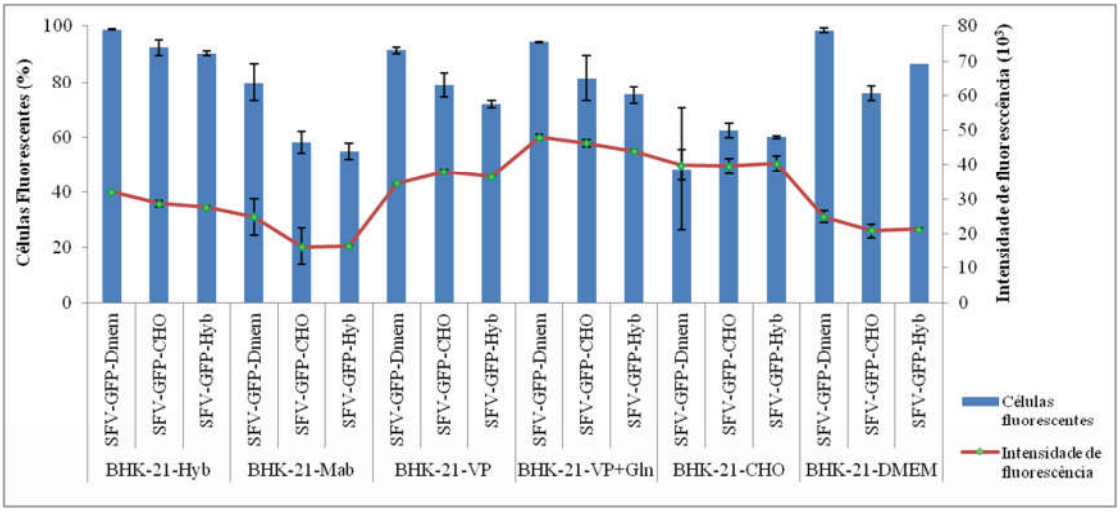


Células BHK-21 adaptadas em meios livres de SFB foram infectadas com SFV-GFP em diferentes relações VRP: Célula (1; 10; 50; 100; 500) e avaliadas após 3; 6; 12 e 24 horas através de citometria de fluxo. À esquerda % de células fluorescentes e a direita intensidade de fluorescência. E e F células BHK-21-VP; G e H células BHK-21-VP+Gln; I e J células BHK-21-CHO; K e L células BHK-21-DMEM. As barras correspondem ao desvio padrão da duplicata.

Em seguida foi realizado mais um experimento, onde células cultivadas nos diferentes meios de cultura foram infectadas separadamente com três vírus diferentes (SFV-RVGP-Hyb;

SFV-RVGP-CHO e SFV-RVGP-DMEM). Os vírus SFV-RVGP-Hyb e SFV-RVGP-CHO foram selecionados pela sua quantificação e pela expressão de GFP observada no experimento anterior. Já o vírus SFV-RVGP-DMEM é considerado um controle por ter sido obtido em células crescendo em meio suplementado com SFB.

Figura 19. Expressão de GFP em células BHK-21 usando diferentes SFV-GFP



Células BHK-21 crescendo em meios Hybridoma, MAb, VP, VP+Gln, CHO e DMEM+SFB foram infectadas com SFV-RVGP-Hyb; SFV-RVGP-CHO e SFV-RVGP-DMEM usando uma relação de VRP:Cél de 100:1, a fluorescência foi medida em FACS 24 h pós-infecção. As barras correspondem ao desvio padrão da duplicata.

Não foram observadas diferenças na expressão (intensidade de fluorescência) quando foi usada a mesma célula hospedeira com VRPs procedentes de diferentes meios usados para cultivo das células BHK-21, apenas nota-se uma ligeira superioridade quando infectadas com SFV-GFP-DMEM (Figura 19). Por tanto, pode-se inferir que diferenças na porcentagem de células fluorescentes e na intensidade parecem ser relativas ao meio no qual a célula foi adaptada e não ao SFV usado para infectar.

Os experimentos realizados para expressão da proteína recombinante GFP, indicam que células crescendo em SFM foram eficientemente infectadas, e apresentaram níveis de expressão (medida como intensidade de fluorescência) similares às células cultivadas em meio basal suplementado com SFB. Observamos que o pico de expressão foi encontrado em 24 horas pós-infecção e que a quantidade de células infectadas (medida como porcentagem de células fluorescentes) aumentou como resposta a uma maior relação VRP:Cél. Também é importante ressaltar que diferente do observado em relação ao crescimento celular e produção de VRPs, células adaptadas em meio VP-SFM com e sem suplementar com glutamina apesar

de apresentarem 10% menos de células fluorescentes, porém a intensidade de fluorescência foi similar à observada nas demais células, mostrando que uma expressão de proteína equivalente. Células em meio MAb apresentaram um pico de expressão em 12 horas, apresentando uma diminuição em 24 horas de infecção, ficando com a menor intensidade de fluorescência de todas as células.

Juntos estes resultados sugerem que não só a titulação viral das VRPs produzidas em SFM é similar às produzidas em meio basal, como a qualidade dessas VRPs também pareceu ser semelhante, mostrando que VRPs obtidas em SFM possuem a mesma capacidade de infecção que VRPs obtidas em meios suplementados com SFB.

5.5.2 Expressão de NS3-HCV domínio protease

Verificada a funcionalidade de células adaptadas em meios livres de SFB de produzir VRPs de SFV e expressar proteína recombinante de forma adequada, prosseguimos a expressão de proteínas mais complexas. Neste sentido, nosso objetivo seguinte foi avaliar a expressão da proteína NS3 do vírus do HCV (domínio protease) no sistema de expressão livre de SFB proposto no presente trabalho.

Num trabalho preliminar no nosso laboratório (LEMOS, 2015) alguns testes para detecção da NS3 foram abordados, porém, foram encontradas uma série de dificuldades que impossibilitou estabelecer um protocolo para detecção da proteína através de técnicas usando anticorpos.

Por este motivo, antes de continuar testando novas estratégias de detecção, optamos por identificar se o RNA-NS3 estava sendo entregue pela VRP de SFV-NS3 e ainda amplificado dentro da célula infectada.

A) Avaliação da expressão de mRNA-NS3

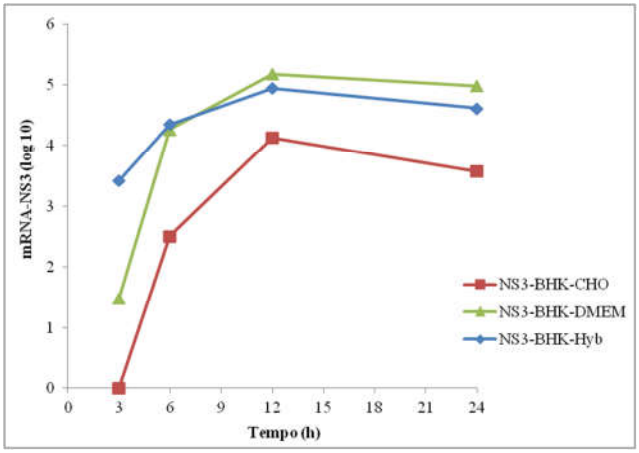
VRPs de SFV-NS3 foram usadas para infecção de células BHK-21-Hyb; BHK-21-CHO e BHK-21-DMEM, crescendo em placa de 6 poços numa relação de VRP:Cél de 50:1. Amostras de células foram extraídas nos tempos de 3; 6; 12 e 24 horas pós-infecção e armazenadas a -80 °C.

Para a análise, o RNA das células infectadas foi extraído e submetido a uma etapa de transcrição reversa e o cDNA foi analisado por PCR convencional para conferir o tratamento com DNase e a correta amplificação da NS3. Em seguida, a expressão relativa ao mRNA-NS3

foi analisada através da amplificação dos cDNAs por qRT-PCR e. Os dados foram avaliados tomando como base o valor da CT mais alto entre as amostras (CT calibrador), isto é, a amostra com menor quantidade do mRNA-NS3, que foi encontrada nas células BHK-21-CHO com 3 horas de infecção.

Nos valores obtidos e apresentados na Figura 20, se observa que o mRNA do material extraído de células BHK-21-Hyb; BHK-21-CHO e BHK-21-DMEM e infectadas com SFV-NS3-Hyb; SFV-NS3-CHO e SFV-NS3-DMEM respectivamente, apresentou um aumento crescente de RNA-NS3 com pico em 12 horas e depois começou a diminuir. Em células em meio Hybridoma-SFM a produção de mRNA-NS3 começa de forma muito mais rápida, sendo que amostras destas células com 3 horas de infecção, apresentaram um valor 1000 vezes superior em relação às células em meio CHO-S-SFMII e 100 superior em relação às células em meio basal. Em 6 horas de infecção células BHK-21-Hyb e BHK-21-DMEM ficam semelhantes, apresentando 100 vezes mais mRNA-NS3 em relação às células BHK-21-CHO. Nos dois pontos seguintes (12 e 24 horas) observamos que células BHK-21-DMEM e BHK-21-Hyb continuam apresentando valores semelhantes de mRNA-NS3 que são superiores em 10 vezes frente às células BHK-21-CHO.

Figura 20. Expressão mRNA-NS3 através da técnica de qRT-PCR



Células crescendo em meios Hybridoma-SFM, CHO-S-SFMII e DMEM foram infectadas em placa de 6 poços usando uma razão de VRP:Cél de 50:1. As células foram coletadas as 3, 6, 12 e 24 horas após infecção e analisadas por qRT-PCR. As células foram mantidas em incubadora a 37°C, com 5 % de CO_2. O resultado apresentado é a média da duplicata.

A detecção de mRNA-NS3 já as 3-6 horas pós-infecção se deve a forte ativação dos promotores do SFV dentro da célula infectada. Estes resultados demonstram uma entrega do material genético adequada por parte das VRPs de SFV-NS3 em células crescendo em

diferentes meios, indicando também uma correta ativação da maquinaria da célula para amplificação do RNA da NS3.

B) Avaliação da Atividade Protease da NS3-HCV

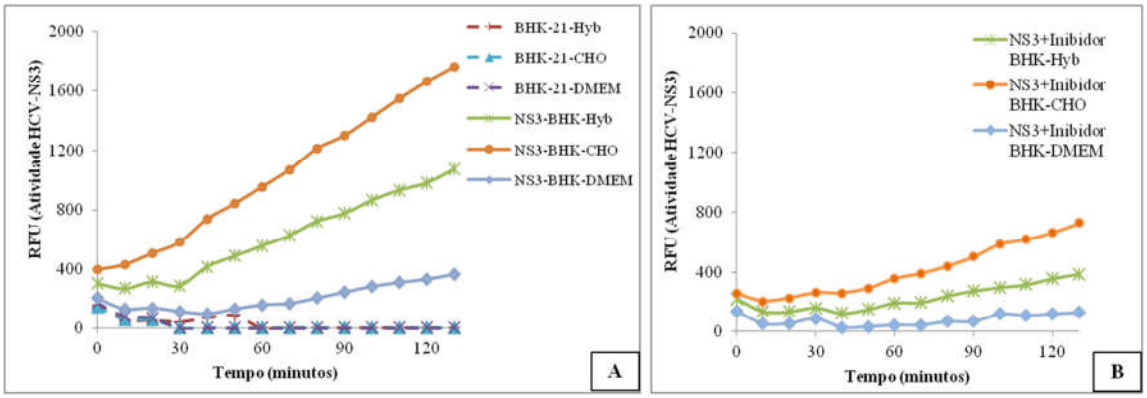
Mediante uma colaboração com o grupo da Dra Ana Sofia Coroadinha (Cell Line Development and Molecular Biotechnology Laboratory) do Instituto de Biologia Experimental Tecnológica (iBET) de Portugal, realizamos vários testes com o intuito de detectar a expressão da NS3. Desta forma, mais uma vez, fizemos a aquisição de um Anticorpo monoclonal Anti-NS3 (HCV) (Cat # IT-004-011M13 da empresa Immune Technology Corp.), porém, ele apresentou inespecificidade, apresentando uma marcação em células BHK-21 sem infectar e ainda em células HEK293 e células HUH 7 usadas como controle (resultados não mostrados). Desta forma, não conseguimos detectar a proteína NS3 por métodos de imunodetecção.

Posteriormente, realizamos a compra de um kit para detecção da atividade protease da NS3 do HCV, onde foi possível avaliar a qualidade da proteína expressa através da detecção da sua atividade protease. Além disso, foi avaliada a atividade da NS3 na presença de um inibidor específico para esta enzima, para que pudessemos validar a especificidade da proteína expressa em nosso sistema livre de SFB. Além das células não infectadas, também adicionamos mais um controle negativo que consistiu de células BHK-21 crescendo em DMEM (10%SFB) infectadas com um SFV que não carrega um RNA heterólogo (SFV-2GenC), este controle foi usado para verificar que a clivagem proteolítica não fosse realizada por alguma das proteases presentes no SFV, já que este vírus conta com 2 proteínas com domínio protease, um presente na sua proteína de cápside e outro na proteína não estrutural nsP2.

Pode ser observado na Figura 21 (A), que a NS3 expressa em sistemas livres de SFB (meios Hybridoma-SF e CHO-S-SFMII) apresenta uma adequada atividade proteolítica, proporcionando valores de fluorescência que vão aumentando conforme o tempo analisado, indicando uma clivagem eficiente do substrato, sem apresentar esgotamento da enzima nas condições avaliadas. Os valores encontrados para células BHK-21-Hyb e BHK-21-CHO foram mais altos na ordem de 3 e 4,8 vezes respectivamente, quando comparados aos valores obtidos em células crescendo em meio basal, pode-se inferir então a presença de NS3 ativa nestas células e, portanto com adequada estrutura conformacional.

Observamos na Figura 21 (B) que o uso de 100 mM de inibidor, causou a inibição de 40% da atividade da enzima, não foi possível atingir a inibição completa da atividade pelo desconhecimento da quantidade de NS3 presente em cada amostra. Entretanto, estes resultados, junto com a ausência do sinal de fluorescência em células não infectadas e em células infectadas por SFV-2GenC (resultados não mostrados), indicam que o resultado apresentado é específico para atividade da NS3 do HCV.

Figura 21. Atividade protease de NS3 expressa em células BHK-21



Clivagem proteolítica do substrato 5-FAM/QXL™520 FRET pela NS3 expressa em células BHK-21 crescendo em meios de cultura Hybridoma, CHO e DMEM (10%SFB) infectadas com SFV-NS3-Hyb; SFV-NS3-CHO e SFV-NS3-DMEM respectivamente (A). As mesmas amostras foram tratadas com 100mM de inibidor para NS3 (AnaSpec Cat#25346) (B). As células foram coletadas 24h pós-infecção e tratadas para posterior análise. O sinal de fluorescência foi monitorado a cada 10 minutos a uma razão de excitação/emissão de 490/520nm. As amostras foram normalizadas a partir do controle do ensaio contendo substrato sem NS3.

5.5.3 Expressão de RVGP

A última proteína a ser expressa usando o sistema livre de SFB proposto neste trabalho foi uma glicoproteína de membrana (RVGP). Para esta proteína, conseguimos realizar uma análise mais completa, pela experiência que já se tem com ela em nosso laboratório.

A) Análise de RVGP por ELISA

Um experimento foi realizado com células BHK-21 adaptadas em diferentes SFM cultivadas em placa de 6 poços e infectadas com os diferentes SFVs usando novamente as relações já testadas para expressão de GFP (1, 50, 100 e 500) e ainda avaliando duas temperaturas (37 e 33 °C). A expressão de RVGP foi avaliada 24 horas pós-infecção pelo

método de ELISA. Da mesma forma que para expressão de GFP e de NS3, as células foram infectadas com os lotes virais produzidos nas mesmas condições, ou seja, as células BHK-21-Hyb foram infectadas com os SFV-RVGP-Hybridoma e assim por diante.

Na Figura 22 (A) são apresentados os valores de expressão especifica por célula ($\mu g/10^6$cel) e na Figura 22 (B) a expressão volumétrica (ng/mL). Observam-se diferentes aspectos relacionados à expressão de RVGP, em primeiro lugar em relação à expressão a 37 °C, encontramos um aumento na expressão da proteína enquanto foi aumentada a quantidade de 1 VRP para 1 célula (1:1) até a relação 50:1, depois deste ponto, o aumento é pouco significativo (células crescendo em meio Hybridoma-SFM, CHO-S-SFMII e VP-SFM+Gln), sendo que a máxima expressão de RVGP foi de 1,4 $\mu g/10^6$ cel (264,4 ng/mL) em células BHK-21-Hyb; 1,2 $\mu g/10^6$ cel (326,3 ng/mL) em células BHK-21-CHO e 1,7 $\mu g/10^6$ cel (320,2 ng/mL) em células BHK-21-VP+Gln (Figura 22 (A) (B)).

No caso das células crescendo no meio VP-SFM, também a 37 °C, observamos um comportamento crescente da expressão até a relação 500:1, atingindo um valor máximo de 2,5 $\mu g/10^6$ cel (459 ng/mL) (Figura 22 (A) (B)), este valor foi ligeiramente superior ao atingido nas demais células, inclusive em células em meio basal, confirmando os resultados obtidos para expressão de GFP e mostrando que células BHK-21-VP mesmo atingindo as menores taxas de crescimento, elas podem possuir alguma vantagem em relação à tradução e/ou processamento da proteína, gerando valores de RVGP equivalentes às demais células.

No caso da expressão de RVGP em células BHK-21-MAb foi encontrado um valor máximo de 0,28 $\mu g/10^6$ cel (88 ng/mL) (Figura 22 (A) (B)), estes valores foram inferiores em relação as demais células. Estes resultados confirmam os dados apresentados para GFP, onde estas células apresentaram os valores mais baixos de GFP quando comparados aos valores obtidos em células cultivadas nos outros meios avaliados. O meio MAb, além de ser livre de SFB é livre de toda proteína de origem animal, e não contem suplementos que facilitam a aderência celular, por este motivo poderia se pensar numa taxa de infecção diferente nestas células, porém, foi observado que elas apresentaram valores de células GFP positivas equivalentes as demais células, significando que houve uma taxa de infecção similar em todas as células e indicando que a baixa expressão nestas células poderia estar relacionada a uma maquinaria de transcrição de mRNA ou de tradução destas células menos eficiente, em relação às outras células.

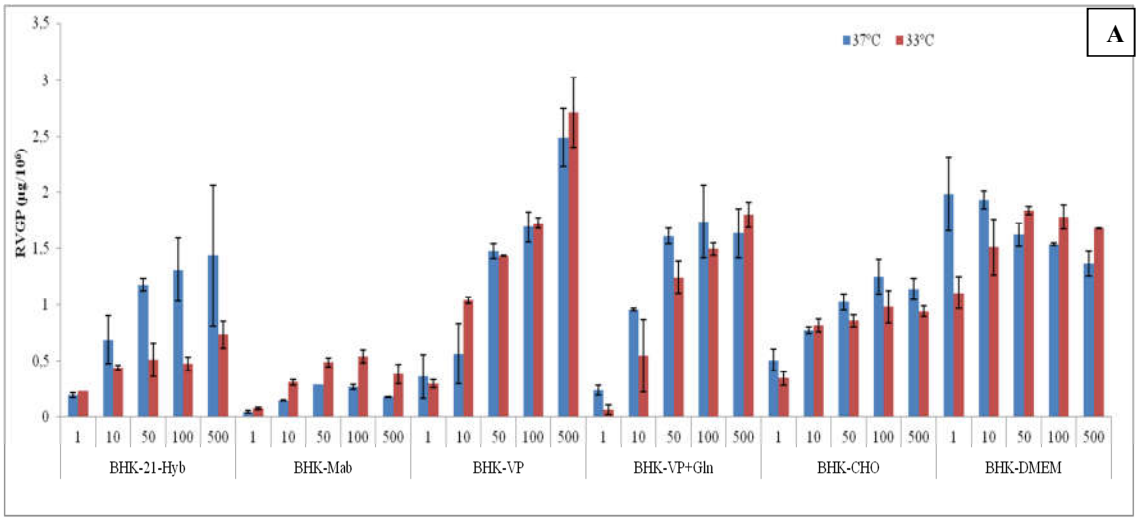
Finalmente, analisando o comportamento de expressão de RVGP em células em meio basal, pode-se observar valores consideráveis de proteína em relações de VRPs:cel baixas,

atingindo 1,97 μg/10^6 cel (364,9 ng/mL) numa relação de 1 VRP:1 Cél (Figura 22 (A) (B)). Ao contrário do observado nas demais células, a quantidade de RVGP nestas células diminuiu conforme foi aumentada a quantidade de SFV-RVGP-DMEM, este fato pode sugerir que células em meio DMEM possam ser infectadas mais eficientemente, como observado pela porcentagem alta de células fluorescentes na relação de 10 VRP: 1cel (Figura 18 do item 5.5.1). Esses dados ainda podem sugerir que essas células apresentam uma maior eficiência para produzir mRNA e o uso do SFB poderia suprir os nutrientes necessários para um melhor processamento da proteína.

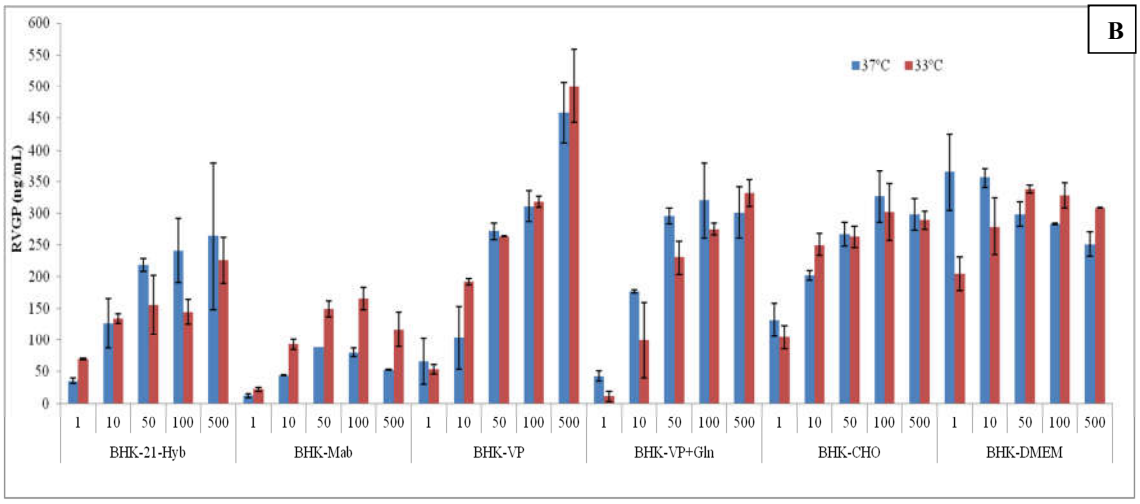
Outro fato observado foi uma diferença de expressão de RVGP em células cultivadas nos diferentes SFM, considerando que foram empregadas concentrações virais semelhantes entre as diferentes linhagens celulares. Este fato confirma novamente a necessidade de avaliar diferentes meios de cultura e seu desempenho para expressão de proteínas.

Finalmente, os resultados dos ensaios realizados em 33 °C mostraram um aumento gradativo da expressão da RVGP em resposta ao aumento na quantidade de vírus, mostrando um comportamento mais homogêneo em todas as células avaliadas, entretanto, não houve um aumento significativo na expressão quando comparada com os valores atingidos em 37 °C.

Figura 22. Expressão de RVGP em células BHK-21 cultivadas em SFM



Em (A) Expressão específica de RVGP (μg/10^6cel) em células adaptadas em diferentes SFM (Hybridoma, MAb, VP, VP+Gln, e CHO) e como controle o meio DMEM+10% de SFB. Foram usadas diferentes proporções de VRP:Cél (1; 10; 50; 100 e 500). Células de cada poço foram coletadas por centrifugação 24 horas após a infecção e analisadas pelo método de ELISA. As barras correspondem ao desvio padrão da triplicata.



Em (B) Expressão volumétrica de RVGP (ng/mL) em células adaptadas em diferentes SFM (Hybridoma, MAb, VP, VP+Gln, e CHO) e como controle o meio DMEM+10% de SFB. Foram usadas diferentes proporções de VRP:Cél (1; 10; 50; 100 e 500). Células de cada poço foram coletadas por centrifugação 24 horas após a infecção e analisadas pelo método de ELISA. As barras correspondem ao desvio padrão da triplicata.

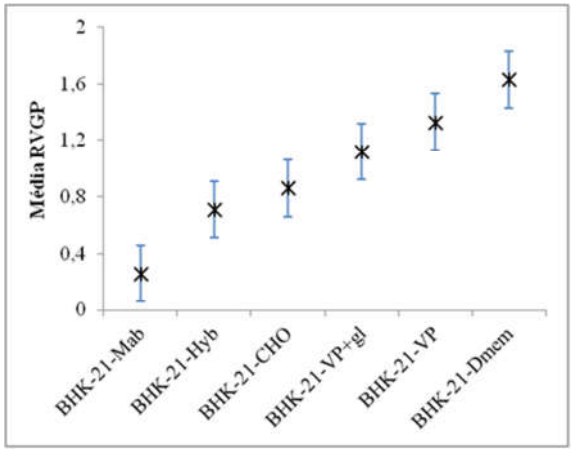
Uma análise estatística foi realizada para avaliar as diferentes variáveis incluídas neste experimento. Na análise de ANOVA não foram encontradas diferenças significativas para a variável temperatura. Em relação às diferentes relações VRP:Cél avaliadas, foram observadas diferenças para as relações de 1:1 e 50:1, porém não há diferenças entre usar 100:1 ou 500:1. Diferenças estatísticas também foram observadas referentes ao meio de cultura no qual as células estão adaptadas. Na Tabela 11 e Figura 23, são apresentados os resultados da análise de TUKEY para as diferentes células, observando que células BHK-21-Mab apresentaram o menor valor, mostrando diferenças significativas com as demais células. Células em meio basal mostraram o valor mais alto, porém sem diferenças com células BHK-21-VP. Estes resultados indicam que as únicas células que não seriam recomendadas para expressão da RVGP, nas condições que foram avaliadas, são as BHK-21-Mab.

Tabela 11- Análise estatística de TUKEY das médias de expressão de RVGP das células BHK-21 adaptadas em diferentes meios de cultura (nível de significância de 95%).

Célula	Média RVGP (μg/10^6cel)
BHK-21-Mab	0,26 [a]
BHK-21-Hyb	0,71 [b]
BHK-21-CHO	0,86 [bc]
BHK-21-VP+gl	1,12 [cd]
BHK-21-VP	1,13 [de]
BHK-21-Dmem	1,63 [e]

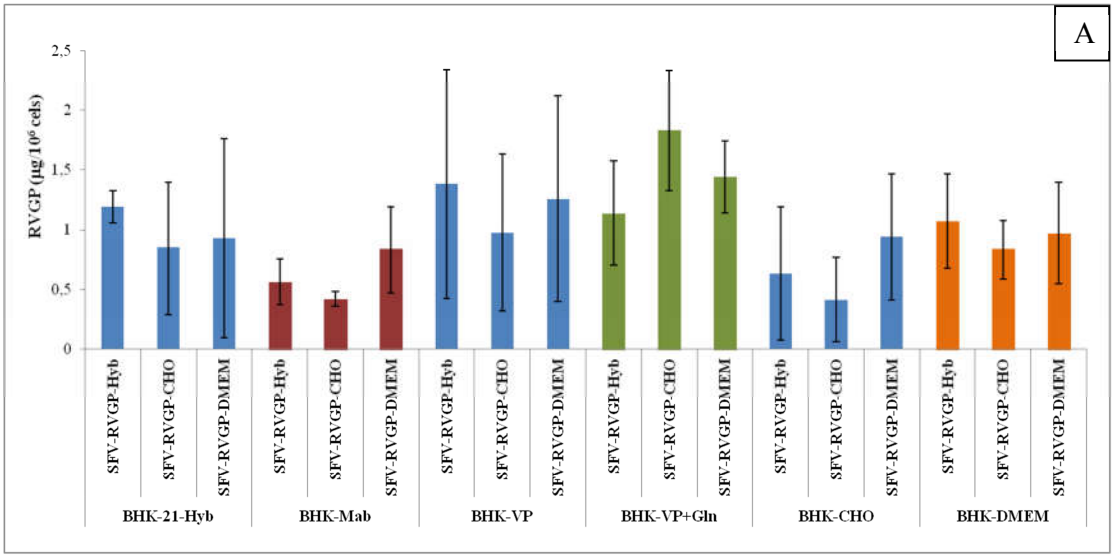
Letras diferentes representam diferenças estatísticas e letras iguais representam ausência de diferenças.

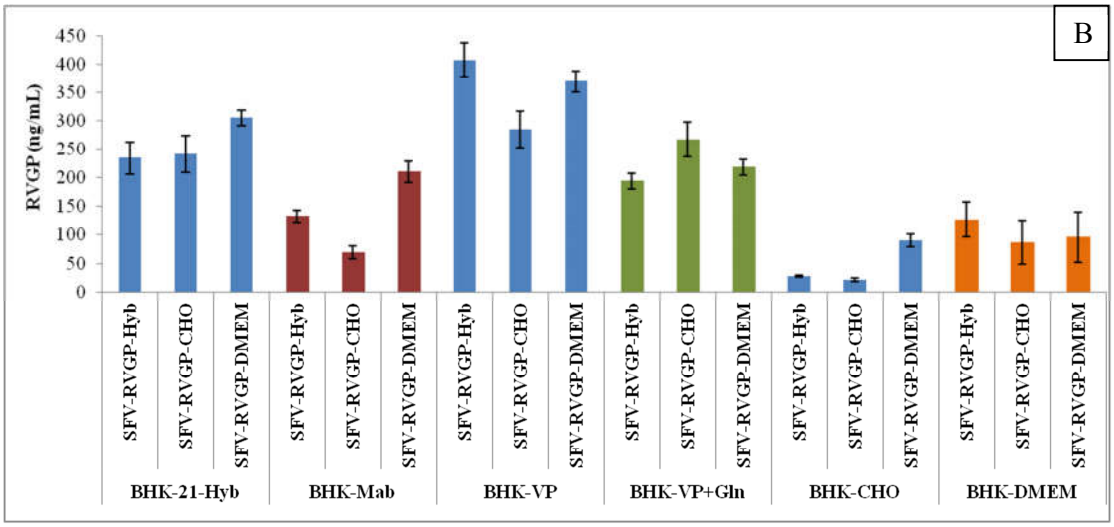
Figura 23. Média da expressão de GFP em células infectadas com SFV-GFP.



Da mesma forma que fizemos para expressão de GFP, foi realizado um experimento infectando as diferentes células com as VRPs de SFV-RVGP-Hyb; SFV-RVGP-CHO e SFV-RVGP-DMEM usando a relação de VRP:Cél de 100:1 Amostras foram coletadas em 24 horas de infecção e a análise de RVGP foi realizada por ELISA. Os resultados obtidos deste experimento confirmaram que células em meio VP-SFM com ou sem suplementar com glutamina apresentaram valores ligeiramente superiores de RVGP em relação às demais células (Figura 24 (A) (B)). Também, pode ser sugerido que a composição da partícula viral, não foi afetada pelo tipo de meio usado na célula produtora.

Figura 24. Expressão de RVGP em células BHK-21 usando diferentes SFV-RVGP





Células BHK-21 crescendo nos diferentes SFM foram infectadas com SFV-RVGP-Hyb; SFV-RVGP-CHO e SFV-RVGP-DMEM usando uma relação de VRP:Cél de 100:1. Células de cada poço foram coletadas por centrifugação 24 horas após a infecção e analisadas pelo método de ELISA. Em A) Expressão específica de RVGP (μg/10^6cel) e em B) Expressão volumétrica de RVGP (ng/mL) em células adaptadas em diferentes SFM (Hybridoma, MAb, VP, VP+Gln, e CHO) e como controle o meio DMEM+10% de SFB. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas de dois experimentos independentes.

A análise estatística deste experimento mostrou novamente que o tipo de meio usado no cultivo das células gerou diferenças significativas na expressão de RVGP (Tabela 12), enquanto, o tipo de VRP (SFV-RVGP-Hyb; SFV-RVGP-CHO ou SFV-RVGP-DMEM) não mostrou afetar significativamente a expressão, confirmando os resultados encontrados para GFP.

Tabela 12- Análise estatística de TUKEY das médias de expressão de RVGP células BHK-21 infectadas com os vírus SFV-RVGP-Hyb; SFV-RVGP-CHO e SFV-RVGP-DMEM (nível de significância de 95%)

Célula	Média RVGP (μg/10^6cel)
BHK-21-Mab	0,6 [a]
BHK-21-CHO	0,6 [a]
BHK-21-Dmem	0,9 [ab]
BHK-21-Hyb	0,9 [ab]
BHK-21-VP	1,2 [ab]
BHK-21-VP+Gln	1,5 [ab]

Letras diferentes representam diferenças estatísticas e letras iguais representam ausência de diferenças.

Os resultados obtidos na expressão de uma proteína mais complexa como é uma glicoproteína de membrana, mostraram que as diferenças na expressão são devidas ao meio de

cultura no qual a célula infectada foi adaptada. Igualmente foi observado que nem a VRP (SFV-RVGP-Hyb; SFV-RVGP-CHO ou SFV-RVGP-DMEM) nem a temperatura tiveram um efeito significativo sobre a expressão de RVGP.

B) Avaliação da produção de mRNA-RVGP

Uma análise da cinética do mRNA-RVGP em células crescendo nos diferentes meios e infectadas com os correspondentes SFV-RVGP numa relação de VRP:Cél de 50:1 também foi realizada. Para isto, amostras de células foram extraídas nos tempos de 3; 6; 12; 24 e 48 horas pós-infecção. Os dados foram avaliados tomando como base o valor da CT mais alto entre as amostras (CT calibrador), isto é, a amostra com menor quantidade do mRNA-RVGP, que foi encontrada nas células BHK-21-VP com 3 horas de infecção.

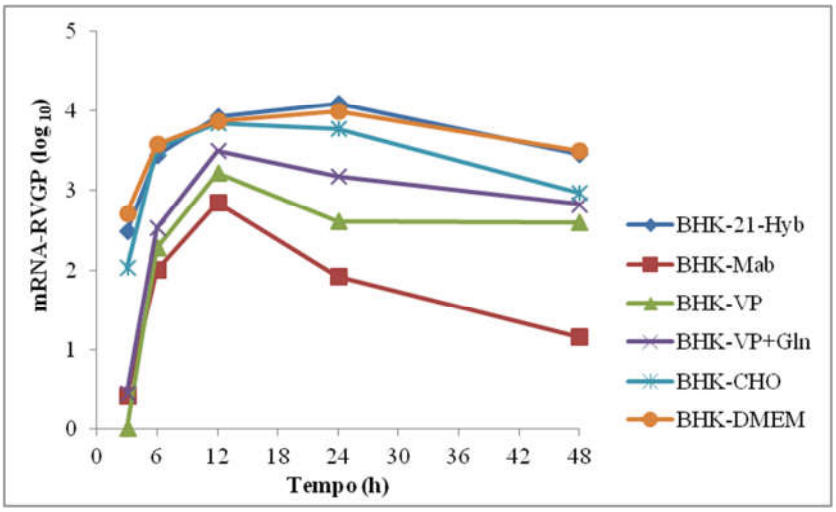
Na Figura 25 observamos que células BHK-21-Hyb; BHK-21-CHO e BHK-21-DMEM apresentaram um comportamento semelhante, sendo que já em 3 horas de infecção apresentaram um valor 100 vezes mais alto em relação às células BHK-21-VP, BHK-21-VP+Gln e BHK-21-MAb. O pico de mRNA-RVGP em células BHK-21-CHO foi encontrado em 12 horas de infecção, enquanto em células BHK-21-Hyb e BHK-21-DMEM o pico foi encontrado em 24 horas. Em todas as células foi verificado que o valor de mRNA-RVGP cai em 48 horas como esperado para uma infecção usando SFV. Também podemos observar que os valores mais altos de mRNA-RVGP correspondem a células em meio Hybridoma e DMEM, apresentando aproximadamente 10 vezes mais mRNA em comparação as demais células (isto avaliando o pico de produção).

Células crescendo em meio VP-SFM com e sem glutamina apresentaram um comportamento similar, mostrando valores crescentes até o ponto de 12 horas pós-infecção (pico de produção), após esse momento pode ser observado que o mRNA-RVGP destas células é mantido até o fim do experimento (Figura 25).

Finalmente, as células BHK-21-MAb apresentaram os valores de mRNA-RVGP mais baixos em relação a todas as células avaliadas. Como pode ser observado na Figura 25, o padrão de amplificação destas células começa de forma similar ao observado para células BHK-21-VP e BHK-21-VP+Gln, atingindo o pico de produção de mRNA-RVGP em 12 horas pós infecção, porém após este ponto foi observada uma queda significativa para o ponto de 24 horas, ficando 10 vezes abaixo das células BHK-21-VP e 100 vezes das células em meios Hybridoma-SFM, CHO-SFM e DMEM. Estes valores inferiores de mRNA-RVGP após 12 horas de infecção, poderiam explicar os resultados na diminuição da intensidade de

fluorescência observados nos experimentos com SFV-GFP, e ainda poderiam ser o motivo da baixa expressão de RVGP em 24 horas de infecção avaliada por ELISA.

Figura 25. Expressão relativa de mRNA-RVGP através da técnica de qRT-PCR



Células crescendo em meios Hybridoma-SFM; MAb; VP-SFM; VP-SFM+Gln; CHO-SFM e DMEM foram infectadas em placa de 6 poços usando uma razão de VRP:Cél de 50:1. As células foram coletadas as 3, 6, 12, 24 e 48 horas após infecção e analisadas por qRT-PCR. O resultado apresentado é a média da duplicata.

C) Expressão de RVGP em células BHK-21-C13 em SFM cultivadas em *spinner*

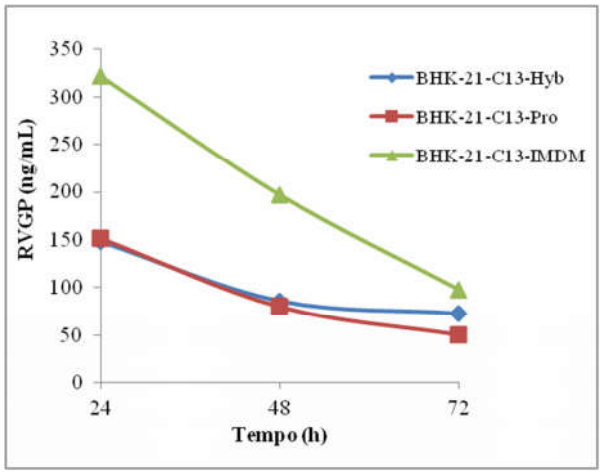
Com o intuito de avaliar o escalonamento de nosso sistema, células BHK-21-C13 adaptadas em SFM, foram cultivadas em frasco de cultura *spinner* de 100 mL com um volume de trabalho de 30 mL, depois de 3 passagens, elas foram infectadas com o vírus SFV-RVGP-CHO (máxima quantificação) usando uma relação VRP:Cél de 100:1. Amostras de células foram retiradas 24; 48 e 72 horas pós-infecção e armazenadas para posterior análise da proteína.

Na Figura 26 se encontram os resultados da expressão volumétrica de RVGP (ng/mL), observamos valores semelhantes em células adaptadas em SFM (BHK-21-C13-Hyb e BHK-21-C13-Pro), os quais foram 2 vezes inferiores em relação às células em meio basal, esta diferença foi encontrada apenas no ponto de 24 horas de infecção, pois em seguida os valores de RVGP em células em meio basal caem significativamente, atingindo o valor de 100 ng/mL no tempo de 72 horas de infecção. Este valor foi similar ao encontrado em células em SFM para o mesmo ponto.

Devido às dificuldades encontradas para a etapa de infecção em *spinner* (devido ao volume de trabalho), acreditamos que algumas padronizações poderiam resultar num aumento

dos valores de expressão da proteína (volume de infecção, tempo de infecção, inóculo celular).

Figura 26. Expressão de RVGP em células BHK-21-C13 cultivadas em *spinner*

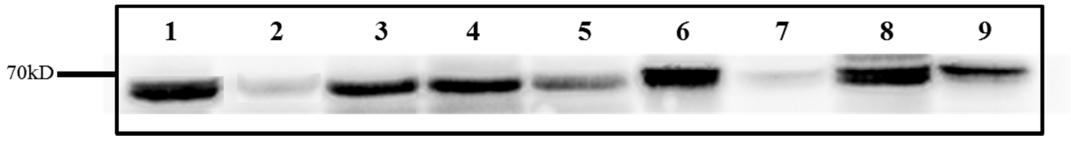


Expressão volumétrica de RVGP (ng/mL) em células BHK-21-C13 crescendo em Hybridoma-SFM e Pro293a e IMDM-DMEM+5% de SFB. Células foram infectadas com SFV-RVGP-CHO usando uma relação de VRP:Cél de 100:1. Uma alíquota contendo 1×10^6 células foi coletada por centrifugação 24; 48 e 72 h após a infecção e analisada pelo método de ELISA. Não tem barra de desvio padrão, porque o experimento foi realizado uma única vez.

D) Avaliação da RVGP por *Western Blot*

A presença da RVGP em células crescendo em meios livres de SFB também foi avaliada pela técnica de *Western Blot*. Células BHK-21 aderentes e células BHK-21-C13 suspensão, foram infectadas com SFV-RVGP na relação VRP:Cél de 100:1. Amostras contendo 1×10^6 cel, foram coletadas após 24 horas de infecção e analisadas por *Western Blot*. Pode ser observado na Figura 27 a presença de RVGP em todas as amostras avaliadas representada por uma banda com um tamanho aproximado de 66 kDa, valor que corresponde ao monômero da RVGP. Ainda nesta figura podemos observar o padrão da RVGP de células BHK-21-C13 em suspensão, nos poços 7-9. Observamos que a RVGP de células BHK-21-MAb (poço 2) como já relatado nos resultados de ELISA apresentou uma banda mais fraca, por possuir uma baixa expressão de proteína. Igualmente a banda de BHK-21-C13-Hyb também mostrou uma marcação mais fraca, devido a quantidade de RVGP menor por célula. Esses resultados mostram que células adaptadas em SFM expressam a proteína de forma eficiente e com uma conformação correta que foi confirmada através de duas técnicas de imunodetecção, como ELISA e *Western Blot*.

Figura 27. Análise da expressão de RVGP através da técnica de *Western Blot*



Células BHK-21 e BHK-21-C13 foram infectadas com SFV-RVGP numa relação VRP:Cél de 100:1. Amostras foram coletadas 24 h pos-infecção e tratadas para análise por *Western Blot*. Poço 1: BHK-21-Hyb; Poço 2: BHK-21-Mab; Poço 3: BHK-21-Dmem; Poço 4: BHK-21-Hyb; Poço 5: BHK-21-VP; Poço 6: BHK-21-VP+Gln; Poço 7: BHK-21-C13-Hyb; Poço 8: BHK-21-C13-Pro; Poço 9: BHK-21-C13-IMDM/DMEM.

6 DISCUSSÃO

A crescente demanda de proteínas recombinantes tem impulsionado o desenvolvimento de novas tecnologias para o aperfeiçoamento na produção de biofármacos inócuos e eficientes a partir do cultivo de células animais. A inocuidade tem sido garantida através de diferentes estratégias, uma delas se trata de evitar o uso do soro fetal bovino no sistema de cultivo que possa significar o risco de transmissão de contaminantes (vírus, bactérias, fungos, prions) ao produto final. Por este e outros fatores negativos associados ao uso do SFB, foi nosso objetivo propor um sistema de expressão de proteínas recombinantes baseado no uso de meios de cultura livres de SFB.

Desta forma, a primeira etapa consistiu da adaptação das células BHK-21 (aderentes) e BHK-21-C13 (suspensão) ao crescimento em SFM. Para isto, foram selecionados 5 meios de cultura, dentre uma lista já disponível no mercado, esta seleção foi realizada sob critérios de disponibilidade, preço e por envolver especificidade para células de mamífero já usadas como plataforma de expressão de proteínas recombinantes.

Assim, temos 3 meios da empresa Gibco-Invitrogen, o meio Hybridoma-SFM recomendado para uso em células hibridoma (produção de anticorpos monoclonais), o meio VP-SFM usado para cultivo de células BHK-21 (suspensão), MDCK, COS7, HEp2 e Vero (produção de vírus, proteínas recombinantes e MAbs) e o meio CHO-S-SFM II indicado para cultivo de células CHO, que são amplamente estudadas na produção de diversos biofarmacêuticos. Da empresa Lonza, selecionamos o meio Pro293a-CDM (quimicamente definido) indicado para cultivo de células HEK-293, também bastante conhecidas na área da pesquisa e produção de vetores virais e proteínas recombinantes. Finalmente da empresa BD selecionamos o meio MAb-BD (ACF- livre de componente animal) recomendado para produção de anticorpos monoclonais em células de hibridoma, mieloma e células CHO.

A análise de aminoácidos dos SFMs mostrou que eles possuem uma concentração superior de vários dos aminoácidos essenciais. Os aminoácidos são considerados os fatores mais importantes para o crescimento celular e a produção, pois podem proteger as células do esgotamento de nutrientes, osmolaridade elevada (PARAMPALLI et al., 2007) e ainda agem como tampão do pH intracelular. Portanto, os aminoácidos são considerados fatores críticos e geralmente devem ser adicionados ao SFM.

Células BHK-21 têm sido usadas extensamente na expressão de proteínas recombinantes e sua capacidade para crescer em meios livres de SFB já foi relatada (BARTELING, 1976; CRUZ et al., 1998; FRAZATTI-GALLINA et al., 2004; KALLEL et

al., 2002). Contudo, a escolha de uma formulação livre de soro para uma determinada linhagem celular e condições específicas de cultivo na maioria das vezes deve ser determinada empiricamente ou através de informações obtidas da literatura (SINACORE; DRAPEAU; ADAMSON, 2000). Consequentemente, embora seja demorada, a avaliação de diferentes meios é aconselhável para alcançar um processo rentável e viável economicamente (RODRIGUES et al., 2012).

Neste sentido, nossos objetivos principais foram analisar o desempenho de diferentes meios em relação a alguns parâmetros cinéticos, produção de VRPs (*Viral replicon particles*) de SFV e, finalmente, a expressão de diferentes proteínas recombinantes.

Diferentes métodos de adaptação em SFM são encontrados na literatura (JOHNSON, 2006; VAN DE VALK et al., 2010). O mais simples consiste da adaptação direta das células ao meio de cultura livre de SFB, este método já teve sucesso para algumas linhagens celulares (FONTANA et al., 2015), porém a taxa de sucesso não é muito alta, sendo na maioria das vezes necessário o uso de outras estratégias. Segundo Link et al. (2004) a maioria dos meios de cultivo comerciais livres de SFB podem não fornecer as condições necessárias para o crescimento celular após uma passagem direta. Um método alternativo é baseado no uso de meio condicionado, assim uma relação entre meio condicionado e SFM é usada até atingir adaptação completa no SFM, entretanto, não se tem muitas referências na literatura do uso desta técnica. Por fim, a técnica talvez mais empregada, se baseia na diminuição gradativa ou sequencial da porcentagem de SFB ou meio com SFB para o novo SFM (COSTA et al., 2013; CRUZ et al., 1998; DO AMARAL et al., 2015; HUANG et al., 2015; RODRIGUES et al., 2012). Assim, optamos por utilizar esta técnica na adaptação das células BHK-21 e BHK-21-C13.

As células BHK-21 crescendo de forma aderente foram adaptadas com sucesso ao crescimento em 4 dos meios de cultura avaliados (Hybridoma-SFM, MAb, VP-SFM e CHO-S-SFM II), obtendo as células BHK-21-Hyb; BHK-21-Mab; BHK-21-VP; BHK-21-VP+Gln e BHK-21-CHO. Já as células BHK-21- C13 crescendo em suspensão foram adaptadas ao crescimento em 3 meios de cultura livres de SFB (Hybridoma-SFM, CHO-S-SFM II e Pro293a), obtendo as células BHK-21-C13-Hyb; BHK-21-C13-CHO e BHK-21-C13-Pro, porém as células BHK-21-C13-CHO não suportaram o crescimento ao longo de várias passagens, evento que também foi descrito por Biaggio (2014) com células HKB-11 no meio SFMII. Uma vez atingida a adaptação completa nos meios livres de SFB, foi feita a caracterização cinética destas células através de diferentes ensaios avaliando variáveis importantes de crescimento, como Xmáx (concentração máxima de células); μmáx

(velocidade máxima de crescimento) e Td (tempo de duplicação), igualmente foi avaliado o consumo e produção de metabólitos (glutamina, glicose e lactato).

Foi notado que as principais diferenças morfológicas das células BHK-21 aderentes cultivadas na ausência de SFB foram a presença de aglomerados e a perda da capacidade de adesão, estes eventos são considerados comuns no processo de adaptação e já foram relatados em células BHK (CRUZ et al., 1998; HESSE; WAGNER, 2000; KALLEL et al., 2002).

As cinéticas de células BHK-21 aderentes mostraram que só as células BHK-21-VP apresentaram um crescimento inferior, com um μmáx inferior e um Td muito alto, em relação às células crescendo na presença de SFB, ainda quando as células foram suplementadas com glutamina. Enquanto que para as células BHK-21 em suspensão, encontramos que elas em meio Hybridoma cresceram de forma similar a células em meio com soro, enquanto células em meio Pro293a apresentaram menores taxas de crescimento. Este comportamento manteve-se ao longo de muitas passagens e ainda após o descongelamento dos bancos celulares. Vale a pena ressaltar que os valores de μmáx e Td se encontram em acordo com os valores já descritos para estas células (CRUZ et al., 1998; FERNÁNDEZ-NÚÑEZ et al., 2015).

Os dados encontrados na literatura sobre comportamento de crescimento de linhagens celulares em meios livres de SFB diferem um pouco e impossibilitam fazer uma conclusão de um padrão geral. Neste sentido, pode se inferir que o comportamento de cada linhagem depende das condições de cultivo e dos meios avaliados. Assim, podem ser encontradas referências que relatam melhores taxas de crescimento em SFM do que em meio com SFB (GENZEL; FISCHER; REICHL, 2006; VAN DER VALK et al., 2010), assim como aquelas onde é relatado um crescimento celular reduzido na ausência de SFB (CRUZ et al., 1998; MOREIRA et al., 1995).

Em relação ao consumo de nutrientes (glicose e glutamina), de modo geral, foi observado que a glutamina parece ser preferivelmente consumida pelas células, tanto BHK-21 aderentes quanto BHK-21-C13 em suspensão, isto indiferentemente da concentração inicial deste nutriente no meio. Em relação ao consumo de glicose, foram encontradas diferenças no consumo deste nutriente em células BHK-21-MAb e BHK-21-DMEM, que apresentaram um baixo consumo de glicose e como resultado disto uma baixa produção de lactato. Outro fato interessante em relação ao consumo de glicose foi observado nas células BHK-21-VP+Gln, já que a suplementação com glutamina alterou o consumo de glicose nestas células, passando de consumir 60% da glicose em células BHK-21-VP para 88% em células BHK-21-VP+Gln, gerando também 2 vezes a mais de lactato. Isto se dá pela natureza interativa do metabolismo

da glicose e a glutamina que gera um controle indireto através das taxas de consumo (CRUZ et al., 1999).

Foi verificado que células BHK-21-C13 cultivadas em frasco tipo *spinner* apresentaram melhores índices de crescimento e um metabolismo mais eficiente quando comparado ao seu cultivo em frasco em pé. No *spinner*, a glutamina foi totalmente consumida, o consumo de glicose também aumentou, porém a produção de lactato foi menor, mostrando um melhor aproveitamento dos nutrientes que foram convertidos numa concentração elevada de células, atingindo aproximadamente 5×10^6 cel/mL em meio Hybridoma e basal e de 2×10^6 cel/mL em Pro293a, significando um aumento de 3 e 2 vezes, respectivamente. Esse comportamento é esperado pelas melhores condições de oxigenação e distribuição de nutrientes (agitação) geradas no cultivo no frasco *spinner*.

Estudos realizados em diferentes células manipulando os principais nutrientes (glicose e glutamina) mostraram que diminuindo as concentrações de glicose, pode se diminuir o consumo de glutamina, estimulando para que o metabolismo da célula seja mais eficiente. Entretanto, observamos que os meios MAb e Pro293a possuem na sua formulação um maior conteúdo de glicose, o que ao contrário do esperado, não afetou o consumo de nenhuma destas duas fontes de energia. Isto sugere que a formulação destes meios é bastante eficiente, pois eles estariam desenhados para cultivos de maior duração (> que 5 dias) sem a necessidade de uma suplementação adicional no meio e sem que esses valores altos afetem a velocidade de consumo e a geração de metabolitos tóxicos como o lactato.

A L-glutamina é um aminoácido essencial e é considerada a fonte principal de energia (30-65%) e nitrogênio para células em cultura (PARAMPALLI et al., 2007), sendo usada sempre em cultivo de células animais. No entanto, a glutamina também é a fonte principal de amônio, portanto, meios com baixos níveis de glutamina provocam uma diminuição do acúmulo de amônio, resultando num aumento de células viáveis e longevidade maior do cultivo (RAJENDRA et al., 2011; TASCHWER et al., 2012).

Os meios VP-SFM e Pro293a não possuem glutamina nas suas formulações, porém é recomendado pelo fabricante a suplementação com esse aminoácido antes do uso. Quando avaliamos o crescimento celular nestes meios na ausência de glutamina, observamos um comportamento interessante, pois as células BHK-21 foram capazes de se adaptar ao crescimento sem glutamina. Isto foi observado tanto nas células aderentes em meio VP, como nas células em suspensão no meio Pro293a.

O crescimento celular em ausência de glutamina já foi relatado em células CHO (BORT; STERN; BORTH, 2010). Nesse trabalho, eles obtiveram uma linhagem que mostrou

uma vida útil prolongada com um incremento na densidade de células integralmente viáveis. Outros trabalhos já relataram as vantagens de se cultivar diferentes células com níveis reduzidos de glutamina (CRUZ et al., 1999; GENZEL; FISCHER; REICHL, 2006; RAJENDRA et al., 2011; TASCHWER et al., 2012). Neste sentido, nós verificamos que células BHK-21 sem suplementação com glutamina, mesmo apresentando menores densidades celulares, mostraram viabilidades superiores a 95% em até 4 dias em cultivo.

Por outro lado, corroborando a necessidade de avaliar vários meios nas condições próprias, temos o caso do meio VP ser recomendado para células BHK-21 (suspensão), porém não conseguimos adaptar nossas células em suspensão para esse meio. Entretanto, o meio Pro293a é recomendado para células aderentes, porém só conseguimos a adaptação completa em células em suspensão, mostrando assim a importância de realizar uma pré-seleção de meios com a finalidade de encontrar o mais adequado. Outros trabalhos também relataram dificuldade de adaptar linhagens celulares (HEK293 e CHO) em alguns meios de cultura, mostrando que é um evento normal no processo de adaptação (DO AMARAL et al., 2015; RODRIGUES et al., 2012).

Quando é realizada uma seleção do potencial de diferentes meios de crescimento para produção com aplicações biológicas, a taxa proliferativa não deve ser o único critério avaliado, pois apesar de um rápido crescimento ser vantajoso para estabelecer culturas de larga escala, a densidade celular máxima e a duração da viabilidade produtiva também devem ser ponderadas. É conhecido que muitos tipos de células geram os maiores títulos de produto biológico na fase estacionária ou sob condições leves de estresse, condições que são consideradas sub-ótimas para a replicação celular. Assim, o determinante final de eficácia de um determinado meio de cultivo não é nem o grau de definição da composição do meio, nem a taxa de proliferação celular, mas a capacidade para suportar a síntese de títulos substanciais do produto desejado numa pureza razoavelmente elevada (JAYME; BLACKMAN, 1985).

Assim, uma vez obtidas as células adaptadas aos SFMs, passamos a seguinte etapa proposta que consistiu em avaliar a capacidade destas células de produzir VRPs de SFV. O uso de plataformas livres de SFB tem sido de grande importância na produção de vacinas virais, sendo descrito para a produção da vacina para raiva em células Vero (FRAZATTI-GALLINA et al., 2004), vacina para febre aftosa em células BHK-21 (BARTELING; VREESWIJK, 1991), vacina para influenza em células MDCK (BRANDS et al., 1999), entre outros. Estudos para produção de outros vírus em plataformas livres de SFB também se encontram em andamento, por exemplo, produção de vírus da influenza em células MDCK (HUANG et al., 2015) ou em células HEK293SF-3F6 (PETIOT et al., 2011), vírus da raiva

em células BHK-21 (MERTEN et al., 1994, 1999; PERRIN et al., 1995) ou em HEK-293 (FONTANA et al., 2015), vírus da pólio em células Vero (CINATL et al., 1993; MERTEN et al., 1994), entre outros.

Tecnologias para o desenvolvimento de novas vacinas vêm ganhando força nas décadas recentes, este é o caso das vacinas baseadas em ácidos nucléicos. Assim, vacinas de DNA (HASAN et al., 1999; ULMER et al., 1993; WOLFF et al., 1990) e mais recentemente vacinas de RNA (GEALL; MANDL; ULMER, 2013; MOGLER; KAMRUD, 2015; SAHIN; KARIKÓ; TÜRECI, 2014) tem ocupado grande espaço na área de pesquisa.

As vacinas de RNA se dividem principalmente naquelas que se baseiam no uso da molécula de RNA sintetizada *in vitro*, e naquelas que usam um RNA capaz de se autorreplicar, estes últimos geralmente provem da engenharia genética realizada a partir de um vírus de RNA fita simples positiva como os alfavírus, picornavírus e flavivírus (SAHIN; KARIKÓ; TÜRECI, 2014). Os alfavírus em particular têm sido parte fundamental no desenvolvimento de plataformas para obtenção de mRNAs que se autorreplicam eficientemente graças a presença dos seus promotores fortes (GEALL; MANDL; ULMER, 2013; MOGLER; KAMRUD, 2015). Já foi observado que eles podem ser usados de forma ativa como sistemas de entrega gênica, sendo que as VRPs de SFV têm mostrado resultados promissores na geração de resposta imune (AJBANI et al., 2015; ASTRAY et al., 2014; LJUNGBERG; LILJESTRÖM, 2015; LUNDSTROM, 2012a). Em trabalhos realizados para tratamento de tumores, a vacinação com SFV mostrou resultados de eficiência semelhantes aos obtidos com adenovírus (NÄSLUND et al., 2007).

Neste contexto, é válido analisar a produção de VRPs que carreguem diferentes antígenos virais (NS3 e RVGP) em células BHK-21 em condições livres de SFB, já que eles podem vir a se tornar sistemas interessantes no estabelecimento de plataformas vacinais. Neste sentido, uma vacina baseada no uso de *replicons* do vírus Sindbis carregando a RVGP mostrou ser efetiva na indução de uma resposta imune em ratos (SAXENA et al., 2009), igualmente um trabalho avaliando o uso de *replicons* de SFV-RVGP mostrou que as VRPs foram capazes de gerar uma resposta imune celular e um nível de anticorpos comparáveis a vacina comercial (ASTRAY et al., 2014). Esses trabalhos nos motivaram também a avaliar esse sistema em cultivos livres de SFB.

Além dos antígenos virais citados, neste trabalho, também foram produzidas VRPs carregando o RNA da GFP nas células adaptadas nos diferentes meios. Os dados obtidos foram usados para caracterizar o funcionamento das partículas geradas na transdução de células crescendo em meios livres de SFB.

Em relação ao vetor de expressão usado neste trabalho, a titulação viral de partículas recombinantes de SFV tem apresentado algumas dificuldades devido ao fato dele ser um vírus não replicativo, tornando inadequado o método de quantificação em placa (BLASEY et al., 2000). Métodos de quantificação indiretos têm sido usados na determinação da titulação viral empregando a expressão de proteínas repórter (luciferase, LacZ, ou GFP) (BLASEY et al., 1997, 2000; CASALES et al., 2008; LUNDSTROM, 2003). No entanto, estes métodos ainda carecem de precisão, e ainda dependem não só da capacidade de infecção do vírus como da maquinaria da célula para expressar a proteína repórter. Atualmente a técnica de qRT-PCR tem se tornado uma ferramenta importante para titulação de vírus, principalmente em amostras biológicas (HOFFMANN et al., 2009; MACKAY; ARDEN; NITSCHE, 2002; SLOMKA et al., 2010). O método de titulação viral por qRT-PCR também tem sido utilizado para titulação de partículas recombinantes de baculovírus (HITCHMAN et al., 2007). Neste sentido, a limitação para o uso desta tecnologia é relativa à disponibilidade do equipamento e ao tempo de implementação e/ou padronização da técnica. Considerando esta abordagem, em nosso laboratório foi desenvolvida uma metodologia de qRT-PCR para quantificar o RNA correspondente a região nsP3 do SFV, possibilitando desta forma a quantificação de diferentes construções baseadas no vetor viral SFV que mantém a região da nsP3 conservada (PUGLIA et al., 2013).

Desta forma, foram obtidos lotes de diferentes SFVs carregando o RNA da GFP, NS3 e RVGP, respectivamente. Estas partículas virais foram geradas a partir da eletroporação de células BHK-21-Hyb, BHK-21-MAb, BHK-21-VP, BHK-21-VP+Gln, BHK-21-CHO, BHK-21-DMEM com os RNAs correspondentes obtidos do processo de transcrição *in vitro*. A quantificação das VRPs de cada célula foi realizada pela técnica de qRT-PCR descrita por Puglia et al. (2013). Através desta técnica conseguimos uma quantificação eficiente das diferentes VRPs (SFV-GFP, SFV-NS3 e SFV-RVGP) corroborando a aplicabilidade e reprodutibilidade do método.

Quando são usados SFM no cultivo de células, considera-se um comportamento satisfatório a obtenção de títulos virais similares àqueles gerados em células crescendo na presença de SFB, entretanto, a produção de altos títulos virais também já foi relatada (GENZEL; FISCHER; REICHL, 2006; JEFFS et al., 2006). Nossos resultados indicaram a superioridade das células BHK-21-CHO na produção de VRPs, fato que foi confirmado com os diferentes SFVs obtidos (SFV-GFP, SFV-NS3 e SFV-RVGP). O meio de cultura CHO-S-SFM II já tem sido utilizado em células BHK-21 por Cruz et al.(1998), nesse trabalho eles mostraram a superioridade deste meio sobre outros SFM testados, indicando maiores taxas de

crescimento e de produção de proteína recombinante. Battista et al. (1993) também relataram a superioridade deste meio no crescimento de células CHO. Não foi encontrada na literatura informação que pudesse ajudar na justificativa da superioridade deste meio em relação à produção de partículas virais. Na descrição do meio, é relatada a adição de suplementos de origem animal, que são de composição fechada, por este motivo não descartamos a possibilidade que algum desses suplementos possa estar favorecendo a produção das partículas virais.

De modo geral, os títulos virais obtidos nas células estabelecidas em SFM (na faixa de 0,3-4,8$\times10^9$ partículas virais/mL) são comparáveis aos títulos encontrados para diferentes SFVs relatados para células BHK-21 crescendo em DMEM suplementado com SFB, cujos valores se encontram na faixa de 0,032 -0,83$\times10^9$ partículas virais/mL (PUGLIA et al., 2013). Ressaltamos ainda que o título encontrado para SFV-GFP e SFV-RVGP no presente trabalho, produzidos em células suplementadas com SFB, se encontram na faixa descrita por Puglia et al. (2013), mostrando reprodutibilidade na técnica usada para obtenção dos SFV e sua quantificação. Comparações com outros trabalhos de SFV não são adequadas devido ao fato deles realizarem uma quantificação indireta de partículas infecciosas, enquanto nossos resultados se referem ao número total de partículas virais.

Trabalhos realizados para a produção de proteínas em larga escala usando o sistema SFV relatam a produção das partículas virais em células aderentes e apenas a etapa de expressão de proteína em células em suspensão (BLASEY et al., 1997, 2000; SCHLAEGER; LUNDSTROM, 1998). Porém os autores não justificam o fato de não produzir as partículas virais em células em suspensão, acreditamos que a existência de um protocolo bem estabelecido para a produção de SFVs recombinantes em células aderentes (LILJESTRÖM; GAROFF, 1991; LUNDSTROM, 2012b) motive esta decisão. Ainda trabalhos descritos por Castro et al. (2015), para produção de adenovírus canino tipo 2 em células MDCK adaptadas a SFM, relataram que a produção de vírus é superior em células crescendo em cultivo aderente. Da mesma forma Peschel et al. (2013) também relataram uma maior produção do vírus da influenza em células aderentes quando comparada às células em suspensão. Sendo assim, e considerando que as quantificações obtidas em nossas condições com células aderentes foram satisfatórias, decidimos não investir na obtenção de VRPs nas células BHK-21-C13 (suspensão).

Uma vantagem do sistema de obtenção de VRPs apresentado no presente trabalho é o uso dos SFM tanto para o crescimento celular como para produção de vírus. Já que alguns meios têm sido especificamente desenhados para uma máxima propagação de vírus

(MegaVir-Hyclone ou mesmo o VP-SFM da Gibco), enquanto a proliferação celular muitas vezes não é satisfatória, exigindo trocas de meio adicionais. Assim, a partir dos dados obtidos neste trabalho, na etapa de produção de VRPs podemos inferir que as células estabelecidas em SFM se mostraram promissoras na produção de partículas virais, e poderiam ser usadas como plataforma de estudo para produção de outros vírus ou vetores virais.

Por fim, a última etapa deste trabalho consistiu em avaliar a eficiência da infecção e transdução das diferentes VRPs geradas e ainda a capacidade das células estabelecidas em SFM de receber, replicar e traduzir o material genético entregue pelas VRPs. Para isto, foi medida a porcentagem de células fluorescentes e a intensidade de fluorescência para os SFV-GFP, a análise do mRNA-NS3 e análise da atividade protease da NS3 para os SFV-NS3 e uma análise mais completa foi realizada para os SFV-RVGP, onde avaliamos a quantificação da RVGP através da técnica de ELISA, a cinética de produção de mRNA-RVGP, a qualidade da proteína através da técnica de *Western Blot* e para finalizar a possiblidade de escalonamento da produção de proteínas recombinantes usando as células BHK-21-C13-Hyb, BHK-21-C13-Pro e BHK-21-C13-IMDM/DMEM em cultivo em frasco *spinner*.

Inicialmente, a proteína GFP foi usada como ferramenta para analisar alguns parâmetros que permitissem identificar algumas características da expressão de proteínas nas células estabelecidas em diferentes SFM. Os experimentos realizados mostraram que a porcentagem de células infectadas aumentou conforme aumentamos a disponibilidade de partículas virais, os aumentos mais significativos foram observados quando passamos de uma relação de VRP:Cél de 1:1 para 10:1 e para 50:1, depois este aumento ficou mais discreto. O aumento na expressão da proteína como resposta a uma maior concentração de vírus é esperado em decorrência de um maior número de células infectadas. Porém, ainda assim uma procura pela relação mais adequada deve ser realizada com a finalidade de estabelecer um protocolo mais conveniente, onde a relação de VRP:Cel seja a suficiente para garantir uma infecção satisfatória e consequentemente uma expressão protéica significativa. Sendo válido ressaltar que concentrações de vírus muito altas podem prejudicar a expressão da proteína como resultado da morte celular gerada pelo vírus (FERNÁNDEZ-NÚÑEZ et al., 2015; RHÊME; EHRENGRUBER; GRANDGIRARD, 2005), fato também observado em nossos experimentos.

Em quase todas as células foi atingido aproximadamente 90% de células fluorescentes (infectadas), sendo que apenas as células em meio VP com e sem suplementação com glutamina apresentaram um valor inferior, com 80% de células fluorescentes. Conseguimos observar uma porcentagem de células fluorescentes significativa em 6 horas de infecção,

mostrando que as células foram infectadas eficientemente e ainda indicando um correto processamento do RNA do SFV após a infecção .

A intensidade de fluorescência mostrou um aumento na expressão em relação aos tempos pós-infecção apresentando um pico com 24 horas em células crescendo em SFM (Hybridoma, CHO e VP), exceto em células em meio MAb, onde observamos uma queda na intensidade no tempo de 24 horas. A porcentagem de células fluorescentes em células BHK-MAb, não apresentou mudanças entre 12 e 24 horas pós-infecção e a diminuição na intensidade foi observada em todas as relações VRP:Cel avaliadas, sugerindo que o decaimento da fluorescência possa estar associado a algum estresse da célula, que afetou a tradução eficiente da proteína ou promoveu sua rápida degradação.

Em relação às células cultivadas na presença de SFB só conseguimos obter os dados de 12 horas pós-infecção, estes valores mostraram uma alta taxa de infecção com 96% de células fluorescentes no tempo avaliado, indicando que células crescendo em SFB podem ser mais permissivas à infecção por SFV ou ainda que a presença de SFB favorece um processamento viral mais eficiente, gerando estes resultados.

Em seguida, usamos três SFV-GFP (SFV-GFP-Hyb; SFV-GFP-CHO e SFV-GFP-DMEM) para avaliar se as diferenças observadas na intensidade de fluorescência entre as diferentes células foram devidas à capacidade inerente da célula de expressar mais proteína ou se eram devidas às diferenças na eficiência de infecção da VRP. O SFV é um vírus envelopado que carrega parte da membrana onde ele é produzido e este fato poderia de alguma forma facilitar a entrada entre células com a mesma conformação na membrana. Tentativas para infectar outras células (Vero, CHO, HUH 7.0 e HEK293) com SFVs produzidos em células BHK-21 já foram relatados (BENMAAMAR et al., 2009; BLASEY et al., 1997). Entretanto, apesar de todas serem passíveis de infecção, os níveis de expressão sempre foram melhores em células BHK-21, indicando alguma vantagem destas células, seja no processamento do RNA ou no processamento da proteína.

A partir destes ensaios, conseguimos observar que as células crescendo em meios sem SFB conservam as características celulares semelhantes às células cultivadas em meio suplementado com SFB, necessárias para uma adequada infecção por SFV recombinantes. Também observamos que as VRPs produzidas em células adaptadas em meios livres de SFB mantêm as características de estabilidade da partícula viral e que os suplementos colocados nesses meios, para viabilizar o cultivo sem SFB, não interferem significativamente com seu mecanismo de infecção. Desta forma, podemos concluir que as diferenças observadas se devem a alterações na maquinaria da célula e não a VRP usada.

A produção da proteína NS3 (proteína não estrutural) do vírus do HCV também foi avaliada. Esta proteína é vista como um alvo para o desenvolvimento de vacinas anti-HCV pelo fato de ser uma proteína altamente conservada, essencial para replicação viral e o mais importante é que tem se demonstrado que a NS3 é capaz de induzir uma resposta celular adequada ao combate da infecção viral (HONEGGER; ZHOU; WALKER, 2014; IP et al., 2014; TAKEI et al., 2014; YU et al., 2014). Desta forma, um trabalho prévio em nosso laboratório foi responsável pela construção dos SFV-NS3 e tentativas foram realizadas para a detecção da NS3 através de imunoensaios (LEMOS, 2015). Entretanto, algumas dificuldades técnicas impossibilitaram a detecção da NS3 por métodos convencionais.

Assim, foi realizado um primeiro ensaio para quantificar o mRNA-NS3 em células adaptadas em SFM e infectadas com SFV-NS3. Este experimento teve a finalidade de avaliar se as VRPs de SFV-NS3 estavam sendo processadas corretamente pelas células adaptadas em SFM, e descartar algum problema ligado ao RNA carregado pela VRP. A cinética do mRNA-NS3 mostrou um correto processamento do RNA, indicando uma amplificação com 3 horas de infecção, característica do rápido início da replicação gerada a partir da infecção com SFV (BENMAAMAR et al., 2009; PUGLIA et al., 2013). Depois das 3 horas de infecção se observa um aumento significativo que vai até 12 e 24 horas pós-infecção. Mesmo não se tratando da mesma proteína, estes dados corroboram com a alta porcentagem de células fluorescentes no tempo de 6 horas de infecção, encontradas no sistema de expressão relatado acima para GFP.

A detecção da proteína NS3 comumente é realizada pelo uso de anticorpos purificados a partir do soro de pacientes (STEINKÜHLER et al., 1996; TOMEI et al., 1993), anticorpos policlonais de coelho (LIN et al., 1994) ou anticorpos anti-histidina (CASTRO, 2007). Porém, não foi possível estabelecer um protocolo de imunodetecção, devido a problemas com a especificidade dos anticorpos avaliados. Sendo que a opção de um anticorpo anti-histidina não é viável, já que a nossa proteína não possui cauda de histidina.

A proteína NS3 é conhecida pela sua função protease no ciclo de vida do HCV, sendo vital em diferentes processos da infecção, desta forma, estratégias relacionadas à inibição de proteases tem surgido como tratamentos alternativos para a Hepatite (BACON et al., 2011; BARTENSCHLAGER; LOHMANN; PENIN, 2013; SALAM; AKIMITSU, 2013; ZEUZEM et al., 2011). Neste sentido, alguns kits se encontram disponíveis para realizar o *screening* de componentes com função antiprotease, ou pesquisar eventos relacionados à atividade protease (BERAN; PYLE, 2008; MAWATARI et al., 2013). Assim, usamos esta estratégia para avaliar de forma qualitativa a presença e integridade da proteína NS3 através da sua função

protease. Os resultados gerados deste ensaio mostraram que a NS3 obtida em células crescendo em SFM (Hybridoma-SFM, CHO-S-SFM II) possui a conformação correta necessária para uma interação com a NS4 (fornecido no kit) essencial para posterior clivagem do substrato correspondente. Ainda podemos inferir que a NS3 expressa em nosso sistema se encontra ligada a membranas, pois uma maior resposta protease foi observada na fração do sobrenadante resultado da lise das células, este resultado corrobora os resultados apresentados por Steinkühler et al. (1996) que também expressaram o domínio protease da NS3 em células Sf9. Finalmente, foi observado que células cultivadas em SFM apresentaram maior atividade do domínio protease expressa por nosso sistema, fato que nos motiva a pensar que a proteína expressa em meios livres de SFB pode apresentar alguma superioridade em relação à quantidade ou a conformação que permitiram a obtenção destes resultados.

Assim, os resultados apresentados para NS3 mostram que foi possível expressar esta proteína através do sistema SFV em células cultivadas em meios livres de SFB, porém são necessárias outras abordagens para estabelecer um protocolo para quantificar este proteína. Trabalhos relatando o uso de uma vacina baseada num SFV carregando todas as proteínas não estruturais do HCV ou carregando a NS3, mostraram que este sistema foi capaz de induzir uma resposta mediada por células T em camundongos, validando a importância de realizar mais estudos abordando esta estratégia (BRINSTER et al., 2002; IP et al., 2014).

Por fim, uma análise mais detalhada foi possível com a RVGP, já que possuímos protocolos padronizados em nosso laboratório e contamos com técnicas mais precisas para sua detecção e quantificação.

Desta forma, em primeiro lugar avaliamos as mesmas relações VRP:Cel usadas com o SFV-GFP com a finalidade de confirmar as observações feitas para expressão de GFP. Além disso, é sabido que temperaturas menores do que 37 °C já tem sido usadas para sistemas de expressão de proteínas usando o SFV (FERNÁNDEZ-NÚÑEZ et al., 2015; SCHLAEGER; LUNDSTROM, 1998), assim como também na expressão de proteínas recombinantes em células CHO, principalmente (KIM; KIM; LEE, 2012; KUMAR et al., 2008), e recentemente em células HEK293 (LIN et al., 2015). Motivados nestes resultados, uma variável foi adicionada ao experimento avaliando a expressão da RVGP a 33 °C.

A análise dos principais resultados deste experimento nos permitiu obter algumas conclusões importantes. Em nossas condições, nem a temperatura nem a VRP usada resultaram em incrementos importantes na expressão da RVGP. Entretanto, as relações VRP:Cel e as células foram variáveis que afetaram a expressão da proteína, corroborando os resultados encontrados para expressão de GFP.

Desta forma, observamos um aumento significativo na expressão quando passamos de uma relação de VRP:cel de 1:1 para 10:1 e para 50:1, porém as seguintes relações avaliadas 100:1 e 500:1 não significaram aumentos representativos na expressão, podemos sugerir que uma relação de 50:1 seja satisfatória para expressar RVGP nas células estabelecidas em SFM. O mesmo raciocínio não é verdadeiro para o caso das células crescendo em DMEM com SFB, pois foi observado que uma relação de 1:1 já foi suficiente para atingir os maiores valores de RVGP registrados para estas células, indicando como tinha sido sugerido para GFP que células suplementadas com SFB podem ser mais permissivas à infecção e ainda parecem apresentar um processamento mais eficiente do SFV, garantindo uma maior concentração de proteína.

Em relação às diferenças geradas entre as células, observamos que apenas as células BHK-21-MAb podem ser consideradas não satisfatórias para a etapa de produção de proteínas. As demais células apresentaram valores de RVGP equivalentes ou ainda superiores às células em meio com SFB. Os valores de RVGP obtidos no presente trabalho estão de acordo com valores descritos para células BHK-21 usando o sistema SFV (BENMAAMAR et al., 2009). Outros sistemas de expressão já têm sido usados para expressão da RVGP visando à produção de uma vacina, porém apenas análises qualitativas foram realizadas (KORAKA et al., 2014; TOMAR et al., 2011).

Os resultados obtidos a partir dos experimentos com RVGP confirmaram os encontrados com GFP, indicando um comportamento reprodutível entre os experimentos desenvolvidos.

Na medida em que entre os fatores determinantes para a concentração da proteína estão a concentração do seu mRNA, a frequência de sua tradução e a estabilidade da proteína propriamente dita (LODISH et al., 2000), avaliar o perfil cinético do mRNA-RVGP pode ser usado como uma ferramenta importante para procurar alguma justificativa para as diferenças observadas na expressão das células BHK-21-MAb em relação as demais células.

Desta forma, a análise da cinética do mRNA-RVGP permitiu observar que o padrão de amplificação para o mRNA-RVGP foi semelhante ao encontrado para o mRNA-NS3. Entretanto, foram identificados valores diferentes de mRNA-RVGP entre algumas células. Neste sentido, o número de cópias de mRNA-RVGP encontrado em células BHK-21-MAb foi inferior em relação as demais células, sendo este resultado muito interessante, pois explicaria a baixa expressão da proteína detectada nestas células. Ainda nestas células foi observada uma queda no RNA-RVGP em 24 horas pós-infecção, corroborando o comportamento de expressão já observado com a intensidade de fluorescência nos experimentos realizados com

SFV-GFP e justificando a menor quantidade de proteína encontrada no momento da coleta realizada em 24 horas de infecção. Estes resultados podem se dar como consequência de uma maior sensibilidade destas células ao processo de *Shut-off* gerado pela infecção com SFV (FROLOV; SCHLESINGER, 1996; TORIBIO; VENTOSO, 2010). O fato de encontrar amplificações similares do mRNA-RVGP entre células BHK-21-Hyb, BHK-21-MAb e BHK-21-DMEM pode indicar que as diferenças observadas na expressão da proteína são associadas à capacidade de tradução ou estabilidade da proteína gerada.

Entretanto, as células BHK-21-Hyb, BHK-21-MAb, BHK-21-CHO e BHK-21-DMEM parecem apresentar um metabolismo mais acelerado com uma elevada produção de mRNA-RVGP já em 3-6 horas de infecção, porém quando observamos a RVGP medida em 24 horas, podemos inferir que o mRNA possivelmente está sendo degradado, antes de ser completamente traduzido em proteína.

Também foi nosso objetivo avaliar a expressão da RVGP pelo sistema SFV em células em suspensão BHK-21-C13 estabelecidas nos meios livres de SFB (Hybridoma e Pro293a) e realizar uma comparação com as células no meio basal suplementada com 5% de SFB. Tomando como base nossas conclusões de que a VRP usada não é uma variável que afete significativamente a expressão de proteína, um experimento foi conduzido infectando as células com o mesmo SFV-RVGP-CHO (escolhido por sua boa quantificação) em frascos de cultura tipo *spinner*. A produção volumétrica de RVGP (ng/mL) obtida em células em meios livres de SFB foi inferior à obtida em células em cultivo aderente. Esta diferença não foi observada na expressão de RVGP em células crescendo em meio basal com SFB, porém estes valores são 2 vezes inferiores em relação a máxima concentração de RVGP registrada por Fernández Nuñez et al. (2015) nas mesmas células. Estas discrepâncias com os nossos resultados, parecem ser consequência do momento da análise, já que os autores deste trabalho relatam um pico de expressão com 10 horas de infecção, atingindo em 24 horas um valor aproximadamente de 300 ng/mL o qual estaria de acordo com o valor que nós obtivemos para as mesmas células. Assim, acreditamos que os valores são passíveis de otimização, melhorando as condições de infecção, como o tempo de infecção, concentração de células, tempo de coleta e ainda a temperatura de cultivo.

A expressão da RVGP também foi avaliada através da técnica de *Western Blot* tanto em células aderentes quanto em suspensão, os resultados mostraram a presença de uma marcação na altura aproximada de 65-70 kDa, tamanho esperado para o monômero deste proteína (BENMAAMAR et al., 2009; BURGER et al., 1991; TOMAR et al., 2011).

Em resumo, podemos dizer que o meio Hybridoma-SFM da Gibco deu origem a células que apresentaram cinéticas de crescimento bem similares às células em meio basal, os títulos virais foram reprodutíveis entre os diferentes lotes de VRPs de SFV e a expressão de proteína foi equivalente àquela encontrada em condições com SFB. Este meio foi capaz de suportar o crescimento tanto de células aderentes quanto em suspensão, mostrando que sua formulação é bastante completa possibilitando o crescimento de linhagens diferentes àquelas para a qual ele foi desenvolvido e ainda apresentando um baixo custo em relação aos outros meios avaliados (R$74/L). As desvantagens associadas às células adaptadas neste meio são relacionadas ao seu metabolismo, pois elas apresentam um consumo mais rápido de nutrientes em relação às demais células e como decorrência uma maior produção de lactato o que representaria uma desvantagem para cultivos de longa duração, este fato faz necessária uma manutenção de 3 repiques por semana para estas células.

O seguinte meio em relação a preço é o CHO-S-SFM II também da Gibco (R$104/L). Este meio já tem sido descrito por alguns autores como um SFM satisfatório em relação ao crescimento e a produção de proteínas recombinantes em células animais, inclusive de células BHK-21 (CRUZ et al., 1998). Neste sentido, nós também conseguimos adaptar BHK-21 aderentes e obtivemos parâmetros cinéticos equivalentes às células em meio basal com SFB. Entretanto, as células adaptadas neste meio apresentaram uma produção de vírus muito alta em relação às demais células, este evento foi verificado em todas as VRPs produzidas (SFV-GFP, SFV-NS3 e SFV-RVGP), corroborando a superioridade deste meio em relação aos outros meios avaliados e ainda em relação ao meio suplementado com SFB. A quantidade de proteína obtida nas células adaptadas neste meio também esteve de acordo com os valores obtidos em células cultivadas com SFB.

O último meio da Gibco que avaliamos foi o VP-SFM (R$147/L), meio indicado para produção de vírus em diferentes linhagens inclusive BHK-21 (suspensão). Este meio como mostrado previamente, permitiu a obtenção de duas linhagens, suplementadas ou não com 4 mM de glutamina. As células BHK-21-VP apresentaram taxas de crescimento inferiores às demais células, porém com uma menor produção de lactato em relação às células descritas anteriormente (BHK-21-Hyb e BHK-21-CHO) e uma viabilidade alta por mais tempo. A adaptação em meio VP com glutamina não gerou aumentos significativos no crescimento celular, mas sim um maior consumo de glicose com alta produção de lactato. Em relação à produção de VRPs, apesar deste meio de cultura ter sido desenvolvido para produção de vírus, obtivemos um baixo título para os SFV-RVGP e a produção de SFV-GFP foi equivalente às células crescendo em meios livres de SFB. Da mesma forma que para o crescimento celular, a

suplementação com glutamina gerou apenas um pequeno incremento nos valores. Por outro lado, tanto células BHK-21-VP como BHK-21-VP+Gln mostraram-se relativamente superiores para produção da proteína RVGP em relação às demais células, estes resultados podem estar associados a um metabolismo mais lento que pode garantir que todo o RNA-RVGP que está sendo amplificado seja traduzido e processado corretamente gerando uma maior quantidade de proteína (detectável pelo método de ELISA, isto é, na sua forma trimérica e imunogênica).

O meio de cultura MAb da BD (R$465/L), tem sido citado como um meio superior para cultivo de células de hibridoma, gerando altas produções de anticorpos, quando comparado com outros SFM. Nós, entretanto, encontramos que células adaptadas neste meio mostraram parâmetros cinéticos superiores as demais células, isto é, baixo consumo de nutrientes e alta produção de células com baixa geração de lactato. A produção de VRPs neste meio foi satisfatória, porém a produção de proteína (GFP e RVGP) foi a mais baixa encontrada em relação às demais células. Se analisarmos os resultados da cinética de GFP e de mRNA-RVGP, podemos sugerir que o pico de expressão de proteína para as células BHK-21-MAb ocorre antes das 24 horas pós-infecção, uma vez que foi identificado que depois das 12 horas de infecção, o mRNA-RVGP e a intensidade de fluorescência apresentaram uma queda significativa, fato que apenas foi observado para estas células e que deu como resultado uma quantidade de RVGP baixa no momento da análise (24 horas).

Os valores de células fluorescentes observados em células BHK-21-MAb infectadas com SFV-GFP foram equivalentes aos valores encontrados para células BHK-21-VP, sugerindo que a taxa de infecção tenha sido semelhante e as diferenças observadas na expressão entre as 2 linhagens deva ser resultado de alguma alteração na maquinaria das células cultivadas em meio MAb.

As divergências encontradas frente a trabalhos que citaram a eficiência deste meio para expressão de anticorpos, pode se dever ao tipo de célula usada e as mudanças geradas pelo processo de adaptação.

O meio MAb, da mesma forma que o meio VP-SFM e CHO-S-SFM II, mesmo sendo indicados para células em suspensão, não suportaram o crescimento da linhagem BHK-21-C13.

Por fim, o meio mais caro foi o Pro293a-CDM da Lonza (R$470/L), que mesmo sendo desenvolvido para células aderentes só permitiu a adaptação de células em suspensão, este meio do mesmo modo que o VP-SFM garantiu o crescimento das células sem adição de glutamina. Desta forma, as células BHK-21-C13-Pro também apresentaram taxas de

crescimento inferiores em relação às demais células em suspensão, porém a produção de proteína foi equivalente à encontrada em células BHK-21-C13-Hyb, corroborando o comportamento observado nas células BHK-21-VP. A partir destes resultados podemos inferir que os fatores que promovem o crescimento celular não necessariamente garantem uma alta produção de proteína e que cada célula, cada proteína e cada meio devem ser analisadas para determinar a combinação mais adequada para atingir os resultados esperados.

Em conclusão, os três meios da Gibco (Hybridoma-SFM, CHO-S-SFM II e VP-SFM) mostraram ser mais baratos e apresentaram resultados satisfatórios em relação a todas as variáveis avaliadas (crescimento celular, produção de VRPs e expressão de proteína), sendo o CHO-S-SFM II recomendável para a produção de VRPs e o VP-SFM para a etapa de expressão de proteína. Cabe ressaltar ainda que as VRPs produzidas em células cultivadas em SFM poderiam ser usadas diretamente para imunização, pois garantem uma amplificação e expressão da proteína eficiente dentro da célula hospedeira.

7 CONCLUSÕES

Este trabalho possibilitou a adaptação das linhagens BHK-21 aderentes e BHK-21 C13 em suspensão ao cultivo em meios livres de SFB, onde as conclusões obtidas estão listadas a seguir:

1. Os dados da cinética e estado metabólico de células BHK-21 adaptadas em diferentes SFM, mostraram que conseguimos células completamente adaptadas que mantiveram uma reprodutibilidade ao longo de muitas passagens. Estas cinéticas mostraram que o único meio no qual as células apresentaram baixos crescimentos em relação às células crescendo na presença de SFB foi o VP-SFM (suplementado ou não com glutamina), sendo que os outros meios de cultura não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) quanto ao μmáx e Td frente às células em meios basal com suplementação de SFB.
2. Os resultados obtidos a partir da adaptação de células BHK-21-C13 mostraram que o meio de cultivo Hybridoma possui uma formulação compatível para o crescimento destas células, apresentando variáveis de eficiência no crescimento e aproveitamento de nutrientes semelhantes às encontradas em células crescendo na presença de SFB.
3. Células estabelecidas em SFMs se mostraram promissoras na geração de VRPs de SFV e poderiam ser usadas como plataforma de estudo para produção de outros vírus ou vetores virais.
4. Células adaptadas no meio de cultura CHO-S-SFM II mostraram ser superiores para geração de diferentes VRPs de SFV.
5. Células estabelecidas em SFM se mostraram eficientes na expressão de diferentes proteínas recombinantes, confirmando a viabilidade de estabelecer uma plataforma de expressão livre de SFB.
6. Células BHK-21 e BHK-21-C13 adaptadas em meios glutamina-free mostraram baixas taxas de crescimento, porém, altas viabilidades foram observadas, rápida recuperação após descongelamento, e ainda um melhor aproveitamento do mRNA para ser traduzido em proteína.

Assim, este trabalho demonstrou a necessidade de padronizações na utilização de sistemas de expressão gênica baseado em vírus recombinantes em células de mamíferos cultivadas em SFM, com muitas possibilidades de otimização de produtividade e custos.

REFERÊNCIAS*

AJBANI, S. P. et al. Immunogenicity of Semliki Forest virus based self-amplifying RNA expressing Indian HIV-1C genes in mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 794–802, 2015.

ANDERSON, N. L. et al. The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources. **Molecular & Cellular Proteomics: MCP**, v. 3, n. 4, p. 311–326, 2004.

ANDERSON, N. L.; ANDERSON, N. G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. **Molecular & Cellular Proteomics: MCP**, v. 1, n. 11, p. 845–867, 2002.

ASTRAY, R. M. et al. Analytical approach for the extraction of recombinant membrane viral glycoprotein from stably transfected Drosophila melanogaster cells. **Biotechnology Journal**, v. 3, n. 1, p. 98–103, 2008.

ASTRAY, R. M. et al. Rabies virus glycoprotein and immune response pattern using recombinant protein or recombinant RNA viral vectors. **Vaccine**, v. 32, n. 24, p. 2829–2832, 2014.

BACON, B. R. et al. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 13, p. 1207–1217, 2011.

BALDI, L. et al. Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 5, p. 677–684, 2007.

BARNES, D.; SATO, G. Growth of a human mammary tumour cell line in a serum-free medium. **Nature**, v. 281, n. 5730, p. 388–389, 1979.

BARNES, D.; SATO, G. Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. **Analytical Biochemistry**, v. 102, n. 2, p. 255–270, 1980.

BARTELING, S. J. Certain aspects of foot--and--mouth disease. Virus production in growing BHK suspended cell cultures. **Developments in Biological Standardization**, v. 35, p. 55–60, 1976.

BARTENSCHLAGER, R.; LOHMANN, V.; PENIN, F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 482–496, 2013.

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. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 43, p. 41624–41630, 2003.

BATTISTA, P. J. et al. Chinese Hamster Ovary (CHO) cell growth and recombinant protein production in serum-free media. In: KAMINOGAWA, S.; AMETANI, A.; HACHIMURA, S. (Ed.). **Animal cell technology:** basic & applied aspects. Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects. [s.l.] Springer Netherlands, 1993. p. 251–257.

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

---

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

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

BEGUM, S. et al. Characterization and engraftment of long-term serum-free human fetal liver cell cultures. **Cytotherapy**, v. 12, n. 2, p. 201–211, 2010.

BERAN, R. K. F.; PYLE, A. M. Hepatitis C viral NS3-4A protease activity is enhanced by the NS3 helicase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 44, p. 29929–29937, 2008.

BERGLUND, P. et al. Semliki Forest virus expression system: production of conditionally infectious recombinant particles. **Biotechnology (Nature Publishing Company)**, v. 11, n. 8, p. 916–920, 1993.

BERGOLD, G. H.; MAZZALI, R. Plaque formation by arboviruses. **Journal of General Virology**, v. 2, n. 2, p. 273–284, 1968.

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, 2013.

BIAGGIO, R. T. **Adaptação de linhagens celulares humanas para crescimento em suspensão e meios de cultura livres de soro fetal bovino**. 2014. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

BIRCH, J. R.; RACHER, A. J. Antibody production. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 5-6, p. 671–685, 2006.

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, 1979.

BLASEY, H. D. et al. Recombinant protein production using the Semliki Forest Virus expression system. **Cytotechnology**, v. 24, n. 1, p. 65–72, 1997.

BLASEY, H. D. et al. Large scale transient 5-HT3 receptor production with the Semliki Forest Virus Expression System. **Cytotechnology**, v. 32, n. 3, p. 199–208, 2000.

BORT, J. A. H.; STERN, B.; BORTH, N. CHO-K1 host cells adapted to growth in glutamine-free medium by FACS-assisted evolution. **Biotechnology Journal**, v. 5, n. 10, p. 1090–1097, out. 2010.

BOROJEVIC, R. **Biotecnologia na área de saúde humana e animal, bioengenharia e biomimética**. 2009. Ministério de Ciência e Tecnologia-MCT. Disponível em: <www.anbio.org.br/pdf/2met_tendencias_futuras_saude.pdf>. Acesso em: 10 out. 2014.

BRANDS, R. et al. Influvac: a safe Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cell culture-based influenza vaccine. **Developments in Biological Standardization**, v. 98, p. 93–100, 1999.

BRINSTER, C. et al. Hepatitis C virus non-structural protein 3-specific cellular immune responses following single or combined immunization with DNA or recombinant Semliki Forest virus particles. **The Journal of General Virology**, v. 83, n. 2, p. 369–381, 2002.

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

BURGER, S. R. et al. Stable expression of rabies virus glycoprotein in Chinese hamster ovary cells. **The Journal of General Virology**, v. 72 , p. 359–367, 1991.

BURGENER, A.; BUTLER, M. Medium development. In: OZTURK, S. S.; HU, W. (Ed.). **Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies**. New York: Taylor e Francis, 2006. cap. 3, p. 41-73.

BUTT, A. A. Hepatitis C virus infection: the new global epidemic. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 3, n. 2, p. 241–249, 2005.

CAPSTICK, P. B. et al. Production of foot-and-mouth disease virus antigen from BHK 21 clone 13 cells grown and infected in deep suspension cultures. **Nature**, v. 205, n. 976, p. 1135–1136, 1965.

CASALES, E. et al. Development of a new noncytopathic Semliki Forest virus vector providing high expression levels and stability. **Virology**, v. 376, n. 1, p. 242–251, 2008.

CASTRO, M. **Expressão e purificação de uma proteína multiepítopo recombinante desenhada a partir de proteínas do vírus da hepatite C.** 2007. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) - Ciências Ambientais e Saúde, Universidade Católica de Goiás, Goias, 2007.

CASTRO, R. et al. Production of canine adenovirus type 2 in serum-free suspension cultures of MDCK cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 17, p. 7059–7068, 2015.

CHAMBERS, T. J. et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 649–688, 1990.

CHASE, L. G. et al. A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 1, n. 1, p. 8, 2010.

CHEN, F. et al. Insight into the roles of hypoxanthine and thymidine [corrected] on cultivating antibody-producing CHO cells: cell growth, antibody production and long-term stability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 169–178, 2012.

CHEVALIEZ, S.; PAWLOTSKY, J.-M. HCV Genome and life cycle. In: TAN, S.-L. (Ed.). **Hepatitis C viruses:** genomes and molecular biology. Norfolk, UK: Horizon Bioscience, 2006.

CHIARINI, E.; PENNA, T. C. V. Extraction, purification and physical-chemical characterization of recombinant green fluorescent protein (GFPuv) expressed in Escherichia coli cells. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 4, p. 457–466, 2003.

CINATL, J. et al. Protein-free culture of Vero cells: a substrate for replication of human pathogenic viruses. **Cell Biology International**, v. 17, n. 9, p. 885–895, 1993.

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, 2005.

COPPE-UFRJ. CASTILHO, L. R. et al. **Formulações de meios de cultivo isentos de soro animal quimicamente definidos e de meios de cultivo isentos de proteínas e de componentes de origem animal**. Pedido de Patente ao INPI: Privilégio e Inovação nº PI 06016553. 24 ab 2004, 18 dez. 2007.

COSTA, W. A. et al. P**rofilaxia da raiva humana**. Manual Técnico do Instituto Pasteur Número 4. 2. ed. São Paulo: Instituto Pasteur, 2000.

COSTA, A. R. et al. The impact of cell adaptation to serum-free conditions on the glycosylation profile of a monoclonal antibody produced by Chinese hamster ovary cells. **New Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 563–572, 2013.

CULP, L. A.; MURRAY, B. A.; ROLLINS, B. J. Fibronectin and proteoglycans as determinants of cell-substratum adhesion. **Journal of Supramolecular Structure**, v. 11, n. 3, p. 401–427, 1979.

CRUZ, H. J. et al. Adaptation of BHK cells producing a recombinant protein to serum-free media and protein-free medium. **Cytotechnology**, v. 26, n. 1, p. 59–64, 1998.

CRUZ, H. J. et al. Metabolic responses to different glucose and glutamine levels in baby hamster kidney cell culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 5, p. 579–585, 1999.

DABHOLE, M. P. Recent innovations in therapeutic recombinant protein. **Pharma Bio World**, p. 10-78, 2014.

DEBRÉ, R.; CELLERS, J. Clinical virology. The evaluation and management of human viral infections. **Annals of Internal Medicine**, v. 74, n. 3, p. 461–461, 1971.

DE CALDAS, E. P. **Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde/ Vigilância epidemiológica**. Situação da Raiva no Brasil. Em: VIII Seminário do Dia Mundial contra a Raiva Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/institutopasteur/pdf/wrd2015/situacaodaraivanobrasil-eduardopachecodecaldas.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2015.

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

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

DO AMARAL, R. L. F. et al. Approaches for recombinant human factor IX production in serum-free suspension cultures. **Biotechnology Letters**, 2015.

DOYLE, A.; GRIFFITHS, J. B. **Cell and tissue culture:** laboratory procedures in biotechnology. Canadá: John Wiley & Sons, 1998.

EIFLER, N. et al. Functional expression of mammalian receptors and membrane channels in different cells. **Journal of Structural Biology**, v. 159, n. 2, p. 179–193, 2007.

EL-ANEED, A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 94, n. 1, p. 1–14, 2004.

ERTL, H. C. J. Novel vaccines to human rabies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 9, p. e515, 2009.

ESAC. **ESAC statement on the use of FCS and other animal-derived supplements**. 2008. Disponível em: <http://ecvam.jrc.it/publication/ESAC28_statement_FCS_20080508.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2014.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). **Sciences Medicines Health.** 2010. Disponível em :<http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/veterinary/002003/WC500104120.pdf>. Acesso em: 06 jul. 2015.

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, 2012.

FERNÁNDEZ-NÚÑEZ, E. G. et al. Transient expression of rabies virus G-glycoprotein using BHK-21 cells cultured in suspension. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 6, p. 1153–1163, 2015.

FINNIS, C. J. et al. High-level production of animal-free recombinant transferrin from saccharomyces cerevisiae. **Microbial Cell Factories**, v. 9, p. 87, 2010.

FOLLMANN, E. et al. Preliminary evaluation of Raboral V-RG® oral rabies vaccine in arctic foxes (*Vulpes lagopus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 47, n. 4, p. 1032–1035, 2011.

FONTANA, D. et al. Immunogenic virus-like particles continuously expressed in mammalian cells as a veterinary rabies vaccine candidate. **Vaccine**, v. 33, n. 35, p. 4238–4246, 2015.

FOOKS, A. R. et al. Current status of rabies and prospects for elimination. **The Lancet**, v. 384, n. 9951, p. 1389–1399, 2014.

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

FRESHNEY, R. I; FRESHNEY, R. I. Serum-free media. In: FRESHNEY, R. I. (Ed). **Culture of animal cells**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2005.

FROLOV, I.; SCHLESINGER, S. Translation of Sindbis virus mRNA: analysis of sequences downstream of the initiating AUG codon that enhance translation. **Journal of Virology**, v. 70, n. 2, p. 1182–1190, 1996.

FROUD, S. J. The development, benefits and disadvantages of serum-free media. **Developments in Biological Standardization**, v. 99, p. 157–166, 1999.

GALLEGOS GALLEGOS, R. M. et al. Rabies veterinary virus vaccine produced in BHK-21 cells grown on microcarriers in a bioreactor. **Archives of Medical Research**, v. 26, n. 1, p. 59–63, 1995.

GAUDIN, Y. et al. Reversible conformational changes and fusion activity of rabies virus glycoprotein. **Journal of Virology**, v. 65, n. 9, p. 4853–4859, 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, 1999.

GEALL, A. J.; MANDL, C. W.; ULMER, J. B. RNA: the new revolution in nucleic acid vaccines. **Seminars in Immunology**, v. 25, n. 2, p. 152–159, 2013.

GENZEL, Y.; FISCHER, M.; REICHL, U. Serum-free influenza virus production avoiding washing steps and medium exchange in large-scale microcarrier culture. **Vaccine**, v. 24, n. 16, p. 3261–3272, 2006.

GHANY, M. G. et al. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis c virus infection: 2011 practice guideline by the american association for the study of liver diseases. **Hepatology**, v. 54, n. 4, p. 1433–1444, 2011.

GLASSY, M. C.; THARAKAN, J. P.; CHAU, P. C. Serum-free media in hybridoma culture and monoclonal antibody production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, n. 8, p. 1015–1028, 1988.

GRAKOUI, A. et al. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 22, p. 10583–10587, 1993.

GRAVITZ, L. Introduction: a smouldering public-health crisis. **Nature**, v. 474, n. 7350, p. 2–4, 2011.

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

GSTRAUNTHALER, G.; LINDL, T.; VAN DER VALK, J. A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. **Cytotechnology**, v. 65, n. 5, p. 791–793, 2013.

GUPTA, K. et al. Ensuring quality of in vitro alternative test methods: issues and answers. **Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP**, v. 43, n. 3, p. 219–224, 2005.

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, 2002.

HASAN, U. A. et al. Nucleic acid immunization: concepts and techniques associated with third generation vaccines. **Journal of Immunological Methods**, v. 229, n. 1-2, p. 1–22, 1999.

HENAO, L. F.; CORTÉS, F.; NAVAS, M. C. Semliki Forest Virus: a viral vector with multiple applications. **Colombia Médica**, v. 38, n. 2, p. 159–169, 2007.

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.

HITCHMAN, R. B. et al. Quantitative real-time PCR for rapid and accurate titration of recombinant baculovirus particles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 4, p. 810–814, 2007.

HOFFMANN, B. et al. A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organization for Animal Health. **Veterinary Microbiology**, v. 139, n. 1-2, p. 1–23, 2009.

HOMMA, A. et al. Vaccine research, development, and innovation in Brazil: a translational science perspective. **Vaccine**, v. 31, p. B54–60, 2013. Suppl 2.

HONEGGER, J. R.; ZHOU, Y.; WALKER, C. M. Will there be a vaccine to prevent HCV infection? **Seminars in Liver Disease**, v. 34, n. 1, p. 79–88, 2014.

HUANG, D. et al. Serum-free suspension culture of MDCK cells for production of influenza H1N1 vaccines. **PloS One**, v. 10, n. 11, p. 1-11, 2015.

IP, P. P. et al. Alphavirus-based vaccines encoding nonstructural proteins of hepatitis C virus induce robust and protective T-cell responses. **Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 22, n. 4, p. 881–890, 2014.

JÄGER, V. et al. High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. **BMC biotechnology**, v. 13, p. 52, 2013.

JAYME, D. W.; BLACKMAN, K. E. Culture media for propagation of mammalian cells, viruses, and other biologicals. **Advances in Biotechnological Processes**, v. 5, p. 1–30, 1985.

JEFFS, S. A. et al. Comparative analysis of HIV-1 recombinant envelope glycoproteins from different culture systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 2, p. 279–290, 2006.

JOHNSON, T. Promises and pitfalls of cell line adaptation-some basic protocols. **BioProcess International**, p. 52-56, 2006.

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. **Journal of Biotechnology**, v. 95, n. 3, p. 195–204, 2002.

KEENAN, J.; PEARSON, D.; CLYNES, M. The role of recombinant proteins in the development of serum-free media. **Cytotechnology**, v. 50, n. 1-3, p. 49–56, 2006.

KIM, J. Y.; KIM, Y.-G.; LEE, G. M. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 917–930, 2012.

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. 1326 p.

KLUGE, S. et al. Proteome analysis of virus-host cell interaction: rabies virus replication in Vero cells in two different media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 12, p. 5493–5506, 2013.

KOLYKHALOV, A. A. et al. Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. **Journal of Virology**, v. 74, n. 4, p. 2046–2051, 2000.

KORAKA, P. et al. A recombinant rabies vaccine expressing the trimeric form of the glycoprotein confers enhanced immunogenicity and protection in outbred mice. **Vaccine**, v. 32, n. 36, p. 4644–4650, 2014.

KUJALA, P. et al. Biogenesis of the Semliki Forest virus RNA replication complex. **Journal of Virology**, v. 75, n. 8, p. 3873–3884, 2001.

KUMAR, N. et al. Differential protein expression following low temperature culture of suspension CHO-K1 cells. **BMC Biotechnology**, v. 8, p. 42, 2008.

LEMOS, M. A. N. **Estudo de expressão gênica da proteína não estrutural 3 do vírus da Hepatite C empregando pseudopartículas virais**. 2014. 85 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

LIANG, T. J.; GHANY, M. G. Current and future therapies for hepatitis c virus infection. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 20, p. 1907–1917, 2013.

LILJESTRÖM, P. et al. In vitro mutagenesis of a full-length cDNA clone of Semliki Forest virus: the small 6,000-molecular-weight membrane protein modulates virus release. **Journal of Virology**, v. 65, n. 8, p. 4107–4113, 1991.

LILJESTRÖM, P.; GAROFF, H. A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. **Bio/technology (Nature Publishing Company)**, v. 9, n. 12, p. 1356–1361, 1991.

LILJESTRÖM, P.; GAROFF, H. Expression of proteins using Semliki Forest virus vectors. **Current Protocols in Molecular Biology / Edited by Frederick M. Ausubel.** Chapter 16, p. Unit16.20, 2001.

LJUNGBERG, K.; LILJESTRÖM, P. Self-replicating alphavirus RNA vaccines. **Expert Review of Vaccines**, v. 14, n. 2, p. 177–194, 2015.

LIN, C. et al. Hepatitis C virus NS3 serine proteinase: trans-cleavage requirements and processing kinetics. **Journal of Virology**, v. 68, n. 12, p. 8147–8157, 1994.

LIN, C. HCV NS3-4A serine protease. In: TAN, S.-L. (Ed.). **Hepatitis C Viruses:** Genomes and Molecular Biology. Norfolk (UK): Horizon Bioscience, 2006.

LIN, C.-Y. et al. Enhancing protein expression in HEK-293 cells by lowering culture temperature. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0123562, 2015.

LINK, T. et al. 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, n. 1, p. 51–62,2004.

LODISH, H. et al. **Molecular cell biology**. 4th. ed. [s.l.] W. H. Freeman, 2000.

LOPEZ, S. et al. Nucleocapsid-glycoprotein interactions required for assembly of alphaviruses. **Journal of virology**, v. 68, n. 3, p. 1316–1323, 1994.

LUNDSTROM, K. et al. Novel Semliki Forest virus vectors with reduced cytotoxicity and temperature sensitivity for long-term enhancement of transgene expression. **Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 7, n. 2, p. 202–209, 2003.

LUNDSTROM, K. Semliki Forest virus vectors for rapid and high-level expression of integral membrane proteins. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1610, n. 1, p. 90–96, 2003.

LUNDSTROM, K. Biology and application of alphaviruses in gene therapy. **Gene Therapy**, v. 12, p. 92-97, 2005.

LUNDSTROM, K. Structural genomics and drug discovery. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 11, n. 2, p. 224–238, 2007.

LUNDSTROM, K. Alphaviruses in Gene Therapy. **Viruses**, v. 1, n. 1, p. 13–25, 2009.

LUNDSTROM, K. Alphavirus vectors in vaccine development. **Journal of Vaccines & Vaccination**, v. 03, n. 03, 2012a.

LUNDSTROM, K. Generation of recombinant alphaviral vectors. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2012, n. 7, p. pdb.prot070151, 2012b.

LUNDSTROM, K. Alphavirus-based vaccines. **Viruses**, v. 6, n. 6, p. 2392–2415, 2014.

LU, Y. E.; KIELIAN, M. Semliki forest virus budding: assay, mechanisms, and cholesterol requirement. **Journal of Virology**, v. 74, n. 17, p. 7708–7719, 2000.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 6, p. 1292–1305, 2002.

MARTINS, T.; NARCISO-SCHIAVON, J. L.; SCHIAVON, L. DE L. Epidemiology of hepatitis C virus infection. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 1, p. 107–112, 2011.

MAWATARI, S. et al. Hepatitis C virus NS3/4A protease inhibits complement activation by cleaving complement component 4. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1-7, 2013.

MCHUTCHISON, J. G.; PATEL, K. Future therapy of hepatitis C. **Hepatology**, v. 36, n. 5, p. 245–252, 2002.

MEHTA, B. et al. Hepatitis C: is a vaccine the solution? **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 10, n. 2, p. 417–419, 2014.

MELLO, I. et al. Conservation of hepatitis C virus nonstructural protein 3 amino acid sequence in viral isolates during liver transplantation. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 16, n. 10, p. 732–737, 2009.

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**, v. 26, n. 12, p. 1305–1317, 1993.

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.

MERTEN, O. W. et al. The new medium MDSS2N, free of any animal protein supports cell growth and production of various viruses. **Cytotechnology**, v. 30, n. 1-3, p. 191–201, 1999.

MEYER, H. P. et al. An emerging start for therapeutic and catalytic protein production. **BioProcess International Magazine**, p.10-21, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Brasil registra caso inédito de cura da raiva**. 2009. Disponível em: <http://www.fomezero.gov.br/>. Acesso em: 21 abr. 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL**. Secretaria de Vigilância em Saúde/ Vigilância epidemiológica**. Raiva. Casos da doenca no Brasil, 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/casos_conf_raiva.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2013.

MINISTÉRIO DE SAÚDE. Simeprevir, sofosbuvir e daclatasvir no tratamento da hepatite crônica tipo C e coinfecções. Relatório Técnico – Conitec. 2015

MOGLER, M. A.; KAMRUD, K. I. RNA-based viral vectors. **Expert Review of Vaccines**, v. 14, n. 2, p. 283–312, 2015.

MOREIRA, J. L. et al. Serum-free and serum-containing media for growth of suspended BHK aggregates in stirred vessels. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 5, p. 437–444, 1995.

MORIISHI, K.; MATSUURA, Y. Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection. **Virology**, v. 3, p. 54, 2012.

MOWAT, G. N.; CHAPMAN, W. G. Growth of foot-and-mouth disease virus in a fibroblastic cell line derived from hamster kidneys. **Nature**, v. 194, p. 253–255, 1962.

MUNIR, S. et al. Hepatitis C treatment: current and future perspectives. **Virology Journal**, v. 7, p. 296, 2010.

MURAKAMI, H. et al. Growth of hybridoma cells in serum-free medium: ethanolamine is an essential component. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 4, p. 1158–1162, 1982.

NÄSLUND, T. I. et al. Comparative prime-boost vaccinations using Semliki Forest virus, adenovirus, and ALVAC vectors demonstrate differences in the generation of a protective central memory CTL response against the P815 tumor. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 11, p. 6761–6769, 2007.

OIKONOMOPOULOS, A. et al. Optimization of human mesenchymal stem cell manufacturing: the effects of animal/xeno-free media. **Scientific Reports**, v. 5, p. 16570, 2015.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.

PAWLOTSKY, J.M. From non-A, non-B hepatitis to hepatitis C virus cure**. Journal of Hepatology**, v. 62, p. 87-99, 2015.

PARAMPALLI, A. et al. Development of serum-free media in CHO-DG44 cells using a central composite statistical design. **Cytotechnology**, v. 54, n. 1, p. 57–68, 2007.

PERES-DA-SILVA, A.; ALMEIDA, A. J. DE; LAMPE, E. Genetic diversity of NS3 protease from Brazilian HCV isolates and possible implications for therapy with direct-acting antiviral drugs. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 2, p. 254–261, 2012.

PÉREZ, O.; PAOLAZZI, C. C. Production methods for rabies vaccine. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 340–347, 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, 1995.

PESCHEL, B. et al. Comparison of influenza virus yields and apoptosis-induction in an adherent and a suspension MDCK cell line. **Vaccine**, v. 31, n. 48, p. 5693–5699, 2013.

PETIOT, E. et al. Metabolic and kinetic analyses of influenza production in perfusion HEK293 cell culture. **BMC biotechnology**, v. 11, p. 84, 2011.

PIPE, S. W. Recombinant clotting factors. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 99, n. 5, p. 840–850, 2008.

PLAUTZ, J. D. et al. Green fluorescent protein and its derivatives as versatile markers for gene expression in living Drosophila melanogaster, plant and mammalian cells. **Gene**, v. 173, n. 1 Spec No, p. 83–87, 1996.

PLOSS, A.; EVANS, M. J. Hepatitis C virus host cell entry. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 1, p. 14–19, 2012.

PSYCHOGIOS, N. et al. The human serum metabolome. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e16957, 2011.

PUGLIA, A. L. P. et al. Quantitative RT-PCR for titration of replication-defective recombinant Semliki Forest virus. **Journal of Virological Methods**, v. 193, n. 2, p. 647–652, 2013.

RADER, R. A. Biopharmaceuticals product approvals and trends in 2012. **BioProcess International**, v. 11, n. 3, p.18-27, 2013.

RAJENDRA, Y. et al. Influence of glutamine on transient and stable recombinant protein production in CHO and HEK-293 cells. **BMC Proceedings**, v. 5, n. 8, p. 35, 2011.

RAMYA, R. et al. Expression and solubilization of insect cell-based rabies virus glycoprotein and assessment of its immunogenicity and protective efficacy in mice. **Clinical and vaccine immunology: CVI**, v. 18, n. 10, p. 1673–1679, 2011.

REGENMORTEL, M. H. V. VAN et al. **Virus Taxonomy**: Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. San Diego; San Francisco; New York etc.: Academic Press, 2000.

RHÊME, C.; EHRENGRUBER, M. U.; GRANDGIRARD, D. Alphaviral cytotoxicity and its implication in vector development. **Experimental Physiology**, v. 90, n. 1, p. 45–52, 2005.

RIEZEBOS-BRILMAN, A. et al. Recombinant alphaviruses as vectors for anti-tumour and anti-microbial immunotherapy. **Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 35, n. 3, p. 233–243, 2006.

RODRIGUES, M. E. et al. Comparison of commercial serum-free media for CHO-K1 cell growth and monoclonal antibody production. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 437, n. 1-2, p. 303–305, 2012.

ROMANO, K. P. et al. The molecular basis of drug resistance against hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitors. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 7, p. 1-15, 2012.

ROSA, F. DA et al. Prevalence of anti-HCV in an inmate population. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 5, p. 557–560, 2012.

SAHIN, U.; KARIKÓ, K.; TÜRECI, Ö. mRNA-based therapeutics — developing a new class of drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 10, p. 759–780, 2014.

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, 1998.

SALAM, K. A.; AKIMITSU, N. Hepatitis C virus NS3 inhibitors: current and future perspectives. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

SAXENA, S. et al. Induction of immune responses and protection in mice against rabies using a self-replicating RNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 1-2, p. 36–44, 2009.

SCHLESINGER, M. J. The replication of togaviridae and flaviviridae at the molecular level. In: BERCOFF, R. P. (Ed.). . **The Molecular Basis of Viral Replication**. NATO ASI Series. [s.l.] Springer US, 1987. p. 217–237.

SCHLAEGER, E.-J.; LUNDSTROM, K. Effect of temperature on recombinant protein expression in Semliki Forest virus infected mammalian cell lines growing in serum- free suspension cultures. **Cytotechnology**, v. 28, n. 1-3, p. 205–211, 1998.

SCHATZMAYR, H. G. Emerging and reemerging viral diseases. **Caderno Saúde Pública**, v. 17, p. 209-13, 2001.

SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 491–500, 2010.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS). **Mapas da Raiva no Brasil.** 2013. Disponível em: <www.saude.gov.br/svs>. Acesso em: 12 jun. 2014.

SERRATO, J. A. et al. Differences in the glycosylation profile of a monoclonal antibody produced by hybridomas cultured in serum-supplemented, serum-free or chemically defined media. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 47, pt. 2, p. 113–124, 2007.

SHUKLA, D. D.; HOYNE, P. A.; WARD, C. W. Evaluation of complete genome sequences and sequences of individual gene products for the classification of hepatitis C viruses. **Archives of Virology**, v. 140, n. 10, p. 1747–61, 1995.

SILLANPÄÄ, M. et al. Hepatitis C virus core, NS3, NS4B and NS5A are the major immunogenic proteins in humoral immunity in chronic HCV infection. **Virology Journal**, v. 6, p. 84, 2009.

SIMMONDS, P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 11, p. 3173–3188, 2004.

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, 2000.

SKOGING, U. et al. Aromatic interactions define the binding of the alphavirus spike to its nucleocapsid. **Structure**, v. 4, n. 5, p. 519–529, 1996.

SLOMKA, M. J. et al. Real time reverse transcription (RRT)-polymerase chain reaction (PCR) methods for detection of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus and European swine influenza A virus infections in pigs. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v. 4, n. 5, p. 277–293, 2010.

SMERDOU, C.; LILJESTRÖM, P. Two-helper RNA system for production of recombinant Semliki forest virus particles. **Journal of Virology**, v. 73, n. 2, p. 1092–1098, 1999.

SOBOLESKI, M. R.; OAKS, J.; HALFORD, W. P. Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 19, n. 3, p. 440–442, 2005.

SOUZA, A. P. D. et al. Recombinant viruses as vaccines against viral diseases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Researchv**, v. 38, n. 4, p. 509–522, 2005.

STEINKÜHLER, C. et al. Activity of purified hepatitis C virus protease NS3 on peptide substrates. **Journal of Virology**, v. 70, n. 10, p. 6694–6700, 1996.

SUOMALAINEN, M.; LILJESTRÖM, P.; GAROFF, H. Spike protein-nucleocapsid interactions drive the budding of alphaviruses. **Journal of virology**, v. 66, n. 8, p. 4737–4747, 1992.

TAKEI, S. et al. Oral administration of genetically modified Bifidobacterium displaying HCV-NS3 multi-epitope fusion protein could induce an HCV-NS3-specific systemic immune response in mice. **Vaccine**, v. 32, n. 25, p. 3066–3074, 2014.

TASCHWER, M. et al. Growth, productivity and protein glycosylation in a CHO EpoFc producer cell line adapted to glutamine-free growth. **Journal of Biotechnology**, v. 157, n. 2, p. 295–303, 2012.

TOMAR, N. R. et al. Expression of rabies virus glycoprotein gene into eukaryotic system and determination of potential T-cell epitopes. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 49, n. 8, p. 594–599, 2011.

TOMEI, L. et al. NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein. **Journal of Virology**, v. 67, n. 7, p. 4017–4026, 1993.

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, 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, 1988.

TORIBIO, R.; VENTOSO, I. Inhibition of host translation by virus infection in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 21, p. 9837–9842, 25 2010.

TWYMAN, R. M. Gene transfer using viral vectors. In:____ **Gene transfer to animal cells**. New York: Garland BIOS Scientific Publishers, 2005. cap. 4, p. 70-119.

ULMER, J. B. et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. **Science (New York, N.Y.)**, v. 259, n. 5102, p. 1745–1749, 1993.

VALLET, S. et al. Genetic heterogeneity of the NS3 protease gene in hepatitis C virus genotype 1 from untreated infected patients. **Journal of Medical Virology**, v. 75, n. 4, p. 528–537, 2005.

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, 2010.

VANDER VEEN, R. L.; HARRIS, D. L. H.; KAMRUD, K. I. Alphavirus replicon vaccines. **Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2012.

VOSS, J. **Boletim do Instituto de Tecnologia do Paraná – Tecpar**, ano 9, n. 210, feb. 2008.

WAHLBERG, J. M. et al. Membrane fusion of Semliki Forest virus involves homotrimers of the fusion protein. **Journal of Virology**, v. 66, n. 12, p. 7309–7318, 1992.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2006. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 769–776, 2006.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 9, p. 917–924, 2010.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2014. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 10, p. 992–1000, 2014.

WARD, W. W. Biochemical and Physical Properties of Green Fluorescent Protein. In: CHALFIE, RTIN; KAIN, S. R. (Ed.). **Green Fluorescent Protein**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2005. cap. 3, p. 39–65.

WARD, T. H.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. The uses of green fluorescent protein in mammalian cells. **Methods of Biochemical Analysis**, v. 47, p. 305–337, 2006.

WELBOURN, S.; PAUSE, A. HCV NS2/3 protease. In: TAN, S.-L. **Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology**. Norfolk (UK): Horizon Bioscience, 2006.

WENDT, A. et al. Chronic hepatitis C: future treatment. **Clinical Pharmacology: Advances and Applications**, v. 6, p. 1–17, 2014.

WIKTOR, T. J. et al. Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 22, p. 7194–7198, 1984.

WILLOUGHBY, R. E. et al. Survival after treatment of rabies with induction of coma. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 24, p. 2508–2514, 2005.

WOJCZYK, B. S. et al. The role of site-specific N-glycosylation in secretion of soluble forms of rabies virus glycoprotein. **Glycobiology**, v. 8, n. 2, p. 121–130, 1998.

WOLFF, J. A. et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. **Science**, v. 247, n. 4949 Pt 1, p. 1465–1468, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Rabies**, 2010. Disponível em: <www.who.int/rabies>, acessado em 26 de Março de 2014.

YANG, J. et al. The specificity of rabies virus RNA encapsidation by nucleoprotein. **Virology**, v. 242, n. 1, p. 107–117, 1998.

YOKOMIZO, A. Y. et al. Rabies virus glycoprotein expression in Drosophila S2 cells. I. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line. **Biotechnology Journal**, v. 2, n. 1, p. 102–109, 2007.

YU, W. et al. A novel challenge model to evaluate the efficacy of hepatitis C virus vaccines in mice. **Vaccine**, v. 32, n. 27, p. 3409–3416, 2014.

ZHAO, H.; GAROFF, H. Role of cell surface spikes in alphavirus budding. **Journal of virology**, v. 66, n. 12, p. 7089–7095, 1992.

ZHANG, J. Mammalian cell culture for biopharmaceutical production. In: BALTZ, R. et al. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 3 ed. Washington: ASM Press, 2010, p. 157–78.

ZEMINIAN, L. B. et al. Variability and resistance mutations in the hepatitis C virus NS3 protease in patients not treated with protease inhibitors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 13–17, 2013.

ZEUZEM, S. et al. Telaprevir for retreatment of HCV infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 25, p. 2417–2428, 2011.

ZIMMER, G. RNA replicons - a new approach for influenza virus immunoprophylaxis. **Viruses**, v. 2, n. 2, p. 413–434, 2010.

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