ANA LIA PRADELLA PUGLIA

Expressão de proteínas estruturais de *Alphavirus* em células S2 (*D. melanogaster*)

São Paulo

2018

ANA LIA PRADELLA PUGLIA

Expressão de proteínas estruturais de *Alphavirus* em células S2 (*D melanogaster*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológica para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Dr. Renato Mancini Astray – orientador

Versão Original

São Paulo

2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Pradella Puglia, Ana Lia
Expressão de proteínas estruturais de Alphavirus em células S2 (D melanogaster) / Ana Lia Pradella Puglia; orientador Renato Mancini Astray. -- São Paulo, 2018.
103 p.

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

1. Alphavirus. 2. Mayaro. 3. Chikungunya. 4. células S2. 5. VLP. I. Mancini Astray, Renato , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidata: **Ana Lia Pradella Puglia**

Título da Tese: **Expressão de proteínas estruturais de *Alphavirus* em células S2 (*D. melanogaster*)**

Orientador: **Prof. Dr. Renato Mancini Astray**

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:_____

butantan

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Expressão de proteínas estruturais de Alphavirus em células S2 (D melanogaster)", protocolada sob o CEUA nº 7183020317, sob a responsabilidade de **Renato Mancini Astray** *e equipe; Ana Lia Pradella Puglia; Ver Lucia Lopes Boldorini; Mayra Rocca Pereira* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 19/04/2017.

We certify that the proposal "Expression of Alphaviral structural proteins in S2 cells (D melanogaster)", utilizing 21 Isogenics mice (21 females), 2 Rabbits (2 females), protocol number CEUA 7183020317, under the responsibility of **Renato Mancini Astray** *and team; Ana Lia Pradella Puglia; Ver Lucia Lopes Boldorini; Mayra Rocca Pereira* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 04/19/2017.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 04/2017 a 08/2017 Área: Imunologia Viral

Origem:	Biotério Central						
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Fêmeas	idade:	6 a 10 semanas	N:	21
Linhagem:	Balb/c			Peso:	18 a 20 g		
Origem:	Biotério Central						
Espécie:	Coelhos	sexo:	Fêmeas	idade:	60 a 65 dias	N:	2
Linhagem:	Branco Nova Zelandia			Peso:	2000 a 2500 g		

Resumo: Recentemente a transmissão do vírus Chikungunya (CHIKV), da família Alphavirus (Togaviridae), foi reportada pela primeira vez na América Central e Caribe, resultando consequentemente na introdução do CHIKV no Brasil, através da transmissão zoonótica por mosquitos Aedes spp. O possível estabelecimento de um ciclo selvático poderá levar à presença definitiva de CHIKV no território brasileiro. Isso já ocorre com outro membro de importância médica da família dos Alphavirus, o vírus Mayaro (MAYV), presente na região amazônica da América do Sul, em que é endêmico na população de macacos, por exemplo. Estudos apontam para uma possibilidade real de urbanização do MAYV, dada sua possibilidade de transmissão por vetores do gênero Aedes spp, embora seu vetor primordial sejam os mosquitos do gênero Haemagogus sp. Este projeto visa obter e analisar proteínas estruturais e imunogênicas desses Alphavirus, possibilitando o futuro desenvolvimento de vacinas ou testes diagnósticos. Para esse fim, clonamos os genes das proteínas estruturais dos vírus MAYV e CHIKV em vetores para a expressão recombinante em células S2 (Drosophila melanogaster), amplamente estudadas por nosso grupo de pesquisa. A estratégia de clonagem das proteínas estruturais foi estabelecida de forma a possibilitar que a expressão dessas proteínas promova a formação de partículas semelhantes a vírus ou VLP (virus like particle). Os resultados preliminares deste trabalho demonstram que as células S2, transfectadas estavelmente com o vetor de expressão, apresentam expressão das proteínas estruturais de CHIKV na fração celular e no sobrenadante.

Local do experimento: Biotério da bacteriologia (Biotério de experimentação do Prédio Novo)

São Paulo, 19 de abril de 2017

Jose Ricardo Jensen
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Maria Leonor Sarno de Oliveira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

Agradecimentos,

Foi um caminho árduo, e enfim consegui chegar ao final. E se eu pudesse resumir minha tese em uma única palavra essa seria, GRATIDÃO. Palavra descrita no dicionário como: Característica ou particularidade de quem é grato. Ação de reconhecer ou prestar reconhecimento (a alguém) por uma ação e/ou benefício recebido; agradecimento: recebeu provas de gratidão. Etimologia (origem da palavra gratidão). Do latim *gratitudo.inis*.

Então eu aqui queria dizer, sou grata! Mas sei que nada disso seria possível sem algumas pessoas muito especiais.

Primeiramente, quero agradecer a Deus, que me apontou o caminho certo quando fiquei em dúvida.

Sou imensamente grata à minha família. Agradeço ao apoio e ao suporte emocional (e algumas vezes financeiro). Obrigada por acreditarem em mim durante toda minha caminhada.

Serei eternamente grata ao meu orientador e conselheiro Dr. Renato Mancini Astray, (Renatinho, para os mais próximos). Sem ele nada disso seria possível. Ele que me orienta desde o mestrado, me transferiu muito de sua bagagem cientifica e também de vida. Sempre com ideias brilhantes e palavras de motivação. Agradeço por juntos termo concluído mais uma etapa.

Agradeço também, com saudades, ao Dr. Carlos Augusto Pereira. Sempre motivou seu grupo de pesquisa e sempre que possível nos fazia questionar a nós mesmos. Deixou saudades e uma frase que para mim é muito inspiradora: "Não tenha pressa, mas não perca tempo*". Merci Beaucoup,* Carlos!

Agradeço à USP, Instituto Buntantan e iBET que me proporcionaram um ensino de primeira e pude ter acesso a tudo que era necessário para iniciar minha carreira profissional. Agradeço também aos professores e professoras, pessoas excelentes com quem aprendi muito.

Aos colegas do LIV, muito obrigada por todas as vezes que estiveram ao meu lado seja pipetando, apoiando, incentivando... A todos que participaram direta ou indiretamente da minha vida acadêmica, minha eterna gratidão! Sem citar uma lista de nomes, as minhas amigas que levarei por mais de 8 anos de amizade, sou imensamente grata por tudo que fizeram por mim, não me deixando desistir e fazendo parte de todas as minhas conquistas.

A quem não mencionei, mas esteve junto comigo, eu prometo reconhecer essa proximidade, ajuda e incentivo todos os dias da minha vida.

Resumo

Puglia, ALP. **Expressão de proteínas estruturais de *Alphavirus* em células S2 (*D melanogaster*).** [tese (Doutorado em Programa de Interunidades em Biotecnologia)] Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2018.

No grupo das doenças infecciosas emergentes e reemergentes, os arbovírus transmitidos por mosquitos, são considerados importantes desafios para a saúde pública. O alastramento mundial do vírus Chikungunya (CHIKV, Togaviridae, *Alphavirus*), acabou resultando na introdução do CHIKV no Brasil, através da transmissão zoonótica por mosquitos do gênero *Aedes spp*, particularmente *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, duas espécies invasoras e cosmopolitas. Outro *Alphavirus*, o vírus Mayaro (MAYV) presente na região amazônica da América do Sul, vem apresentando indícios de uma real urbanização, elevando a preocupação sobre sua possível transmissão por mosquitos urbanos. Diante desse cenário, fica clara a necessidade da realização de estudos sobre estratégias de controle e prevenção da infecção por MAYV e CHIKV, uma vez que não há vacinas ou terapia antiviral específica para a infecção por esses arbovírus. Este projeto descreve pela primeira vez a eficiente expressão, purificação e análise de partículas semelhantes a vírus (VLP, "*virus-like particles"*) dos *Alphavirus* CHIKV e MAYV em células de inseto S2 (*Drosophila melanogaster*). Para esse fim, clonamos os genes das proteínas estruturais dos vírus MAYV e CHIKV em vetores para a expressão recombinante em células S2. Essa plataforma de expressão de proteínas provou ser adequada para o processamento de glicoproteínas do CHIKV e MAYV para produção de VLP, uma vez que detectamos a presença de partículas no sobrenadante do cultivo por *Western blotting* e Microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Ainda, foi possível selecionar células para uma maior produção de VLP e estabelecer um método de purificação das partículas.

Palavras chave: *Alphavirus*, Mayaro, Chikungunya, células S2.

Abstract

Puglia, ALP. **Expression of *Alphavirus* structural proteins in the *Drosophila Schneider 2* cell system** [Ph.D thesis (Doutorado em Programa de Interunidades em Biotecnologia)]Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo ; 2018.

In the group of emerging and reemerging infectious diseases, mosquito-borne arboviruses are considered major public health challenges. The transmission of Chikungunya (CHIKV, Togaviridae, *Alphavirus*) in America continent was first reported in Central America and Caribbean region The CHIKV epidemics reached Brazil through zoonotic transmission by *Aedes spp* mosquitoes, particularly *Ae. Aegypti and Ae. albopictus*, two invasive and cosmopolitan species. Another *Alphavirus*, the Mayaro virus (MAYV) present mainly in the Amazon region has been showing evidence of a real urbanization, increasing concerns about its transmission by urban mosquitoes. Therefore, it is clear that studies on strategies for the control and prevention of MAYV and CHIKV infection are needed. Currently no vaccines or antiviral therapy specific for CHIKV and MAYV infection are available. This work describes for the first time an efficient expression, purification and analysis of virus-like particles (VLP) of CHIKV and MAYV Alphaviruses in S2 (*Drosophila melanogaster*) insect cells. The genes coding for the structural proteins of the MAYV and CHIKV viruses were cloned into vectors for recombinant expression in S2 cells. This platform proved to be suitable for the processing of CHIKV and MAYV glycoproteins and to produce VLP, since we detected the presence of particles in the culture supernatant by Western blotting and Transmission Electron Microscopy (TEM). Furthermore, it was possible to select cells for greater production of VLP and to establish a method for particle purification.

Key words: *Alphavirus*, Mayaro, Chikungunya, VLP, S2 cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Figura representativa do genoma dos alphavirus _____ 27
Figura 2- Esquema representativo da replicação viral de Alphavirus _____ 28
Figura 3- Esquema representativo da estrutura dos Alphavirus _____ 29
Figura 4- Tipos de vacinas virais _____ 31
Figura 5. Vetor comercial pMT/V5His do sistema de expressão em células S2-Invitrogen: _____ 46
Figura 6. Desenho dos primers para amplificação do gene da Higromicina à partir do pCOHygro _____ 48
Figura 7- Esquema de obtenção do vetor pMT-MAYV-Hy _____ 50
Figura 8 Representação da seleção imunomagnética _____ 53
Figura 9- Esquema representativo do método de produção de VLPs _____ 56
Figura 10- Gel de agarose para confirmação da construção do pMT-CHIKV _____ 66
Figura 11- Teste de imunofluorescência indireta (IFI) para a avaliação da melhor concentração de agente indutor ($CuSO_4$). _____ 68
Figura 12- Imunofuorescência para avaliação da expressão pelo tempo _____ 69
Figura 13- Gel de agarose para confirmação da construção do pMTCHIKV-Hy ____ 70
Figura 14- Imunofluorescência para avaliação de expressão de proteínas estruturais de CHIKV nas populações S2MT-CHIKV e S2MT-CHIKV-Hy _____ 71
Figura 15- Expressão de proteínas estruturais do CHIKV detectada por Western blotting _____ 73
Figura 16- Comparação da expressão de proteínas em células S2MT-CHIKV e S2MT-CHIKV-Hy cultivados em meio de cultura SF900™-III SFM (Gibco™) com ou sem suplementação de lipídeos _____ 75
Figura 17-Gel de agarose para confirmação da construção do pMT-MAYV-Hy ____ 76
Figura 18- Análise de formação de VLP por Nanosight _____ 79
Figura 19- Determinação do tamanho das VLP por Zetasizer _____ 79
Figura 20- VLP de Alphavirus obtidos a partir de células S2 analisadas por TEM ___ 81
Figura 21- Análise da purificação por gradiente de densidade Iodixanol _____ 82
Figura 22- Cinética de crescimento de células S2 selvagens _____ 82
Figura 23- Cinética de células S2MT-CHIKV-Hy e expressão de VLP _____ 83
Figura 24- Cinética de células S2MT-MAYV-HyM1 e expressão de VLP _____ 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Plataformas de expressão de VLP e suas vantagens e desvantagens _____ 33
Tabela 2- Características dos primers desenhados para amplificação do gene da higromicina_____ 47
Tabela 3- Características dos primers desenhados para obtenção do pMT-MAYV-Hy 49
Tabela 4- Características dos Anticorpos utilizados no ensaio de IFI _____ 54
Tabela 5- Características dos Anticorpos utilizados no ensaio Citometria de fluxo __ 55
Tabela 6- Características dos Anticorpos utilizados no ensaio de Western blotting __ 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CHIKV	Vírus Chikungunya
$CuSO_4$	Sulfato de Cobre
DMSO	Dimetilsulfóxido
eVLP	*Enveloped Vírus like particles*
ELISA	*Enzyme-linked Immnosorbent Assay*
GPV	Glicoproteína do Lyssavírus da raiva
IFI	Imunofluorescência Indireta
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
TM	*Melting temperature*
MAYV	Vírus Mayaro
MPT	Modificações pós-traducionais
IRES	Sítio de entrada interno ribossomal
ORF	*Open Reading Frame*
PBS	Solução Tampão de Salina Fosfatada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com transcriptase reversa
S2	Célula de *Drosophila melanogaster* (Schneider 2)
RRV	Vírus Ross River (Togaviridae, *Alphavirus*)
SFB	Soro Fetal Bovino
SFV	Semliki Forest Virus (Togaviridae, *Alphavirus*)

TNE	Tris-HCl, NaCl e EDTA
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
VEEV	Vírus da encefalite equina da Venezuela (Togaviridae, *Alphavirus*)
VLP	*Virus like particles*
CHO	*Chinese Hamster Ovary cells*
EMCV	Vírus da encefalite cardíaca (Picornaviridae, *Cardiovirus*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 17

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19

2.1 Arbovírus 19

2.1.1 Vírus Chikungunya 19

2.1.2 O Vírus Mayaro 22

2.2 Sinais e sintomas de infecção por CHIKV ou MAYV 23

2.3 Diagnóstico e tratamento de MAYV e CHIKV 25

2.4 Genoma, Estrutura e Replicação dos vírus CHIKV e MAYV 27

2.5 Vacinas virais 29

2.5.1 Tipos de VLP 31

2.5.2 Métodos de produção de VLP 32

2.5.2.1 Bactérias e leveduras 34

2.5.2.2 Células de Mamíferos 34

2.5.2.3 Plantas 35

2.5.2.4 Células de insetos 35

2.6 Vacinas para CHIKV 38

2.7 Vacinas para MAYV 40

3 OBJETIVOS 41

4. MATERIAIS E MÉTODOS 42

4.1 Cultura de células S2 (Drosophila melanogaster Schneider 2) 42

4.1.1 Congelamento e Descongelamento 43

4.1.2 Determinação da concentração e viabilidadede celular 43

4.1.3 Determinação da taxa específica de crescimento 44

4.2 Obtenção dos vetores de expressão 44

4.2.1 Obtenção do vetor pMT-CHIKV 45

4.2.2 Obtenção do vetor pMT-CHIKVHy 47

4.2.3 Obtenção do vetor pMT-MAYV-Hy 49

4.3 Obtenção das células S2 recombinantes 50

4.3.1 Enriquecimento populacional das linhagens S2MT-MAYV-Hy e S2MT-CHIKV-Hy por seleção imunomagnética - iMAC 51

4.4 Detecção de proteínas estruturais de CHIKV e MAYV 53

4.4.1 Imunofluorescência indireta-IFI 53
4.4.2 Citometria de Fluxo (FACS) 54
4.5 Produção de VLP (partículas virais semelhantes a vírus) 55
4.6 Análise da expressão recombinante 56
4.6.1 Detecção de proteínas em células 56
4.7 Concentração de VLP para detecção de proteínas no sobrenadante 56
4.7.1 Colchão de sacarose 56
4.7.2 Gradiente de iodixanol 57
4.8 Western blotting, detecção das proteínas estruturais de CHIKV e MAYV 58
4.9 Avaliação de formação de VLP 60
4.10 Desenvolvendo um método e escolha de linhagem 62
4.10.1 Avaliação da concentração ideal do indutor$CuSO_4$ em células S2-MTCHIKV por IFI 62
4.10.2 Avaliação do tempo de expressão das proteínas em células S2-MTCHIKV por IFI 62
4.10.3 Comparação da expressão de proteínas entre os vetores pMTCHIKV e pMTCHIKV-Hy por IFI 62
4.10.4Comparação da expressão de proteínas entre os vetores pMTCHIKV e pMTCHIKV-Hy por citometria de fluxo 62
4.10.5 Comparação da expressão de proteínas em células S2MTCHIKV e S2MTCHIKV-Hy cultivados em meio de culturaSF900™-III SFM (Gibco™) suplementado 63
4.10.6 Comparação da expressão de proteínas de MAYV em células S2MTMAYV-Hy após a seleção imunomagnética por citometria de fluxo 63
4.11 Cinética de crescimento e expressão de proteínas estruturais de CHIKV e MAYV 64
4.12 Ensaios preliminares de imunogenicidade 64
5 RESULTADOS OBTIDOS 66
5.1 Construção do vetor pMT-CHIKV e obtenção da linhagem S2MT-CHIKV ... 66
5.2 Determinação das condições padrão para avaliação da expressão das proteínas estruturais de Alphavirus em células S2 recombinantes 67
5.2.1 Determinação da melhor concentração do indutor $CuSO_4$ 67
5.2.2 Determinação do melhor tempo após a indução para a análise da expressão das proteínas recombinantes 69
5.3 Obtenção do vetor de expressão pMT-CHIKV-Hy e da população S2MT-CHIKV-Hy 70
5.4 Análise comparativa da expressão de proteínas recombinantes pelas linhagens S2MT-CHIKV e S2MT-CHIKV-Hy. 71

5.5 Caracterização das proteínas de CHIKV expressas e avaliação de produção de VLP de CHIKV a partir de células S2 recombinantes 72

5.6 Comparação da expressão de proteínas de CHIKV no sobrenadante de células S2MT-CHIKV e S2MT-CHIKV-Hy cultivadas em meio de cultura SF900™-III SFM (Gibco™) suplementado 74

5.7 Construção do vetor de expressão pMT-MAYV-Hy..... 76

5.8 Análise comparativa da expressão de proteínas recombinantes pelas linhagens S2MT-MAYV-Hy após seleção imunomagnética (iMAC)..... 77

5.9 Avaliação da expressão das proteínas de Alphavirus no formato de VLP 78

5.10 Cinética de crescimento celular e expressão de VLP 82

6 DISCUSSÃO 87

7 CONCLUSÃO..... 95

Referências Bibliográficas 96

1 INTRODUÇÃO

A introdução do vírus Chikungunya (CHIKV) no Brasil aconteceu na sequência de uma série de alertas epidemiológicos realizados anteriormente. Esse vírus tem se espalhado pelas regiões tropicais e causado surtos em diversos países da África, Ásia, Europa e América. A transmissão entre humanos é promovida pelos mosquitos do gênero *Aedes*, abundantemente encontrados em nosso país. O vírus se espalhou por diversas regiões do país, conforme o previsto por especialistas (Figueiredo e Figueiredo, 2014).

O CHIKV pertence à família Togaviridae, gênero *Alphavirus*, que concentra alguns vírus patogênicos aos seres humanos. A patogenia causada pela infecção por CHIKV manifesta-se primeiro como um estágio agudo de inflamação articular grave e doença febril, que depois evolui para um estágio crônico, durante o qual os pacientes podem experimentar dores articulares debilitantes e persistentes por períodos prolongados. A gravidade da artrite causada pelo CHIKV chama a atenção das autoridades de saúde pública dos países afetados, visto que metade dos casos tem evoluído para forma crônica da doença (Runowska *et al.*, 2018).

O vírus Mayaro, assim como o CHIKV é um arbovírus da família Togaviridae e gênero *Alphavirus*. É transmitido aos humanos pela picada da fêmea do mosquito do gênero *Haemagogus,* tendo sido detectado na natureza em vários hospedeiros vertebrados como primatas não humanos, roedores, pássaros, preguiças e outros pequenos mamíferos. Experimentalmente o mosquito urbano *Aedes aegypti* já mostrou capacidade de se tornar um vetor para o vírus Mayaro, gerando a preocupação de que, assim como o vírus da febre amarela, poderia ser transmitido em áreas urbanizadas (Mackay e Arden, 2016). Os sintomas da doença são semelhantes a outras arboviroses, entretanto a infecção por MAYV pode persistir por meses, tornando-se mais incapacitante que a dengue. Nos últimos anos, o número de casos de febre Mayaro vem aumentado em vários estados brasileiros. Com a circulação simultânea de MAYV e CHIKV, em muitos locais é possível questionar se os sintomas apresentados por um paciente são provocados por uma infecção por MAYV ou CHIKV (Hotez e Murray, 2017).

Tendo em vista esse cenário, é fundamental que sejam propostas alternativas para o combate a esses vírus emergentes. Neste trabalho buscamos a expressão recombinante

das proteínas estruturais e imunogênicas desses *Alphavirus*, de maneira a possibilitar futuros estudos da utilização dessas preparações para fins de imunização. Desenvolvemos uma metodologia de obtenção das proteínas imunogênicas do CHIKV e/ou MAYV, visando sua apresentação como partículas semelhantes a vírus (VLP), consideradas uma das formas mais promissoras para a imunização contra *Alphavirus*. As VLP apresentam diversas vantagens frente a outras formas de apresentação de antígenos vacinais: são mais seguras que as vacinas virais inativadas ou atenuadas e por serem essencialmente desprovidas de material genético infeccioso não são infectivas ou replicativas.

A abordagem utilizada para a obtenção das VLP envolveu a utilização de células de inseto S2 (*Drosophila melanogaster*). Essa estratégia é inicialmente atrativa, pois além de permitir a expressão estável das proteínas recombinantes, envolve um sistema de inseto em que não deve haver modificações importantes nas características estruturais das proteínas, dado que em seu ciclo zoonótico, ambos os vírus realizam passagem em insetos da mesma ordem *Diptera* das células S2. Dessa forma espera-se que as proteínas produzidas pelas células de inseto tenham as características de modificações pós-traducionais e imunogenicidade desejadas.

Os trabalhos realizados envolveram a amplificação e clonagem dos genes das proteínas estruturais a partir do próprio vírus (Mayaro) ou de genes sintéticos (Chikungunya) em vetores de expressão em células S2; a avaliação das melhores condições de expressão das proteínas recombinantes e VLP; o estabelecimento de métodos analíticos adequados e de purificação das VLP até então inexistentes no laboratório e a análise das estruturas geradas utilizando métodos específicos para a análise de partículas.

Os resultados apresentados nesta tese permitem concluir que as células S2 recombinantes obtidas produzem proteínas estruturais de CHIKV ou MAYV em estrutura compatível com o esperado para a forma de VLP.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Arbovírus

Arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes (*Arthropod-borne virus*) e são assim designados não somente pela sua veiculação através de artrópodes, mas principalmente pelo fato de parte de seu ciclo replicativo ocorrer nos insetos. São transmitidos aos seres humanos e outros animais pela picada de artrópodes hematófagos. Os arbovírus que causam doenças em humanos e outros animais de sangue quente são membros de cinco famílias virais: Bunyaviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Reoviridae e Rhabdoviridae. Estima-se que haja mais de 545 espécies de arbovírus, dentre as quais, mais de 150 relacionadas com doenças em seres humanos, sendo a maioria zoonótica. São mantidos em ciclo de transmissão entre artrópodes (vetores) e reservatórios vertebrados como principais hospedeiros amplificadores (Azevedo *et al.*, 2009; Vasconcelos e Calisher, 2016).

A infecção pela maioria destes vírus em geral não causa nenhuma doença. Em alguns casos pode ocorrer uma doença branda caracterizada por febre, dor de cabeça e mal-estar. Outros vírus podem causar uma doença severa em casos individuais ou mesmo em conjunto de casos ou epidemias. Os arbovírus mais conhecidos incluem os vírus da encefalite equina da Venezuela (VEEV), Oropouche, Mayaro vírus, Caraparu, Chikungunya, Dengue, Zika entre outros da América do Sul (Vasconcelos e Calisher, 2016).

2.1.1 Vírus Chikungunya

O vírus chikungunya (CHIKV), primeiramente isolado em Newala distrito de Tanzânia em 1952–1953, é um vírus RNA que pertence ao gênero *Alphavirus* da família Togaviridae e é transmitido para os humanos através da picada do mosquito *Aedes* spp . (i.e. *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*), possuindo taxa de letalidade de 1/1000 (Powers e Logue, 2007). Como diversos *Alphavirus* transmitidos por mosquitos, o CHIKV causa em humanos febre, artralgia e "*rash*" cutâneo (erupções discretas). O nome Chikungunya deriva de uma palavra do idioma Makonde que é entendida como "aqueles que se dobram", descrevendo a aparência encurvada de pacientes que sofrem de artralgia intensa

(Lumsden, 1955; Robinson, 1955). A artralgia pode persistir por meses ou alguns anos podendo progredir para artrite crônica. Os sintomas da doença ocorrem tipicamente em 72 a 97 % dos infectados (Thiberville *et al.*, 2013).

A patologia da infecção, por desenvolver sintomas semelhantes aos de outras arboviroses, faz com que a doença seja facilmente confundida com a dengue, sendo anteriormente descrita como "*uma variante clínica da dengue clássica diferindo na ausência de dor de cabeça, pressão do globo ocular e dores nos movimentos oculares*" (Ross, 1956).

São reconhecidos 3 genótipos virais do CHIKV, os quais historicamente circularam em áreas geográficas distintas, sendo as cepas nomeadas: Oeste Africano, Leste Central Sul Africano (*East Central South African* - ECSA), e Asiático. A análise filogenética sugere que o genótipo Asiático derivou do genótipo ECSA entre os anos 1879 e 1927. Na África, o vírus é mantido no ciclo silvestre envolvendo primatas não-humanos e mosquitos silvestres do gênero *Aedes* spp. Nas regiões rurais, os surtos humanos tendem a ser baixos e dependentes de condições ambientais (como aumento das chuvas) que aumentam a quantidade de mosquitos silvestres, particularmente do *Aedes furcifer-tayleri*. O ciclo de transmissão silvestre não foi identificado na Ásia, mas é provável que ocorra devido à atividade humana em zonas de mata (Petersen e Powers, 2016).

Embora os genótipos de CHIKV variem, as cepas individuais são antigenicamente relacionadas, sendo possível que o desenvolvimento de uma vacina funcione contra as 3 cepas heterólogas (Harrison *et al.*, 1967). Um estudo recente, realizado com voluntários de fase clínica 1 de vacina de VLP de CHIKV, sugere que a vacinação com uma única cepa de CHIKV pode gerar anticorpos neutralizantes contra todos os três genótipos, confirmando a proposta de que a vacina baseada em uma cepa seja efetiva contra as outras cepas heterólogas (Goo *et al.*, 2016).

Na última década o CHIKV reemergiu causando uma série de grandes surtos, começando no Quênia em 2004, devastando as ilhas Comoros e ilha de La Reunion, e outras ilhas do sudeste do Oceano Indico em 2005, seguindo para uma epidemia no subcontinente Indiano em 2005/2006 (Kariuki Njenga *et al.*, 2008). Da primavera de 2004 ao verão de 2006, ocorreu um número estimado em 500 mil casos.

A epidemia propagou-se do Oceano Índico à Índia, onde grandes eventos emergiram em 2006. Uma vez introduzido, o CHIKV alastrou-se em 17 dos 28 estados

da Índia e infectou mais de 1,39 milhões de pessoas antes do final do ano. O surto da Índia continuou em 2010 com novos casos aparecendo em áreas não envolvidas no início da fase epidêmica. Os casos também têm sido propagados da Índia para as Ilhas de Andaman e Nicobar, Sri Lanka, Ilhas Maldivas, Singapura, Malásia, Indonésia e numerosos outros países por meio de viajantes virêmicos. A preocupação com a propagação do CHIKV atingiu um pico em 2007, quando o vírus foi encontrado em transmissão autóctone no norte da Itália após ser introduzido por um viajante com o vírus advindo da Índia. As taxas de ataque em comunidades afetadas em recentes epidemias variaram de 38% a 63% e, embora em níveis reduzidos, muitos casos continuam sendo relatados nesses países. Em 2010 o vírus continuou a causar doença na Índia, na Indonésia, em Myanmar, na Tailândia, nas Maldivas e reapareceu na Ilha Réunion. Casos importados também foram identificados no ano de 2010 em Taiwan, na França, nos Estados Unidos e no Brasil, trazidos por viajantes advindos, respectivamente, da Indonésia, da Ilha Réunion, da Índia e do sudoeste asiático. A transmissão do CHIKV foi reportada pela primeira vez nas Américas em 2013. Indivíduos virêmicos com CHIKV foram encontrados no Caribe (Martinica), nos Estados Unidos (EUA) e na Guiana Francesa (Leparc-Goffart *et al.*, 2014).

Em 2014, nos EUA houve 11 casos de infecção autóctone confirmada e 1606 casos de infecções importadas de países endêmicos (Handler *et al.*, 2016). Acredita-se que houve duas introduções separadas do CHIKV no Brasil, pois o genótipo isolado no Oiapoque (Amapá) e Caribe, não é igual àquele isolado na Bahia (Donalisio e Freitas, 2015).

Segundo o Boletim Epidemiológico 16, volume 49, publicado em abril de 2018 pelo Ministério de Saúde, nos anos de 2016 e 2017 foram registrados 277.882 e 185.854 casos prováveis de febre chikungunya, respectivamente. Em 2018, até a semana epidemiológica 12 (31/12/2017 a 24/03/2018), foram registrados 18.800 casos prováveis de febre de chikungunya no país, com uma incidência de 9,1 casos/100 mil habitantes, destes, 11.447 (60,9%) foram confirmados e outros 3202 casos suspeitos foram descartados. Ainda em 2018, a região Centro-Oeste apresentou o maior número de casos prováveis de febre de chikungunya (9.011 casos; 47,9 %) em relação ao total do país. Em seguida aparecem as regiões Sudeste (4.861 casos; 25,9%), Nordeste (2.731 casos; 14,5 %), Norte (2.040 casos; 10,9%) e Sul (157 casos; 0,8%). Quanto aos óbitos, em 2018 até a SE 12, foram confirmados laboratorialmente três óbitos por febre chikungunya e

existem ainda 15 em investigação. Em relação ao mesmo período do ano de 2017, foram confirmados 44 óbitos e 19 existiam em investigação.

Ao se comparar com a dengue, a epidemiologia da Chikungunya apresenta características que amplificam a disseminação da doença e aumentam a possibilidade de grandes e explosivas epidemias. Entre elas estão a maior proporção de casos sintomáticos (> 90%), menor tempo de incubação intrínseca (de 2 a 7 dias), maior período de viremia (2 dias antes e 10 depois da febre) e menor período de incubação extrínseca (no mosquito). A replicação viral no mosquito *Aedes albopictus* aumenta a extensão geográfica das regiões com potencial de circulação viral. Existe, ainda, o risco de estabelecimento de um ciclo enzoótico do Chikungunya macaco-mosquito no Brasil, dificultando a erradicação da doença no país (Figueiredo, 2007; Figueiredo e Figueiredo, 2014).

2.1.2 O Vírus Mayaro

O MAYV foi isolado em 1954 em Trinidad-Tobago e desde então tem sido encontrado em florestas tropicais e equatoriais da América do Sul. A infecção pelo MAYV é responsável por uma alta debilidade clínica que inclui febre, cefaleia, exantema, mialgias, artralgias, fotofobia, edema articular e manifestações gastrointestinais, que podem levar ao diagnóstico errado de febre causado pelo vírus da dengue. Além disso, a infecção pelo MAYV pode persistir por meses, tornando-se mais incapacitante que a dengue. O tratamento é sintomático, já que não existe uma terapia específica contra o MAYV (Tesh *et al.*, 1999; Coimbra *et al.*, 2007).

O MAYV é transmitido tipicamente pela picada do mosquito *Haemagogus janthinomysk,* porém outros gêneros de mosquitos, como o *Aedes sp* também podem transmitir o MAYV, o que o torna um potencial vírus urbano, assim como ocorre com a febre amarela, cujo ciclo de transmissão silvestre é muito semelhante ao do MAYV (Muñoz e Navarro, 2012).

O MAYV é considerado um vírus emergente em diversos países, como Brasil, Venezuela, Equador e Peru (Izurieta *et al.*, 2011). Existem vários fatores associados à urbanização dos arbovírus que podem estar relacionados a mudanças ecológicas produzidas pelo homem no habitat do vetor, criando novos reservatórios ou induzindo adaptações nos arbovírus para a manutenção do seu ciclo replicativo (Lorenz *et al.*, 2017).

Há também a alta taxa de desflorestamento, as invasões humanas para comércio ou turismo, além da globalização que facilitam o espalhamento dos mosquitos a longas distâncias, podendo percorrer até 5 km, atingindo novos continentes e países (Figueiredo, 2007).

O vírus é considerado endêmico em alguns locais do Brasil, como na região norte, central e oeste. O primeiro caso no país foi reportado em 1955, em uma cidade do Pará, e neste estado, próximo ao rio Guamá, ocorreu o primeiro surto epidêmico registrado no Brasil. Quase duas décadas depois, em 1978 em Belterra no Pará, outro surto foi confirmado com 55 casos de um total de 72 indivíduos suspeitos (43 por isolamento viral e 12 por testes sorológicos). Tempos depois, outros dois surtos foram relatados em Conceição do Araguaia e Benevides. Em 2008, um surto aconteceu nas redondezas de Santa Barbara do Pará. Nos últimos 30 anos, 36 pacientes foram confirmados com IgM anti-MAYV de um total de 105 indivíduos que relataram uma condição febril sugestiva de febre Mayaro (Esposito e Fonseca, 2017). Além disso, 15 de 604 pacientes foram diagnosticados como positivos para Mayaro durante um surto de dengue no Mato Grosso (Zuchi *et al.*, 2014). Recentemente, outro surto aconteceu no estado do Goiás e foram notificados 183 casos da doença. No período de dezembro de 2014 a janeiro de 2016, um total de 343 casos suspeitos foram notificados. Entre esses casos, alguns inicialmente foram relatados como febre chikungunya, uma vez que o teste diagnóstico apresenta reação cruzada entre esses vírus (Brunini *et al.*, 2017).

O aumento da incidência dos casos de febre Mayaro em outras regiões não endêmicas do Brasil sugere que o vírus tem se espalhado para outras partes do país e que futuros surtos epidêmicos podem ocorrer em áreas onde os profissionais de saúde não estão familiarizados com a apresentação clínica da febre Mayaro (Esposito e Fonseca, 2017).

2.2 Sinais e sintomas de infecção por CHIKV ou MAYV

A partir da picada de um mosquito infectado com CHIKV ou MAYV, a maioria dos indivíduos apresenta a doença sintomática após um período de incubação de dez dias. Porém nem todos os indivíduos infectados com o vírus desenvolvem sintomas. Alguns estudos indicam que aproximadamente 90% apresentam sinais clínicos da infecção (Thiberville *et al.*, 2013), entretanto análises sorológicas indicam que aproximadamente

18% das pessoas com anticorpos anti-CHIKV apresentaram infecção assintomática (Assunção-Miranda *et al.*, 2013). Indivíduos agudamente infectados por CHIKV, sejam clinicamente aparentes ou assintomáticos, podem contribuir para a propagação da doença se os vetores que transmitem o vírus estiverem presentes e ativos na mesma localidade. A maioria dos pacientes se recupera totalmente, mas em alguns casos as dores nas articulações podem persistir por vários meses, ou mesmo anos.

No caso de CHIKV, após os primeiros dez dias de fase subaguda e crônica**,** a maioria dos pacientes sente uma melhora na saúde geral e na dor articular. Porém, após este período, o reaparecimento dos sinais pode ocorrer com alguns pacientes alegando sintomas reumáticos, incluindo poliartrite distal, exacerbação da dor em articulações e ossos previamente afetados e tenossinovite hipertrófica subaguda nos punhos e tornozelos. Isso é muito comum entre dois e três meses após o início da doença. Alguns pacientes também podem desenvolver distúrbios vasculares periféricos, como a síndrome de Raynaud. A doença crônica é definida por sintomas que persistem por mais de três meses, com casos de dor persistente por 18 meses a 3 anos (Ministério da Saúde, 2014).

O sintoma persistente mais comum é a artralgia inflamatória nas mesmas articulações afetadas durante os estágios agudos. Geralmente, não há mudança significante em testes laboratoriais e nas radiografias das áreas afetadas. Porém, alguns indivíduos desenvolvem artropatia/artrite semelhante à artrite reumatóide ou artrite psoriática (Roosenhoff *et al.*, 2016). Outros sintomas da fase crônica da doença podem incluir cansaço e depressão. Casos ocasionais de complicações oculares, neurológicas e cardíacas têm sido relatados, bem como queixas gastrointestinais, porém não são comuns. Esses casos mais graves ocorrem frequentemente em recém-nascidos e pacientes acima de 65 anos de idade. Além disso, há relatos de transmissão de CHIKV da mãe para o bebê com alta taxa de morbidade (Morrison, 2014).

No caso do MAYV, as manifestações clínicas são semelhantes às da dengue, tendo relatos de uma febre branda e a síndrome febril auto-limitada. A fase aguda apresenta uma viremia curta transiente (3 a 7 dias), e o período de incubação viral varia de 7 a 12 dias. Após o período de incubação, ocorre um súbito aparecimento de febre (39 a 40 ˚C), dor de cabeça frontal, artralgia, mialgia, edemas articulares, arrepios, dor retro-orbital, *rash* cutâneo, vômito e diarreia. Aproximadamente 20% dos casos apresentam inchaço nas juntas (dedos, tornozelos e pulsos). Após a fase aguda, se inicia a fase convalescente

em que podem permanecer os sintomas de artralgia, esta é a manifestação clínica menos comum, porém pode persistir por meses (Mota *et al.*, 2015)

2.3 Diagnóstico e tratamento de MAYV e CHIKV

Métodos laboratoriais rápidos, sensíveis e confiáveis devem ser usados para o diagnóstico da infecção para ambos CHIKV e MAYV. Essas técnicas devem ser empregadas a fim de fornecer uma melhor conduta ao paciente, assim como a detecção e controle de surtos. Técnicas moleculares são ferramentas rápidas e sensíveis para o diagnóstico da infecção por qualquer destes vírus em estágios inicias de viremia. A técnica de PCR em tempo real vem sendo empregada com o uso de *primers* genéricos específicos para *Alphavirus* ou *primers* específicos para regiões dos genes nsP1, nsP2 ou E1 de cada vírus MAYV ou CHIKV. O isolamento viral pode ser realizado a partir do soro do paciente coletado no primeiro ou segundo dia da infecção, este soro virêmico é inoculado em células C636 ou Vero, ou também pode ser feita uma inoculação intra-cerebral em camundongos recém-nascidos. A detecção dos primeiros anticorpos pode ser feita no soro do paciente a partir de cinco dias após o desaparecimento dos sintomas. Estes anticorpos neutralizam o vírus prevenindo seu isolamento, o isolamento desses vírus requer ao menos três dias e é fundamental para investigação da epidemiologia e patogênese viral. O isolamento de CHIKV e MAYV também permite sua caracterização molecular (Zuchi *et al.*, 2014; Sam *et al.*, 2015).

A resposta às infecções por CHIKV e MAYV pode ser detectada no soro por ELISA, IFI, ensaio de hemaglutinação e ensaio de neutralização. O teste ELISA é uma técnica rápida e sensível para detecção de anticorpos específicos e pode distinguir entre IgG e IgM. A IgM para CHIKV é tipicamente detectada 3 dias após o desaparecimento dos sintomas e pode persistir por até 3 meses. A IgG para ambos os vírus surge após o aparecimento dos anticorpos IgM e persiste por anos. Algumas técnicas usam como antígenos células infectadas por vírus, vírus íntegros, envelopes virais recombinantes ou proteínas não estruturais. Também estão disponíveis análises sorológicas comerciais, incluindo métodos rápidos, entretanto a sensibilidade para detecção de anticorpos antes do quinto dia após o desaparecimento dos sintomas depende da estirpe viral ou da origem do antígeno usado para o ensaio. Ensaios baseados em antígenos recombinantes podem

ser mais específicos dependendo do genótipo viral e suas mutações (Figueiredo e Figueiredo, 2014).

Um par de soros (fase aguda e convalescente), que são positivos ou que apresentam aumento do título de anticorpos na segunda amostra de soro, pode ser necessário para confirmar o diagnóstico de vírus com base em ensaios de hemaglutinação ou neutralização. Para serem mais precisos, os diagnósticos de infecção pautados exclusivamente em um teste sorológico específico para cada vírus não podem ser usados separadamente. No entanto, essas técnicas sorológicas são úteis no diagnóstico de viajantes que regressam de áreas geográficas endêmicas em MAYV e CHIKV. Além disso, o diagnóstico de infecção por CHIKV e MAYV pode apresentar reações cruzadas. Como esses vírus circulam na mesma região, é necessário realizar a diferenciação por técnicas capazes de detectar o genoma viral (RT-PCR) ou ensaio de neutralização altamente específico para cada espécie (PRNT). Adicionalmente, será necessário desenvolver melhores testes diagnósticos que sejam simples, rápidos, específicos e confiáveis para o diagnóstico de CHIKV e MAYV (Figueiredo e Figueiredo, 2014).

Não existem medicamentos específicos para o tratamento de infecções causadas por CHIKV ou MAYV. Pacientes são mantidos em repouso e são submetidos a tratamento sintomático com analgésicos simples (paracetamol) e também com drogas antiinflamatórias não-esteroidais (ibuprofeno e naproxeno), os quais podem aliviar a dor e a febre. O uso de corticosteróides foi empregado em casos pontuais de CHIKV. O Arbidol é um antiviral licenciado na Rússia e um de seus análogos tem apresentado atividade anti-CHIKV (Krutikov e Manson, 2016). A Ribavirina, tradicionalmente usada no tratamento do vírus sincicial respiratório em crianças e também para o vírus da hepatite C, foi administrada a pacientes com CHIKV duas vezes ao dia por um período de 7 dias, demonstrando eficácia no alívio das dores que incapacitavam o movimento dos membros inferiores, melhorando a resolução dessas manifestações (Ravichandran e Manian, 2008). A combinação de INF-α2b e ribavirina produz um efeito de sinergia anti-CHIKV como foi demonstrado em alguns estudos *in vivo* (Cunha e Trinta, 2017).

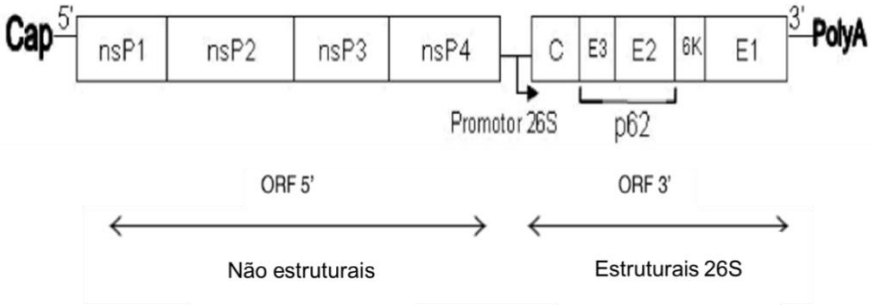
A imunização passiva pode ser uma terapia preventiva apropriada bem como uma opção para as manifestações causadas pela infecção de CHIKV e MAYV, uma vez que não existem terapias alternativas disponíveis. Em modelo animal de camundongo foi administrada IgG purificada de plasma de um doador CHIKV+ convalescente, demonstrando alta atividade neutralizante, assim como um poder terapêutico e ação

profilática anti-CHIKV. Portanto, a imunização passiva poderia ser usada para o tratamento da febre Chikungunya e para a prevenção em pacientes com grave risco de manifestar a doença, bem como em adultos em condições subjacentes (Tharmarajah *et al.*, 2017).

2.4 Genoma, Estrutura e Replicação dos vírus CHIKV e MAYV

Os *Alphavirus*, como o CHIKV e o MAYV, possuem aproximadamente 70 nm de diâmetro e contêm um RNA positivo, simples fita, de aproximadamente 11.8 kb que funciona como RNA mensageiro (Figura 1). O genoma viral é dividido em duas ORFs (*Open Read frames*). A região ORF 5´ compreende aproximadamente dois terços do genoma e codifica as proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) que participam da replicação do genoma, RNA *capping*, quebra da poliproteína e outras funções necessárias à replicação viral. As proteínas estruturais são codificadas pelo RNA subgenômico, correspondendo a um terço do genoma viral localizado na segunda ORF na porção 3´. Essa região codifica para cinco proteínas estruturais (Cápside, E3, E2, 6k e E1), que são formadas após atividade proteolítica. As sequências nas extremidades 5' e 3', bem como na região intergênica, possuem elementos repetidos conservados que desempenham papéis importantes na regulação da síntese viral de RNA (Jose *et al.*, 2009).

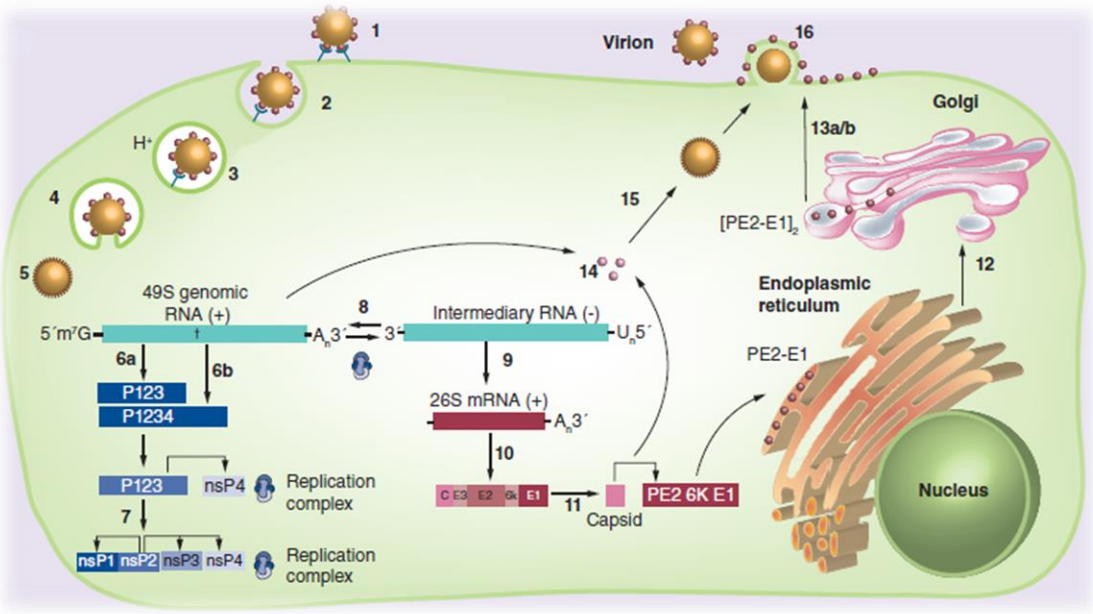
Figura 1- Figura representativa do genoma dos *Alphavirus*



Na replicação viral (Figura 2), o vírus entra nas células alvo por endocitose mediada por clatrina, em que a proteína E2 possui papel de interação com os receptores celulares. Após esse evento, a conformação do envelope viral se transforma devido à ação do pH ácido do endossoma. Com essa mudança conformacional, a proteína E1 é exposta e media a fusão da membrana viral com a membrana endossomal do hospedeiro. Ocorre

então a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma e o RNA agora livre é diretamente traduzido em sua 5' ORF em uma poliproteína que se cliva em nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4.

Figura 2- Esquema representativo da replicação viral de *Alphavirus*



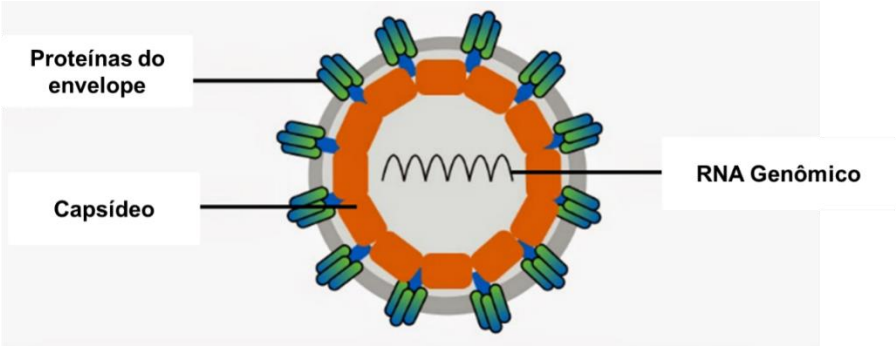
O ciclo replicativo dos *Alphavirus*. (1) Ligação ao receptor; (2) Endocitose mediada por receptor; (3) Acidificação do vacúolo; (4) Fusão com a membrana; (5) Separação do core; (6a) Tradução; (6b) Tradução da poliproteína; (7) Processamento; (8) Transcrição RNA intermediário; (9) Transcrição RNA+ (10) Tradução; (11) Processamento; (12) Processamento e maturação de glicoproteínas; (13a) Transporte das glicoproteínas processadas à membrana plasmática; (13b) Ativação por clivagem mediada por Furina; (14) Empacotamento RNA genômico; (15) Montagem do nucleocapsídeo; (16) Brotamento das partículas virais (adaptado de Mota et al., 2015).

As proteínas não estruturais se associam formando o complexo de replicação viral, originando uma fita de RNA intermediário negativa. Este RNA intermediário é então usado como molde para síntese do mRNA subgenômico 26S e do RNA viral. O mRNA subgenômico 26S é traduzido e forma a poliproteína estrutural (C-p62- 6K-E1). Essa poliproteína é processada por autoclivagem pela atividade serino-protease presente na proteína C, levando à sua liberação no citoplasma. As outras proteínas restantes são direcionadas ao retículo endoplasmático onde sofrem modificações pós-traducionais. A proteína p62 (ou pE2) é clivada no golgi e forma então as glicoproteínas E2 e E3. As glicoproteínas E1 e E2 se associam formando um heterodímero que é então transportado para a membrana plasmática da célula hospedeira. Na fase de brotamento esse heterodímero é incorporado à superfície viral na forma de espículas triméricas.,

totalizando 80 espículas triméricas presentes na superfície do vírus maduro (Weaver *et al.*, 2012).

Por fim, o vírus maduro se forma na membrana plasmática, em que ocorre o brotamento viral, neste processo o nucleocapisídeo icosaédrico, que consiste no RNA genômico associado à proteína C, adquire uma bi-camada lipídica derivada da célula, contendo as espículas triméricas (Figura 3).

Figura 3- Esquema representativo da estrutura dos *Alphavirus*



O papel das proteínas estruturais se relaciona à formação do vírus e às suas propriedades de infecção. A proteína 6k, por exemplo, está associada à formação do vírus e ao brotamento viral. Também existem relatados de sua associação com parte dos canais iônicos, afetando a permeabilidade da membrana. A proteína E3 tem a função de direcionar as proteínas estruturais ao retículo endoplasmático após a sua síntese nos ribossomos, para que estas sejam processadas adequadamente e adquiram a conformação adequada (Jose *et al.*, 2009).

2.5 Vacinas virais

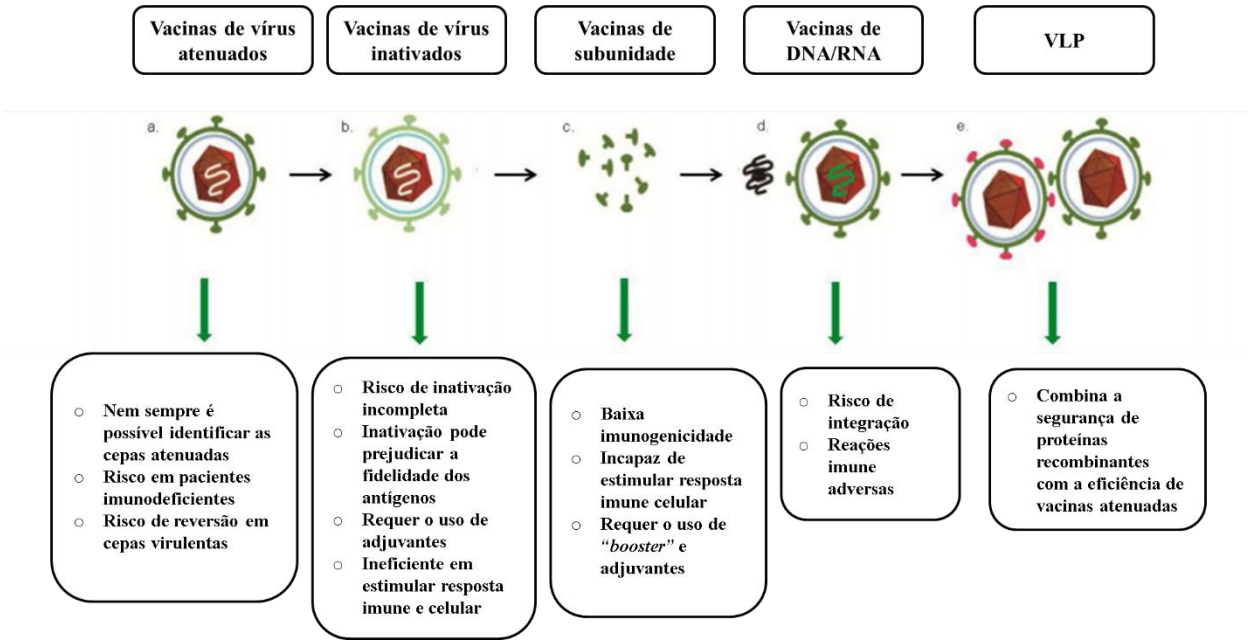
A grande maioria das vacinas preventivas para vírus consiste em um vírion atenuado ou inativado que é administrado ao indivíduo, sendo capaz de gerar uma resposta imune protetora (Figura 5). Esses tipos de vacinas são altamente efetivos e algumas não requerem a administração de uma segunda dose ou uso de adjuvantes. Entretanto, particularmente as vacinas atenuadas apresentam riscos operacionais de produção ou administração, uma vez que podem reverter em forma patogênica (Mäkelä, 2000). As vacinas de nova geração apresentam uma maior segurança por não utilizar o vírion completo em sua formulação, entre elas podemos utilizar as vacinas de subunidades

proteicas, vacinas de DNA/RNA ou as *virus-like particles* (VLP). As vacinas de subunidades são compostas por proteínas virais recombinantes ou proteínas purificadas do vírus selvagem que agem como antígenos. A vacinação com DNA consiste em uma técnica direta de administração de um plasmídeo de DNA que codifica uma proteína antigênica, essas proteínas são apresentadas por receptores celulares e subsequentemente são capazes de gerar uma resposta imune (Mäkelä, 2000; Fuenmayor *et al.*, 2017).

O desenho racional de vacinas envolve o uso de ferramentas interdisciplinares que conduzem à produção do que se é esperado para uma vacina ser mais eficiente e segura. Essa nova abordagem conta com tecnologias recombinantes para entrega de vacinas ou DNA recombinante que resultará em uma ou mais proteínas recombinantes, das quais podem ou não resultar uma partícula como, por exemplo, uma VLP. Essas novas vacinas recombinantes, como no caso de subunidades Prevnar (Wyeth) e, têm demonstrado um mercado com potencial de inovação no desenvolvimento de vacinas biotecnológicas (Fernandes *et al.*, 2013).

As VLP consistem em uma nanoestrutura artificial que se assemelha aos vírus. Estas são basicamente compostas por algumas ou todas as proteínas que formam a estrutura viral, porém o material genético se encontra ausente, impedindo assim qualquer possibilidade de mutação reversiva ou infecção patogênica. Apesar de serem incapazes de se replicarem no indivíduo, as VLP estimulam o sistema imune através do reconhecimento repetitivo de subunidades, sendo capazes de gerar uma alta resposta imune celular e humoral. Por essa vantagem em relação às outras vacinas disponíveis, o interesse na tecnologia de VLP tem aumentado nos últimos anos (Mäkelä, 2000).

Figura 4- Tipos de vacinas virais



Adaptado de: (Fuenmayor *et al.*, 2017)

2.5.1 Tipos de VLP

As VLP são compostas por uma ou mais proteínas estruturais, sendo capazes de se auto-formar quando são expressas de forma recombinante. As proteínas podem se arranjar em camada única, dupla ou tripla, como no caso do HPV (vírus do papiloma humano), em que as VLP são formadas por uma única proteína estrutural que forma o capsídeo da partícula. Já as VLP mais complexas possuem várias proteínas estruturais, como exemplo, temos as VLP da família de *Reoviridae*, estas são formadas de 2 a 4 diferentes proteínas que são dispostas em várias camadas. Diversas vacinas baseadas em VLP já estão disponíveis comercialmente, como exemplo temos vacinas contra o HPV (Papiloma vírus humano), Cervarix® , Gardasil® & Gardasil9® , para Hepatite B temos a Sci-B-Vac™, e recentemente a primeira vacina licenciada para Malaria a Mosquirix™ (Mohsen *et al.*, 2017) .

As VLP podem também possuir um envelope lipídico externo, sendo também conhecidas como eVLP. Neste caso, o *core* da proteína estrutural sai da célula através de um processo de brotamento, de forma que o envelope viral carrega uma parte da membrana celular. Este é o caso das VLP de HIV-1, as quais são formadas pela poliproteína Gag e carregam parte da membrana da célula hospedeira como envelope

viral. Consequentemente, a escolha da linhagem celular produtora é muito importante uma vez que as eVLP irão conter parte da membrana.

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

2.5.2 Métodos de produção de VLP

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

Tabela 1- Plataformas de expressão de VLP e suas vantagens e desvantagens

Plataforma de produção	Vantagens	Desvantagens
E.coli	• Fácil expressão • Possibilidade de escalonamento • Baixo custo	• Presença de endotoxinas • Não faz glicosilação
Levedura	• Fácil expressão • Possibilidade de escalonamento • Baixo custo	• Não apropriado para glicosição de proteínas (ex: alta modificação de manose) • Risco de formação e *folding* incorreto.
Células de mamífero	• Produção semelhante ao hospedeiro natural • Realiza MPT adequadas e formação correta de VLP	• Baixa produtividade • Alto custo
Plantas	• Fácil expressão • Possibilidade de escalonamento • Não possui contaminação derivada de vírus humanos	• Baixo nível de expressão • Baixa estabilidade
Células de insetos	• Pode produzir grandes quantidades de VLP formada corretamente em alta densidade celular • Possibilidade de escalonamento • Baixo risco de cultivo de patógenos quando comparado a cultura de células de mamíferos • Componentes do hospedeiro podem atuar como adjuvantes vacinais	• Limitado para modificações traducionais de alta manose • Difícil a remoção de baculovírus

Adaptado de: (Fuenmayor *et al.*, 2017)

2.5.2.1 Bactérias e leveduras

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

2.5.2.2 Células de Mamíferos

Vários tipos de células de mamíferos estão disponíveis para produção de VLP. Ao ser comparado com outros sistemas, essas células apresentam um menor rendimento de produção de proteína, entretanto possuem a capacidade de formar proteínas mais complexas e realizar MPT. Por esta razão, células de mamíferos são utilizadas na produção de VLP envelopadas, mais complexas, compostas por múltiplas proteínas estruturais. Uma ampla variedade de células de mamíferos está disponível para a produção de proteínas recombinantes sendo capazes de crescer em suspensão utilizando meios quimicamente definidos e livres de soro fetal bovino (Zhu, 2012). Uma das células mais utilizadas é a célula CHO (*Chinese Hamster Ovary*), que apresenta a vantagem de não ser uma célula derivada de humano tendo assim baixo risco de contaminação por vírus humanos. Está célula já foi utilizada na produção de VLP de hantavírus que foi capaz de induzir uma resposta imune em camundongos (Li *et al.*, 2010). Outras células utilizadas com a finalidade de produzir VLP são HEK293 e células derivadas de fluido amniótico (Lua *et al.*, 2014) .

2.5.2.3 Plantas

As plantas podem produzir compostos terapêuticos em diversas formas, sendo utilizadas como biofábricas e também vem sendo usadas para produção de VLP. Como exemplo, temos a produção de VLP de HPV 16 e influenza. O *Agrobacterium tumefaciens* é comumente utilizado para infecção e transformação dessas células, de forma que o gene específico de interesse é introduzido no genoma do hospedeiro. As plantas mais comuns utilizadas para produção de proteínas são *Nicotiana tabacum* e *Arabidopsis thaliana (Van Zyl e Hitzeroth, 2016).*

2.2.2.4 Células de insetos

Há diversos exemplos na literatura cientifica da aplicação de sistemas de expressão em células de insetos com alta produção de proteínas heterólogas, tipicamente para produção de biofármacos para uso veterinário, como Porcilis®, Bayovac e Vibragen. Entretanto, é recente a produção de biofármacos comerciais para uso humano. Células de inseto são ferramentas promissoras para a expressão de proteínas complexas, fornecendo um ambiente eucariótico propício para a realização das modificações pós-traducionais necessárias para a atividade biológica da proteína.

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

A expressão baseada em células de insetos pode ser dividida em dois diferentes modos de expressão:

- Expressão lítica: com uso do sistema de Baculovírus (BEVS). As células de insetos utilizadas por esse sistema são derivadas de mariposa (*Spodoptera frugiperda*: Sf9 e Sf21 e *Trichioplusiani*: Hi-5). Entre as vantagens desse sistema de expressão, há o fato de que os Baculovírus são inofensivos aos humanos e permitem um acesso relativamente rápido à atividade biológica da proteína. Entretanto, há algumas desvantagens relacionadas ao uso do BEVS e a expressão

lítica que devem ser destacadas como: a proteína pode ser proteolizada; a infecção por baculovírus é uma etapa extra no processo; apresenta um padrão de glicosilação heterogêneo; apresenta dificuldade de reprodutibilidade e coerência nos ciclos de produção; além de não permitir a produção em modo de perfusão.

- Linhagens estáveis e expressão não-lítica: se baseia em mecanismos diferentes de expressão. Nesse modelo, o vetor de expressão é estável e se integra ao cromossomo da célula de inseto. A proteína recombinante então é expressa de forma que não ocorra a lise celular. As células utilizadas neste sistema são Sf9, Sf21, Hi-5 e *D. melanogaster* tal como a S2. A desvantagem mais relevante ao comparar com sistema de BEVS é a necessidade de se estabelecer uma linhagem estável de expressão, o que acaba consumindo tempo (Jongh *et al.*, 2012; John e Salgueiro, 2013).

Baseado no sistema de expressão de baculovírus, já foram produzidas VLP não envelopadas como de Parvovírus, Poliovírus, Enterovírus, Vírus da doença da infecção bursal, vírus "Bluetongue" e Rotavírus. Em relação a VLP envelopadas (eVLP), já foram descritas para o vírus da Hepatite C, SARS, Ebola e Influenza A (Zeltins, 2013), dentre outras.

O sistema de expressão baseado em S2 foi desenvolvido no começo dos anos 70 por Schneider e vem sendo usado na pesquisa há mais de 40 anos. As células de *Drosophila melanogaster* S2 são células derivadas de uma cultura primária de embriões em estágio tardio de desenvolvimento. São relativamente pequenas (8-10 μm), são muito robustas, de fácil cultivo, crescem rapidamente em meio livre de soro sem necessidade de longa adaptação e podem ser cultivadas em monocamadas e suspensão. Essas células geralmente podem alcançar densidades de até 70 milhões de células/ mL, de maior magnitude quando comparadas com outras células de insetos e mamíferos em batelada. Outro aspecto vantajoso é a facilidade e rapidez com que uma linhagem estável é obtida. Em duas a três semanas após a transfecção, populações celulares altamente produtoras são estabelecidas, enquanto que para o estabelecimento de uma linhagem CHO estável altamente produtora, podem ser necessários alguns meses e um processo de amplificação gênica (Johansson *et al.*, 2007).

Os sistemas de expressão em células de drosófilas, utilizando eficientes promotores gênicos e elevado número de cópias de plasmídeos por célula transfectada, têm obtido sucesso em relação às demais estratégias, produzindo um elevado nível de

expressão de proteínas heterólogas (Mccarroll e King, 1997). Os promotores mais utilizados para a expressão em células S2 são os promotores da actina e da metalotioneína.

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

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

A RVGP é amplamente estudada pelo grupo de nosso laboratório e seus colaboradores, havendo diversas publicações nesta área. Sua expressão utilizando a plataforma de células S2 atinge a concentração de 705 µg/mL, sendo a síntese de RVGP otimizada pelo desenho do vetor para seleção/expressão, seleção de subpolulações celulares, exposição da cromatina e emprego de meios de cultura. A RVGP expressa, foi utilizada na imunização de camundongos e apresentou proteção contra o vírus rábico no teste experimental de desafio (Ventini *et al.*, 2010; Moraes *et al.*, 2012; Astray *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2016).

A produção de HIV-1 VLP em células S2 foi descrita e apresenta maior rendimento frente a outros sistemas, como o sistema de células de mamíferos e levedura. A expressão de proteínas do HIV-1 pelo sistema de baculovírus também apresentou uma alta quantidade de VLP, no entanto, há o desafio deste sistema de expressão em separar as VLP dos BEVs recombinantes. Outro aspecto ressaltado é quanto à natureza lítica dos BEVs, o que torna necessária a produção de novos lotes de BEVs, tornando a produção

de VLP mais complexa. Assim, o sistema de S2 é uma alternativa atraente para produção de HIV-1 VLP (Yang *et al.*, 2012).

2.6 Vacinas contra CHIKV

Atualmente não existe uma vacina contra CHIKV licenciada e disponível no mercado. Diversas tecnologias podem ser usadas para o desenvolvimento de vacinas contra o CHIKV, como: vírus inativados, vírus atenuados, quimeras de *Alphavirus*, vírus recombinantes, vacinas de DNA, subunidades de proteína recombinante e, finalmente, vacinas utilizando *virus-like particle* (VLP) (Wang *et al.*, 2011).

A primeira vacina descrita para CHIKV foi preparada a partir de vírus inativado com formalina. As vacinas preparadas dessa forma, obtendo o vírus a partir do cultivo em células de embrião de galinha, não induziram uma resposta imune protetora e potente. Entretanto, vírus obtidos em células VERO induziram anticorpos neutralizantes e proteção no modelo de desafio intra-cerebral. Quando administradas a humanos, induziram anticorpos neutralizantes contra CHIKV sem o aparecimento de eventos adversos (White *et al.*, 1972).

A vacina de vírus vivo atenuado (chamado de cepa 181/ clone 25) foi desenvolvida pelo instituto americano "*US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID)*. O vírus progenitor, cepa 15561, foi isolado de um paciente virêmico durante um surto de CHIKV na Tailândia em 1962. A cepa 181/25 foi derivada de 15561 por 18 passagens seriadas em células MRC-5. Essa cepa exibiu diversas características de atenuação como: fenótipo de placas pequenas, sensibilidade à temperatura, diminuição de neurovirulência em camundongos recém-nascidos, e reduzidos níveis de viremia em macacos. CHIKV 181/25 também demonstrou proteção em macacos Rhesus. Essa vacina foi testada em estudos de Fase I e em um estudo randomizado, controlado por placebo em estudo de Fase II (Edelman *et al.*, 2000). Em todos os estudos a vacina demonstrou ser segura e bem tolerada. No estudo de Fase II, 59 indivíduos foram vacinados com uma única administração subcutânea de aproximadamente 10^5 PFU da cepa 181/25 e 14 indivíduos receberam o placebo. Apenas um indivíduo vacinado desenvolveu reação no local da injeção e nenhum voluntário apresentou febre. Entretanto, cinco indivíduos vacinados desenvolveram artralgia leve durante os 14 primeiros dias após a vacinação. Todavia, estudos recentes levantaram desconfiança sobre a vacina, uma vez que a cepa

181/25 é atenuada somente devido à substituição de dois aminoácidos, e que em uma ocasião foi descrita uma reversão à forma patogênica em camundongos (Gorchakov *et al.*, 2012).

A vacina de DNA foi desenvolvida com base na sequência das proteínas de envelope viral (E1, E2 e E3), otimizada para expressão em células de mamífero. Quando utilizada para a imunização de camundongos, a vacina foi capaz de induzir a formação de anticorpos neutralizantes (Mallilankaraman *et al.*, 2011).

As vacinas mais promissoras aparentemente são as baseadas em VLP. As VLP de CHIKV são constituídas de proteínas do envelope viral. Quando testadas em macacos, essas vacinas produziram altos níveis de anticorpos neutralizantes após administração de três doses, e protegeram os animais após o ensaio de desafio (Akahataet al, 2010). Proteínas estruturais do CHIKV foram expressas após a transfecção do cDNA em células HEK293 dando origem às VLP. As VLP foram purificadas do sobrenadante celular por gradiente de densidade. Posteriormente foi feita a caracterização *in vitro* mediante ensaio de infecção e foi avaliada a capacidade de neutralização dos anticorpos gerados. O estudo clínico de fase I (*ClinicalTrials.gov identifier*: NCT01489358) foi realizado em 25 indivíduos adultos saudáveis, sendo administradas 3 doses (10, 20 e 30 µg) nas semanas 0, 4 e 24 pela via intramuscular. Esta vacina se mostrou bem tolerada, e gerou altos títulos de anticorpos contra as três cepas de CHIKV. Um ensaio multicêntrico de fase II (Clinicaltrials.gov NCT02562482) foi iniciado em dezembro de 2015 (Weaver *et al.*, 2012; Dezure *et al.*, 2016).

A expressão de VLP *in vitro* por meio do sistema lentivírus também deu origem a uma preparação que demonstrou ser capaz de proteger camundongos deficientes em IFN tipo I contra o desafio letal com vírus CHIKV (Akahata *et al.*, 2010).

Recentemente, vacinas baseadas na mutação-atenuação viral vêm sendo o foco de ensaios pré-clinicos. Nesse caso a mutação sitio-dirigida em NoLS (*nuclear localisation sequenc*e) na região N-Terminal da proteína do capsídeo viral de CHIKV prejudicou a replicação viral *in vitro e* protegeu camundongos adultos após o ensaio de desafio (Taylor *et al.*, 2017). Ainda, uma vacina quimérica viral que combina o vírus Eliat (um vírus específico de insetos) e as proteínas estruturais de CHIKV, foi capaz de gerar anticorpos neutralizantes após uma única dose em modelo animal C57BL/6 (Erasmus *et al.*, 2017).

2.7 Vacinas contra MAYV

Até o momento, não há nenhuma vacina licenciada disponível para MAYV, sendo a estratégia de prevenção o controle do vetor e principalmente o uso de repelentes para evitar a exposição. Na literatura foram encontrados alguns candidatos vacinais contra a infecção por MAYV. Um deles consiste na inativação viral (cepa TRVL15537) por formalina. Tal vacina foi testada em camundongos CD-1 em uma única imunização. Essa vacina foi imunogênica e demonstrou ser eficaz na transferência passiva de imunidade de mãe para prole, durante o ensaio de desafio (Robinson *et al.*, 1976).

Outro candidato vacinal descrito envolve uma estratégia que teve sucesso na atenuação viral de outros *Alphavirus*. Em tal estratégia, é inserida a sequência do vírus da encefalite cardíaca (EMCV) e um sítio de entrada interno ribossomal (IRES) diretamente após o promotor subgenômico. Essa alteração do promotor subgenômico reduz a expressão das proteínas estruturais, que então são traduzidas via IRES do RNA genômico. Ocorre ainda um ineficiente reconhecimento da IRES pelos ribossomos do inseto, o que resulta em um fenótipo que também se torna incapaz de replicar em células de inseto. Testes realizados em camundongos demonstraram uma alta atenuação e a indução de anticorpos neutralizantes (Weise *et al.*, 2014).

3.OBJETIVOS

Este trabalho teve como principal objetivo desenvolver um sistema de expressão de proteínas estruturais de *Alphavirus*, em forma de VLP, utilizando células de inseto.

O trabalho envolveu algumas etapas:

- Construção de diferentes vetores plasmidiais utilizando os genes das proteínas estruturais de *Alphavirus*;
- Obtenção de um sistema S2 de expressão heteróloga capaz de sintetizar as proteínas estruturais de *Alphavirus*;
- Obtenção e detecção de VLP de MAYV e/ou CHIKV em células S2;
- Desenvolvimento de protocolos de análise adequados para a identificação da expressão recombinante das proteínas em estudo;
- Melhoramento da expressão inicial das proteínas recombinantes ou VLP por meio de seleção imunomagnética;
- Teste de imunogenicidade das proteínas estruturais de MAYV e CHIKV.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultura de células S2 (*Drosophila melanogaster* Schneider 2)

As células de *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (células S2) foram utilizadas para a transfecção e obtenção das linhagens recombinantes para expressão de proteínas estruturais de CHIKV e MAYV. As células S2 foram cultivadas em meio de cultura SF900™-III SFM (Gibco™) sem ou com adição de CDLipid (*Chemically Defined Lipid Concentrate*- ThermoFisher) na concentração de 1:100 e incubadas na temperatura de28ºC, sendo mantidas em cultivo estático ou em suspensão.

As células transfectadas ou não, foram subcultivadas quando a densidade atingiu cerca de 2-4 x 10^6 cels/mL. A manutenção do cultivo foi realizada a cada 3 ou 4 dias. As células S2, como outras células de insetos, tem a capacidade de serem cultivadas de forma estática, por serem células semiaderentes e também podem ser cultivadas em suspensão. Para os cultivos estáticos se empregou:

- Frasco T (T-*flasks*, TPP®) de 25 cm^2 e 75 cm^2 de superfície, utilizando um volume de 5 mL e 10 mL de meio de cultura respectivamente.
- Placas de poliestireno para cultivo de células de 12 e 6 poços (TPP®) com uma superfície de 3,8 e 9,5 cm^2 utilizando 2 mL e 3 mL de meio de cultura respectivamente.

Todas as vezes em que foi feita a mudança das células de cultivo estático para cultivo em suspensão, uma etapa intermediara de adaptação de células foi realizada antes de iniciar um experimento. Essa adaptação foi realizada com uma simples diluição (1:4) do inoculo de um frasco de T 25 cm^2 com 80-90% de confluência em 15 mL de meio de cultura fresco e transferidos para frasco tipo Schott de 100 mL e mantidos em agitação por 2 dias. Após esse período, as células estão adaptadas para iniciar um novo experimento sob agitação.

4.1.1 Congelamento e Descongelamento

A conservação de célula por congelamento ou criopreservação é um método que permite manter intactas as propriedades metabólicas da célula no momento em que são congeladas.

As células em fase exponencial, com alta viabilidade (> 95 %) foram centrifugadas a 300g por 5 minutos. As células foram então ressuspendidas em meio de congelamento (50% de SFB- Soro Fetal Bovino, 40% de SF900™-III SFM (Gibco™) e 10 % de DMSO (Dimetilsulfóxido) com uma concentração de 10^7cels/mL e distribuídas em alíquotas de 1 mL por criotubo. Os criotubos foram transferidos para o container de congelamento (Mr. Frosty™ Freezing Container - ThermoFisher) e resfriados 1 ºC/ minuto a -80ºC.No dia seguinte, os criotubos foram transferidos para o nitrogênio líquido para a conservação das células. Desta forma, foi estabelecido um banco de células de cada subpopulação.

Para o descongelamento das células, um criotubo foi retirado do nitrogênio líquido, descongelado parcialmente a 37 °C, transferido para um frasco T 25 cm^2 contendo 4 mL de meio de cultura SF900™-III SFM (Gibco™). Após 24 horas ocorreu a adesão celular no frasco de cultivo e o meio de cultura foi totalmente trocado adicionando meio de cultura fresco, desta forma é retirado do meio de congelamento contendo DMSO. Em seguida, as células foram mantidas a 28 °C.

4.1.2 Determinação da concentração e viabilidadede celular

Neste trabalho, os parâmetros de cultivo de concentração e viabilidade foram determinados mediante a contagem de células em câmara de Neubauer. Uma diluição apropriada da suspensão celular com o corante azul de Tripan (0,2 %) foi aplicado na câmara e foi realizada a contagem de células viáveis e não viáveis (azuis) em um microscópio invertido. Para determinação da viabilidade celular foi empregada a técnica de exclusão por corante. Essa técnica se baseia em que certos corantes, como o azul de Tripan, não são capazes de penetrar nas membranas intactas, e somente naquelas que tem sua permeabilidade aumentada, um efeito associado com a perda da viabilidade.

A viabilidade celular foi determinada pela razão entre o número de células viáveis e o número de células total no meio (células viáveis e inviáveis), multiplicados por 100, e a concentração celular determinada após a correção dos cálculos de diluição e a multiplicação por 10.000, obtendo-se assim o número de células por mililitro de suspensão (céls/mL).

4.1.3 Determinação da taxa específica de crescimento

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

$$\frac{dXv}{dt} = \mu . X_v$$

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

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

Plotando os pontos do logaritmo neperiano de Xv contra o tempo, temos uma curva de crescimento celular (ln(Xv)=f(t)) que ao ser linearizado (ln(Xv)=f(t)), representa uma reta durante a fase exponencial de crescimento. A taxa específica máxima de crescimento (μmáx) foi obtida através da derivação dessa reta para a obtenção do coeficiente angular correspondente a μmáx.

4.2 Obtenção dos vetores de expressão

Três construções distintas foram obtidas para a análise da expressão das proteínas estruturais do CHIKV e MAYV em células S2. Substancialmente, além da diferença da sequência gênica entre as proteínas estruturais dos vírus, o vetor pode possuir ou não o gene de resistência a higromicina. Para aquele vetor que não possui esse gene foi realizada a co-transfecção do vetor de interesse com o vetor de seleção comercial pCOHygro - Thermo Fisher Scientific™.

4.2.1 Obtenção do vetor pMT-CHIKV

O cDNA das proteínas estruturais de CHIKV linhagem 37997 (GenBank: AY726732.1) do Oeste da África foi sintetizado pela empresa GeneCust (pUC-CHIKV). Após verificação de homologia superior a 95% para a região das proteínas estruturais em relação aos sequenciamentos publicados dos vírus circulantes no Brasil (Belém KP164572.1; Recife KP164571.1; Feira de Santana KP164570.1; Oiapoque KP164567.1) a sequência do vírus do Senegal foi escolhida com base em outros trabalhos que também utilizaram essa sequência para produção de VLP.

Para a construção do vetor de expressão foi utilizado o vetor pMT/V5-His (3.5 kb) (Thermo Fisher Scientific™). Tal vetor possui o promotor indutível da metalotioneína (pMT) que é induzido com a adição de metáis pesados, como o sulfato de cobre, gene de resistência à ampicilina para seleção em bactérias, possui ainda a sequência de poli-adenilação do vírus SV40, origem de replicação em bactérias (*Ori*), epítopo de detecção V5 para uma rápida detecção com anticorpo anti-V5 e uma His-tag, para uma purificação através de proteínas de fusão utilizando resinas de níquel (Figura 5, A).

Figura *5*. Vetor comercial pMT/V5His do sistema de expressão em células S2-Invitrogen:

A) Mapa do vetor pMT/V5-His (3.5 kb) . B) Região de policlonagem do vetor pMT/V5-His (3.5 kb).

Primeiramente, foi obtida a construção do pMT-CHIKV por técnicas de clonagem. Para tanto, ambos vetores (pUC-CHIKV e pMT/V5-His) foram digeridos com as enzimas *EcoRI* e *NotI* por 4 horas a 37 ºC. A seguir, a digestão foi confirmada por eletroforese em gel de 0,8% de agarose. O vetor pMT/V5-His e o fragmento de 3790 pb referente a região codificante das proteínas estruturais do CHIKV foram recuperados do gel de agarose com o kit *Wizard ® SV Gel e PCRclean-Up System* seguindo as recomendações do fabricante. A inserção do fragmento contendo as proteínas estruturais do CHIKV dentro da região do policlonagem do vetor (Figura 5 B) foi realizada com o kit T4 ligase (Promega) *overnight* a 4 ºC na proporção de 1:1 (vetor: inserto).

O produto da ligação foi utilizado para transformação de bactérias DH5α para análise da obtenção do vetor pMT-CHIKV. Para isso, as bactérias DH5α foram transformadas por choque térmico na proporção de 5:50 (ligação:bactérias), foi

adicionado 200 μL de meio SOC, incubados a 200 rpm a 37 °C, plaqueadas em meio LB (Luria Bertani) sólido contendo ampicilina (100 μg/mL) e incubadas *overnight* a 37 °C.

As colônias resistentes a ampicilina foram submetidas a uma extração de DNA plasmidial e foi analisado o padrão de digestão de enzimas de restrição e o sequenciamento gênico para a confirmação da construção.

4.2.2 Obtenção do vetor pMT-CHIKVHy

O vetor pMT-CHIKV foi empregado para a obtenção do vetor pMT-CHIKV-Hy pela inserção do gene de resistência à higromicina. Tal etapa foi realizada durante um período de estágio no exterior, no iBET- Portugal. A inserção do gene de resistência à higromicina no pMT-CHIKV foi feito com o kit *in-fusion HD cloning Plus* (Takara), que contém os reagentes necessários para clonagem, a enzima para PCR, bactérias competentes e kit de purificação do gel, sendo um sistema alternativo de clonagem mais simples e rápido apresentando uma eficiência de 95%. Com esse método, 2 μg do vetor pMT-CHIKV foram linearizados com enzima *SalI* (Thermo Fisher®) por 2 horas a 37 ºC e o inserto contendo o gene da higromicinina (pCOHygro®) foi amplificado por PCR por 18 ciclos utilizando DNA polimerase de alta fidelidade e os *primers* específicos descritos na tabela 2.

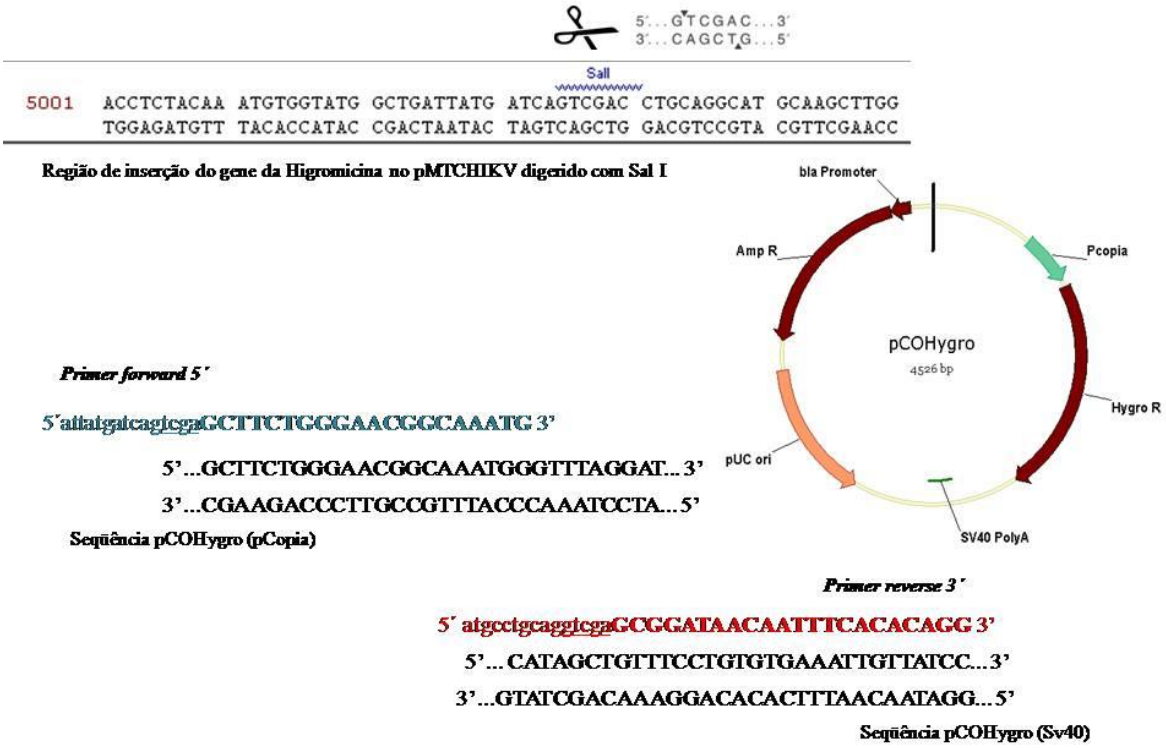
Tabela 2- Características dos *primers* desenhados para amplificação do gene da higromicina

	***Primers* desenhados para construção do pMT-CHIKV -Hy**	**TM**
***Primer forward* Hygro**	5´ATTATGATCAGTCGAGCTTCTGGGAACGG CAAATG 3´	56,9
***Primer reverse* Hygro**	5´ATGCCTGCAGGTCGAGCGGATAACAATTT CACACAGG 3´	53,8

Os *primers* foram desenhados com auxílio de uma plataforma on-line disponível no site da *Clontech "Online In-Fusion Tools - Clontech*", de forma que cada *primer* continha duas características: a região 5´ do *primer* com 15 bases homólogas a 15 bases

da região final do fragmento do vetor pMT-CHIKVlinear (*Sal I*), e a região 3´ do *primer* contendo a sequência específica ao gene alvo – pCOHygro. A porção 3´ de cada *primer* foi desenhada de forma que o conteúdo de GC ficou entre 50%, temperatura de *melting* (Tm) média de 58ºC, conforme as instruções do kit de clonagem, com base no esquema da figura 6.

Figura 6. Desenho dos *primers* para amplificação do gene da Higromicina à partir do pCOHygro



O produto da PCR foi separado por eletroforese em gel de agarose 1% com corante *GelRed*, purificado do gel e submetido à ligação conforme as instruções do fabricante. Os produtos das ligações foram inseridos em bactérias *Stellar* por choque térmico como previamente já descrito para DH5α. As colônias resistentes à ampicilina foram submetidas a uma extração de DNA plasmidial para análise da construção obtida através do padrão de digestão das enzimas de restrição e o sequenciamento gênico.

4.2.3 Obtenção do vetor pMT-MAYV-Hy

O cDNA das proteínas estruturais do vírus Mayaro foi obtido do isolado de vírus selvagem BeAr20290 (GenBank: KT754168.1), o vírus foi gentilmente cedido pelo professor Maurício Nogueira da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - UMERP. Primordialmente, o RNA viral foi extraído utilizando o kit *QIAamp Viral RNA Mini*, e o cDNA foi sintetizado utilizando um *primer* específico (descrito na tabela 3) para a região das proteínas estruturais(C-E3-E2-6k-E1) e uma enzima de alta fidelidade (MML-V).

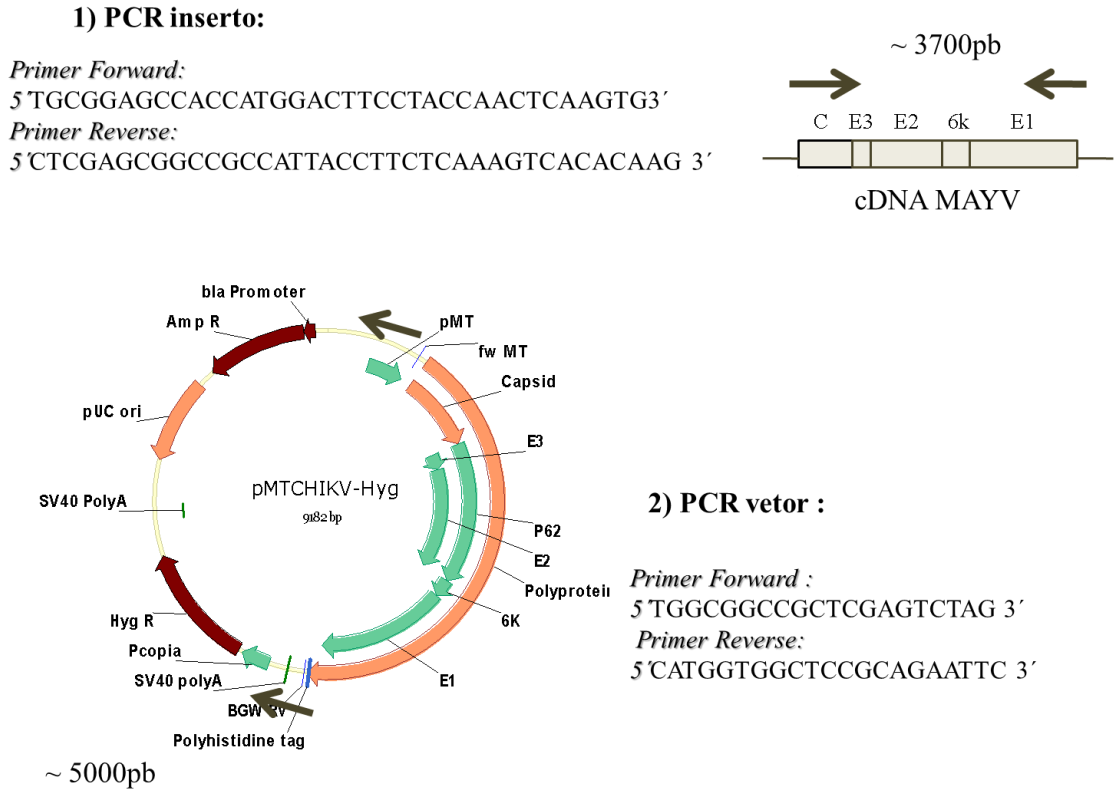
Tabela 3- Características dos *primers* desenhados para obtenção do pMT-MAYV-Hy

	***Primers* desenhados para construção do pMT-MAYV-Hy**	**TM**
***Primer* para transcrição reversa:**	5´ttaccttctcaaagtcacacaagt 3´	
***Primer forward* vetor:**	5´TGGCGGCCGCTCGAGTCTAG 3´	68,8
***Primer reverse* vetor:**	5´CATGGTGGCTCCGCAGAATTC 3´	64,5
***Primer forward* inserto:**	5´TGCGGAGCCACCATGGACTTCCTACCAACTCAAGTG 3´	58,1
***Primer reverse* inserto:**	5´CTCGAGCGGCCGCCATTACCTTCTCAAAGTCACACAAG 3´	58,4

A obtenção do pMT-MAYV-Hy foi originária do vetor pMT-CHIKV-Hy através do kit *Infusion*. A amplificação do fragmento pMT-Hygro (vetor) e a região codificante das proteínas estruturais do MAYV (inserto) foi realizada com pares de *primers* específicos e homólogos (tabela 3), estes foram desenhados conforme foi descrito para a inserção do gene da higromicina no vetor pMT-CHIKV-Hy.

O produto do PCR foi analisado conforme já foi descrito para obtenção do vetor pMT-CHIKV-Hy.

Figura 7- Esquema de obtenção do vetor pMT-MAYV-Hy



4.3 Obtenção das células S2 recombinantes

Com os diferentes vetores obtidos, foi realizada a transfecção em células S2 utilizando o lipossoma *Cellfectin Reagent* (Life Technologies). Um total de $5x10^6$ células S2 foram inoculadas em frasco T 25 cm^2 um dia antes da transfecção. A solução de transfecção foi preparada em duas etapas, conforme as instruções do fabricante. Para a co-transfecção, foi utilizado 10 µg do pMT-CHIKV (vetor de expressão) e 1 µg do vetor de seleção (pCOHygro) em 500 µL de meio de cultura SF900™-III SFM. Para a transfecção do pMTCHIKV-Hy e pMT-MAYV-Hy, foi diluído 4 µg do vetor em 500 µL de meio. Em seguida, cada solução foi misturada gentilmente com a solução previamente preparada contendo 20 µL de Cellfectin e 480 µL de SF900™-III SFM (Gibco™) a solução final foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, o meio de cultura das células foi substituído por 1 mL da solução de transfecção e a cultura foi incubada a 28 °C por 5 horas. Em seguida, foram adicionados 4 mL de meio de cultura

SF900™-III SFM (Gibco™) ao frasco e as células transfectadas foram incubadas por 48 horas a 28 °C e após esse período iniciou-se a seleção.

A seleção da população transfectada foi feita pela adição de 300 µg/mL de higromicina ao meio de cultura. A cada passagem de célula foi adicionada a mesma concentração de higromicina, assim como ao controle da transfecção (células S2 selvagens).

As células foram consideradas selecionadas no momento em que todas as células da cultura selvagem estavam mortas e neste momento retiramos a pressão seletiva das culturas transfectadas e seguimos para análise de expressão das proteínas estruturais de CHIKV e MAYV e preparamos um banco de células. As populações foram nomeadas da seguinte forma:

- ***S2MT-CHIKV***: população de células obtida da co-transfecção dos vetores pMTCHIKV e pCOHygro
- ***S2MT-CHIKV-Hy****:* população de células obtida da transfecção do vetor pMTCHIKV-Hy.
- ***S2MT-MAYV-Hy:*** população de células obtida da transfecção do vetor pMTMAYV-Hy

4.3.1 Enriquecimento populacional das linhagens S2MT-MAYV-Hy e S2MT-CHIKV-Hy por seleção imunomagnética - iMAC

A estratégia de seleção positiva através de colunas Miltenyi consiste na separação magnética de células alvo e a sua coleta para posterior cultivo. Esta técnica oferece a vantagem de alta especificidade de anticorpos monoclonais para o isolamento de células de alta pureza quanto à expressão do antígeno pesquisado e permite o cultivo, entre outras aplicações, das células marcadas logo após o procedimento de separação *iMACs*. Além disso, não há a necessidade de remoção das *microbeads* das células devido ao tamanho (aproximadamente 50nm de diâmetro, comparável ao tamanho de uma partícula viral) e composição das mesmas (polissacarídeo e óxido de ferro), que as tornam biodegradáveis. Fator relevante que precisa ser levado em consideração é que a utilização das microbeads

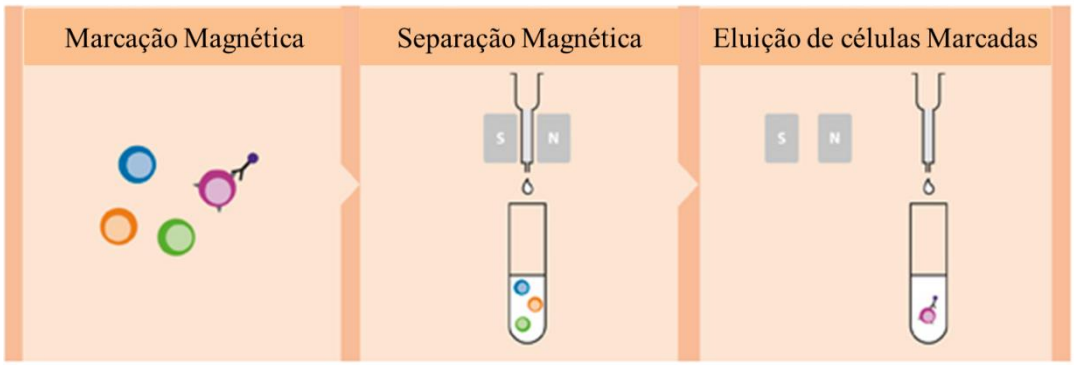
não ativam ou influenciam na função ou viabilidade celular, tampouco na aparência microscópica.

A técnica MACs, através de seleção positiva, pode ser aplicada para a maioria das marcações específicas, permitindo pureza, excelente recuperação das células marcadas e isolamento de células raras quando nenhuma etapa de separação subsequente é necessária.

O procedimento a seguir foi realizado conforme o protocolo descrito por MAC Miltenyi Biotec, com algumas modificções (Santos, N.G.L. *et al.*, 2016). Para a realização da técnica, as linhagens celulares S2MTMAYV-Hy e S2MTCHIKV-Hy foram induzidas com 1 mM de $CuSO_4$ em frascos T75 cm^2 de cultivo para a expressão das proteínas estruturais. Após 5 dias, foram separadas 3,4 x 10^7 células totais, centrifugadas a 300 g por 5 minutos a 7 ˚C para eliminar o meio de cultura e lavadas com PEB (PBS EDTA, 2 mM BSA 0,5 %). Em seguida, o precipitado celular foi ressuspendido em 340 μL de PEB, onde foram adicionados 15μL do anticorpo primário soro hiperimune de camundongo anti-MAYV e anti-CHIKV, e incubado a 4˚C por 10 minutos, sendo posteriormente lavado por duas vezes adicionando 3,4 mL de PEB. Foi novamente centrifugado, o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuspendido em 272 μL de PEB e 68 μL de *microbeads* e incubado por 15 minutos a 4˚C, seguido de uma lavagem com 3,4 mL de PEB.

O sobrenadante foi descartado e 500 μL de PEB foram adicionados ao pellet. A coluna para separação das células foi preparada com 500 μL de PEB e a suspensão celular aplicada, descartando o que passava diretamente pela coluna. Esta foi lavada por três vezes com PEB, removida do separador magnético e posicionada em tubo coletor estéril. Foi adicionado 1 mL de meio de cultura SF900™-III SFM (Gibco™) e as células eluídas com o auxílio de um êmbolo. O princípio da técnica segue conforme a ilustração abaixo.

Figura 8 - Representação da seleção imunomagnética



O conteúdo celular marcado e coletado foi cultivado em placa de 12 poços até atingir a confluência de 100% para a transferência à placa de 6 poços e frascos T25. Posteriormente, foi feito o congelamento das linhagens selecionadas, sendo então nomeadas como:

- ***S2MT-MAYV-Hy-M1:*** população de células obtida da transfecção do vetor pMTMAYV-Hy selecionadas por iMAC.
- ***S2MT-CHIKV-Hy-M1*:** população de células obtida da transfecção do vetor pMTCHIKV-Hy selecionadas por iMAC.

4.4 Detecção de proteínas estruturais de CHIKV e MAYV

4.4.1. Imunofluorescência indireta-IFI

Para o ensaio de IFI, as células em camadas confluentes foram coletadas, lavadas com PBS 1x, gotejadas na lâmina, fixadas com metanol-acetona (1:1), incubadas 20 minutos à temperatura ambiente, lavadas novamente com PBS 1x. E em seguida incubadas com anticorpo primário anti-CHIKV e anti-MAYV (descrição na tabela 4) e posteriormente incubadas a 37 °C por 1 hora. A lâmina foi lavada 3 vezes com PBS 1x e adicionado o anticorpo secundário anti-mouse IgG conjugado a FITC e incubado à temperatura ambiente por 1 hora ao abrigo da luz e lavadas novamente. As amostras foram mantidas protegidas da luz até o momento da visualização em microscópio de fluorescência Olympus BX21. As imagens foram adquiridas por meio do aplicativo CellSens (Olympus).

Tabela 4- Características dos Anticorpos utilizados no ensaio de IFI

Anticorpos	Breve descrição	Diluição
Anticorpo Policlonal anti-CHIKV	(ATCC® VR-1241AF™) *Hyperimmune ascitic fluid (Mouse*) – N.I.H. Research Referecence Reagent - produzido em camundongo.	1:250
Anticorpo Policlonal anti-MAYV	(ATCC® VR-1277AF™) *Hyperimmune ascitic fluid (Mouse)* – N.I.H. Research Referecence Reagent - produzido em camundongo.	1:250
Anticorpo IgG-FITC	FITC-Goat Anti-mouse Invitrogen ® Ref:626511	1:250

4.4.2. Citometria de Fluxo (FACS)

Para avaliar quantitativamente a porcentagem de células que expressam as proteínas estruturais de CHIKV e MAYV foi realizado um ensaio por Citometria de fluxo (FACS).

Neste ensaio, cada amostra contendo 10^6 células foi centrifugada (750g/5min), e o sobrenadante descartado. Os precipitados celulares foram incubados com 50 μL de anticorpo primário policlonal anti-CHIKV (descrição na Tabela 5) e incubados por 1 hora a temperatura de 4 ºC. Após a ligação do anticorpo primário, as células foram novamente centrifugadas e em seguida ressuspendidas com anticorpo secundário IgG FITC anti-mouse e incubados a 4 ºC por 1 hora. Novamente as células foram centrifugadas e ressuspendidas em solução de PBS e armazenadas ao abrigo da luz. A análise da proporção de células fluorescentes e da mediana de fluorescência foram realizadas no aparelho FACSCanto (Becton Dickinson), a partir da contagem de 10.000 eventos para

cada amostra. A o anticorpo conjugado ao FITC é detectado pelo filtro de 530nm (FL1) sendo capaz de detectar a proteína marcada pela fluorescência.

Tabela 5- Características dos Anticorpos utilizados no ensaio Citometria de fluxo

Anticorpos	Breve descrição	Diluição
Anticorpo Policlonal anti-CHIKV	(ATCC® VR-1241AF™) *Hyperimmune ascitic fluid (Mouse*) – N.I.H. Research Referecence Reagent - produzido em camundongo.	1:250
Anticorpo Policlonal anti-MAYV	(ATCC® VR-1277AF™) *Hyperimmune ascitic fluid (Mouse)* – N.I.H. Research Referecence Reagent - produzido em camundongo.	1:250
Anticorpo IgG-FITC	FITC-Goat Anti-mouse – Invitrogen ®Ref:626511	1:250

4.5 Produção de VLP (partículas virais semelhantes a vírus)

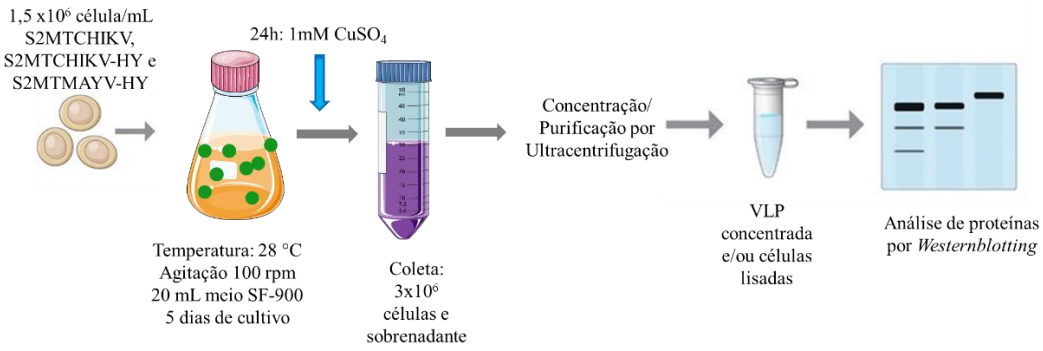
Para a produção de VLP de MAYV e CHIKV, células S2MTCHIKV, S2MTCHIKV-HY e S2MTMAYV-HY foram inoculada na concentração de $1{,}5x10^6$ cels/mL e cultivadas por 5 dias a 28ºC em frasco tipo Schott contendo 20 mL de meio de cultura SF900™-III SFM (Gibco™), sob agitação de 100 rpm. As células foram induzidas após 24 horas por adição de 1 mM de $CuSO_4$, e a análise da expressão de proteína foi feita após 96 horas de indução por *Western blotting* (Figura 9).

Para análise, foram retiradas amostras de cada subpopulação contendo 3 $x10^6$ células e o sobrenadante do cultivo foi coletado por ultracentrifugação (procedimento descrito a seguir) e armazenado a –20 ºC até o momento da análise.

Este método de produção de VLP foi utilizado para os experimentos preliminares de detecção de VLP no sobrenadante, para os ensaios de comparação de expressão das

proteínas de CHIKV (item 5.5), para a comparação da expressão em meio de cultivo suplementado (item 5.6), e também para os ensaios de formação de VLP (item 4.9).

Figura 9- Esquema representativo do método de produção de VLPs



4.6 Análise da expressão recombinante

4.6.1 Detecção de proteínas em células

Para análise de expressão em amostra de célula é necessária uma etapa de lise e obtenção de extratos celular. A lise celular foi feita com agente químico RIPA (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% NP40 e pH 7,4). Esse tampão foi definido com base em trabalhos científicos publicados para extração protéica de células de inseto. Para a lise, pellets contendo $3x10^6$ células foram descongelados e foi adicionado 200 µL do tampão de lise, homogeneizados por vortex por 10 segundos e incubados no gelo por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 8000 g por 15 minutos a 4 º C. O sobrenadante foi então separado para análise por *Western blotting*.

4.7 Concentração de VLP para detecção de proteínas no sobrenadante

4.7.1 Colchão de sacarose

Para analisar a presença de proteínas estruturais de MAYV e CHIKV no sobrenadante do cultivo, uma etapa de concentração foi necessária. O sobrenadante dos cultivos de células S2MT-CHIKV, S2MT-CHIKV-HY e S2MT-MAYV-HY foi coletado, clarificado por centrifugação a 8000 g por 15 minutos para remoção de células

e debris e por filtração a 0,45 μm e a seguir, foi realizada a concentração por ultracentrifugação a 149000 g por 1,5 horas a 4 °C hora utilizando o rotor MLA-50. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1,5 mL de tampão TNE (0,01 M Tris-HCl, pH 7,2, 0,1 M NaCl, 0,001 M EDTA).

Para obter uma amostra purificada, uma segunda ultracentrifugação foi feita a 188.000 g em 7 mL de sacarose a 20 %, por 2 horas a 4 ºC. O pellet foi ressuspendido em tampão TNE de forma que obtivemos uma amostra 100x concentrada e armazenado a -20 ºC até a análise.

4.7.2 Gradiente de iodixanol

Uma alternativa aos gradientes de sacarose, o Opti-prep (Iodixanol) foi utilizado para a separação da proteína solúvel das VLP. Existem muitos artigos que relatam o uso de gradientes de iodixanol não só para purificar vírus, mas também para investigar a montagem viral. O protocolo utilizado foi descrito para purificação de vírus de RNA do Grupo IV conforme orientação do fornecedor.

Primordialmente foram preparadas as seguintes soluções:

- *Solução diluente* (EDTA 3 mM, Tris-HCL 0,3 M em pH 7,4).
- *Solução de suspensão* (NaCl 0,1 M, EDTA 0,5 mM e Tris-HCL 50 mM em pH 7,4).
- *Solução trabalho- Iodixanol* (Iodixanol 50%, 0,5 mM EDTA, Tris-HCL 50 mM em pH 7,4).
- *Iodixanol 30% e 5%:* partindo da solução de trabalho foram preparadas as soluções de concentração de 30 e 5% de iodixanol diluindo com a solução diluente. Obs: A concentração de cada solução foi aferida com o uso de refratômetro.

Para a separação das partículas do sobrenadante, primeiramente uma etapa de clarificação foi realizada por centrifugação à 7000 g por 15 minutos na temperatura de 4˚ C. A seguir, o sobrenadante foi filtrado a 0,45 μm e a suspensão com VLP foi concentrada por ultracentrifugação a 149000 g por 1 hora utilizando o rotor MLA-50. O pellet obtido foi resuspendido por 12 horas em solução de suspensão no volume de 1,5 mL mantidos na temperatura de 4℃. Seguidamente, a suspensão de partículas foi centrifugada com uma

solução de Iodixanol- 5% (7 mL) através da ultracentrifugação à 149000 g por 1 hora na temperatura de 4˚C no mesmo rotor. Mais uma vez, o pellet obtido foi deixado por 12 horas em solução de suspensão no volume de 0,5 mL mantidos na temperatura de 4 ℃. O passo de formação do gradiente foi realizado em tubos de 6 mL sendo utilizado 2 mL da solução iodixanol 30 % ao fundo do tubo e 2 mL da solução a 5% na parte superior, ao topo do gradiente foi colocada com cautela uma camada de 0,5 mL da suspensão viral e a seguir foi submetido a ultracentrifugação a 160000 g por 1,5 horas na temperatura de 4℃ utilizando o rotor MLS-50. O volume aproximado de 1mL foi coletado, correspondente ao anel formando contendo as VLPs, foi verificada a concentração desta fração coletada com a utilização do refratômetro e feita uma análise por *Western blotting* (como descrito abaixo).

4.8 *Western blotting*, detecção das proteínas estruturais de CHIKV e MAYV

Para identificar a expressão das proteínas, o sobrenadante celular concentrado e as células S2 recombinantes lisadas foram analisadas por *Western blotting*.

Para a marcação com os anticorpos policlonais da ATCC anti-CHIKV e anti-MAYV (Tabela 6) foi necessário tratar a amostra com tampão redutor 4x (Tris 0,5 M, pH 6,8 glicerol SDS 10%, azul de bromofenol 1% e betamercaptoetanol 1% em água miliQ) e uma incubação a 70 °C por 10 min.

Tabela 6- Características dos Anticorpos utilizados no ensaio de *Western blotting*

Anticorpos	Breve descrição	Diluição
Anticorpo Policlonal anti-CHIKV	(ATCC® VR-1241AF™) *Hyperimmune ascitic fluid (Mouse*) – N.I.H. Research Referecence Reagent - produzido em camundongo.	1:250
Anticorpo Policlonal anti-MAYV	(ATCC® VR-1277AF™) *Hyperimmune ascitic fluid (Mouse)* – N.I.H. Research Referecence Reagent - produzido em camundongo.	1:250
Anticorpo Monoclonal CHIKV (CHIKV-Env)	(HM337) – EastCoast Bio – produzido em camundongo.	1:2000
Anticorpo IgG anti-camondongo –HRP	Anti- mouse IgG, conjugado HRP-horseradishperoxidase - Invitrogen.	1:5000

O fracionamento das proteínas de sobrenadante ou provenientes da lise celular foram realizados em gel SDS-PSGE 12% por 2 horas a 100 V, sendo que um volume de amostra de 25 µL foi aplicado e usado o padrão de peso molecular *Page Ruler Plus Prestained Protein ladder*. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Protran®) por um sistema semi-Dry (Bio-Rad, Hercules, CA) através de um protocolo adaptado do método descrito por Sambroock, et al., 1989. As membranas foram bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado em tampão PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, foi feita uma lavagem com PBS 1x por 5 minutos.

Os anticorpos primários anti-CHIKV, anti-CHIKV-E2 monoclonal ou anti-MAYV (tabela 6) foram diluídos em PBS 1x com 1 % de BSA sendo a membrana incubada por 12 horas (*overnight*) a 4 ºC. Após realizadas 3 lavagens de 10 minutos com PBS 1x, em seguida foi adicionado o anticorpo anti–IgG secundário conjugado à peroxidase por 2 horas à temperatura ambiente e lavadas novamente nas condições acima

descritas. A revelação foi realizada pela metodologia de ECL (Cyanagen) e a captura da imagem realizada em sistema automatizado (Uvitec- Alliance) com auxílio do s*oftware* Alliance.

4.9 Avaliação de formação de VLP

Para avaliar a formação das VLP produzidas por células S2, foram utilizados equipamentos e técnicas que tínhamos disponíveis e em colaboração com outros laboratórios de pesquisa. Tais técnicas são:

Nanosight: iBET, Oeiras – Portugal. Foi avaliada a formação de VLP por análise em microscopia Nanosight. A técnica detecta e visualiza populações de nanopartículas em meio líquido, sendo capaz de mensurar seu tamanho, concentração e agregação. Para tal análise, 20 mL de sobrenadante de cultivo de células S2MTCHIKV induzidas com $CuSO_4$ e não induzidas (controle) foram coletados após 96 horas, concentrados por ultracentrifugação com sacarose 20% (etapa previamente já descrita) e ressuspendidos em tampão PBS 1X de forma que a amostra final estivesse concentrada cem vezes.

Zetasizer: Laboratório de Vacinas Aeróbicas, Instituto Butantan. Esse equipamento permite analisar tamanho de partículas com melhor detecção de agregados, podendo efetuar a medição de amostras pequenas ou diluídas ou amostras com concentração elevada. Da mesma forma, 20 mL de sobrenadante de cultivo de células S2MTCHIKV-Hy induzidos com $CuSO_4$ foram coletados após 96 horas do tempo de indução, concentrados por ultracentrifugação com sacarose 20% (etapa previamente já descrita) e ressuspendidos em tampão PBS 1X de forma que a amostra final estivesse concentrada cem vezes. As amostras foram lidas em triplicatas pelo equipamento.

Microscopia Eletrônica de transmissão: Laboratório de Biologia Celular, Instituto Butantan. Para avaliação do brotamento de partículas das células S2, as células S2MT-CHIKV-HY E S2MT-MAYV-HY foram cultivadas em frasco tipo Schott no volume de trabalho de 20 mL, induzidas com $CuSO_4$ e coletadas por centrifugação após 72 horas de indução.

Para avaliar a presença de VLPs presentes no sobrenadante do cultivo, o sobrenadante foi coletado após 96 horas de indução e ultraconcentrado por sacarose e/ou Iodixanol.

O preparo da amostra para microscopia eletrônica de transmissão e as fotos foram feitas no laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan pela técnica Simone Gonçalves Jared.

Para analisar o brotamento de VLP em células, um total de 10^7 células foi separado por centrifugação, o meio de cultura retirado, e as células foram lavadas com uma solução de tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 e fixados com solução de aldeído glutárico 2,5% com formaldeído 2%. Após 2 horas de incubação, o fixador foi retirado e o material passou por três banhos de 5 minutos em tampão cacodilato de sódio 0,1M. Após este processo iniciou-se a pós-fixação com uma solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M por 1 hora à temperatura ambiente. As células foram lavadas em água destilada e seguiram para uma gradual desidratação etílica de 15 minutos cada banho (70, 80, 90 e 2x 100% etanol).

Na etapa final de desidratação, o material ficou imerso em óxido de propileno + resina Epon® (Electron Microscopy Science, PA, EUA) (1:1) durante 4 horas. A mistura foi substituída por resina Epon® pura, permanecendo as células nesta solução por 12 horas. A inclusão das células foi feita em formas de silicone preenchidas com a mesma resina, sendo esta polimerizada após 72 horas em estufa a 65 ºC.

Após o debaste dos blocos de resina, foram feitos cortes semifinos em ultramicrotomo Leica EM UC7 com espessura de 1 μm. Estes cortes foram montados em lâmina de vidro, corados com azul de toluidina e visualizados ao microscópio de luz. Escolhida a região de interesse do bloco, foram feitos cortes na espessura de 60 nm no mesmo aparelho, utilizando dessa vez navalha de diamante. Posteriormente, os cortes foram colocados em telas de cobre, que foram contrastadas em uma solução de acetato de uranila 4% por 30 minutos, posteriormente lavados em água e colocados em uma solução de citrato de chumbo a 10%. Após serem novamente lavados, retirou-se o excesso de água destilada e as telas de cobre foram acondicionadas e mantidas em ambiente resfriado. O material foi analisado e fotografado em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss (Leo 906 E).

4.10 Avaliação da expressão em diferentes linhagens de células

4.10.1 Avaliação da concentração ideal do indutor$CuSO_4$ em células S2MT-CHIKV por IFI

Preliminarmente, um ensaio para avaliar a concentração ideal de uso do indutor $CuSO_4$ para expressão da proteína de interesse foi realizado. Neste ensaio, 10^6 células S2MT-CHIKV foram inoculadas em cada poço da placa de 6 poços em meio de culturaSF900™-III SFM (Gibco™) em seguida induzidas pela adição de diferentes concentrações de $CuSO_4$, e incubadas a 28ºC. Após 48 horas de indução, as células foram coletadas e analisadas por IFI.

4.10.2 Avaliação do tempo de expressão das proteínas em células S2MT-CHIKV por IFI

Após determinar a concentração ideal do indutor, foi necessário avaliar o tempo de expressão a nível celular das proteínas estruturais do CHIKV e MAYV por microscopia de fluorescência, para isto10^6 células S2MT-CHIKV foram inoculadas em cada poço da placa de 6 poços em meio de cultura SF900™-III SFM (Gibco™) em dias consecutivos (1-5 dias), em seguida induzidas com adição de 1 mM de $CuSO_4$, e incubadas a 28ºC.As células foram coletadas após 5 dias.

4.10.3 Comparação da expressão de proteínas entre os vetores pMT-CHIKV e pMT-CHIKV-Hy por IFI

Após a inserção do gene da Higromicina no vetor de expressão, foi necessário avaliar se a presença do gene de seleção a no vetor faria a diferença nos níveis de expressão da proteína de interesse. Para tal, 10^6 células S2MT-CHIKV, S2MT-CHIK-Hy e S2 selvagem (controle negativo) foram cultivadas em duplicata, em placa de 6 poços com meio de cultura SF900™-III SFM (Gibco™) induzidas com 1 mM de $CuSO_4$ e coletadas após 4 dias de indução.

4.10.4 Comparação da expressão de proteínas entre os vetores pMT-CHIKV e pMT-CHIKV-Hy por citometria de fluxo

Paralelamente ao ensaio anteriormente descrito, foi determinada a quantidade de células CHIKV positivas por citometria de fluxo com a finalidade de avaliar se a presença do gene da higromicina no vetor faria a diferença nos níveis de expressão da proteína de interesse. Da mesma forma, 10^6 células S2MT-CHIKV, S2MT-CHIK-Hy e S2 selvagem (controle negativo) foram cultivadas em duplicata, em placa de 6 poços com meio de cultura SF900™-III SFM (Gibco™) induzidas com 1 mM de $CuSO_4$ e coletadas após 4 dias de indução e seguiu-se com o protocolo de marcação de anticorpos previamente já descrito.

4.10.5 Comparação da expressão de proteínas em células S2MT-CHIKV e S2MT-CHIKV-Hy cultivadas em meio de culturaSF900™-III SFM (Gibco™) suplementado

A produção de eVLP (core, membrana lipídica e camada de glicoproteínas) é de maior complexidade que de VLP não envelopadas, das quais são estruturalmente mais simples pois no processo de brotamento uma parte da membrana celular é carregada juntamente com a partícula. Esse processo, acaba danificando a integridade da membrana celular, podendo levar a morte celular. Afim de manter e prolongar o crescimento celular, a adição de uma emulsão de concentrado lipídico (CDlipid Concentrate- Gibco™) foi adicionado no meio de cultura SF900-III, sendo esta emulsão normalmente usada para reduzir o uso de soro fetal bovino (SFB) em meios de cultura.

Assim, neste ensaio a avaliação de expressão de VLP em células S2MT-CHIKV e S2MT-CHIKV-Hy foram cultivadas em meio SF900™-III SFM e SF900™-III SFM suplementado, em frasco tipo Schott, com 20 mL de meio de trabalho. As células foram induzidas com 24 horas de cultivo e o sobrenadante contendo as VLP foi coletado separadamente após 96 horas de indução e concentrado conforme o protocolo descrito do colchão de sacarose (item *4.7.1*). Após a concentração, a expressão de VLP foi avaliada por *Western blotting.*

4.10.6 Comparação da expressão de proteínas de MAYV em células S2MT-MAYV-Hy após a seleção imunomagnética por citometria de fluxo

O objetivo deste ensaio foi de avaliar a seleção imunomagnética (iMAC ou MAC) de células S2MT-MAYV-Hy. Para tal, 10^6 células S2MT-MAYV-Hy, S2MT-MAYV-Hy.M1 e S2 selvagem (controle negativo) foram cultivadas em duplicata, em placa de 6

poços com meio de cultura SF900™-III SFM (Gibco™) induzidas com 1 mM de $CuSO_4$ e coletadas após 4 dias de indução.

4.11 Cinética de crescimento e expressão de proteínas estruturais de CHIKV e MAYV

Esse ensaio foi realizado no intuito de obter uma curva de crescimento celular em conjunto com a cinética de expressão de proteínas do CHIKV e MAYV para elucidar a questão do melhor tempo de coleta de VLP.

Células S2 selvagens, S2MT-CHIKV-Hy-M1 e S2MT-MAYV-Hy-M1 foram cultivadas em frasco tipo Schott de 500 mL, com volume de trabalho de 100 mL de meio SF900™-III SFM (Gibco™) modificado sob uma agitação constante de 130 rpm e mantidos a temperatura de 28℃ por um período de 166 horas. O inóculo inicial foi de 1,5 x 10^6 células/mL e, 24 horas após o início do cultivo, as células recombinantes foram induzidas com 1 mM de $CuSO_4$.

Diariamente foram retiradas amostras para determinação da concentração de células, viabilidade e determinação da taxa específica de crescimento. Um volume de 6 mL do sobrenadante do cultivo de células recombinantes foi aliquotado para concentração de VLP e análise por *Western blotting*.

4.12 Ensaios preliminares de imunogenicidade

As células S2MT-MAYV-Hy e S2-MT-CHIKV-Hy foram cultivadas e a expressão foi induzida em 24 horas com 1 mM de $CuSO_4$. Com 144 h após a indução, uma quantidade de 10^6 células foi aliquotada e congelada em PBS, correspondendo a uma dose de imunização. O ensaio *in vivo* foi realizado em camundongos Balb/c (n = 3 / grupo), com imunização intra-peritonial, realizando dose de reforço após sete dias. Sete dias após o reforço uma amostra de sangue foi retirada via retro-orbital e o soro analisado por ELISA (ensaio estabelecido em nosso laboratório). Em seguida os animais, inclusive os controles previamente imunizados com salina, receberam um reforço contendo vírus inativado (MAYV ou CHIKV). Sete dias após o reforço final (vírus inativado) foram feitas novas amostragens de sangue e os animais foram eutanasiados.

A resposta de anticorpos específicos no soro dos animais imunizados foi determinada por ELISA. Uma placa de 96 poços foi sensibilizada a 4 C por 12 horas com 100 µL vírus inativados (MAYV ou CHIKV) correspondentes a cada grupo em estudo. A seguir, a placa foi incubada com 200 µL de solução de albumina bovina a 3% por 1 hora. Após a incubação por 1 hora das amostras de soro diluídas 1:100, em PBS 1x as placas foram lavadas e foram adicionados anticorpos anti-camundongo HRP (Sigma). As placas foram reveladas com solução de OPD em tampão citrato. A leitura da absorbância foi realizada a 492 nm. Para a análise estatística foi utilizado o Teste T bicaudal.

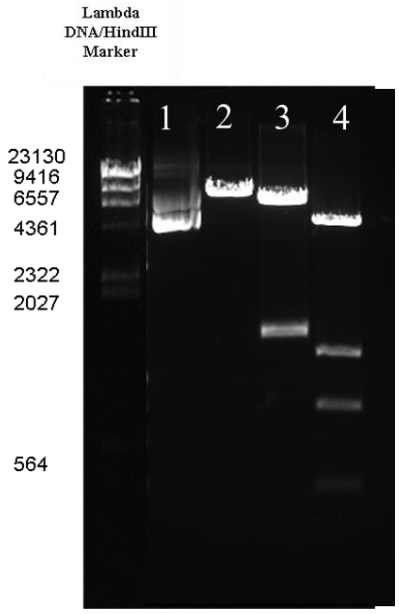
5. RESULTADOS OBTIDOS

5.1. Construção do vetor pMT-CHIKV e obtenção da linhagem S2MT-CHIKV

O cDNA que codifica para as proteínas estruturais do CHIKV (C, E3, E2, 6k, E1) foi recebido em vetor puc57 (6500 pb). Os vetores pMT/V5-His (3.5 kb) e pUC57-CHIKV foram obtidos conforme o descrito em Materiais e Métodos.

A confirmação da construção do vetor pMT-CHIKV foi verificada através da análise do padrão de restrição das digestões com as enzimas *DraI, NcoI e NotI* e sequenciamento gênico. O padrão de restrição observado (Figura 10) e a análise do sequenciamento confirmaram a obtenção da construção desejada no plasmídeo pMT-CHIKV (7291 pb).

Figura 10- Gel de agarose para confirmação da construção pMT-CHIKV



Gel de agarose 1% representando a confirmação dos padrões de restrição do vetor pMT-CHIKV com base no Marcador de peso molecular HindIII. (1) pMT-CHIKV circular (7291 pb); (2) pMT-CHIKV digerido com *Not I* (7291pb); (3) pMT-CHIKV digerido com *Nco I* (6028/1263 pb); (4) pMT-CHIKV digerido com *Dra I*(5167/1183/692/230/19).

Após a confirmação da clonagem, uma preparação de plasmídeo pMT-CHIKV foi misturada com plasmídeo de resistência à higromicina pCoHygro. Essa mistura foi utilizada para transfectar células S2 entre as passagens 10 e 14 utilizando o reagente Celfectin (Thermo Scientific). Em seguida, foi adicionada Higromicina ao meio de

cultivo para exercer pressão seletiva sobre a população de células mista. Dessa forma, as células não transfectadas morreram após 3-4 semanas, restando em cultura a população selecionada transfectada de forma estável, S2-MT-CHIKV.

5.2 Determinação das condições padrão para avaliação da expressão das proteínas estruturais de *Alphavirus* em células S2 recombinantes

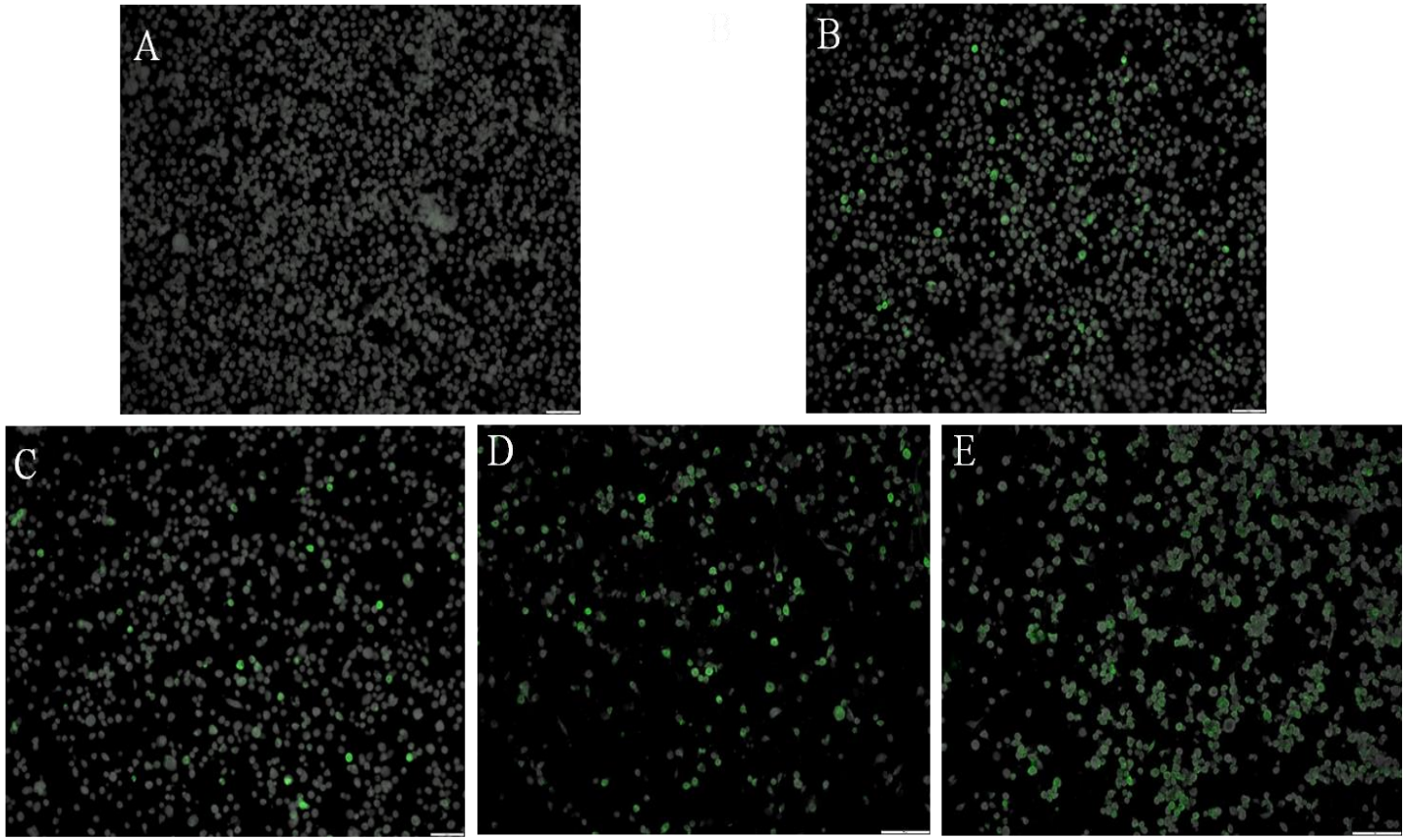
De maneira geral, a análise da expressão de uma proteína recombinante deve ser realizada em diversos momentos da cultura, visando definir os melhores momentos para a coleta da proteína de interesse. Como a detecção de VLP no sobrenadante de cultivo geralmente necessita da concentração prévia do material, devido às baixas concentrações alcançadas, sendo necessário um processo mais longo e custoso, primeiramente foi avaliada a expressão das proteínas estruturais de CHIKV na fração celular. Por se tratar de um promotor de expressão induzível, foi avaliada igualmente a concentração ideal de indutor para a expressão das proteínas de interesse. As condições padronizadas nessa etapa foram utilizadas posteriormente para a avaliação de outras linhagens celulares estabelecidas, tanto para a expressão das proteínas de CHIKV quanto de MAYV.

5.2.1 Determinação da melhor concentração do indutor $CuSO_4$

Anteriormente ao ensaio para determinar a cinética de expressão das proteínas de CHIKV em células S2, foi realizado um ensaio para avaliar a melhor concentração de agente indutor $CuSO_4$ para a expressão das proteínas estruturais de CHIKV. A avaliação foi realizada por ensaio de Imunofluorescência indireta (IFI) após a indução da expressão em células S2-MT-CHIKV por 48 h, utilizando $CuSO_4$ nas concentrações de 250 μM, 500 μM, 750 μM, 1 mM ou 1,5 mM.

A determinação da melhor concentração foi realizada por microscopia de fluorescência (Figura 11). Como podemos observar nas imagens obtidas, quando induzidas com 1 mM de $CuSO_4$ (Figura 11- E) as células S2-MT-CHIKV apresentaram visivelmente uma maior proporção de células fluorescentes, quando comparada com as populações na presença de concentrações mais baixas de indutor. Foi observado também que a utilização de 1,5 mM de indutor apresentou um impacto negativo sobre o crescimento celular, não sendo apropriada.

Figura 11- Teste de imunofluorescência indireta (IFI) para a avaliação da melhor concentração de agente indutor ($CuSO_4$).



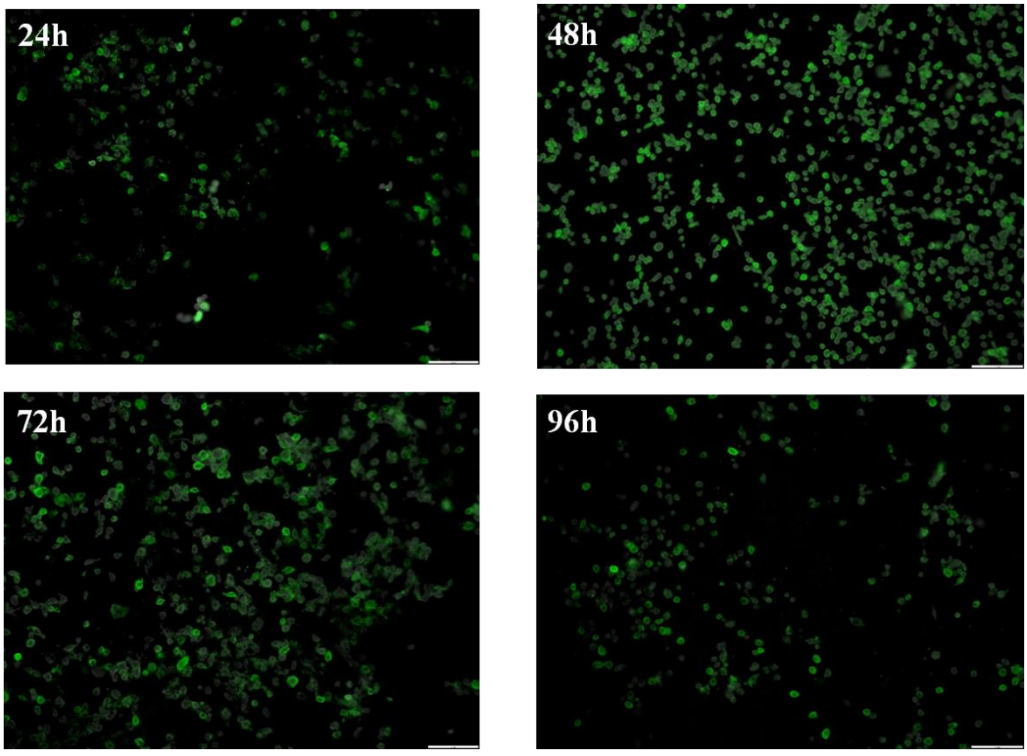
O teste de IFI foi realizado com anticorpo policlonal anti-CHIKV (ATCC VR-1241AF) seguido de anticorpos anti-camundongo conjugados com FITC. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência (Olympus, BX21). Aumento 200X. S2 selvagem (A); S2-MTCHIKV induzida com 250 µM (B); 500 µM (C); 750 µM (D); 1 mM (E).

5.2.2 Determinação do melhor tempo após a indução para a análise da expressão das proteínas recombinantes

A expressão das proteínas de CHIKV foi monitorada por IFI a partir de 24 h de indução com 1 mM para a definição dos melhores tempos de análise. A quantidade de células marcadas pelo anticorpo anti-CHIKV aumentou visivelmente a partir do tempo 48 h (~80%), permanecendo no mesmo patamar até 72 h (~80%). A partir de 96 h foi observado um decréscimo na quantidade de células positivas (~30%) (figura 12). Como não foi realizada permeabilização das células, os resultados mostram que a as proteínas estruturais de CHIKV foram reconhecidas na superfície das células.

Esses dados sugerem que o tempo de 96 horas pós indução seria um bom momento para avaliar as proteínas de CHIKV no sobrenadante das células S2MT-CHIKV, uma vez que os níveis de expressão diminuem na membrana celular.

Figura 12- Imunofuorescência para avaliação da expressão pelo tempo



Resultado de IFI realizado com anticorpo policlonal anti-CHIKV (ATCC VR-1241AF) seguido de anticorpos anti-camundongo conjugados com FITC. Representando a marcação de células S2-MT-CHIKV de 24h a 96 h pós-indução com $CuSO_4$.

Embora os resultados tenham demonstrado a produção de proteínas de CHIKV na superfície das células S2MT-CHIKV, análises preliminares (*Dot* e *Western blotting*) do

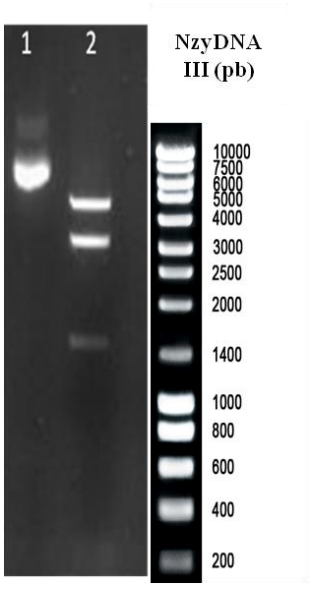
sobrenadante dessas células resultaram em fraca detecção das proteínas. Dessa maneira, baseado em estudos anteriores do grupo (Lemos et al., 2008; Santos et al., 2013), foi realizada nova construção para a expressão das proteínas estruturais de CHIKV, adicionando o cassete que confere resistência à Higromicina (gene de resistência e promotor pCopia) ao vetor pMT-CHIKV.

5.3 Obtenção do vetor de expressão pMT-CHIKV-Hy e da população S2MT-CHIKV-Hy

A clonagem do gene de resistência à Higromicina juntamente com o promotor pCopia no vetor de expressão pMT-CHIKV foi realizada em colaboração com o grupo de pesquisa do iBET durante período de estágio em Portugal.

Os plasmídeos foram extraídos das colônias positivas e a construção do vetor pMT-CHIKV-Hy foi verificada através da análise do padrão de restrição da digestão com a enzima *EcoRI* e sequenciamento gênico. O padrão de restrição observado (Figura 13) e a análise do sequenciamento confirmaram a obtenção do plasmídeo pMT-CHIKV-Hy (9182 pb).

Figura 13- Gel de agarose para confirmação da construção do pMTCHIKV-Hy



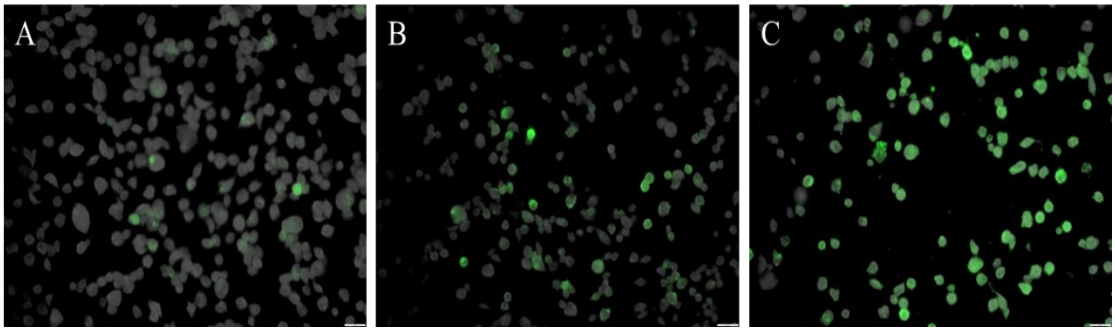
Gel de agarose 1% representando a confirmação dos padrões de restrição do vetor pMT-CHIKV-Hy com base no Marcador de peso molecular NzyDNAIII (adicionado à foto do gel em substituição à linha original de difícil visualização). (1) pMT-CHIKV-Hy (9182 pb); (2) digestão com EcoRI (4762/3177/1243 pb)

O plasmídeo foi então utilizado para a transfecção de células S2 utilizando cellfectin (ThermoScientific). Após a seleção com higromicina, conforme anteriormente descrito (item 4.1), a população S2MT-CHIKV-Hy foi obtida.

5.4 Análise comparativa da expressão de proteínas recombinantes pelas linhagens S2MT-CHIKV e S2MT-CHIKV-Hy.

As populações de células S2MT-CHIKV-Hy e S2MT-CHKV foram avaliadas comparativamente por IFI nas condições anteriormente padronizadas (Figura 14).

Figura 14- Imunofluorescência para avaliação da expressão de proteínas estruturais de CHIKV nas populações S2MT-CHIKV e S2MT-CHIKV-Hy



Análise de IFI realizada com anticorpo policlonal anti-CHIKV (ATCC VR-1241AF) seguido de anticorpos anti-camundongo conjugados com FITC. (A) células S2 selvagens. (B) células S2MT-CHIKV após 96 horas de indução, (C) células S2MT-CHIKV-Hy após 96 horas de indução.

Ao comparar a expressão entre as duas populações recombinantes, foi concluído com base na observação da quantidade de células fluorescentes, que as células S2MT-CHIKV-Hy apresentaram um maior número de células expressando a proteína. Para fins de uma diferenciação quantitativa mais precisa, as linhagens celulares foram analisadas por citometria de fluxo (Tabela 6). Ao comparar as linhagens obtidas, foi observado que as células transfectadas com o vetor contendo o gene de resistência à Higromicina incorporado (S2MT-CHIKV-Hy) apresentaram quase o dobro da porcentagem de células fluorescentes (FITC +) e maior mediana de fluorescência em relação às SMT-CHIKV (Tabela 6).

Tabela 6- Comparação da expressão de proteínas de CHIKV em células S2MT-CHIKV e S2MT-CHIKV-Hy por citometria de fluxo

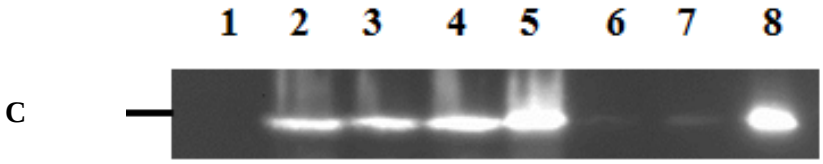
Células	Porcentagem de Células Fluorescentes	Mediana de Fluorescência (FITC)
Controle (células selvagens)	9	32
S2MTCHIKV	36,1	68
S2MTCHIKV-Hy	69,9	172

Com o propósito de enriquecer a população para obter uma quantidade ainda maior de células expressando as proteínas do CHIKV, as células S2MT-CHIKV-Hy foram mantidas sob pressão seletiva adicional com 300 μg/mL de Higromicina por 4 semanas (dados não apresentados). Em seguida foi realizada uma seleção imunomagnética dessa população de células.

5.5 Caracterização das proteínas de CHIKV expressas e avaliação da produção de VLP de CHIKV a partir de células S2 recombinantes

A expressão das proteínas estruturais de CHIKV a nível celular e no sobrenadante das populações selecionadas S2MT-CHIKV e S2MT-CHIKV-Hy, foi realizada primeiramente em ensaios de *Western Blotting*. Para a avaliação da presença de proteínas de CHIKV no sobrenadante, indicativo da presença de VLP, o sobrenadante foi coletado após 96 horas de indução, concentrado por ultracentrifugação e analisado em paralelo aos extratos celulares (Figura 15).

Figura 15- Expressão de proteínas estruturais do CHIKV detectada por *Western blotting*



Western blotting para comparação de expressão de proteínas de CHIKV após a indução com 1 mM de $CuSO_4$ em diferentes tempos: 1) Células S2 selvagens (controle negativo); 2) Células S2MT-CHIKV / 72 h; 3) Células S2MT-CHIKV-Hy / 72 h; 4) Células S2MT-CHIKV / 96 h; 5) Células S2MT-CHIKV-Hy / 96 h; 6) Sobrenadante concentrado de S2MT-CHIKV / 96 h; 7) Sobrenadante concentrado de S2MT-CHIKV-Hy / 96 h; 8) Controle positivo (CHIKV inativado).

O peso molecular previsto para as proteínas estruturais do CHIKV é de 138 kDa para a poliproteína precursora C-E3-E2-6k-E1; 62 kDa para P62 (complexo E3/E2 antes da clivagem final por furina membranária); 47 kDa para ambas E2 e E1; 29 kDa para capsídeo (C); e 6 kDa para proteína 6K.

A análise mostrou uma marcação intensa da proteína C no lisado celular e no controle positivo (CHIKV- inativado). Uma marcação mais fraca, de mesmo tamanho pode ser vista para as amostras de sobrenadante concentrado. Esse primeiro resultado apontou a possível formação do nucleocapsídeo nas VLP.

A detecção de apenas uma proteína tanto nas amostras como no controle positivo, sugere que o anticorpo utilizado, embora policlonal e descrito como anti-CHIKV (produzido pela injeção de um vírus íntegro) detecta eficazmente apenas essa proteína (C).

Este resultado mostra que foi possível padronizar um procedimento de *Western blotting* para a detecção de proteína estrutural de CHIKV referente à proteína da cápside (29 kDa), viabilizando a análise da expressão recombinante, bem como detectar sinal no sobrenadante do cultivo, sugerindo a formação de VLP.

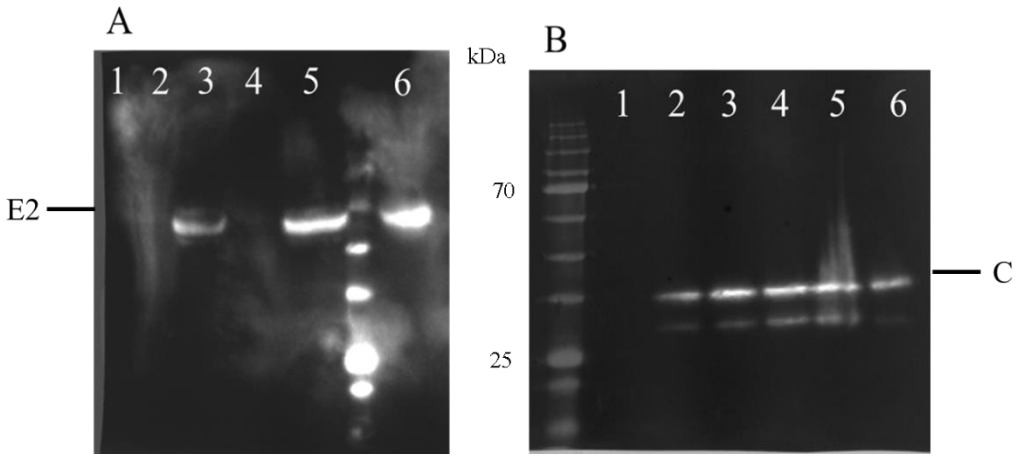
5.6 Comparação da expressão de proteínas de CHIKV no sobrenadante de células S2MT-CHIKV e S2MT-CHIKV-Hy cultivadas em meio de cultura SF900™-III SFM (Gibco™) suplementado

Tendo em vista que a detecção das proteínas de CHIKV no sobrenadante se deu de forma limitada nos primeiros ensaios, com bandas aparecendo em uma intensidade muito baixa quando comparadas às bandas obtidas a partir de amostras de lisados celulares, foi realizado um ensaio para a detecção em amostras de sobrenadante mais concentrado. Além disso, as populações celulares foram cultivadas em meio SF900 III enriquecido com lipídeos, buscando enriquecer o meio de cultura em componentes importantes para o brotamento das VLP e manutenção da viabilidade celular.

O sobrenadante de duas populações celulares S2MT-CHIKV e S2MT-CHIKV-Hy cultivadas em meio de cultura SF900™-III SFM, suplementado ou não, foram concentrados e comparados por *Western blotting* (Figura 16).

Foi observado que em todas as condições testadas houve marcação positiva correspondente ao tamanho esperado para a proteína de capsídeo viral (proteína C, 30 kDa), indicando a presença da expressão no sobrenadante das células recombinantes (Figura 16 B). Contudo, quando a detecção foi realizada com anticorpo monoclonal anti-E2 de CHIKV (anti-ENV-CHIKV), somente a população S2MT-CHIKV-Hy apresentou marcação positiva para a proteína de envelope (E2 ~ 45 kDa), igualmente ao controle positivo (Figura 16 A). Ao comparar a marcação com anti-E2, constatou-se que o sobrenadante de células cultivadas em meio de cultura SF900™-III SFM (Gibco™) suplementado mostrou uma banda mais intensa, sendo um indicativo de que a suplementação do meio de cultura com a adição de uma emulsão lipídica favoreceu a expressão de VLP.

Figura 16- Comparação da expressão de proteínas em células S2MT-CHIKV e S2MT-CHIKV-Hy cultivadas em meio de cultura SF900™-III SFM (Gibco™) com ou sem suplementação de lipídeos



Western blotting para comparação de expressão de proteínas de CHIKV no sobrenadante de células recombinantes em meio SF900 III convencional ou suplementado. A) Marcação com anticorpo Monoclonal anti-E2 de CHIKV e B) Marcação com anticorpo Policlonal anti-CHIKV. Amostras de sobrenadante concentrado: 1) S2 selvagem (controle negativo); 2) S2MT-CHIKV em SF900™-III SFM; 3) S2MT-CHIKV-Hy em SF900™-III SFM; 4) S2MT-CHIKV em SF900™-III SFM suplementado; 5) S2MT-CHIKV-Hy em SF900™-III SFM suplementado; 6) controle positivo (CHIKV inativado).

O sinal obtido para a proteína C (Figura 16B) apresentou-se homogêneo entre todas as amostras. A detecção de uma proteína adicional na membrana marcada com os anticorpos policlonais ainda é uma incógnita. De fato, dois trabalhos anteriores em que esses mesmos anticorpos foram utilizados (Tretyakova et al., 2014; Hidajat et al., 2016), mostraram um perfil de marcação semelhante. No primeiro é argumentado que o soro foi desenvolvido a uma cepa de CHIKV específica (S27) e por isso não são vistas as demais estruturais além da proteína C no vírus em estudo (181/25). No segundo, utilizando o mesmo vírus 181/25 são vistas todas as proteínas estruturais, porém a quantidade de material inserida é bem maior. Em ambos existe a marcação de uma proteína ao redor de 28 kDa a partir de amostras de vírus, tal qual ocorre com nossas preparações.

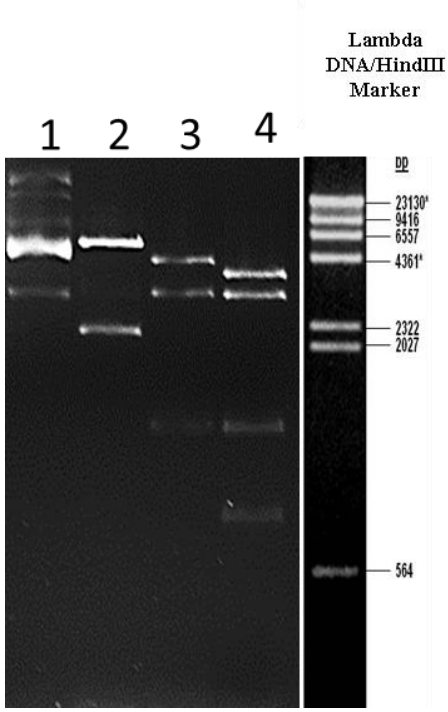
A partir deste resultado, a expressão de VLP foi realizada utilizando meio de cultura suplementado e a população S2MT-CHIK-Hy foi definida para expressão de VLP de CHIKV.

5.7 Construção do vetor de expressão pMT-MAYV-Hy

O cDNA das proteínas estruturais do MAYV (C, E3, E2, 6k, E1), obtido a partir da transcrição reversa do RNA de MAYV selvagem, foi clonado no vetor pMT-CHIKV-Hy após a retirada das sequências correspondentes ao CHIKV, conforme descrito em materiais e métodos.

A confirmação da construção do vetor pMT-MAYV-Hy foi verificada através dos padrões de restrição após digestão com as enzimas *EcoRI*, *KpnI* e *ScaI* e pelo sequenciamento gênico. O padrão de restrição observado (Figura 17) e a análise do sequenciamento confirmaram a obtenção do plasmídeo pMT-MAYV-Hy (9100 pb). Para uma visualização mais clara dos padrões de restrição, o desenho do marcador foi inserido ao lado da imagem do gel de agarose 1%.

Figura 17-Gel de agarose para confirmação da construção do pMT-MAYV-Hy



Gel de agarose 1% representando a confirmação dos padrões de restrição do vetor pMT-MAYV-Hy com base no marcador de peso molecular Lambda HindIII. 1) pMT-MAYV-Hy circular (9152 pb); 2) pMT-MAYV-Hy digerido com *ScaI* (6838/2314 pb); 3) pMT-MAYV-Hy digerido com *EcoRI* (4732/3177/1243pb); 4) pMT-MAYV-Hy digerido com *KpnI* (4017/3165/1235/735 pb).

Após a confirmação da correta clonagem do cDNA das proteínas estruturais do MAYV foi realizada a transfecção de células S2, obtendo a população S2MT-MAYV-Hy após a seleção com higromicina.

5.8 Análise comparativa da expressão de proteínas recombinantes pelas linhagens S2MT-MAYV-Hy após seleção imunomagnética (iMAC)

Com o propósito de enriquecer a população de células expressando as proteínas de MAYV foi realizado um protocolo anteriormente estabelecido no laboratório para células S2 recombinantes (Santos et al., 2013). Para isso, as células S2MT-MAYV-Hy foram mantidas sob pressão seletiva adicional com 300 μg/mL de higromicina por 4 semanas. Em seguida foi realizada uma seleção imunomagnética, utilizando "beads" conjugadas com anticorpos anti-anticorpos de camundongo. Às células foi adicionado anticorpo de camundongo anti-MAYV, de forma que as células apresentando grande quantidade de proteína expressa na superfície foram marcadas com as "*beads*" magnéticas, sendo selecionadas positivamente em um campo magnético. Após o procedimento de seleção, as células foram expandidas e induzidas para a análise da expressão das proteínas de MAYV por citometria de fluxo (Tabela 7).

Tabela 7- Comparação da expressão de proteínas de MAYV após enriquecimento por seleção imunomagnética

Células	Porcentagem de Células Fluorescentes	Mediana de Fluorescência (FITC)
Controle (células selvagens)	9	32
S2MTMAYV-Hy	73	110
S2MTMAYV-Hy selecionado	67,8	244

A partir dos dados apresentados, podemos observar que, embora a população de células positivas para a expressão das proteínas não tenha sido alterada significativamente (de 73 % para 67,8 %) a seleção imunomagnética resultou na seleção de células com maior intensidade de fluorescência (mediana de fluorescência passou de 110 unidades de fluorescência para 244). O valor mais elevado da mediana de fluorescência significa que uma maior quantidade de anticorpos (primários e consequentemente secundários) se ligou às células recombinantes, provavelmente em consequência da maior expressão das proteínas recombinantes na superfície dessas células.

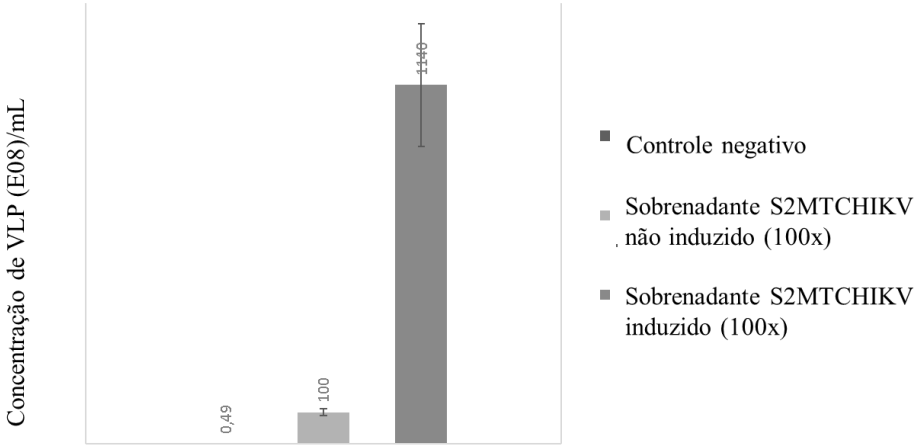
Para os ensaios seguintes de avaliação da expressão de VLP foi utilizada a população enriquecida por seleção imunomagnética.

5.9 Avaliação da expressão das proteínas de *Alphavirus* no formato de VLP

Os ensaios realizados para a avaliação da expressão das proteínas de *Alphavirus* no formato de VLP compõem uma das etapas fundamentais deste trabalho. Para essa avaliação, o sobrenadante de células S2MT-CHIKV-Hy e de S2MT-MAYV-Hy foram concentrados em gradiente de sacarose e/ou iodixanol. O produto desse processo de concentração e purificação parcial foi analisado por três diferentes técnicas, segundo a disponibilidade no momento em que as células recombinantes estiveram estabelecidas: Nanosight e Zetasizer (VLP de CHIKV) e microscópio eletrônico de transmissão (VLP de MAYV e CHIKV).

Primeiramente foi realizada uma análise para a verificação da presença de VLP de CHIKV no sobrenadante de células S2MT-CHIKV (Figura 18). Esta análise foi realizada no iBET (Portugal), porém no momento não havia células S2 selvagens disponíveis para serem utilizadas como controle negativo, neste caso, foi selecionado o sobrenadante de células S2MTCHIKV sem indução para ser utilizado como controle. Com base no resultado da análise por Nanosight foi possível detectar partículas esféricas com tamanho médio de 100nm e concentração de 1,14 x 10^{11} partículas/mL, sugerindo assim a formação e concentração por gradiente de sacarose das CHIKV-VLP. Os controles (PBS e células não induzidas) apresentaram partículas de tamanhos heterogêneos variando de 40 nm a 270 nm (dados não apresentados).

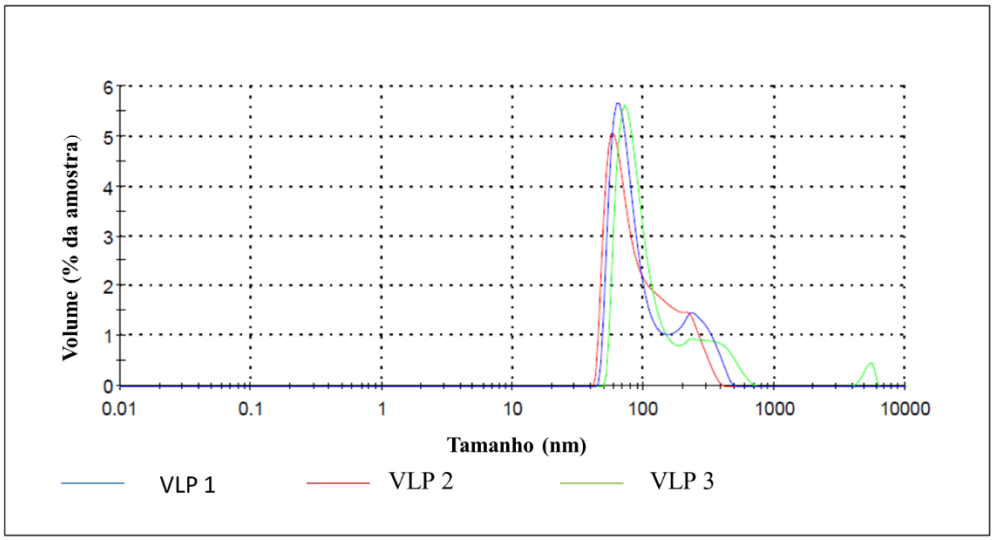
Figura 18- Análise de formação de VLP por Nanosight



Análise por Nanosight da concentração de partículas após ultracentrifugação do sobrenadante de cultivo. Controle negativo consistiu em PBS utilizado para ressuspender as células após ultracentrifugação; O sobrenadante das células S2MTCHIKV não induzidas foi utilizado como um segundo controle negativo (concentrado 100 vezes); Amostra do sobrenadante de S2MTCHIKV após indução com 1 mM de $CuSO_4$ concentrado cem vezes. A imagem é representativa de uma análise em duplicata.

Quando analisadas no equipamento Zetasizer, as amostras de sobrenadante de cultura de células S2MT-CHIKV-Hy apresentaram partículas com tamanho médio de 70 nm (Figura 19).

Figura 19- Determinação do tamanho das VLP por Zetasizer



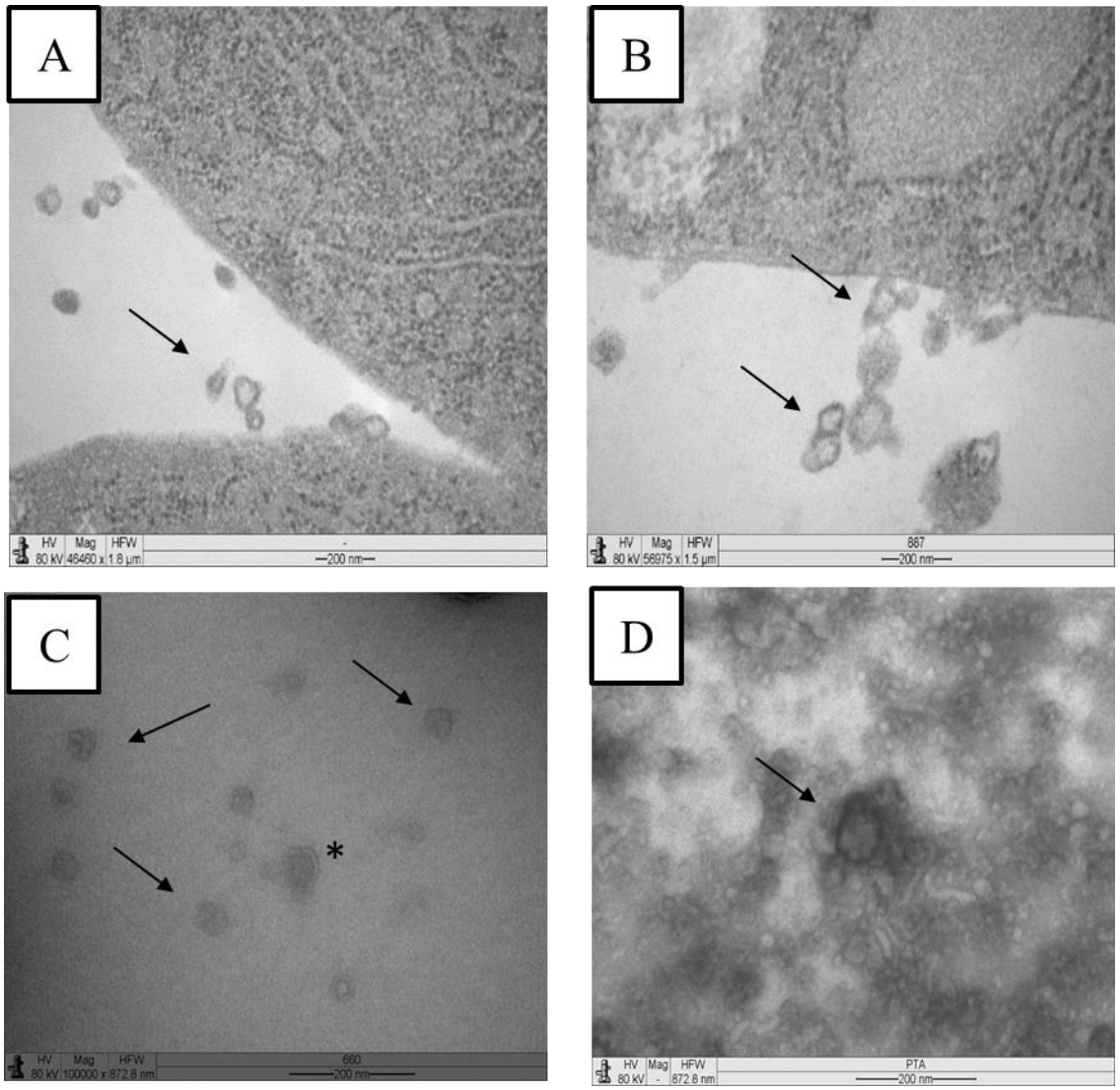
Determinação do tamanho de partículas ressuspendidas em PBS mensurado por Zetasizer. O sobrenadante do cultivo de células S2MT-CHIKV-Hy contendo as VLP foi ultracentrifugado e

resuspendido em tampão PBS. A leitura foi feita em triplicata: VLP1, VLP2 e VLP3. As VLP apresentaram um tamanho médio de 70 nm (eixo x).

Como forma de obter uma evidência mais segura da formação das VLP, foi realizada a análise por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 20).

A microscopia realizada a partir de cortes de células após a indução da expressão, mostra que em ambas as populações S2MT-CHIKV-Hy e S2MT-MAYV-Hy foi possível observar o momento em que algumas partículas esféricas são formadas (Figura 20, A e B respectivamente). Finalmente, quando analisadas as VLP obtidas por purificação-concentração em colchão de sacarose ou gradiente de iodixanol, constatou-se que neste último foi obtida uma amostra mais límpida e aparentemente mais concentrada, enquanto que as amostras resultantes da purificação em colchão de sacarose apresentaram um depósito e a presença de artefatos. Quanto à análise das VLP, as imagens obtidas por TEM mostram partículas esféricas, semelhantes ao vírus selvagem, com tamanho variando de 60nm a 90nm.

Figura 20- VLP de *Alphavirus* obtidos a partir de células S2 analisadas por TEM

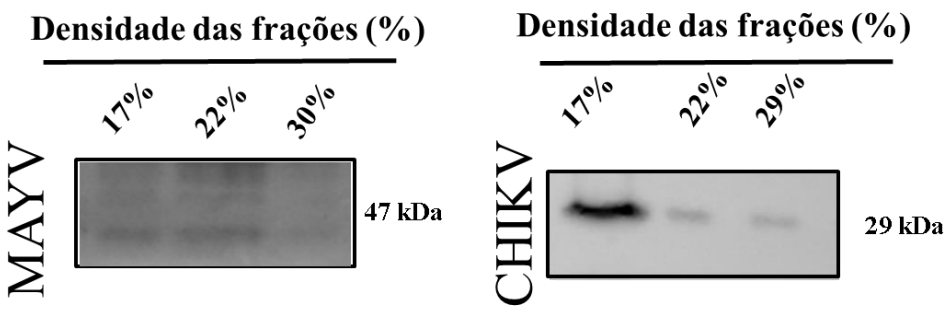


Micrografias obtidas por TEM mostrando VLP produzidas por células S2. A) brotamento de VLP-CHIKV a partir de célula S2MT–CHIKV-Hy (70000x); B) brotamento de VLP-MAYV a partir de célula S2MT-MAYV-Hy (75000x); C) VLP-CHIKV purificadas em gradiente de Iodixanol (70000x); D) VLP-CHIKV purificadas em colchão de sacarose 20% (70000x) Descrição: (→) Marcação de VLP e (*) Marcação de vesículas. .

Com base nas imagens obtidas, foi adotada a metodologia de purificação das VLP por ultracentrifugação em gradiente de densidade de iodixanol. Dessa forma, após a purificação e concentração das amostras, as frações positivas foram coletadas de um "anel visível" formado após a ultracentrifugação e foram analisadas por *Western blotting* nas frações com densidade 17-30 %, no tamanho correspondente a proteína C para VLP de CHIKV e ao tamanho correspondente a proteína E2 para VLP de MAYV (Figura 21). A formação do anel no gradiente e a correspondente presença das proteínas virais em uma

pequena faixa do gradiente são um indicativo da formação de VLP estáveis e com certa homogeneidade.

Figura 21- Análise da purificação por gradiente de densidade Iodixanol



Western blotting representando as frações positivas de MAYV -VLP (marcadas com anticorpo policlonal anti-MAYV) e CHIKV -VLP (marcadas com anticorpo policlonal anti-CHIKV) coletadas após a concentração utilizando o gradiente de densidade iodixanol, tendo a densidade de frações mensuradas por densitometria, sendo detectadas entre 17% a 30%.

5.10 Cinética de crescimento celular e expressão de VLP

O crescimento celular apresentado pelas linhagens S2 selvagens, S2MT-MAYV-Hy e S2MT-CHIKV-Hy em meio de cultura suplementado foi semelhante ao crescimento de outras linhagens celulares provenientes de células S2 transfectadas e já caracterizadas no laboratório (Figuras 22, 23 e 24). Tipicamente, a concentração celular pode atingir de 1 a 2 x 10^7células/mL (Ventini *et al.*, 2010).

Figura 22- Cinética de crescimento de células S2 selvagens

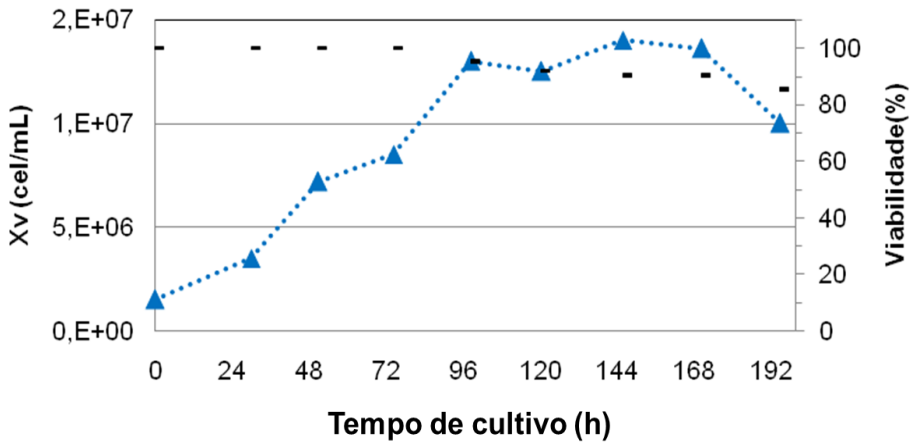


Gráfico representativo da cinética de crescimento de células S2 selvagens em meio de cultura SF900 + CD Lipid, incubadas a 28 ºC a 100 rpm. Concentração celular Xv (triângulos); Viabilidade celular (traços).

Figura 23- Cinética de células S2MT-CHIKV-Hy e expressão de VLP

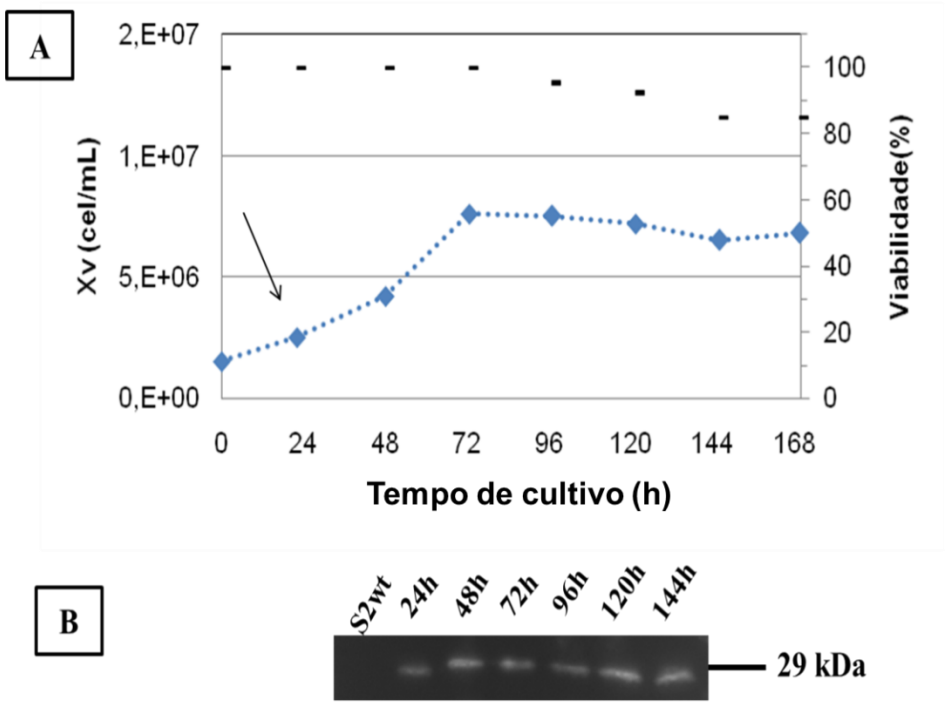
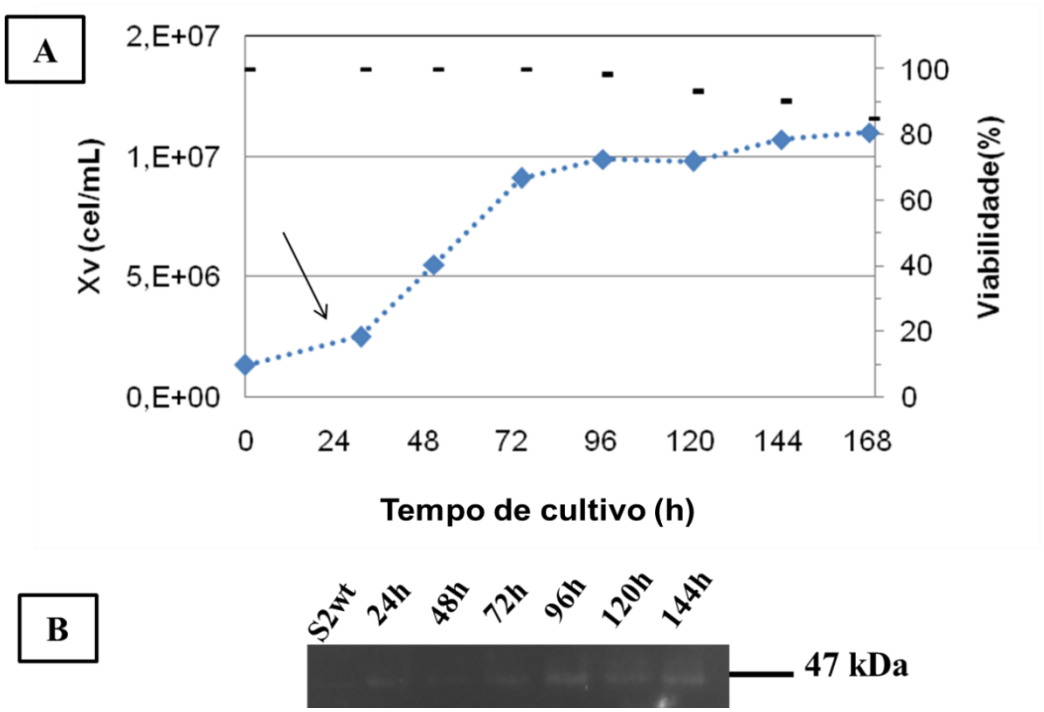


Gráfico representativo da cinética de crescimento de células S2MT-CHIKV-Hy em meio de cultura SF900 + CD Lipid, incubadas a 28 ºC a 100 rpm. Cinética de crescimento celular (A): Concentração celular Xv (triângulos); Viabilidade celular (traços); Indução da expressão em 24 h de cultivo pela adição de $CuSO_4$ (seta). *Western blotting* para a avaliação da presença de VLP no sobrenadante concentrado a partir de diferentes tempos de cultivo (B). A marcação das VLP foi realizada com anticorpo policlonal anti-CHIKV (ATCC).

Figura 24- Cinética de células S2MT-MAYV-HyM1 e expressão de VLP



Dado representativo da cinética de crescimento de células S2MT-MAYV-HyM1 em meio de cultura SF900 + CD Lipid, incubadas a 28 ºC a 100 rpm. Cinética de crescimento celular (A): Concentração celular Xv (triângulos); Viabilidade celular (traços); Indução da expressão em 24 h de cultivo pela adição de $CuSO_4$ (seta). *Western blotting* para a avaliação da presença de VLP no sobrenadante concentrado a partir de diferentes tempos de cultivo (B). A marcação das VLP foi realizada com anticorpo policlonal anti-MAYV (ATCC).

As células S2 recombinantes induzidas em 24 horas de cultivo com 1 mM $CuSO_4$ para produção de VLP apresentaram a mesma taxa de crescimento que as S2 selvagens ($\mu máx$ de 0,0011) até 24 horas pós-indução e após esse momento apresentaram uma redução nesta taxa (período de 72 a 120 horas) tendo $\mu máx$ de 0,0085 para células S2 selvagens de 0,0012 para células S2MT-CHIKV-Hy e de 0,0015.para células S2MT-MAYV-Hy.

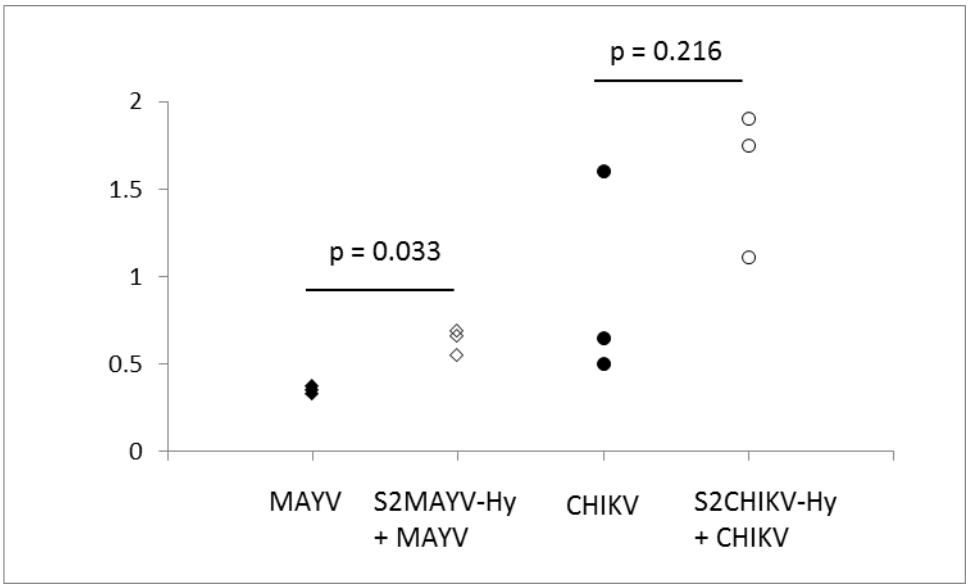
Ao analisar a produção de VLP pelas células S2 transfectadas, foi possível detectar a produção de proteínas a partir de 24 horas de indução com um aparente aumento no decorrer do tempo de cultivo, sugerindo que as VLP estejam se acumulando no sobrenadante com o decorrer do cultivo. Esse fato é importante, pois é um primeiro indicativo de que o sistema de expressão possa estar gerando estruturas com estabilidade adequada. É importante ressaltar que o anticorpo anti-MAYV utilizado nesse estudo não possui a mesma afinidade e performance que o anticorpo anti-CHIKV. Apesar de amplamente testado e de várias tentativas de padronização, constatou-se que sua ligação

até mesmo ao vírus obtido de cultura de células não permite a obtenção de bons resultados, seja pela utilização de técnicas de fluorescência ou de *blotting*.

5.11 Avaliação preliminar da imunogenicidade *in vivo*

Para verificar preliminarmente o potencial imunogênico das preparações obtidas a partir das células de inseto, foi realizado um experimento de imunização de camundongos. Após duas imunizações, os animais não apresentavam quantidades detectáveis de anticorpos anti-*Alphavirus*, por esse motivo receberam uma dose de reforço contendo MAYV ou CHIKV inativados com betapropiolactona, enquanto os controles receberam apenas uma dose da mesma preparação de vírus inativados. Os soros foram coletados e analisados por ELISA, em placas sensibilizadas com os vírus inativados (**Figura 25**).

Figura 25 - Resposta de anticorpos anti-*Alphavirus* em animais imunizados.



Resultado de ELISA de soros diluídos 1:100 dos animais imunizados com células S2. Como controle foi utilizado o soro de animais imunizados somente uma vez com o vírus inativado. A leitura da absorbância foi realizada a 492 nm. Para a análise estatística foi utilizado o Teste T bicaudal.

Os resultados do ensaio de imunização mostram que as células S2 recombinantes foram capazes de sensibilizar o sistema imune dos animais contra os antígenos presentes nos vírus. Isso ficou comprovado especialmente com a preparação em que foi avaliado o efeito para MAYV, em que a diferença entre os animais sensibilizados previamente com as células S2MTMAYV-Hy e os que apenas receberam o vírus inativado foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Para as amostras de CHIKV não houve diferença

estatística devido ao baixo número de animais e uma variância maior, porém o resultado indica um efeito de reforço após a imunização com CHIKV inativado.

Como as preparações de VLP ainda estavam sendo feitas de forma limitada, e destinadas à análise estrutural e dos passos de purificação, nesses ensaios foram usados lisados celulares contendo as proteínas estruturais de *Alphavirus*

6. DISCUSSÃO

No processo de seleção do hospedeiro apropriado para expressão funcional de uma proteína, as células S2 são uma alternativa às células de mamíferos ou a outros sistemas de células de insetos utilizando infecção viral.Este sistema não lítico e baseado em plasmides, de fato, combina varias vantahens fisiológicas e de bioprocessos que to tornam uma ferramenta altamente potente e escalonavel para produção de proteínas de membrana com uma gama de aplicações, entre essas temos: a caraterização funcional, determinação do perfil farmacológico, caracterização estrutural e produção de vacinas (Brillet *et al.*, 2010).

Há mais de 10 anos o uso do sistema de expressão de proteínas baseado em células S2 vem sendo estudado por nosso grupo de pesquisa. Um dos primeiros trabalhos publicados envolve o emprego desse sistema para expressão da glicoproteína do vírus da raiva (Yokomizo *et al.*, 2007). Em vista dos resultados promissores que obtivemos na expressão desta proteína, escolhemos esse sistema para a expressão de proteínas estruturais de arbovírus.

O uso de VLP em vacinação é uma abordagem relativamente nova. Seu uso combina a eficácia das vacinas inativadas com o perfil de segurança das vacinas de subunidades. Na maioria das vezes, as VLP possuem a mesma morfologia de seus vírus homólogos, com exceção do ácido nucléico que não está presente, o que as torna seguras por não serem infeciosas e, portanto, incapazes de se espalhar ou causar doença. Por outro lado, sua semelhança às estruturas virais relacionadas é uma característica capaz de potencializar a resposta imune, quando comparadas às vacinas de subunidade. Além disso, as VLP podem ser produzidas sob condições padrão de laboratório, em contraste com a maioria dos vírus patogênicos que são utilizados nas vacinas inativadas e com isso necessitam de laboratórios de nível de segurança elevados.

Uma consulta sobre "VLP" e "vacinas" na plataforma do NIH no website do "*clinicaltrials.gov*" retornou 118 estudos sobre "*virus like particles*". Alguns desses estudos encontram-se em fase de recrutamento (Fase I) e outros ensaios já estão completos. Entre os estudos de VLP e vacinas, grande parte estão relacionados a Influenza, Papilomavirus (HPV) e Norovírus. Na mesma plataforma estão cadastrados 26 ensaios relacionados a vacinas de CHIKV, entre as Fase I a IV, relacionados à imunogenecidade, segurança e tolerância em sujeitos de pesquisa saudáveis. Não foram encontrados ensaios clínicos envolvendo vacinas para MAYV.

Existem diversos atrativos para o uso de células de insetos na produção de VLP de arbovírus. Dentre eles, o fato de que os insetos são hospedeiros naturais de arbovírus, o que significa que o *folding* das proteínas virais e modificações pós-traducionais tendem a ser bem processadas em células de inseto, sendo uma excelente escolha para produção de VLP de alta qualidade. Algumas células de insetos, como de lepidópteros já apresentam um perfil de segurança e são utilizadas na produção de algumas vacinas humanas e veterinárias (Pijlman, 2015).

O uso de VLP no desenvolvimento de vacinas como já foi demonstrado anteriormente, vem sendo uma estratégia promissora em termos de imunogenicidade e segurança. Com isso, este trabalho teve como foco a expressão de CHIKV-VLP e MAYV-VLP em células de insetos, utilizando um sistema de expressão recombinante baseado em células S2 (*Drosophila Expression System -DES*).

Embora o desenvolvimento de uma vacina contra o CHIKV tem sido citado por muitos estudos, até o momento não há uma vacina disponível comercialmente (Akahata *et al.*, 2010; Mallilankaraman *et al.*, 2011; Akahata e Nabel, 2012; Gorchakov *et al.*, 2012; Weaver *et al.*, 2012; Metz *et al.*, 2013; Plante *et al.*, 2015; Dezure *et al.*, 2016; Metz e Pijlman, 2016; Erasmus *et al.*, 2017; Tharmarajah *et al.*, 2017). No caso do vírus Mayaro, além de não haver uma vacina disponível comercialmente, há pouca quantidade de estudos realizados sobre a imunidade a esse vírus. Pelo menos dois estudos relataram candidatos com um potencial vacinal (Robinson *et al.*, 1976; Weise *et al.*, 2014).

Como descrito anteriormente, para a obtenção dos clones produtores de VLP de CHIKV, os genes das proteínas estruturais de CHIKV (E3-E2-C-6k- -E1) foram inseridos no vetor de expressão comercial indutível pMT/V5-His. Com a confirmação da construção, seguimos com a transfecção e pressão seletiva com higromicina, obtendo assim os clones produtores.

Este sistema de expressão quando utilizado o promotor indutível pMT (metalotioneína), requer a adição de um metal pesado à cultura celular para que as células iniciem o processo de produção de proteína heteróloga. A concentração de $CuSO_4$ sugerida pelo sistema de expressão de células S2 é de 500 μM. Entretanto, como descrito pelas especificações do protocolo do sistema de expressão em células S2, concentrações mais altas de indutor podem ser necessárias para algumas proteínas (Millar *et al.*, 1994), fazendo-se necessário um ensaio de determinação da concentração do indutor. As

diferentes concentrações do indutor sobre a expressão das proteínas do CHIKV foram avaliadas por IFI após 48 horas, nas concentrações de 250 μM, 500 μM, 750μM, 1 mM e 1,5 mM. Com isso, determinamos a concentração de 1 mM de $CuSO_4$ como ideal, pois foi observada uma marcação celular mais intensa e mais células fluorescentes ao comparar com as concentrações mais baixas. Além disso, concentrações mais altas que 1 mM aparentaram ser tóxicas ao cultivo pois inibiram o crescimento celular.

Após determinada a concentração de uso do indutor, seguimos com a avaliação do melhor tempo de expressão de proteínas estruturais de CHIKV após a indução. Nossos resultados de IFI indicaram que após 96 horas de indução ocorria a perda da marcação das proteínas recombinantes, o que poderia ser um indicativo de queda na produção de VLP. Com isso, determinamos de forma preliminar que o melhor tempo de análise/coleta de proteínas estruturais de CHIKV é de 96 horas pós-indução (5º dia de cultivo). Posteriormente esses resultados foram confirmados pela realização de um ensaio de cinética de crescimento celular e expressão de VLP.

A co-transfecção de vetores de expressão e seleção é vista como uma desvantagem uma vez que na entrega do vetor algumas células podem receber somente o vetor de seleção e com isso, após a pressão seletiva essas células são resistentes porem "vazias" por não conter o vetor de expressão. A inserção do gene de seleção da Higromocina no vetor de expressão pMT, já havia sido avaliada anteriormente em nosso laboratório, levando a uma maior quantidade de células contendo o vetor de interesse (Dos Santos *et al.*, 2009). A mesma abordagem já descrita foi empregada neste trabalho com a finalidade de aumentar a expressão heteróloga.

Quando comparamos a expressão de proteínas estruturais de CHIKV entre as populações S2MT-CHIKV e S2MT-CHIKV-Hy por IFI e citometria de fluxo observamos que as células S2MT-CHIKV-Hy possuíam praticamente o dobro de células CHIKV positivas que as células S2MT-CHIKV. Esses dados corroboram os estudos anteriores do grupo e apontam definitivamente para a necessidade de utilizar vetores plasmidiais contendo o gene de seleção ao invés de recorrer ao método de co-transfecção, no estabelecimento de populações de células S2 recombinantes.

Os dados do *Western blotting* (Figura 14), nos mostram que foi possível detectar proteínas estruturais do CHIKV em ambas as populações (lisados celulares e sobrenadante) com marcação igual ao controle positivo (CHIKV inativado). Resultados

similares foram relatados por outros autores ao expressar CHIKV VLP (C, E3, E2, 6K, E1) por outros sistemas de expressão (Noranate *et al.*, 2014; Metz e Pijlman, 2016). Comparando as populações, foi verificado que a intensidade da marcação foi maior nas amostras de lisado celular e sobrenadante de cultivo da população S2-MTCHIKV-Hy. Neste momento, com base nos dados apresentados, o uso de células S2-MTCHIKV-Hy foi definido como a melhor escolha para produção de CHIKV-VLP.

A obtenção dos clones produtores de MAYV-VLP foi realizada após a obtenção dos clones produtores de CHIKV-VLP. Desta forma, alguns parâmetros como a utilização de vetor de expressão contendo o gene da higromicina incorporado; a análise de expressão com 96 horas pós-indução; e a indução com 1 mM de $CuSO_4$, que foram definidos anteriormente para as células produtoras de CHIKV-VLP, após a análise dos resultados de IFI, citometria de fluxo e *Western blotting* , foram aplicados na obtenção das células S2MT-MYAV-Hy e para a análise das MAYV VLP.

Logo após a obtenção dos clones produtores de VLP de CHIKV e MAYV, foi realizada uma seleção imunomagnética das células S2-MTMAYV-Hy e S2-MTCHIKV-Hy, obtendo um enriquecimento populacional das células apresentando boa expressão.

A análise comparativa da expressão de MAYV entre as linhagens S2-MTMAYV-Hy selecionadas e não selecionadas deixou claro que após a seleção imunomagnética foi obtida uma população mais produtiva, apresentando um aumento no nível de expressão. Em estudos anteriores, tal tratamento também apresentou resultados promissores em célula S2 expressando a glicoproteína do vírus da raiva (Santos *et al.*, 2016).

A suplementação de meios de cultura de células com soro animal é uma prática comum em pesquisa biotecnológica, uma vez que esta suplementação fornece nutrientes e fatores que são essenciais para o crescimento e proliferação celular. Porém, a composição pouco definida do soro e a variação de lote a lote, bem como o potencial risco de contaminação com agentes adventícios dificultam a segurança e a padronização dos cultivos celulares, fazendo do soro animal um suplemento pouco desejável para a produção de biofármacos (Usta *et al.*, 2014). Além disso, a maioria das proteínas animais presentes no soro é imunogênica, aumentando a complexidade do processo de purificação pela necessidade de eliminar essas proteínas indesejadas, o que implica no aumento do custo do processo. Assim, o uso de meios livres de soro e meios quimicamente definidos

representa uma alternativa ao uso de meios com soro animal para o cultivo de células (Rodrigues *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2012).

No entanto, em um cultivo celular utilizando meio de cultura livre de soro fetal, a falta da fração lipídica normalmente suprida pelo soro foi descrita como uma das maiores causas na diminuição de produtividade da formação de partículas virais. Ainda, os lipídios são relacionados como componentes fundamentais para a produção de vetores retrovirais infectivos (Rodrigues *et al.*, 2012) e também na produção de lentivírus (Gélinas *et al.*, 2017).

Os lipídios desempenham várias funções para as células: atuam como fonte de energia, estão envolvidos no processo de sinalização celular e compõem a membrana celular. Muitas vezes são críticos para a produção de biofármacos, por estarem envolvidos na síntese de proteínas, modificações pós-traducionais e ainda na secreção de proteínas que ocorre através de membrana lipídica. Embora as células possam sintetizar o colesterol e alguns ácidos graxos, a adição de lipídios às células pode aumentar o crescimento e o metabolismo celular. A partir disso, estudos relatam que a suplementação de meios de cultura com lipídios resultam no aumento dos níveis de expressão de proteínas por célula (Van Der Valk *et al.*, 2010).

Em vista dos pontos apresentados sobre as vantagens de suplementação lipídica do meio de cultura, o meio SF900-III comumente utilizado em nosso laboratório para o cultivo de células S2 foi suplementado com CDLipid (*Chemically Defined Lipid Concentrate*- ThermoFisher) (1:100). Com base na figura 16, nossos resultados mostram que a adição de uma emulsão lipídica efetivamente levou a uma maior produção relativa de VLP. Esse resultado levou à adoção da suplementação do meio de cultivo com lipídeos para a realização da produção de maiores quantidades de VLP, visando sua purificação e caracterização.

No entanto, a detecção de proteínas estruturais dos *Alphavirus* no sobrenadante das células transfectadas não configura dado suficiente para afirmar que essas proteínas estão associadas no formato de VLP. Para isso são necessários procedimentos analíticos específicos efetuados sobre amostras concentradas e ao menos parcialmente purificadas.

O procedimento de separação das VLP de outras proteínas e estruturas celulares tem sido um dos principais gargalos ao desenvolvimento dessa tecnologia. O processo completo de recuperação de VLP pode ser divido em 3 fases: 1) clarificação, 2)

concentração/ purificação intermediaria e 3) polimento. Neste trabalho o processo de clarificação consistiu em uma centrifugação em alta velocidade (~8000 g) por 15 min com refrigeração (4 ºC), seguida de uma filtração a 0,45 μm. Na fase de concentração e purificação intermediaria, duas etapas foram necessárias: primeiro foi realizada uma ultra centrifugação de todo material clarificado para concentração das VLP, que foram recuperadas em um pellet formado no fundo do tubo. Esse material foi ressuspendido cuidadosamente em tampão TNE e submetido ao passo seguinte de purificação intermediaria.

Algumas VLP podem ser purificadas por ultracentrifugação utilizando CsCl, sacarose ou gradiente de iodixanol. Durante meu período de estágio no iBET, padronizei técnicas de concentração de VLP e tal conhecimento está sendo empregado na concentração de outras VLP produzidas no laboratório. A utilização de sacarose na purificação de CHIKV-VLP é aplicada em alguns trabalhos, entretanto é conveniente para produção em pequena escala, sendo pouco escalonável e laboriosa (Peixoto et al., 2007; Saha et al., 1994).

O reagente iodixanol (OptiPrep™) vem sendo empregado na purificação de diversos vírus como HIV-1, HTLV-1, Adenovírus associado recombinante (rAAV), HCV entre outros vírus (Gias *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2012). O iodixanol oferece grandes vantagens ao ser comparado à sacarose para a purificação em gradiente. O meio é menos viscoso, apresentando também menor toxicidade, permitindo um subseqüente ensaio de infecção viral sem a necessidade de sua remoção. Além disso, ele possui uma osmolalidade mais baixa e pode ser diluído em tampões iso-osmóticos, permitindo que as partículas possam ser purificadas em condições em que sua integridade e funcionalidade estejam preservadas (Graham, 2002).

Obtivemos um maior sucesso com a separação feita com gradiente de iodixanol, uma vez que foi possível observar um "anel" contendo as partículas, e a detecção de VLP de CHIKV e MAYV nas frações de densidade de 17 a 30 %. Em outro estudo em que foi utilizado iodixanol para separação de CHIKV VLP, obtidas por outros sistemas de expressão, também foram detectadas partículas positivas por um protoloco de separação com iodixanol semelhante (Akahata W., 2010), o que corrobora nossos resultados e ressalta que este seria um método conveniente para a separação de VLP desses arbovírus.

A fase de polimento de recuperação de VLP não foi realizada neste trabalho, uma vez que os métodos de purificação parcial se mostraram suficientes para possibilitar as análises estruturais das VLP. Portanto, as análises foram efetuadas em amostras purificadas em colchão de sacarose ou gradiente de iodixanol. Vale ressaltar a importante contribuição deste trabalho para o estabelecimento das duas metodologias no laboratório, possibilitando o desenvolvimento de outros trabalhos, envolvendo a separação de outras VLP ou mesmo de partículas virais.

As análises estruturais, efetuadas em amostras de sobrenadante das células, após as etapas de purificação, revelaram a existência das VLP. As imagens obtidas por TEM indicaram que essas VLP são morfologicamente semelhantes às partículas de vírus nativo e outros *Alphavírus*, sendo possível a visualização de seu brotamento a partir de células S2 recombinantes.

Em relação ao tamanho das partículas, mensuradas por Zetasizer, Nanosight e TEM, foi encontrada uma variação de 65 – 100 nm, sendo semelhante ao tamanho natural do CHIKV e provavelmente MAYV (Akahata *et al.*, 2010; Metz e Pijlman, 2016). Assim, as proteínas expressas demonstraram a capacidade de auto-combinação e formação de VLP, sendo liberadas no sobrenadante do cultivo.

O estudo cinético de células S2MT-CHIKV-Hy e S2MT-MAYV-Hy e a expressão de VLP foram realizados visando a determinação do melhor tempo de coleta dessas partículas no sobrenadante.

Através da taxa especifica de crescimento e cinética de crescimento celular apresentada nas figuras 22, 23 e 24, observamos diferença entre as velocidades de crescimento de células não induzidas (células S2 selvagens) e induzidas (células S2 produtoras de VLP de MAYV e CHIKV). Entretanto, a adição de sulfato de cobre ao meio de cultura não afetou o crescimento final e nem a viabilidade celular, uma vez que as concentrações celulares atingiram em torno de ~$8x10^6$céls/mL com 72 horas de cultivo e a viabilidade celular se manteve superior a 80% até o fim dos cultivos.

Em relação a expressão de VLP de MAYV e CHIKV neste ensaio, observamos que em ambas linhagens foi possível detectar VLP no sobrenadante do cultivo a partir de 24 horas de indução. A maior marcação relativa a VLP no sobrenadante ocorreu após 144 horas de indução. Isso indica um acúmulo de VLP no sobrenadante, fornece informação

sobre sua estabilidade e aponta uma possibilidade de prolongamento do cultivo em relação ao que vinha sendo praticado nos experimentos anteriores (96 h após a indução).

Para análises mais precisas do processo produtivo das VLP e sua melhoria, buscando obter altas quantidades em cultivos padronizados, é fundamental desenvolver um método analítico quantitativo, capaz de determinar a concentração das VLP, sem a necessidade de etapas de purificação prévias. Para isso utilizamos os protocolos de purificação das VLP para realizar duas preparações virais, uma de CHIKV e outra de MAYV. Esses vírus foram inativados quimicamente e utilizados para a imunização de coelhos. O soro policlonal foi submetido a uma coluna de proteína A, sendo obtido um soro policlonal purificado e dialisado, contra cada um dos vírus. Esse material está sendo utilizado para o desenvolvimento de um teste do tipo ELISA que será utilizado para a quantificação de VLP de MAYV e CHIKV, incluindo algumas das amostras geradas neste trabalho.

Em resumo, este trabalho descreve pela primeira vez o desenvolvimento de uma plataforma de produção de proteínas estruturais de arbovírus (MAYV e CHIKV) com a capacidade de formar VLP utilizando o sistema de células de *Drosophila melanogaster* (Células S2). Ensaios consistentes permitem concluir que as proteínas estruturais dos *Aphavirus* expressas nesse sistema se associaram em estruturas de VLP. Isso também mostra a aplicabilidade de vetores pMT-V5 para o processamento funcional e correto das proteínas estruturais em S2, uma vez que foram formadas partículas virais semelhantes aos vírus selvagens. Ensaios preliminares mostraram que as proteínas estruturais foram capazes de sensibilizar o sistema imune de camundongos, que produziram anticorpos quando expostos aos vírus MAYV e CHIKV inativados, na ausência de adjuvantes. Ensaios de imunogenicidade utilizando amostras de VLP purificadas poderão resultar em uma avaliação mais completa sobre a capacidade do desenvolvimento de uma resposta imune protetora e com isso determinar se essas VLP podem ser consideradas para a constituição de uma vacina no futuro.

7. CONCLUSÃO

1. Células S2 transfectadas estavelmente com vetores indutíveis para a expressão de proteínas de *Alphavirus* foram estabelecidas com sucesso.
2. As populações demonstram melhor expressão das proteínas de CHIKV quando foram obtidas a partir da transfecção com o vetor modificado para conter o gene de seleção, evitando a necessidade da realização de co-transfecção.
3. O procedimento de enriquecimento populacional por técnica imunomagnética demonstrou melhorar a expressão das proteínas recombinantes.
4. Com base na utilização de anticorpos específicos, foi possível observar a presença das proteínas C e E2 de Chikungunya, e da proteína C de Mayaro, tanto em amostras de células íntegras (Imunofluorescência) como em lisados celulares e sobrenadante de cultivo (*Western blotting*).
5. Com base em análises de cultivos em diferentes meios de cultura, contendo ou não suplementação, foi verificada uma maior presença de proteínas recombinantes no sobrenadante celular quando o meio SF900 III foi suplementado com emulsão lipídica.
6. Cinéticas de cultivo celular demonstraram uma presença das proteínas recombinantes com aumento gradual de quantidade no decorrer do tempo de cultivo após a indução.
7. Lisados celulares de células S2MT-MAYV-Hy e S2MT-CHIKV-Hy foram capazes de estimular camundongos contra os antígenos virais, sendo observado aumento no título de anticorpos específicos quando os animais foram expostos aos respectivos vírus inativados.
8. Os dados obtidos utilizando técnicas de análise de estruturas e partículas (TEM, Zetasizer e Nanosight) indicam claramente a formação de estruturas VLP a partir dos cultivos de S2MT-MAYV-Hy e S2MT-CHIKV-Hy.

Referências Bibliográficas*

AKAHATA, W.; NABEL, G. J. A specific domain of the Chikungunya virus E2 protein regulates particle formation in human cells: implications for alphavirus vaccine design. **J Virol,** v. 86, n. 16, p. 8879-83, Aug 2012. ISSN 1098-5514. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22647698 >.

AKAHATA, W. et al. A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection. **Nat Med,** v. 16, n. 3, p. 334-8, Mar 2010. ISSN 1546-170X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20111039 >.

ASSUNÇÃO-MIRANDA, I.; CRUZ-OLIVEIRA, C.; DA POIAN, A. T. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of alphavirus-induced arthritis. **Biomed Res Int,** v. 2013, p. 973516, 2013. ISSN 2314-6141. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24069610 >.

ASTRAY, R. M. et al. Kinetic studies of recombinant rabies virus glycoprotein (RVGP) cDNA transcription and mRNA translation in Drosophila melanogaster S2 cell populations. **Cytotechnology,** v. 65, n. 5, p. 829-38, Oct 2013. ISSN 0920-9069. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23340966 >.

AZEVEDO, R. S. et al. Mayaro fever virus, Brazilian Amazon. **Emerg Infect Dis,** v. 15, n. 11, p. 1830-2, Nov 2009. ISSN 1080-6059. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19891877 >.

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

BRUNINI, S. et al. High Frequency of Mayaro Virus IgM among Febrile Patients, Central Brazil. **Emerg Infect Dis,** v. 23, n. 6, p. 1025-1026, 06 2017. ISSN 1080-6059. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28518022 >.

CHUNG, Y. T.; KELLER, E. B. Regulatory elements mediating transcription from the Drosophila melanogaster actin 5C proximal promoter. **Mol Cell Biol,** v. 10, n. 1, p. 206-16, Jan 1990. ISSN 0270-7306. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2104658 >.

COIMBRA, T. L. et al. Mayaro virus: imported cases of human infection in São Paulo State, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo,** v. 49, n. 4, p. 221-4, 2007 Jul-Aug 2007. ISSN 0036-4665. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17823750 >.

CUNHA, R. V. D.; TRINTA, K. S. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 112, n. 8, p. 523-531, Aug 2017. ISSN 1678-8060. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28767976 >.

DEZURE, A. D. et al. Whole-Inactivated and Virus-Like Particle Vaccine Strategies for Chikungunya Virus. **J Infect Dis,** v. 214, n. suppl 5, p. S497-S499, Dec 2016. ISSN 1537-6613. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27920180 >.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requeriments for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [Cited 2011 Jul 15]. Available from: http://www.icmje.org

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

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

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

ERASMUS, J. H. et al. A chikungunya fever vaccine utilizing an insect-specific virus platform. **Nat Med,** v. 23, n. 2, p. 192-199, Feb 2017. ISSN 1546-170X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27991917 >.

ESPOSITO, D. L. A.; FONSECA, B. A. L. D. Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? **Braz J Infect Dis,** v. 21, n. 5, p. 540-544, 2017 Sep - Oct 2017. ISSN 1678-4391. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28688628 >.

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

FIGUEIREDO, L. T. Emergent arboviruses in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop,** v. 40, n. 2, p. 224-9, 2007 Mar-Apr 2007. ISSN 0037-8682. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17568894 >.

FIGUEIREDO, M. L.; FIGUEIREDO, L. T. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. **Rev Soc Bras Med Trop,** v. 47, n. 6, p. 677-83, 2014 Nov-Dec 2014. ISSN 1678-9849. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25626645 >.

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

GIAS, E. et al. Purification of human respiratory syncytial virus by ultracentrifugation in iodixanol density gradient. **J Virol Methods,** v. 147, n. 2, p. 328-32, Feb 2008. ISSN 0166-0934. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18029032 >.

GOO, L. et al. A virus-like particle vaccine elicits broad neutralizing antibody responses in humans to all Chikungunya virus genotypes. **J Infect Dis**, Sep 2016. ISSN 1537-6613. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27655868 >.

GORCHAKOV, R. et al. Attenuation of Chikungunya virus vaccine strain 181/clone 25 is determined by two amino acid substitutions in the E2 envelope glycoprotein. **J Virol,** v. 86, n. 11, p. 6084-96, Jun 2012. ISSN 1098-5514. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22457519 >.

GRAHAM, J. M. Formation of self-generated gradients of iodixanol. **ScientificWorldJournal,** v. 2, p. 1356-60, May 2002. ISSN 1537-744X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12805920 >.

GUO, P. et al. Rapid and simplified purification of recombinant adeno-associated virus. **J Virol Methods,** v. 183, n. 2, p. 139-46, Aug 2012. ISSN 1879-0984. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22561982 >.

GÉLINAS, J. F. et al. Assessment of selected media supplements to improve F/HN lentiviral vector production yields. **Sci Rep,** v. 7, n. 1, p. 10198, Aug 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28860488 >.

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

HARRISON, V. R.; BINN, L. N.; RANDALL, R. Comparative immunogenicities of chikungunya vaccines prepared in avian and mammalian tissues. **Am J Trop Med Hyg,** v. 16, n. 6, p. 786-91, Nov 1967. ISSN 0002-9637. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4965219 >.

HOTEZ, P. J.; MURRAY, K. O. Dengue, West Nile virus, chikungunya, Zika-and now Mayaro? **PLoS Negl Trop Dis,** v. 11, n. 8, p. e0005462, 08 2017. ISSN 1935-2735. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28859086 >.

IWAKI, T.; CASTELLINO, F. J. A single plasmid transfection that offers a significant advantage associated with puromycin selection in Drosophila Schneider S2 cells expressing heterologous proteins. **Cytotechnology,** v. 57, n. 1, p. 45-9, May 2008. ISSN 0920-9069. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19003171 >.

IWAKI, T. et al. Rapid selection of Drosophila S2 cells with the puromycin resistance gene. **Biotechniques,** v. 35, n. 3, p. 482-4, 486, Sep 2003. ISSN 0736-6205. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14513552 >.

IZURIETA, R. O. et al. Hunting in the Rainforest and Mayaro Virus Infection: An emerging Alphavirus in Ecuador. **J Glob Infect Dis,** v. 3, n. 4, p. 317-23, Oct 2011. ISSN 0974-8245. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22223990 >.

JOHANSSON, D. X. et al. Efficient expression of recombinant human monoclonal antibodies in Drosophila S2 cells. **J Immunol Methods,** v. 318, n. 1-2, p. 37-46, Jan 2007. ISSN 0022-1759. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17137589 >.

JOHN, W. A.; SALGUEIRO, S. **The use of Drosophila S2 in R&D and bioprocessing**. Pharmaceutical Bioprocessing. 1**:** 197-213 p. 2013.

JONGH, W. A.; SANCHA, S.; CHARLLOTTE, D. **The**

use of Drosophila S2 cells in R&D and bioprocessing Pharmaceutical Bioprocessing. 1**:** 197-213 p. 2012.

JOSE, J.; SNYDER, J. E.; KUHN, R. J. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. **Future Microbiol,** v. 4, n. 7, p. 837-56, Sep 2009. ISSN 1746-0921. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19722838 >.

KARIUKI NJENGA, M. et al. Tracking epidemic Chikungunya virus into the Indian Ocean from East Africa. **J Gen Virol,** v. 89, n. Pt 11, p. 2754-60, Nov 2008. ISSN 0022-1317. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18931072 >.

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

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

LI, C. et al. Hantavirus-like particles generated in CHO cells induce specific immune responses in C57BL/6 mice. **Vaccine,** v. 28, n. 26, p. 4294-300, Jun 2010. ISSN 1873-2518. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20433802 >.

LORENZ, C. et al. Impact of environmental factors on neglected emerging arboviral diseases. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 11, n. 9, p. e0005959, Sep 2017. ISSN 1935-2735. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28953892 >.

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

LUMSDEN, W. H. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. II. General description and epidemiology. **Trans R Soc Trop Med Hyg,** v. 49, n. 1, p. 33-57, Jan 1955. ISSN 0035-9203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14373835 >.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E. Mayaro virus: a forest virus primed for a trip to the city? **Microbes Infect,** v. 18, n. 12, p. 724-734, Dec 2016. ISSN 1769-714X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27989728 >.

MALLILANKARAMAN, K. et al. A DNA vaccine against chikungunya virus is protective in mice and induces neutralizing antibodies in mice and nonhuman primates. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 5, n. 1, p. e928, 2011. ISSN 1935-2735. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21264351 >.

MCCARROLL, L.; KING, L. A. Stable insect cell cultures for recombinant protein production. **Curr Opin Biotechnol,** v. 8, n. 5, p. 590-4, Oct 1997. ISSN 0958-1669. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9353223 >.

METZ, S. W. et al. Chikungunya virus-like particles are more immunogenic in a lethal AG129 mouse model compared to glycoprotein E1 or E2 subunits. **Vaccine,** v. 31, n. 51, p. 6092-6, Dec 2013. ISSN 1873-2518. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24099875 >.

METZ, S. W.; PIJLMAN, G. P. Production of Chikungunya Virus-Like Particles and Subunit Vaccines in Insect Cells. **Methods Mol Biol,** v. 1426, p. 297-309, 2016. ISSN 1940-6029. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27233282 >.

MILLAR, N. S.; BUCKINGHAM, S. D.; SATTELLE, D. B. Stable expression of a functional homo-oligomeric Drosophila GABA receptor in a Drosophila cell line. **Proc Biol Sci,** v. 258, n. 1353, p. 307-14, Dec 1994. ISSN 0962-8452. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7533909 >.

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

MORAES, A. M. et al. Drosophila melanogaster S2 cells for expression of heterologous genes: From gene cloning to bioprocess development. **Biotechnol Adv,** v. 30, n. 3, p. 613-28, 2012 May-Jun 2012. ISSN 1873-1899. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22079894 >.

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

MOTA, M. T. et al. Complete Genome Sequence of Mayaro Virus Imported from the Amazon Basin to São Paulo State, Brazil. **Genome Announc,** v. 3, n. 6, Nov 2015. ISSN 2169-8287. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26607884 >.

MUÑOZ, M.; NAVARRO, J. C. [Mayaro: a re-emerging Arbovirus in Venezuela and Latin America]. **Biomedica,** v. 32, n. 2, p. 286-302, Jun 2012. ISSN 0120-4157. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23242303 >.

MÄKELÄ, P. H. Vaccines, coming of age after 200 years. **FEMS Microbiol Rev,** v. 24, n. 1, p. 9-20, Jan 2000. ISSN 0168-6445. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10640596 >.

NORANATE, N. et al. Characterization of chikungunya virus-like particles. **PLoS One,** v. 9, n. 9, p. e108169, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25265335 >.

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

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

PLANTE, K. S. et al. Extended Preclinical Safety, Efficacy and Stability Testing of a Live-attenuated Chikungunya Vaccine Candidate. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 9, n. 9, p. e0004007, 2015. ISSN 1935-2735. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26340754 >.

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

RAVICHANDRAN, R.; MANIAN, M. Ribavirin therapy for Chikungunya arthritis. **J Infect Dev Ctries,** v. 2, n. 2, p. 140-2, Apr 2008. ISSN 1972-2680. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19738340 >.

ROBINSON, D. M. et al. Inactivated Mayaro vaccine produced in human diploid cell cultures. **Mil Med,** v. 141, n. 3, p. 163-6, Mar 1976. ISSN 0026-4075. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/815839 >.

ROBINSON, M. C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. **Trans R Soc Trop Med Hyg,** v. 49, n. 1, p. 28-32, Jan 1955. ISSN 0035-9203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14373834 >.

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

_____. Retroviral vector production under serum deprivation: The role of lipids. **Biotechnol Bioeng,** v. 104, n. 6, p. 1171-81, Dec 2009. ISSN 1097-0290. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19655394 >.

ROOSENHOFF, R.; ANFASA, F.; MARTINA, B. The pathogenesis of chronic chikungunya: evolving concepts. **Future Virology,** v. 11, n. 1, p. 61-77, 2016. ISSN 1746-0794. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000367159400007 >.

ROSS, R. W. The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **J Hyg (Lond),** v. 54, n. 2, p. 177-91, Jun 1956. ISSN 0022-1724. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13346078 >.

RUNOWSKA, M. et al. Chikungunya virus: a rheumatologist's perspective. **Clin Exp Rheumatol**, Mar 2018. ISSN 0392-856X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29533749 >.

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

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

SARASWAT, S. et al. Expression and Characterization of Yeast Derived Chikungunya Virus Like Particles (CHIK-VLPs) and Its Evaluation as a Potential Vaccine Candidate. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 10, n. 7, p. e0004782, Jul 2016. ISSN 1935-2735. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27399001 >.

TAN, M. et al. E. coli-expressed recombinant norovirus capsid proteins maintain authentic antigenicity and receptor binding capability. **J Med Virol,** v. 74, n. 4, p. 641-9, Dec 2004. ISSN 0146-6615. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15484274 >.

TAYLOR, A. et al. Mutation of the N-Terminal Region of Chikungunya Virus Capsid Protein: Implications for Vaccine Design. **MBio,** v. 8, n. 1, 02 2017. ISSN 2150-7511. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28223458 >.

TESH, R. B. et al. Mayaro virus disease: an emerging mosquito-borne zoonosis in tropical South America. **Clin Infect Dis,** v. 28, n. 1, p. 67-73, Jan 1999. ISSN 1058-4838. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10028074 >.

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

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

USTA, S. N. et al. Chemically defined serum-free and xeno-free media for multiple cell lineages. **Ann Transl Med,** v. 2, n. 10, p. 97, Oct 2014. ISSN 2305-5839. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25405151 >.

VAN DER VALK, J. et al. Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. **Toxicol In Vitro,** v. 24, n. 4, p. 1053-63, Jun 2010. ISSN 1879-3177. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20362047 >.

VAN ZYL, A. R.; HITZEROTH, I. I. Purification of Virus-Like Particles (VLPs) from Plants. **Methods Mol Biol,** v. 1404, p. 569-79, 2016. ISSN 1940-6029. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27076323 >.

VASCONCELOS, P. F. C.; CALISHER, C. H. Emergence of Human Arboviral Diseases in the Americas, 2000-2016. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases,** v. 16, n. 5, p. 295-301, May 2016. ISSN 1530-3667. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000374836400001 >.

VENTINI, D. C. et al. Recombinant rabies virus glycoprotein synthesis in bioreactor by transfected Drosophila melanogaster S2 cells carrying a constitutive or an inducible promoter. **J Biotechnol,** v. 146, n. 4, p. 169-72, Apr 2010. ISSN 1873-4863. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20176061 >.

WANG, D. et al. A complex adenovirus vaccine against chikungunya virus provides complete protection against viraemia and arthritis. **Vaccine,** v. 29, n. 15, p. 2803-9, Mar 2011. ISSN 1873-2518. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21320541 >.

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

WEISE, W. J. et al. A novel live-attenuated vaccine candidate for mayaro Fever. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 8, n. 8, p. e2969, Aug 2014. ISSN 1935-2735. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25101995 >.

WHITE, A.; BERMAN, S.; LOWENTHAL, J. P. Comparative immunogenicities of Chikungunya vaccines propagated in monkey kidney monolayers and chick embryo suspension cultures. **Appl Microbiol,** v. 23, n. 5, p. 951-2, May 1972. ISSN 0003-6919. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4624213 >.

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

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

ZELTINS, A. Construction and characterization of virus-like particles: a review. **Mol Biotechnol,** v. 53, n. 1, p. 92-107, Jan 2013. ISSN 1559-0305. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23001867 >.

ZHU, J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. **Biotechnol Adv,** v. 30, n. 5, p. 1158-70, 2012 Sep-Oct 2012. ISSN 1873-1899. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21968146 >.

ZUCHI, N. et al. Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 109, n. 6, p. 820-3, Sep 2014. ISSN 1678-8060. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25141284 >.