

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**Avaliação da expressão de proteínas de
Chikungunya
em células S2 (*Drosophila melanogaster*)**

Orientador: Dr. Renato Mancini Astray

Discente: Fernanda Santos de Oliveira

**São Paulo
2019**

Fernanda Santos de Oliveira

**Avaliação da expressão de proteínas de
Chikungunya
em células S2 (*Drosophila melanogaster*)**

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biomédicas, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas, Ênfase em Biotecnologia em Saúde.

Orientador: Dr. Renato Mancini Astray

**São Paulo
2019**

“Nada vem do nada. Não no sentido de que somos destinados a tudo que nos acontece, mas no sentido de que devemos lutar por tudo aquilo que almejamos, para deixar de ser sonho e se tornar realidade.”

Fernanda Santos de Oliveira

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo apoio motivacional, por sempre acreditarem em mim, e pelo auxílio financeiro quando precisei estar longe, pois sem isso não seria possível ter chegado até aqui.

À turma 3, por todos os momentos em que nos ajudamos, fortalecemos e nos incentivamos a continuar em frente. Também pelos momentos de diversão e alegria nos quais nos apoiamos para deixar a graduação mais leve. Em especial aos meus amigos de turma Douglas S. e Queren A. que além de tudo isso sempre estiveram dispostos a oferecer um ombro amigo nos momentos de crise, angústia e dúvidas mesmo em assuntos pessoais. Me mostraram que mesmo quando eu achava que não tinha jeito, havia uma forma de superar o obstáculo e que eu não estava sozinha ali. Sem dúvidas pessoas admiráveis que quero ter a honra de continuar cultivando amizade.

Aos veteranos do curso que sempre que puderam estiveram dispostos a ajudar, tirar dúvidas, emprestar material de estudos e até dar conselhos.

Aos meus amigos, que espalhados por diversas cidades, muitas vezes distantes, sempre me apoiaram e acreditaram na minha competência e dedicação.

Aos colaboradores do Laboratório de Imunologia Viral do Butantan que ajudaram na minha evolução pessoal e profissional, especialmente ao meu orientador perante este projeto Dr. Renato, por todo conhecimento repassado com uma paciência admirável, e à doutoranda Livia Pilatti que me acompanhou diversas vezes, me orientando e tirando dúvidas acerca de técnicas e experimentos.

Agradeço também aos colaboradores do Laboratório de Neuroendocrinologia da FMRP- USP que apesar de não terem a ver diretamente com este projeto, foram de fundamental importância para minha construção profissional e pessoal. Principalmente ao Prof^o Dr. José Antunes que através do seu conhecimento de mundo e experiências de vida me possibilitou enxergar como colaborar com outras pessoas e ao mesmo tempo ter autonomia e responsabilidade, e ao Dr. Wagner L. Reis por toda paciência e ensinamento durante o desenvolvimento do meu primeiro projeto de iniciação científica, conhecimentos esses que hoje julgo essenciais.

RESUMO

O vírus Chikungunya (CHIKV, *Togaviridae*, *Alphavirus*) foi introduzido no território brasileiro a partir de 2014 e desde então vem causando surtos epidêmicos em vários estados como Roraima, Sergipe e Rio de Janeiro. O combate ao CHIKV envolve medidas de controle de seu principal vetor *Ae. Albopictus* e abordagens selecionadas ao diagnóstico preciso, tratamento e prevenção. Neste último caso, vários candidatos vacinais têm sido propostos incluindo vírus atenuados, inativos, ácidos nucleicos e subunidades. Entre as categorias subunidades e vírus inativos, destacam-se as vacinas de VLP (*Virus Like Particles*) por combinar a segurança das vacinas de subunidades e o efeito imunogênico das estruturas típicas das vacinas de vírus inativados. O objetivo deste trabalho foi o estudo das melhores condições de cultura de células S2 (*Drosophila melanogaster*) para a produção de antígenos de CHIKV, sendo potencialmente organizados como VLP. Para isso, foram testadas condições de cultivo em dois meios de cultura distintos: SF900 III suplementado com lipídio e IPL-41 modificado. Ensaio foram realizados em triplicata em frascos Schott com volume final de 20 mL, inóculo inicial de 2×10^6 células/mL, sob agitação de 100 rpm e a 28°C. A expressão das proteínas do CHIKV foi induzida em diferentes tempos da cinética de crescimento celular, visando avaliar qual o melhor meio de cultura e tempo de indução da expressão das proteínas. Foi constatada a melhor condição de expressão a partir da indução em 48h de crescimento, utilizando o meio SF900III + CD Lipid, obtendo o maior nível de expressão no tempo 96h. Essa condição foi utilizada para a produção de um volume maior de cultura com aumento de escala de cinco vezes e o mesmo inóculo inicial, objetivando obter maiores quantidades de VLP. Após o cultivo, as VLP foram concentradas e submetidas à ultracentrifugação em gradiente de iodixanol, que demonstrou não ser eficiente para separação das VLP em uma única fração. Análises de SDS-PAGE e *Western Blotting* mostraram que nas frações de ultracentrifugação (1 a 8) são evidentes proteínas de alto peso molecular que foram marcadas pelos anticorpos anti-CHIKV. Apesar de a marcação inespecífica não poder ser descartada, é provável que sejam formas agregadas, ou mesmo imaturas das proteínas que compõem as VLP. Na fração 9 houve uma concentração grande das proteínas específicas de CHIKV, nos tamanhos esperados, mas ainda foram encontradas as proteínas de alto peso molecular, evidenciando que o processo de purificação por gradiente ainda não foi satisfatório e deverá ser melhorado. Os resultados de maneira geral permitiram a definição do melhor meio, tempo de indução e coleta do produto, bem como a caracterização da presença das proteínas de CHIKV com provável organização em forma de VLP.

Palavras-chave: células S2, Chikungunya, Alphavirus, VLP.

ABSTRACT

The Chikungunya virus (CHIKV, *Togaviridae*, *Alphavirus*) was introduced in the Brazilian territory from 2014 and since then has caused epidemic outbreaks in several states such as Roraima, Sergipe and Rio de Janeiro. Combating CHIKV involves controlling your main vector *Ae. Albopictus* and the development of selected approaches to accurate diagnosis, treatment and prevention. In the latter case, several vaccine candidates have been proposed including attenuated, inactive viruses, nucleic acids and subunits. Between the subunit and inactive virus categories, Virus Like Particles (VLP) vaccines stand out for combining the safety of subunit vaccines and the immunogenic effect of typical structures of inactivated virus vaccines. The objective of this work was to study the best culture conditions of S2 cells (*Drosophila melanogaster*) for the production of CHIKV antigens, being potentially organized as VLP. Culture conditions were tested in two distinct culture media: SF900 III supplemented with lipid and modified IPL-41. Assays were performed in triplicate in Shott flasks with final volume of 20 mL, initial inoculum of 2×10^6 cells / ml, under agitation at 100 rpm at 28 ° C. CHIKV protein expression was induced at specific time points during cell growth kinetics, aiming to evaluate the best culture medium and protein expression induction time. The best expression condition was found with the induction at 48h of growth, using SF900III + CD Lipid medium, obtaining the highest expression level at 96h. This condition was used to produce a larger culture volume with five times scaling and the same initial inoculum concentration, aiming to obtain larger quantities of VLP. After cultivation, the VLP were concentrated and further submitted to iodixanol gradient ultracentrifugation, which proved to be inefficient for separating the VLP in a single fraction. SDS-PAGE and Western Blotting analysis showed that in ultracentrifugation fractions (1 to 8) high molecular weight proteins were evident which were labeled by anti-CHIKV antibodies. Although nonspecific labeling cannot be discarded, it is likely that they represent aggregates or even immature forms of the VLP proteins. In fraction 9 there was a large concentration of CHIKV specific proteins in the expected sizes, but the high molecular weight proteins were still found, evidencing that the gradient purification process was not efficient and must be improved. The overall results allowed the definition of the best medium, induction time and product harvest point, as well as the characterization of the presence of CHIKV proteins with probable VLP organization.

Keywords: S2 cells, Chikungunya, *Alphavirus*, VLP.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1. Vírus Chikungunya	15
2.2. Genoma, Replicação e Estrutura do CHIKV.....	16
2.3. Diagnóstico e Tratamento	19
2.4. Vacinas Virais	20
2.5. <i>Virus Like Particles</i> (VLP).....	21
2.6. Plataformas de produção de VLP	22
2.7. Sistema de expressão em células de <i>Drosophila melanogaster</i>	24
2.8. Influência do meio de cultura no cultivo celular.....	24
3. OBJETIVO GERAL	26
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1. Meios de cultura.....	27
4.2. Linhagem Celular.....	27
4.3. Manutenção das Células	28
4.4. Banco de Células e Criopreservação	28
4.4.1. Congelamento.....	28
4.4.2. Descongelamento	28
4.5. Cinética de Crescimento Celular	29
4.6. Determinação da Concentração e Viabilidade Celular	29
4.7. Produção das VLP	30
4.8. Determinação da Curva de Crescimento Celular nos diferentes meios de cultura	30
4.9. Obtenção das VLP	31
4.9.1. Clarificação	31
4.9.2. Concentração por ultracentrifugação	31
4.9.3. Colchão de iodixanol.....	31
4.9.4. Gradiente de iodixanol	32
4.10. Análise da expressão, da concentração e purificação das proteínas	32
4.10.1. Dot Blotting.....	32

4.10.2.	SDS-PAGE	33
4.10.3.	Western Blotting.....	34
5.	RESULTADOS	35
5.1.	Cinética de crescimento celular nos diferentes meios de cultura	35
5.2.	Avaliação da expressão das proteínas nos diferentes meios de cultura	37
5.2.1.	Análise qualitativa	37
5.2.2.	Análise semi-quantitativa.....	40
5.3.	Experimento com aumento de escala	44
5.3.1.	Cinética de crescimento celular	44
5.4.	Expressão das proteínas em maior escala	46
5.4.1.	Análise qualitativa	46
5.4.2.	Análise semi-quantitativa.....	47
5.5.	Purificação de VLP de CHIKV por gradiente de iodixanol	48
5.5.1.	Análise qualitativa	48
5.5.2.	Análise semi-quantitativa.....	49
5.5.3.	Purificação (SDS-Page)	49
5.5.4.	Western blotting	50
6.	DISCUSSÃO	52
7.	CONCLUSÕES.....	54
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
9.	APÊNDICE	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina Sérica Bovina
BEVS	Sistema de Vetor de Expressão de Baculovírus
CHIKV	Vírus Chikungunya
CuSO₄	Sulfato de cobre
DENV	Vírus da Dengue
DMSO	Dimetilsulfóxido
EEEV	Vírus da Encefalite Equina Oriental
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Papiloma Vírus Humano
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IFI	Imunofluorescência Indireta
MAYV	Vírus Mayaro
ORF	Open Read Frames
OROV	Vírus Oropouche
PBS	Solução Tampão de Salina Fosfatada
PCR	Polymerase Chain Reaction
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
S2	Célula de <i>Drosophila melanogaster</i> (Schneider S2)
SFB	Soro Fetal Bovino
VEEV	Vírus da Encefalite Equina Venezuelana
VLP	Virus like particle
WHO	Organização Mundial de Saúde
ZIKV	Vírus Zika

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Genoma dos <i>Alphavirus</i>	17
Figura 2 - Replicação de um <i>Alphavirus</i> em célula hospedeira.....	18
Figura 3 - Estrutura em 3D do vírus montado.....	19
Figura 4 - Estratégias vacinais, principais vantagens e desvantagens.	21
Figura 5 - Estrutura geral de VLP “nuas” e envelopadas.....	22
Figura 6 - Gráfico da cinética de crescimento celular das diferentes condições no meio de cultura SF900 III + CD Lipid.....	35
Figura 7 - Gráfico da cinética de crescimento celular das diferentes condições no meio de cultura IPL-41 modificado.	36
Figura 8 - Imagem da membrana de <i>Dot blotting</i> de amostras de sobrenadante dos cultivos em meio SF900 III + CD Lipid.	37
Figura 9 - Imagem da membrana de <i>Dot blotting</i> de amostras de células dos cultivos em meio SF900 III + CD Lipid.	38
Figura 10 - Imagem da membrana de <i>Dot blotting</i> de amostras de sobrenadante dos cultivos em meio IPL-41 modificado.....	39
Figura 11 - Imagem da membrana de <i>Dot blotting</i> de amostras de células dos cultivos em meio IPL-41 modificado.....	39
Figura 12 - Gráfico da intensidade de sinal da marcação das proteínas de CHIKV em amostras de sobrenadante das diferentes condições de indução em meio SF900 III + CD Lipid.....	40
Figura 13 - Gráfico da intensidade de sinal da marcação das proteínas de CHIKV em amostras de células das diferentes condições de indução em meio SF900 III + CD Lipid.	41
Figura 14 - Gráfico da intensidade de sinal da marcação das proteínas de CHIKV em amostras de sobrenadante das diferentes condições de indução em meio IPL-41 modificado.....	42
Figura 15 - Gráfico da intensidade de sinal da marcação das proteínas de CHIKV em amostras de células das diferentes condições de indução em meio IPL-41 modificado.....	42
Figura 16 - Gráfico da intensidade de sinal das marcações das proteínas de CHIKV em amostras de sobrenadante comparativo entre a condição 2 do meio SF900 III + CD Lipid e a condição 2 do meio IPL-41 modificado.....	43
Figura 17 - Gráfico da intensidade de sinal das marcações das proteínas de CHIKV em amostras de células comparativo entre a condição 2 do meio SF900 III + CD Lipid e a condição 2 do meio IPL-41 modificado.....	44

Figura 18 - Gráfico da cinética de crescimento celular com aumento de escala (Erlenmeyers) em comparação à escala menor (Frascos Schott), na Condição 2 de indução, utilizando o meio de cultura SF900 III + CD Lipid.....	45
Figura 19 - Gráfico da concentração celular linearizada com aumento de escala (Erlenmeyers) em comparação à escala menor (Frascos Schott), na Condição 2 de indução, utilizando o meio de cultura SF900 III + CD Lipid.....	46
Figura 20 - Imagem da membrana de <i>Dot blotting</i> de amostras de sobrenadante dos Erlenmeyers.	47
Figura 21 - Gráfico da intensidade de sinal de proteínas de CHIKV no sobrenadante após aumento de escala da condição 2 do meio SF900 III + CD Lipid.....	47
Figura 22 Imagem da membrana de <i>Dot blotting</i> das frações coletadas no gradiente de iodixanol.....	48
Figura 23 - Gráfico da intensidade de sinal obtido por <i>Dot Blotting</i> das frações do gradiente de iodixanol.	49
Figura 24 - SDS-Page das frações obtidas pelo gradiente de iodixanol.	50
Figura 25 - <i>Western Blotting</i> das frações obtidas pelo gradiente de iodixanol.....	51
Figura 26 - Gráfico de absorbância do teste de Elisa do protocolo 1.	63
Figura 27 - Gráfico de absorbância do teste de Elisa do protocolo 2.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos utilizados nos ensaios de <i>Dot Blotting</i>	33
Tabela 2 - Características dos anticorpos utilizados no ELISA no Protocolo 1.	61
Tabela 3 - Características dos anticorpos utilizados no ELISA no Protocolo 2.	62

1. INTRODUÇÃO

Recentemente tem sido observado o aparecimento de diversas arboviroses em diferentes partes do mundo, principalmente nos continentes americano, africano e asiático. A dispersão desses patógenos virais se intensificou com a ampliação dos sistemas de transportes globais, que facilitam e aumentam o acesso às viagens internacionais. As alterações ecológicas promovidas pelo homem, a urbanização não planejada e a rápida adaptação dos mosquitos transmissores aos ambientes, também contribuem para a disseminação.

A introdução do vírus Chikungunya (CHIKV) no Brasil aconteceu na sequência de uma série de alertas epidemiológicos realizados anteriormente. Como consequência, o vírus acabou se espalhando por diversas regiões do país.

O CHIKV (arbovírus pertencente ao gênero *Alphavirus*) é transmitido para humanos através da picada do mosquito *Aedes* ssp.: *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Que são duas espécies cosmopolitas, que estão presentes em todo o território brasileiro, e que transmitem outras arboviroses como a Dengue. O que faz com que a disseminação das arboviroses, incluindo a febre Chikungunya, seja potencializada em território nacional (Figueiredo e Figueiredo, 2014).

Quando se compara a febre Chikungunya com a Dengue, a epidemiologia da febre Chikungunya apresenta características que amplificam a sua disseminação e aumentam a possibilidade de epidemias. Entre elas estão um menor tempo de incubação tanto extrínseca como a intrínseca, e maior período de viremia.

Os sintomas da infecção por CHIKV podem existir ou não, quando se manifestam há primeiro 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 longos períodos. 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 a forma crônica da doença (Runowska et al., 2018). Tendo em vista esse cenário, é fundamental que sejam propostas alternativas para o combate a esse vírus emergente.

Neste trabalho buscamos a expressão recombinante, concentração e purificação das proteínas estruturais e imunogênicas do CHIKV, de maneira a possibilitar futuros estudos da utilização dessas preparações para fins de imunização.

Buscamos entender a melhor maneira de obtenção das proteínas imunogênicas do CHIKV, visando sua apresentação como partículas semelhantes a vírus (VLP), consideradas uma das formas mais promissoras para a imunização contra *Alphavirus* por apresentarem diversas vantagens frente a outras formas

vacinais. Elas são mais seguras que as vacinas virais atenuadas e por serem 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*), cultivadas em monocamada e posteriormente em suspensão. Além das células S2 permitirem a expressão estável das proteínas recombinantes, este é um sistema em que não deve haver modificações importantes nas características estruturais das proteínas, dado que em seu ciclo zoonótico, o vírus realiza passagem em insetos da mesma ordem *Diptera* das células S2.

Os trabalhos realizados envolveram a avaliação da melhor condição de expressão das proteínas de CHIKV na forma de VLP (meio de cultura e tempo de indução); cinética de crescimento celular; a tentativa de estabelecimento de métodos analíticos adequados para quantificação (padronização de um ELISA); aumento de escala; concentração e purificação das VLP.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Vírus Chikungunya

O vírus chikungunya (CHIKV) é um arbovírus, o que significa que sua veiculação é realizada exclusivamente através de artrópodes (*Arthropod-borne virus*). Além disso, parte do seu ciclo replicativo ocorre impreterivelmente em insetos. Esses vírus são transmitidos a seres humanos e a outros animais pela picada de artrópodes hematófagos já contaminados com o vírus, e assim são mantidos em ciclo de transmissão entre artrópodes, que são vetores, e reservatórios vertebrados como principais hospedeiros amplificadores (macacos, aves, gado, roedores e seres humanos durante os períodos de epidemia) (Azevedo et al., 2009; Vasconcelos e Calisher, 2016; Schwarz et al, 2012). No caso do CHIKV a transmissão para humanos ocorre principalmente através da picada do mosquito *Aedes ssp.* (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*).

Os arbovírus mais conhecidos incluem os vírus: Zika (ZIKV); Mayaro (MAYV); o vírus da encefalite equina da Venezuela (VEEV); o Oropouche (OROV); Caraparu; Dengue (DENV); e Chikungunya (Vasconcelos e Calisher, 2016). Em sua maioria, os vírus que pertencem a esse gênero não causam doenças graves. Na maior parte dos casos pode ocorrer uma doença branda que apresenta sintomas gerais comuns ao gênero, que são: febre, dor de cabeça e mal-estar. Porém, alguns dos arbovírus supracitados podem causar uma doença mais severa, podendo inclusive levar o paciente acometido a óbito.

A principal questão que requer atenção em relação a esses vírus é que atualmente o surgimento e a dispersão dos arbovírus se intensificaram, sendo ampliadas principalmente devido a fatores ambientais, causados pela ação humana e à rápida adaptação dos artrópodes à crescente urbanização (Donalisio et al., 2015). As mudanças ecológicas causadas pelo homem podem também criar novos reservatórios, ou mesmo induzir os arbovírus a se adaptarem a outros ciclos de manutenção, nos quais antes não eram capazes de se manter. Embora cada vírus tenha suas próprias variáveis que colaboram para sua epidemiologia, os arbovírus são capazes de se disseminar por várias regiões do mundo, o que eleva ainda mais seu potencial de causar uma pandemia (Morrison, 2014; Figueiredo, 2007).

Historicamente, o primeiro surto registrado causado por CHIKV pode ter sido no século XVIII, em 1779 (Carey, 1971). As evidências genéticas moleculares sugerem que ele surgiu por volta do ano 1700 (Cherian et al, 2009). Mas ele só foi isolado pela primeira vez na Tanzânia na década de 50. Entre 1952 e 1953, ele foi responsável por causar em humanos: febre alta (92% dos casos sintomáticos), artralgia (87%), dor nas costas (67%), dor de cabeça (62%) e erupções discretas. A maior parte dos pacientes apresenta a doença de forma sintomática, apenas após o período de incubação de dez dias do vírus. Ainda assim, uma fração menor dos pacientes, cerca de 10%, não apresentam sinais clínicos da infecção em nenhum

momento (Thiberville et al., 2013), possuindo taxa de mortalidade significativa (1:1000), atingindo principalmente idosos com doenças crônicas (Powers e Logue, 2007).

Seu nome “Chikungunya” deriva de uma palavra do idioma Maconde, língua regional muito falada no sudeste da Tanzânia e no norte de Moçambique, e significa “tornar-se dobrado”, descrevendo a aparência de pacientes que sofrem de artralgia intensa (Lumsden, 1955; Robinson, 1955). A artralgia pode persistir por meses ou até anos, podendo inclusive progredir para artrite crônica, o que ocorre em 72 a 97% dos infectados (Thiberville et al., 2013).

O CHIKV está amplamente distribuído no mundo. A doença causa cerca de 3 milhões de infecções por ano (Seppa, 2015). Epidemias registradas nas Ilhas do Pacífico, no Oceano Índico e nas Américas continuam alterando a distribuição da doença (Poh et al, 2012). No continente africano, o Chikungunya é espalhado por um ciclo silvestre em que o vírus se adapta dentre primatas não-humanos, mamíferos pequenos, e os mosquitos geram surtos em humanos (Powers et al, 2001).

No Brasil, no ano de 2015, foram notificados cerca de 20.600 casos suspeitos de febre Chikungunya. Ao todo 7.823 casos foram confirmados, sendo 560 por testes laboratoriais e 7.263 por critério clínico-epidemiológico, sendo que em 2014 foram apenas 3.657 casos notificados. De acordo com os dados, 18 estados registraram a circulação do vírus. No período, foram registrados três óbitos pela doença no Brasil, na Bahia (dois) e em Sergipe (um). Essas mortes ocorreram em idosos (85, 83 e 75 anos) com histórico de doenças crônicas preexistentes.

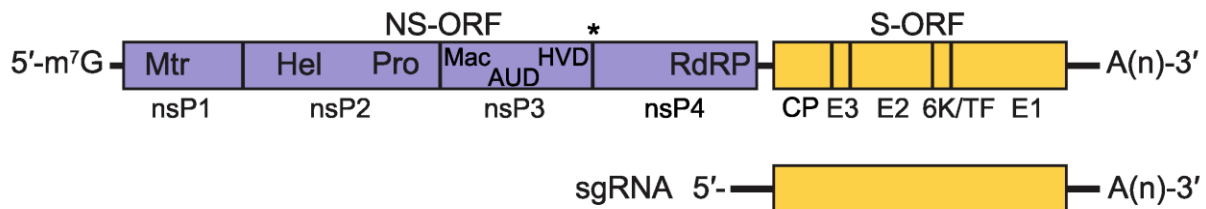
Atualmente, a melhor estratégia para evitar ser infectado pelo vírus é evitar a proliferação do mosquito vetor, pois ainda não existe nenhuma vacina aprovada para comercialização e uso humano. Esse controle da população dos mosquitos transmissores vem da eliminação de locais onde a água fica parada, pois são nesses locais que os mosquitos depositam os ovos que se desenvolvem como larvas. (Weaver et al, 2015). Outro método importante de prevenção é o uso de repelentes que afastam os insetos e assim são evitadas picadas.

2.2. Genoma, Replicação e Estrutura do CHIKV

O CHIKV pertence ao gênero dos *Alphavirus*, família *Togaviridae*. Esse gênero tem como característica geral o genoma organizado na forma de RNA positivo de fita simples de 11,8 kb que é dividido em duas ORFs (Open Read Frames); a que se inicia na extremidade 5' corresponde a dois terços do genoma e codifica proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4 - que participam da replicação, RNA capping e proteólise); e a ORF 3' que corresponde a um terço do

genoma e codifica 5 proteínas estruturais (capsídeo, E1, E2, E3 e 6k), essa porção é considerada o RNA subgenômico (figura 1).

Figura 1 - Genoma dos *Alphavirus*.

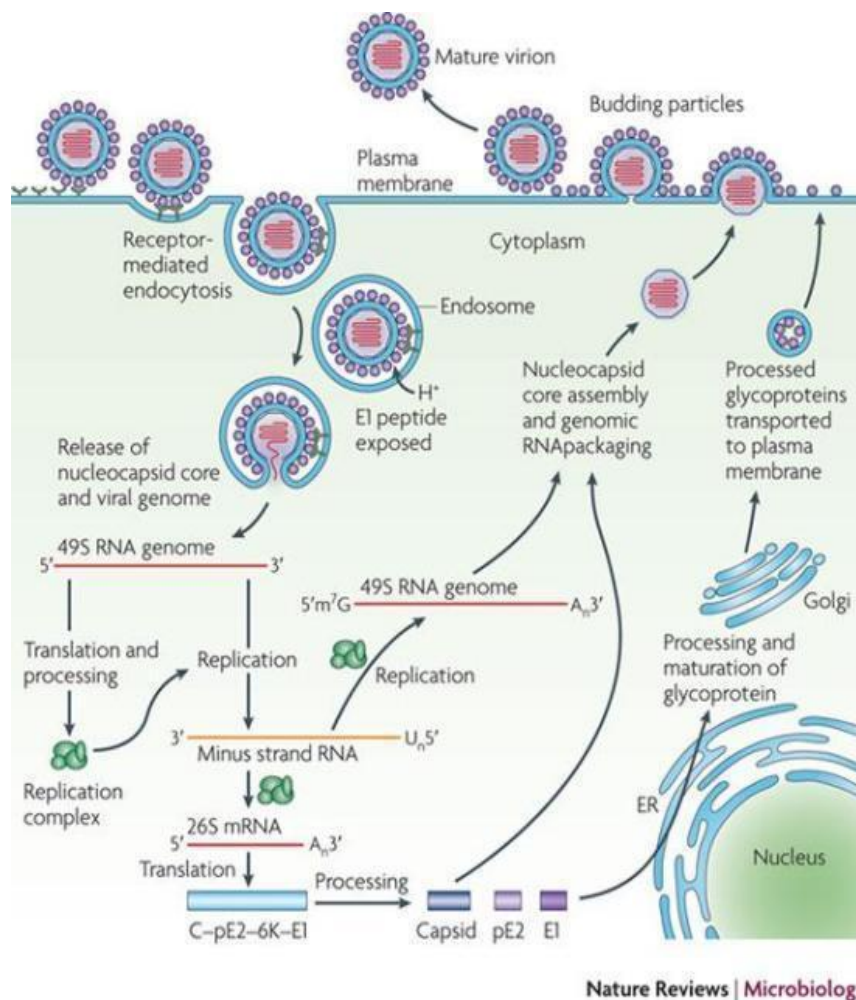


Fonte: ICTV Report.

RNA genômico com regiões não codificadoras representadas como linhas pretas sólidas e ORFs como caixas abertas (NS-ORF= ORF de proteínas não estruturais; S-ORF= ORF de proteínas estruturais). Dentro de cada ORF, as sequências de codificação para as proteínas processadas a partir do produto de tradução da ORF são delineadas. O asterisco entre nsP3 e nsP4 indica o códon de parada presente em alguns *Alphavirus*. Além disso, dentro da NS-ORF, a localização dos motivos associados às seguintes atividades é indicada: (Mtr) metil transferase, (Pro) protease, (Hel) helicase, (Mac) macro domínio, (AUD) domínio exclusivo de *Alphavirus*, (HVD) domínio hipervariável e (RdRP) RNA polimerase dependente de RNA. As sequências englobadas pelo sgRNA= RNA subgenômico, também são mostradas (CP, E3, E2, 6K/TF, E1).

Para se replicar, o vírus entra na célula por endocitose mediada por clatrina, iniciada pela interação da proteína E2 com receptores da membrana celular. No endossomo, o pH ácido muda a conformação do vírus e expõe o domínio de fusão da proteína E1 levando à fusão da membrana viral com a membrana do endossomo (Voss et al, 2010). O nucleocapsídeo icosaédrico é liberado no citoplasma e o RNA (+) é traduzido somente na sua porção ORF 5' (RNA 49s) gerando as proteínas não estruturais, que se associam formando um complexo de replicação o qual originará uma fita de RNA (-). Essa fita de RNA(-) será usada como molde para transcrição em RNA (+). O RNA (+) então compreende o "RNA subgenômico ou RNA 26s" e o RNA viral. O RNA 26s é então traduzido em uma poliproteína (C-p62-6k-E1) que é autoclivada por atividade serina-protease da proteína C, que é liberada no citoplasma. As outras proteínas restantes são direcionada ao RER (pela sinalização de E3) onde sofrem modificações pós traducionais. A proteína p62 (ou pE2) juntamente com E1 é encaminhada ao complexo de Golgi, ambas são levadas associadas à vesícula, até a membrana plasmática onde p62, que compreende a E2 e E3 é clivada nessas duas glicoproteínas. A montagem viral é promovida pela interação do nucleocapsídeo viral, que consiste no RNA viral associado à proteína C e o recrutamento das glicoproteínas do envelope associada à membrana (figura 2).

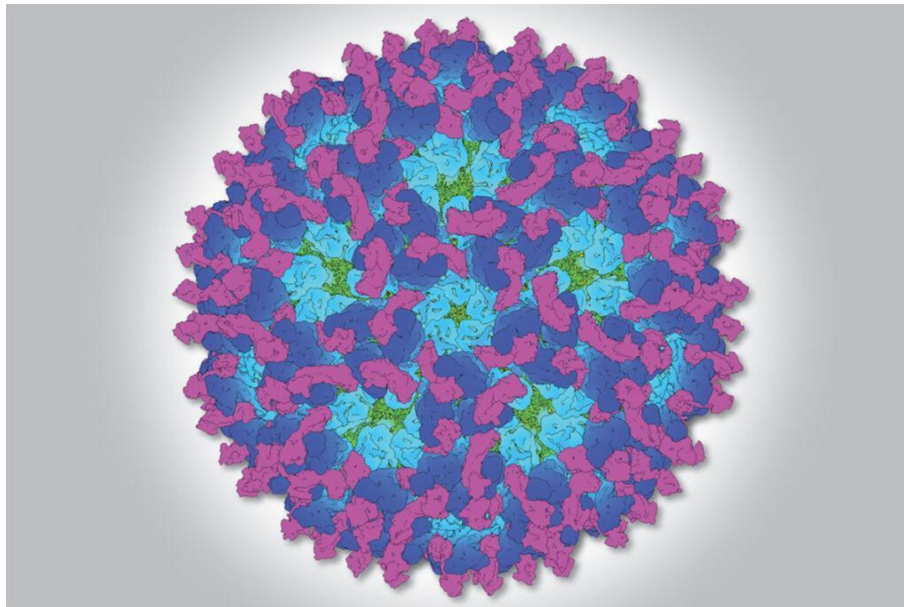
Figura 2 - Replicação de um *Alphavirus* em célula hospedeira.



Esquema representativo do ciclo de replicação viral de um *Alphavirus* desde a entrada na célula até o brotamento de um novo vírus.

O vírus maduro é esférico, contém envelope, e cerca de 240 espículas heterodiméricas de E2/E1 na membrana plasmática (figura 3).

Figura 3 - Estrutura em 3D do vírus montado.



Fonte: Katherine Basore, Faculdade de Medicina da Universidade de Washington em St. Louis.

2.3. Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico de infecção por CHIKV não está totalmente estabelecido e consolidado, mas atualmente consiste basicamente no isolamento viral, na detecção do RNA viral e na sorologia. Os objetivos principais das técnicas empregadas são fornecer uma melhor conduta ao paciente, assim como a detecção e o controle de surtos.

Os métodos moleculares de diagnóstico do CHIKV, como a PCR em tempo real (RT-PCR) têm ganhado importância crescente por fornecer um diagnóstico rápido e sensível em estágios iniciais da viremia. O método baseado em RT-PCR vem sendo empregado com o uso de *primers* específicos para *Alphavirus* ou *primers* específicos para as regiões dos genes nsP1, nsP2 e E1 (Zuchi et al., 2014; Sam et al., 2015). Mas por esse motivo ainda existe o problema da inespecificidade pois se o paciente tiver sido infectado por outro *alphavirus* o teste poderá acusar um falso positivo de CHIKV.

A resposta às infecções por CHIKV pode ser detectada no soro a partir do sangue coletado do paciente utilizando os métodos de 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, porém tem custo mais elevado. A IgM 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 (Grivard et al., 2007; Reddy et al., 2012).

Também estão disponíveis no mercado testes comerciais rápidos para análises sorológicas, porém 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. Nesse caso ensaios baseados em antígenos recombinantes podem ser mais específicos dependendo do genótipo viral e suas mutações (Figueiredo e Figueiredo, 2014).

Ainda não existem medicamentos específicos para o tratamento de infecções causadas por CHIKV no mercado, portanto as estratégias terapêuticas são voltadas aos sintomas da doença (WHO, 2009; Kaur et al., 2013). Dessa forma, os pacientes são mantidos em repouso e submetidos a tratamento com analgésicos e drogas anti-inflamatórias não-esteroidais, as quais podem aliviar a dor e a febre (WHO, 2009). Em casos agudos de febre Chikungunya, a administração de anti-inflamatórios não-esteroidais juntamente com baixas doses de corticosteroides tem mostrado uma redução da dor e melhora na qualidade de vida (Padmakumar et al., 2009).

A imunização passiva pode ser uma terapia preventiva apropriada, uma vez que não existem terapias alternativas disponíveis. Existe estudo em que foi administrada a proteína IgG purificada de plasma de um doador positivo para CHIKV, em camundongos, onde foi demonstrada alta atividade neutralizante, tendo assim um poder terapêutico e provável ação profilática contra o vírus Chikungunya. Dessa forma a imunização passiva poderia ser usada para o tratamento efetivo da febre Chikungunya e para a prevenção (Tharmarajah et al., 2017).

2.4. Vacinas Virais

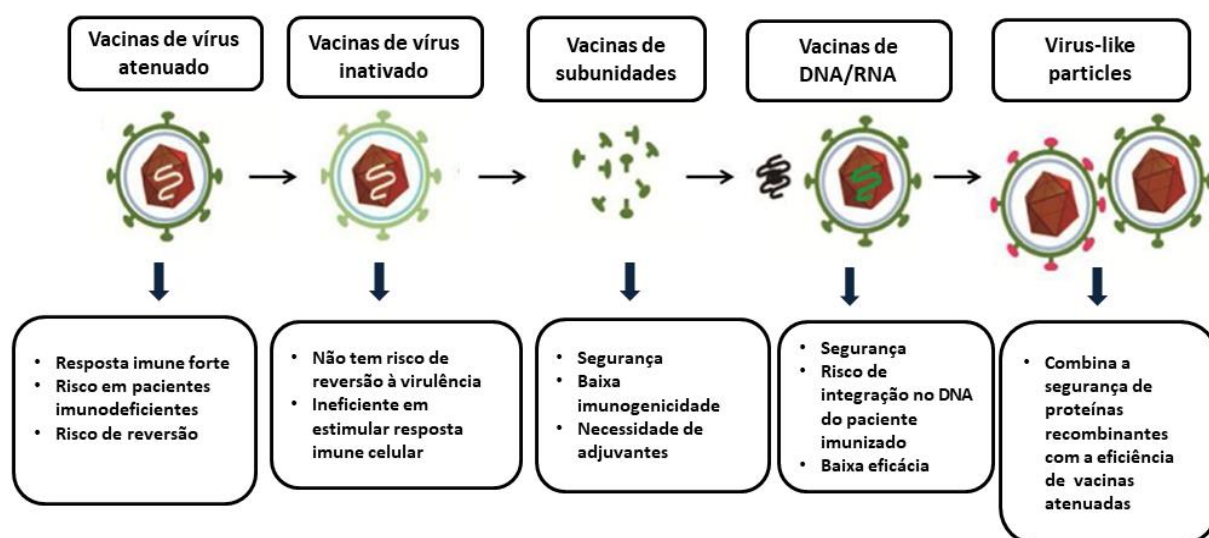
A maioria das vacinas virais são produzidas com o uso de vírus atenuado, sendo extremamente eficientes e dificilmente requerem uma segunda dose. No caso das vacinas de vírus inativado, muitas vezes se faz necessário o uso de adjuvantes. Em ambos os casos pode existir risco na administração e produção, pois em alguns casos a forma atenuada pode se reverter na forma patogênica (vacina Sabin), enquanto que o inativado pode não estar totalmente inativado (vacina Salk), colocando em risco a saúde dos indivíduos (Mäkela, 2000). Outro ponto é que para pessoas com imunodeficiência, a administração de um vírus atenuado pode apresentar riscos maiores.

As vacinas mais modernas se utilizam de outras estratégias como subunidades proteicas do vírus, que são diretamente purificadas ou, mais comumente, conseguidas de maneira recombinante. Elas geralmente requerem

uma dose de reforço ou administração conjunta com adjuvantes, não sendo tão eficientes em estimular a resposta imune do tipo celular.

As VLP (*virus like particles*) são nanopartículas na forma de vesículas que contém uma ou mais proteínas do vírus (figura 4) e, dessa maneira, se assemelham muito às estruturas tipicamente virais em questão de tamanho e estrutura. Por terem a forma semelhante à do vírus e conterem proteínas virais antigênicas em sua estrutura, estimulam o sistema imune como se um vírus estivesse presente, com ampla resposta celular e humoral. Porém, como não contém o material genético viral, não apresentam risco de integração ao genoma ou de ocorrência de uma mutação que a torne patogênica. Elas surgem então como uma alternativa aos candidatos vacinais. Devido às maiores vantagens, as VLP têm sido amplamente estudadas para aplicação biotecnológica (Fuenmayor et al; 2017; Mäkela, 2000; Fernandes et al; 2013).

Figura 4 - Estratégias vacinais, principais vantagens e desvantagens.



Fonte: Adaptado de (Fuenmayor et al; 2017).

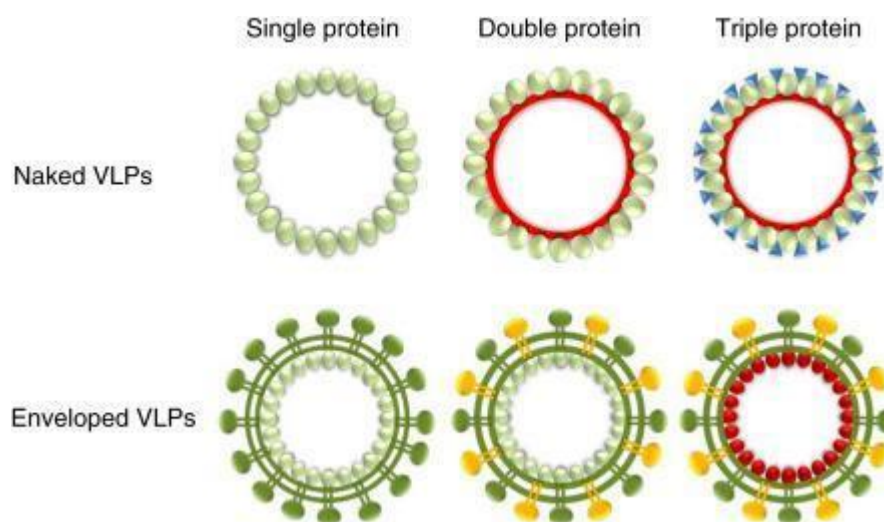
2.5. *Virus Like Particles* (VLP)

As VLP tem capacidade de se autoformar quando são expressas de maneira recombinante em determinadas plataformas (tipos celulares específicos, como células de inseto) e ocorrem naturalmente no processo de replicação de vários tipos de vírus como HIV, HPV e o vírus da Hepatite B. Elas são compostas de uma (como no caso do HPV) ou mais proteínas estruturais do vírus (o que ocorre com os vírus da família *Reoviridae*, vírus que afetam o sistema gastrointestinal e respiratório do

hospedeiro) e podem ter uma ou várias camadas. Outra variedade de VLP possui uma camada externa de lipídios (figura 5) e são conhecidas como eVLP (enveloped VLP), nesse caso o núcleo de proteínas estruturais sai da célula por processo de brotamento e dessa forma o envelope lipídico carrega parte da membrana celular, sendo extremamente importante a escolha do tipo de célula na qual será produzida, já que parte da membrana celular irá compor a eVLP.

Já existem diversas vacinas baseadas em VLP como por exemplo Cervarix e Gardasil (HPV), Sci-B-Vac (Hepatite b), e Mosquirix (Malária) (Mohsen et al; 2017).

Figura 5 - Estrutura geral de VLP “nuas” e envelopadas.



Fonte: (Tagliamonte, M. et al; 2017).

Recentemente foi desenvolvida um tipo de VLP quimérica, contendo proteínas de um tipo de vírus na estrutura e de outro tipo de vírus na formação do envelope. A utilidade desse tipo de VLP seria para entrega a tecidos específicos, já que determinadas proteínas de envelope sinalizam para direcionar a molécula para locais específicos, tendo aplicação na entrega de medicamentos, genes (terapia celular) e no tratamento contra o câncer (Fuenmayor et al; 2017).

2.6. Plataformas de produção de VLP

Existem diversas plataformas para a produção de VLP, cada uma com sua vantagem e desvantagem. Entre elas estão leveduras, bactérias, células de mamíferos, plantas e células de inseto. As bactérias e leveduras possuem alto

rendimento, porém são limitadas quanto às modificações pós traducionais em geral e glicosilação em particular (bactérias não possuem tal capacidade), sendo utilizadas para VLP mais simples sem envelope e com poucas proteínas (Tan et al; 2004). As células de mamífero produzem VLP com envelope e mais proteínas estruturais por possuírem capacidade de modificações mais complexas. No entanto para as células de mamíferos, existe um risco de contaminação por moléculas da própria célula, o rendimento é menor e o custo é alto. A produção em plantas é facilmente escalável e tem fácil expressão, porém tem baixa estabilidade e rendimento.

No caso das células de inseto, o risco de contaminação por moléculas da própria célula é bem menor quando comparado às células de mamífero, é fácil de escalonar, e produz VLP de alta complexidade por ser um ambiente eucariótico propício. Sua desvantagem seria a limitada complexidade das modificações pós traducionais, caracterizada por glicosilação de alta manose.

Existem 2 tipos de expressão em células de inseto:

a) Expressão lítica

Onde com uso do sistema de Baculovírus (BEVS) há produção das proteína recombinantes e lise da célula infectada por eles. As células de insetos utilizadas por esse sistema são derivadas de mariposa (*Spodoptera frugiperda*: Sf9 e Sf21; e *Trichoplusia ni*: Hi-5). Há algumas desvantagens relacionadas ao uso de BEVS e a expressão lítica: a proteína pode sofrer proteólise; a infecção por baculovírus é uma etapa extra no processo; esse sistema em geral não permite a produção em modo de perfusão, o que é um problema para produção em larga escala.

b) Expressão não-lítica e linhagens estáveis

Nesse modelo, o vetor de expressão é estável e se integra ao cromossomo da célula de inseto. A proteína recombinante 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 as células S2. A desvantagem mais relevante ao comparar com sistema de BEVS é a necessidade de se estabelecer uma linhagem estável de expressão (Jongh et al., 2012; John e Salgueiro, 2013). Mas tendo isso estabelecido seu uso pode ser mais vantajoso.

Tendo em vista que o CHIKV possui parte de seu ciclo replicativo em insetos, é razoável supor que a expressão de suas VLP nesses sistemas não apresentaria padrões de glicosilação que alterem as características dos antígenos virais. Seriam esperadas partículas de conformação correta e imunogênicas.

A utilização de células de inseto para expressão de proteínas recombinantes é comumente adotada para produção de biofármacos de uso veterinário como Porcilis, Bayovac e Vibragen, sendo recentemente introduzida para produção de biofármacos de uso humano. Para esse fim ainda não existe uma regulamentação

muito bem definida, mas sua utilização para produção de VLP como candidatas vacinais têm sido amplamente discutida e estudada com perspectivas promissoras.

2.7. Sistema de expressão em células de *Drosophila melanogaster*

O sistema de expressão baseado em células S2 vem sendo usado há mais de 70 anos. As células são pequenas (8-10 µm), de fácil cultivo, robustas, crescem rápido em meios sem soro e não necessitam longa adaptação. Linhagens transfectadas estáveis são obtidas em uma média de 3 semanas, além disso alcançam altas densidades se comparadas a outras células de inseto e às células de mamíferos.

As linhagens modificadas normalmente são obtidas transfectando 2 vetores distintos, um contendo os genes de interesse para formação das VLP e outro contendo um gene de resistência que será utilizado para seleção (normalmente de higromicina ou puromicina) (Iwaki et al; 2003; Iwaki e Castellino, 2008).

Os promotores mais utilizados são o de actina, que é constitutivamente ativo com o funcionamento fisiológico da célula, sendo regulado por mecanismos de regulação gênica da própria célula; e metalotioneína que é um promotor cuja ativação é induzida pela presença de metais pesados no meio (Chung e Keller, 1990).

As células S2 já foram utilizadas para a expressão de proteínas virais utilizadas em vacina como Dengue, glicoproteína do vírus rábico, vírus oeste do Nilo e vírus da encefalite japonesa. Também já foi descrito seu uso para produção de VLP de HIV tipo 1, sendo constatado rendimento maior do que o obtido com células de levedura e de mamíferos (Yang et al; 2012).

2.8. Influência do meio de cultura no cultivo celular

O estudo do cultivo de células de inseto começou por volta de 1915, mas somente na década de 60 foi estabelecida a primeira linhagem capaz de se replicar indefinidamente, a qual teve origem no tecido ovariano de uma mariposa, *Antheraea eucalypti* (Soares; Augusto; Castilho, 2007).

Por ter menor complexidade de manipulação, o domínio da técnica de cultura celular de inseto garantiu que os estudos com vírus *in vitro* pudessem ser realizados de maneira mais eficiente. As células de inseto são de fácil cultivo e são mais resistentes que células de mamíferos, tem rápida adaptação de sistemas aderentes para suspensos, não necessitam de suporte sólido e se desenvolvem livremente no meio de cultura. Dependendo da célula, não se faz necessário o uso de uma estufa de CO₂, ou aeração com O₂ (em escala laboratorial), havendo a necessidade quase

que unicamente da manutenção da temperatura, em torno de 25-30°C (King e Possee, 1992).

O principal fator limitante ao crescimento celular nesse caso é a demanda nutricional, que é muito importante para permitir uma boa estabilidade na cultura ao longo do tempo. Os meios de cultivo devem ser cada vez mais específicos, possuindo características bem definidas, tais como: pH, quantidade dos sais inorgânicos (importante para manutenção do balanço iônico e pressão osmótica), glicose (principal fonte de energia), aminoácidos, osmolaridade e fontes de carbono (Almeida, 2005).

O meio de cultura deve fornecer nutrientes essenciais para a síntese de novas células, substratos para realização do metabolismo celular, além de compostos que desempenham função fisiológica, catalítica ou atuam como co-fatores de enzimas necessárias para a manutenção bioquímica da célula. A cultura também deve ser livre de compostos tóxicos ou que inibem seu crescimento. Em determinados casos os próprios produtos de seu metabolismo são inibidores.

Ainda hoje existem poucos trabalhos disponíveis sobre o metabolismo e as necessidades nutricionais das células de *Drosophila* em cultura. Mas estas células têm sido amplamente utilizadas para expressão de proteínas heterólogas, onde nesse caso o crescimento celular é levado em conta, assumindo que a expressão é associada positivamente ao crescimento. Nesse sentido para determinação da melhor estratégia de cultivo e produção de proteínas recombinantes, os meios de cultura e suas formulações devem ser estudados e analisados.

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi o estudo das melhores condições de cultura de células S2 (*Drosophila melanogaster*) para a produção de antígenos de CHIKV, sendo potencialmente organizados como VLP.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudar a cinética de crescimento celular em diferentes meios.
2. Determinar a melhor condição (o melhor meio e tempo de indução) de expressão de proteínas.
3. Avaliar a expressão de proteínas de CHIKV tanto na célula quanto no sobrenadante dos diferentes meios.
4. Aumentar a escala da melhor condição para obter maiores quantidades de proteína.
5. Estudar a cinética de crescimento celular do aumento de escala.
6. Purificar e analisar a expressão de proteínas de CHIKV do sobrenadante.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Meios de cultura

Para construção do banco de células e cultivos celulares em monocamada, foram utilizados três meios de cultura diferentes:

1)SF900 III + CD Lipid

O meio de cultura SF900 III (Thermo) é o meio padrão utilizado para células S2 no Laboratório de Imunologia Viral. Possui formulação fechada, porém as quantidades de aminoácidos e glicose são bem conhecidas devido às diversas análises de metabolismo já realizadas pelo grupo. Neste meio foi adicionado um concentrado de lipídios chamado CD-Lipid (Thermo) na diluição 1:100. Este meio não foi filtrado pois já vem estéril assim como o lipídio usado para suplementação.

2)IPL-41 modificado

O meio de cultura IPL-41 (Thermo) modificado (Batista et al., 2011) é quimicamente definido, sem soro fetal bovino (SFB) e livre de proteínas de origem animal. Em sua composição são adicionados 7,5 g/L glicose (Synth Laboratórios), 6 g/L yeastolate ultrafiltrate (Thermo), 1% chemically defined lipid (Thermo), 2 g/L lactose (Sigma), 4 g/L glutamina (Sigma) e 0.1% m/v Pluronic F68 (Sigma). Após a preparação, o meio foi filtrado em membrana PES 0,22 µm (KASVI).

3)Schneider + 10% SFB

O meio Schneider (LCG) com 1,8 g/L de L-Glutamina e 2 g/L de D+ Glicose é o meio de referência para o cultivo de células S2. Este meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Após a preparação, o meio foi filtrado da mesma forma que o meio IPL-41 modificado.

4.2. Linhagem Celular

Foi utilizada uma linhagem de células recombinantes de *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (células S2). Essa linhagem (S2 CHIKV-HY) foi obtida pela transfecção de vetor contendo os genes das proteínas do CHIKV (C, E1, E2,

6k, E3). Ela possui um vetor de expressão/seleção induzível por metais pesados (promotor methalotioneína) e que confere resistência à higromicina.

4.3. Manutenção das Células

A manutenção das células foi realizada nos meios de cultura SF900 III + CD Lipid, IPL-41 modificado, e Schneider +SFB 10% , todos à temperatura de 28 °C (\pm 2 °C), sendo sub cultivadas (repicadas) em intervalos de 4 a 6 dias. A cada passagem em frascos T25 cm² foram adicionados 30 μ L de higromicina (50 mg/mL) para a seleção das células contendo o vetor de expressão/seleção.

Foram realizadas culturas estáticas em frascos T de 25 cm², com repiques na proporção de 1:5 e posteriormente, em frascos T de 75 cm² de superfície, com repiques na proporção 3:15. Nas garrafas T25 cm² o volume de trabalho foi de 5 mL e nas T75 cm² foi de 15 mL.

4.4. Banco de Células e Criopreservação

4.4.1. Congelamento

Após o preenchimento da superfície das garrafas T75 cm² em no mínimo 98% da área disponível, as células, que se encontravam em fase de crescimento, foram suspendidas e o volume foi transferido para tubos falcon de 50 mL. Após centrifugação por 5 minutos a 3000 rpm, as células foram suspendidas em meio de congelamento contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), 40% de soro fetal bovino (SFB) e 50% de meio de cultura. Foram preparadas alíquotas de 1 mL com uma concentração de 1×10^7 células/mL e estas foram distribuídas em criotubos. Os criotubos foram transferidos para um container de congelamento e armazenados a -80°C, para decréscimo da temperatura à taxa de 1 °C / minuto. Após 24h, os criotubos foram transferidos para o nitrogênio líquido para a preservação das células.

4.4.2. Descongelamento

Os criotubos do banco de células foram descongelados à temperatura ambiente e as células foram transferidas para um tubo falcon de 15 mL, foi adicionado 4 mL de meio de cultura e este foi centrifugado por 3 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspendidas em 4 mL de

meio e transferidas para uma garrafa T25 cm². Em seguida as células foram mantidas a 28 °C ($\pm 2^\circ\text{C}$).

4.5. Cinética de Crescimento Celular

As células foram inicialmente descongeladas, cultivadas em garrafas T25 cm², sendo feito primeiro repique em garrafa T25 cm² (1:5) no caso do meio IPL-41 e no caso do meio SF900 III (2:3). Após esse primeiro repique, as células cresceram até mais de 95% de ocupação da superfície das garrafas em monocamada e no caso dos dois meios foram repicadas para garrafas T75 cm² na proporção de 3:15. Novamente, quando em confluência maior que 95%, as células foram suspensas e a concentração celular foi determinada. A quantidade de 4×10^7 células totais de cada um dos meios foi utilizada para inocular cada frasco Schott (100 mL), tendo seu volume completado para 20 mL com meio de cultura, finalizando assim o inóculo em 2×10^6 células/mL. As células foram cultivadas sob agitação de 100 rpm a 28 °C ($\pm 2^\circ\text{C}$). Os cultivos foram feitos em triplicata, três frascos Schott para cada meio. A cada 24 h, 1 mL de meio foi coletado de cada Schott para contagem de células e amostragem. Foram feitas amostragens até o tempo 120 h pós inóculo.

As células em meio Schneider não foram utilizadas nessa etapa, uma vez que apresentaram crescimento lento e concentrações celulares baixas após o descongelamento (mais de uma semana para atingir confluência menor que 80% em T25 cm²). Demonstrando ser inviável prosseguir com a utilização desse meio.

4.6. Determinação da Concentração e Viabilidade Celular

A concentração celular em um dado cultivo foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer, utilizando microscópio invertido, sendo realizadas contagens diárias em duplicata de cada frasco. A concentração celular foi determinada após a correção dos cálculos de diluição (multiplicação pelo fator de diluição) e a multiplicação por 10^4 , obtendo assim o número de células por mililitro de suspensão.

Foi utilizado o corante azul de Trypan (0,2%) com o intuito de excluir as células inviáveis da contagem celular. O azul de Trypan, penetra apenas em células mortas ou com membrana celular comprometida, e estas passam a apresentar coloração azul (Almeida, 2005). Assim, essas células revelam perda de viabilidade e portanto são contadas como células inviáveis. A viabilidade celular foi determinada pela razão entre o número de células viáveis e o número de células totais no meio (células viáveis e inviáveis), multiplicados por 100 para que o valor resultasse em porcentagem.

4.7. Produção das VLP

A fim de avaliar o melhor tempo de indução da expressão de proteínas e o melhor meio de cultura para produção de VLP, ou seja, a melhor condição, foram realizadas cinéticas em triplicata para cada condição. Foram utilizados frascos do tipo Schott (100 mL) com volume final de 20 mL e inóculo de 2×10^6 células/mL tanto para o meio de cultura SF900 III + CD Lipid, quanto para o meio IPL-41 modificado. As células foram cultivadas em suspensão sob agitação de 100 rpm e temperatura de 28°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). Foram testados três momentos de indução da expressão: 24, 48 e 72 horas após a inoculação. A indução foi realizada com 1 mM de CuSO_4 . Foram coletadas amostras de 1 mL de cada frasco todos os dias após a indução da expressão no intervalo de 24h até 120h. Esse volume foi utilizado para contagem e posterior análise por *Dot Blotting* para a escolha da melhor condição de indução.

Em seguida, a melhor condição de indução foi utilizada para a produção das VLP com aumento de escala em 5 vezes. Para isso foram utilizados três frascos Erlenmeyers de 500 mL, com inóculo também de 2×10^6 células/mL e volume total de trabalho de 100 mL. Foram coletadas alíquotas de 1,2 mL de cada frasco todos os dias pós indução, em intervalos de 24 h, até atingir o tempo ótimo. Essas alíquotas foram utilizadas para análise por *Dot Blotting* para confirmação da produção. Quando se atingiu o tempo ótimo, a cinética foi encerrada e todo volume restante foi coletado para concentração por gradiente e análise do pool por *Dot Blotting* e *Western Blotting*.

4.8. Determinação da Curva de Crescimento Celular nos diferentes meios de cultura

O crescimento celular é dado pela taxa específica de crescimento (μ), que é determinada pelo balanço de massa de células em um cultivo celular com a seguinte equação:

$$dX_v/dt = \mu \cdot X_v$$

Onde, X_v é a concentração celular; t é o tempo de cultivo; μ é a taxa específica de crescimento celular; e dX_v/dt é a variação de células.

Fazendo a integração do balanço descrito, temos a equação:

$$\text{LN}(X_v) = \mu t$$

Plotando os pontos do LN (logaritmo neperiano) de X_v contra o tempo, temos uma curva de crescimento celular linearizada [$\text{LN}(X_v) = f(t)$], e esta representa uma

reta quando em fase de crescimento exponencial. A taxa específica de crescimento (μ) corresponde ao coeficiente angular da reta de tendência traçada em relação à esses pontos. Se em crescimento exponencial, corresponde ao $\mu_{\text{máx}}$.

4.9. Obtenção das VLP

4.9.1. Clarificação

A partir da alíquota amostrada diariamente (1,0 mL ou 1,2 mL), foram separadas duas amostras contendo 1×10^6 células cada. Estas foram centrifugadas a 5000 rpm por 3 minutos formando um pellet celular que foi armazenado. O restante da alíquota foi então centrifugada a 13.000 rpm por 5 minutos para remoção de células e debris celulares. Nessa amostra o sobrenadante foi armazenado e as células descartadas. Todas as amostras contendo células ou sobrenadante foram armazenadas a -20 °C.

4.9.2. Concentração por ultracentrifugação

Após esse procedimento, as amostras de sobrenadantes clarificados foram submetidas a uma ultracentrifugação a fim de obter apenas as VLP. Elas foram transferidas em volumes de 800 μ L para os tubos da ultracentrífuga. Foram então ultra centrifugadas por 1 hora e 30 minutos a 149.000 g, o sobrenadante foi descartado e o pellet suspenso em 80 μ L de PBS, sendo então armazenados a -20°C. Para as amostras do experimento em maior escala, o volume de sobrenadante (aproximadamente 300 mL) foi filtrado em filtro de poro 0,45 μ m. Então foi feita uma ultracentrifugação a 149.000 g por 1 hora em frascos de 29,8 mL, com volume de sobrenadante em torno de 29 mL. Os sobrenadantes foram então descartados e os pellets ressuspensos em solução de suspensão por 12 horas no volume de 800 μ L por tubo. As amostras contendo as VLP após a concentração por ultracentrifugação, correspondentes ao experimento em maior escala, foram submetidas a dois passos de purificação: colchão de iodixanol e gradiente de iodixanol.

4.9.3. Colchão de iodixanol

O volume dos tubos foi juntado em um único frasco e esse distribuído em 4 tubos no volume de 2 mL em cada. A cada um desses tubos foi adicionado previamente 6,5 mL de iodixanol 5 %. Os tubos foram ultra centrifugados a 149.000

g por 1 hora. Posteriormente, o volume foi descartado e os pellets foram suspendidos em 500 µL de solução de suspensão cada, por 12 horas

4.9.4. Gradiente de iodixanol

Para a realização do gradiente de iodixanol foram preparadas as seguintes soluções:

- Solução de suspensão (NaCl 0,1 M, EDTA 0,5 mM e Tris-HCL 50 mM em pH 7,4).

- Solução diluente (EDTA 5 mM, Tris-HCL 0,5 M em pH 7,4).

- Solução trabalho-iodixanol (Iodixanol 50%, EDTA 0,5 mM, Tris-HCL 50 mM em pH 7,4).

- Iodixanol a 30% e a 5% (ambas preparadas partindo da solução de trabalho, sendo diluídas com a solução diluente).

Em 4 tubos adicionou-se inicialmente em cada um 2 mL de iodixanol 30% na fração inferior e 2 mL de iodixanol 5% na fração superior. Acima da fração superior, foram posicionados cuidadosamente 500 µL das amostras. O gradiente foi então ultracentrifugado a 169.000 g por 1 hora e 30 minutos. Após a ultracentrifugação, os tubos foram cuidadosamente retirados da ultracentrífuga para não misturar as frações formadas. Alíquotas de 500 µL de cada tubo foram retiradas, cada uma correspondente a uma fração, totalizando 9 frações (F1 a F9). Como haviam 4 tubos, as frações estavam em quadruplicata.

4.10. Análise da expressão, da concentração e purificação das proteínas

4.10.1. Dot Blotting

As amostras de células coletadas na cinética e separadas previamente por centrifugação (descrito em “Clarificação”) foram primeiramente submetidas a um processo de lise, adicionando-se 100 µL de tampão RIPA, sendo então homogeneizadas por vortex e incubadas por 30 minutos a 4°C. Posteriormente foram centrifugadas por 15 minutos a 8.000 g.

A membrana de nitrocelulose Amersham Hybond – ECL (GE Healthcare) foi cortada e posicionada no aparelho para dot Bio-Dot (Bio Rad). Foram utilizados 50 µL do sobrenadante de cada amostra para aplicar na membrana. Para as amostras de vírus inativado (controle positivo), foram aplicados 25 µL de diversas diluições

(em PBS) diretamente na membrana de nitrocelulose. Utilizando uma bomba a vácuo acoplada ao aparelho Bio-Dot, as amostras aplicadas à membrana foram submetidas à força de sucção para permearem a membrana mais rapidamente. Posteriormente, foram feitas duas lavagens adicionando 100 µL de PBS / poço. A membrana foi então retirada do aparelho e incubada em solução de bloqueio (leite em pó desnatado 3% em PBS 1x) por 16 h. A membrana foi então lavada 3 vezes por 10 minutos com PBS + Tween 20 (0,05%), e posteriormente foram adicionados os dois anticorpos primários, de forma a obter a marcação de duas proteínas do CHIKV simultaneamente, a proteína C e a proteína E1 (tabela 1). Os anticorpos foram diluídos em 20 ml de BSA 1% em PBS, e a incubação foi realizada por 2 horas sob agitação. Após esse período, três novos procedimentos de lavagem foram realizados e, em seguida, adicionou-se o anticorpo secundário (tabela 1) em 20 ml de BSA 1% em PBS, sendo novamente incubado por 1 hora, sob agitação. Após nova série de lavagens, a membrana foi revelada com o reagente ECL Select, da empresa GE HealthCare, e o resultado adquirido no fotodocumentador Uvitec Cambridge, com análise no aplicativo Alliance (Uvitec Cambridge).

Tabela 1 - Anticorpos utilizados nos ensaios de *Dot Blotting*.

Anticorpo	Descrição	Diluição
Anticorpo Policlonal anti-CHIKV (CHIKV-C)	(ATCC® VR-1241AF™) Hyperimmune ascitic fluid (Mouse) – N.I.H. Research Reference Reagent - produzido em camundongo	1:250
Anticorpo Monoclonal anti-CHIKV (CHIKV-Env)	(HM337) – EastCoast Bio – produzido em camundongo	1:1000
Anticorpo IgG anti-camundongo –HRP	Goat anti-mouse IgG (H+L) horseradishperoxidase conjugated - Invitrogen - produzido em cabra	1:2000

4.10.2. SDS-PAGE

Foi feito um gel de corrida em poliacrilamida utilizando o kit “TGX and TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit and Starter Kit” (Bio-Rad), seguindo o passo a passo do manual de instrução. Após a polimerização do gel, foram separados 25 µL

de cada uma das frações de 1 a 8 do gradiente de iodixanol. No caso da fração 9, diluiu-se 15 µL em 10 µL de tampão de suspensão pois esta fração estava muito concentrada. Foram então adicionados 5 µL de Loading Buffer 6x com β-mercaptoetanol a 2% a cada um dos tubos e a reação foi incubada a 70°C por 10 minutos antes da aplicação no gel. Também foram aplicados 15 µL do marcador Precision Plus Proteins Standard (Bio-Rad). A corrida do gel foi realizada a 100 V por 1,5 horas. Em seguida, o gel retirado do aparelho foi lavado 3 vezes por 10 minutos com água destilada, sob agitação. Depois das lavagens foram adicionados 25 mL de corante Page Blue (Bio-Rad), em que o gel ficou submerso sob agitação por 2 horas. Ao fim da coloração retirou-se o corante e deixou-se o gel descorando por 16 h sob agitação. No dia seguinte, a água foi descartada e a marcação das proteínas foi registrada com o fotodocumentador Uvitec Cambridge.

4.10.3. Western Blotting

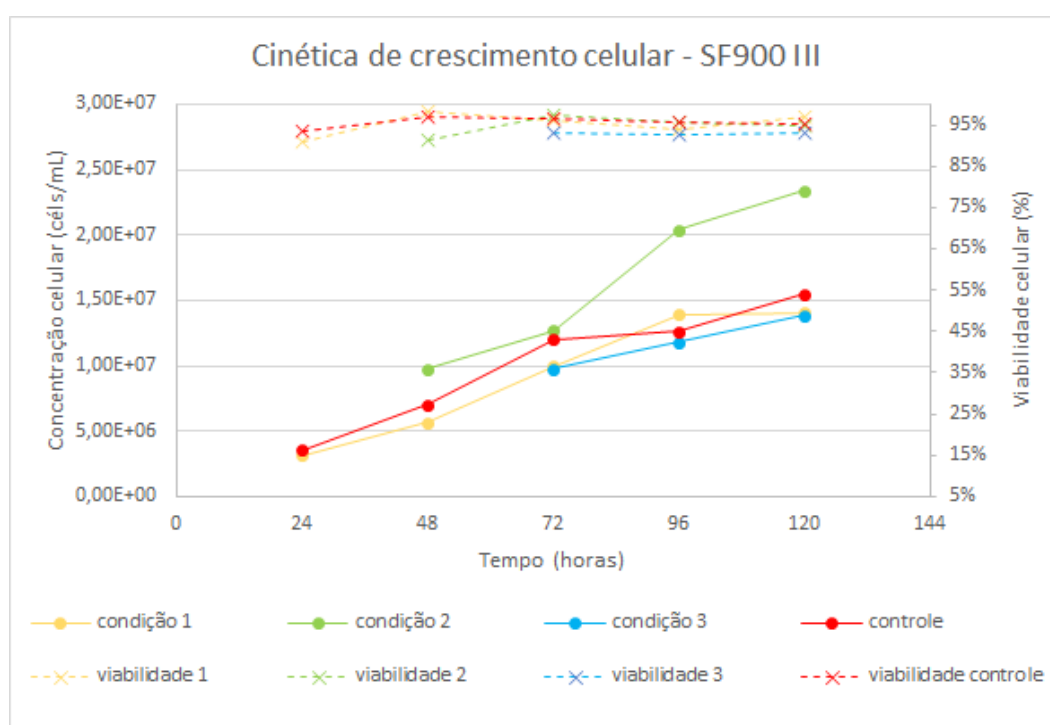
As amostras das frações foram submetidas à separação por SDS-PAGE conforme o descrito no item anterior. As proteínas separadas no gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Amersham Hybond – ECL” (GE Healthcare), por transferência úmida “Mini Trans-Blot Cell Module” (Bio-Rad), a 100 V por 1 hora. Posteriormente, a membrana foi tratada com solução de bloqueio (leite em pó desnatado 3% em PBS) por 16 h a 4 °C. Em seguida, a membrana foi lavada 3x por 10 minutos com PBS + Tween 20 (0,05%), sob agitação. Logo após, foram adicionados os anticorpos primários (tabela 1), diluídos em 20 mL de BSA 1%, sendo incubado 2 horas sob agitação. Após esse período, três novos procedimentos de lavagem com PBS 1x foram realizados, e em seguida adicionou-se o anticorpo secundário (tabela 1), diluído em 20 mL de BSA 1%, sendo incubado por 1 hora sob agitação. O mesmo procedimento de lavagem já descrito foi realizado novamente. A membrana foi revelada com o reagente “ECL Select” (GE HealthCare) e o resultado registrado no fotodocumentador Uvitec Cambridge, com análise no aplicativo Alliance (Uvitec Cambridge).

5. RESULTADOS

5.1. Cinética de crescimento celular nos diferentes meios de cultura

O crescimento celular no meio de cultura SF900 III + CD Lipid ou no meio IPL-41 modificado, assim como a viabilidade celular ao longo do tempo foram registrados em cinéticas de crescimento celular nas condições de indução e não indução (Figura 6 e Figura 7).

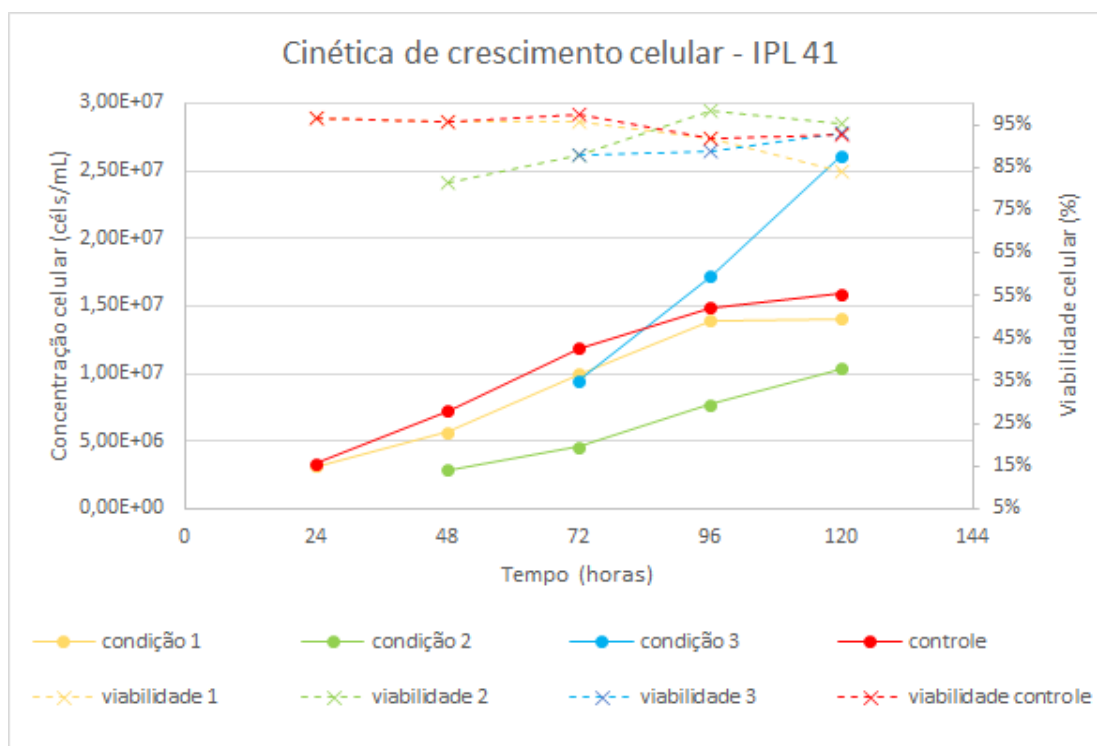
Figura 6 - Gráfico da cinética de crescimento celular das diferentes condições no meio de cultura SF900 III + CD Lipid.



Cinéticas de crescimento celular em meio SF900 III + CD lipid. As células recombinantes foram monitoradas por 120 h, sendo que a expressão das proteínas de CHIKV foi induzida com 1 mM de CuSO_4 após 24 h (Condição 1), 48 h (Condição 2), 72 h (Condição 3) ou não induzidas (Controle).

Fonte: Autor.

Figura 7 - Gráfico da cinética de crescimento celular das diferentes condições no meio de cultura IPL-41 modificado.



Cinéticas de crescimento celular em meio IPL-41 modificado. As células recombinantes foram monitoradas por 120 h, sendo que a expressão das proteínas de CHIKV foi induzida com 1 mM de CuSO_4 após 24 h (Condição 1), 48 h (Condição 2), 72 h (Condição 3) ou não induzidas (Controle).
Fonte: Autor.

A análise das cinéticas de crescimento revela que não houve inibição significativa do crescimento que possa ser associada ao momento da indução da expressão. Quando tal inibição ocorre, é esperada uma interrupção do crescimento ou diminuição da velocidade de crescimento logo após a adição do indutor.

Na condição de indução em 48 h de crescimento no meio IPL-41 modificado, é nítido que a cultura (triplicata) apresentava menor crescimento no momento da indução. Em outra situação, as células induzidas atingiram concentrações celulares maiores que a do controle não induzido. Particularmente, o cultivo induzido em 72 h em meio IPL-41 modificado apresentou crescimento fora do esperado e os dados provavelmente apresentam um erro de amostragem ou contagem no tempo 120 h.

A avaliação do crescimento e sua potencial inibição após a indução da expressão é importante para avaliar o melhor protocolo para a expressão recombinante, uma vez que as concentrações das proteínas de interesse em geral se correlacionam diretamente à quantidade de unidades produtoras (células) que o sistema é capaz de atingir.

5.2. Avaliação da expressão das proteínas nos diferentes meios de cultura

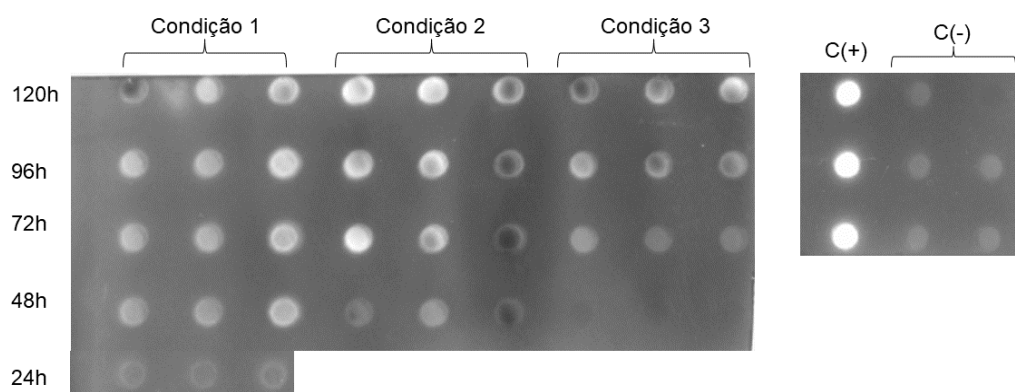
5.2.1. Análise qualitativa

As amostras de células e de sobrenadante após a concentração por ultracentrifugação foram analisadas por *Dot blotting* para a verificação da presença da expressão das proteínas recombinantes nos tempos após a indução da expressão, em ambos os meios e em todas as condições testadas.

a) SF900 III + CD Lipid

A análise das amostras de sobrenadante revela que diversas amostras tiveram marcação próxima à intensidade do controle positivo (vírus CHIKV inativado), principalmente quando as células foram induzidas nas condições 1 e 2, e a partir de 72 h (figura 8). Esse resultado permite afirmar que há uma quantidade relevante de proteínas de CHIKV no sobrenadante de cultivo. Essas proteínas estão potencialmente organizadas em forma de VLP, uma vez que as amostras foram clarificadas previamente à centrifugação, para a remoção de debris celulares e posteriormente concentradas por ultracentrifugação, com a recuperação da fração sedimentada, para a remoção de proteínas solubilizadas.

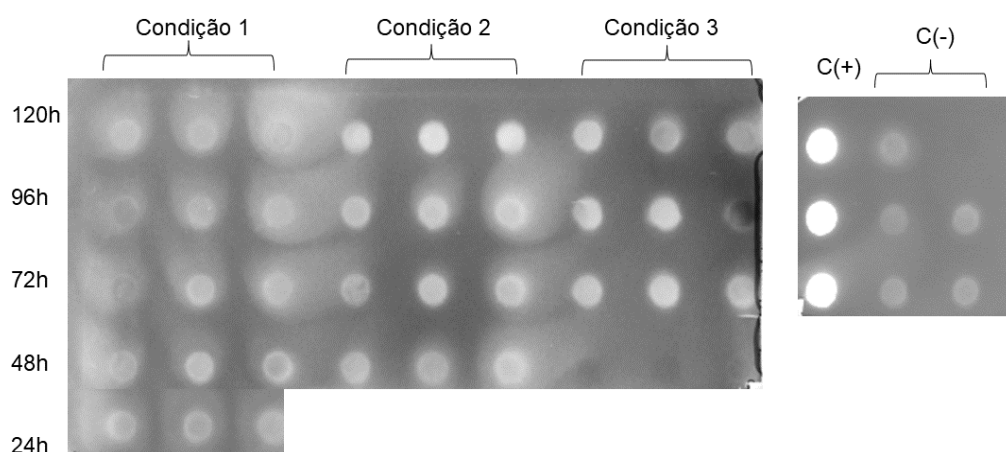
Figura 8 - Imagem da membrana de *Dot blotting* de amostras de sobrenadante dos cultivos em meio SF900 III + CD Lipid.



Dot blotting das amostras em triplicata dos sobrenadantes dos cultivos em SF900 III + CD Lipid, com expressão induzida em diferentes tempos: Condição 1 - indução em 24 h; Condição 2 - indução em 48 h; Condição 3 - indução em 72 h; C(+) - vírus sem diluição; C(-) - sobrenadante de células S2 recombinantes não induzidas. **Fonte: Autor.**

A análise das amostras de células apresentou marcações semelhantes para as amostras de todas as condições. As intensidades dos sinais podem ser visualmente comparadas àquelas observadas para os controles positivo e o negativo (figura 9).

Figura 9 - Imagem da membrana de *Dot blotting* de amostras de células dos cultivos em meio SF900 III + CD Lipid.

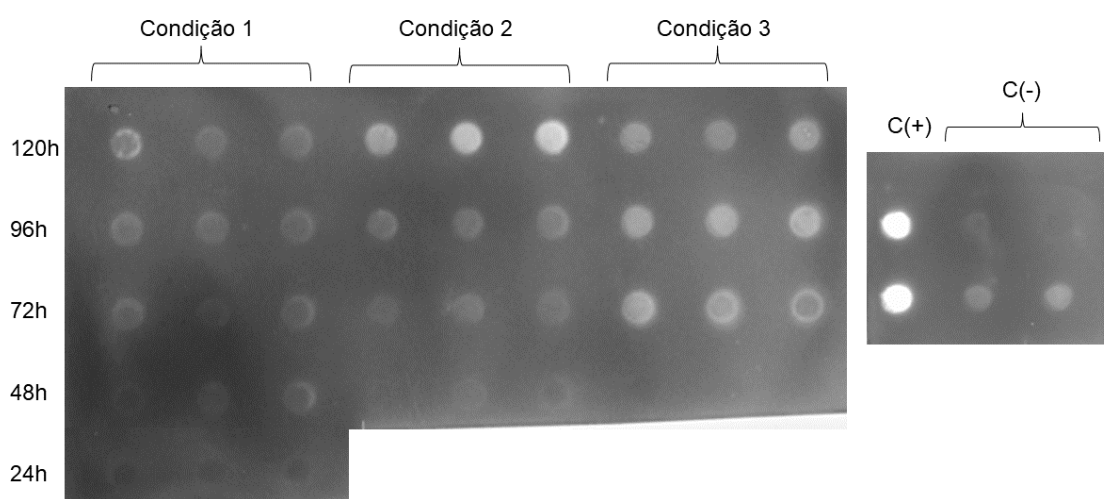


Dot blotting das amostras em triplicata das células dos cultivos em SF900 III + CD Lipid, com expressão induzida em diferentes tempos: Condição 1 - indução em 24 h; Condição 2 - indução em 48 h; Condição 3 - indução em 72 h; C(+) - vírus sem diluição; C(-) - sobrenadante de células S2 recombinantes não induzidas. **Fonte: Autor.**

b)IPL-41 modificado

Ao observar a membrana com as amostras dos sobrenadantes, notamos que na Condição 1 (indução em 24 h) as marcações em todos os tempos se assemelham muito ao controle negativo. Na Condição 2 (indução em 48 h) aparece um sinal mais intenso em 120 h, e na condição 3 não parece haver grandes diferenças entre todos os tempos, mas visivelmente a marcação é de maior intensidade que a encontrada na condição 1 (figura 10).

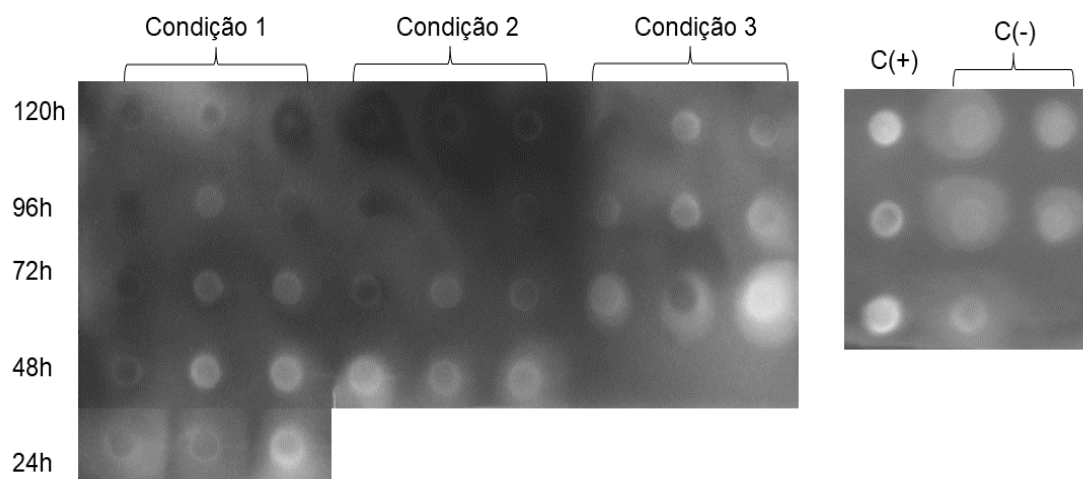
Figura 10 - Imagem da membrana de *Dot blotting* de amostras de sobrenadante dos cultivos em meio IPL-41 modificado.



Dot blotting das amostras em triplicata das células dos cultivos em IPL-41 Modificado, com expressão induzida em diferentes tempos: Condição 1 - indução em 24 h; Condição 2 - indução em 48 h; Condição 3 - indução em 72 h; C(+) - vírus sem diluição; C(-) - sobrenadante de células S2 recombinantes não induzidas. **Fonte: Autor**

Na membrana com as amostras de células é observável a marcação mais intensa no tempo de 48 h das condições 1 e 2 (figura 11).

Figura 11 - Imagem da membrana de *Dot blotting* de amostras de células dos cultivos em meio IPL-41 modificado.



Dot blotting das amostras em triplicata das células dos cultivos em IPL-41 Modificado, com expressão induzida em diferentes tempos: Condição 1 - indução em 24 h; Condição 2 - indução em 48 h;

Condição 3 - indução em 72 h; C(+) - vírus sem diluição; C(-) - sobrenadante de células S2 recombinantes não induzidas. **Fonte: Autor**

As análises qualitativas apresentaram claramente que os cultivos realizados em SF900 III foram capazes de expressar as proteínas de CHIKV de maneira mais coerente e intensa, tanto na fração de sobrenadante quanto celular. Para uma análise mais adequada dessas marcações e para a definição da melhor condição de expressão das proteínas, foi realizada uma análise semi-quantitativa das membranas de *Dot blotting*.

5.2.2. Análise semi-quantitativa

Nessa análise utilizamos as imagens de *Dot blotting* capturadas pelo aparelho Uvitec Cambridge, com análise da intensidade do sinal (pixels) de cada amostra marcada na membrana pelo aplicativo UVI Band (Uvitec Cambridge). Essa análise foi feita para se ter algum parâmetro numérico que possibilitasse comparar as amostras entre si e definir qual estava apresentando melhor expressão relativa entre elas.

a) SF900 III + CD Lipid

Na análise do sobrenadante de SF900 III, duas condições dentre as três, apresentaram diferença (Anova, $p < 0,05$). Quando comparamos as duas podemos notar que a Condição 2 mostra ter sinal mais elevado em todos os tempos exceto em 120 h. Sendo que o maior sinal é visto na Condição 2 em 96 h (figura 12).

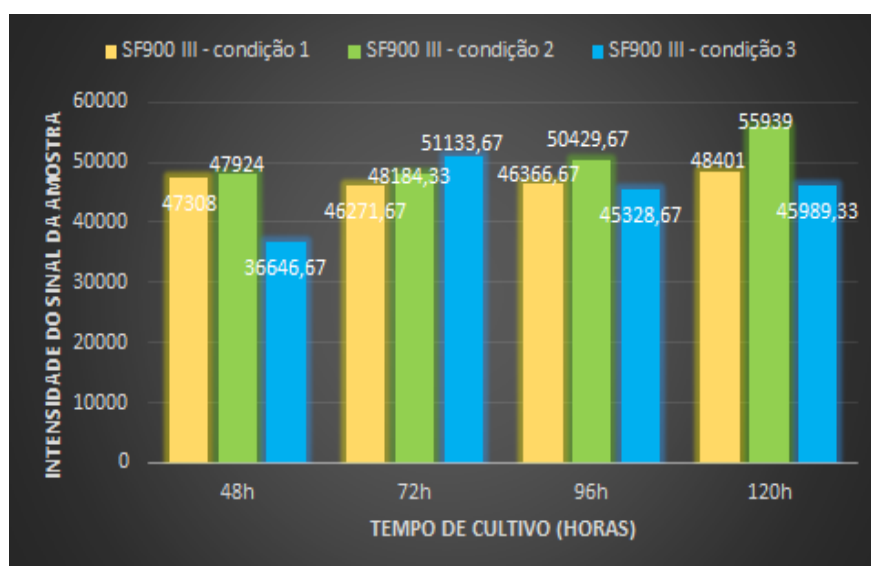
Figura 12 - Gráfico da intensidade de sinal da marcação das proteínas de CHIKV em amostras de sobrenadante das diferentes condições de indução em meio SF900 III + CD Lipid.



Fonte: Autor.

Na análise das amostras de células, apenas a Condição 2 apresentou diferença estatística (Anova, $p < 0,05$) na intensidade do sinal frente às outras. Sendo possível observar que a maior intensidade se deu no tempo 120 h (figura 13).

Figura 13 - Gráfico da intensidade de sinal da marcação das proteínas de CHIKV em amostras de células das diferentes condições de indução em meio SF900 III + CD Lipid.



Fonte: Autor.

b) IPL-41 modificado

Na análise do sobrenadante é visto a condição 2 sendo a única apresentando diferença (Anova, $p < 0,05$), com maior sinal em 120 h. Aqui ao contrário das amostras de células, observamos um aumento gradativo na intensidade do sinal conforme o tempo de cultivo nas condições 1 e 2, sendo que a condição 3 apresentou mais variações (figura 14).

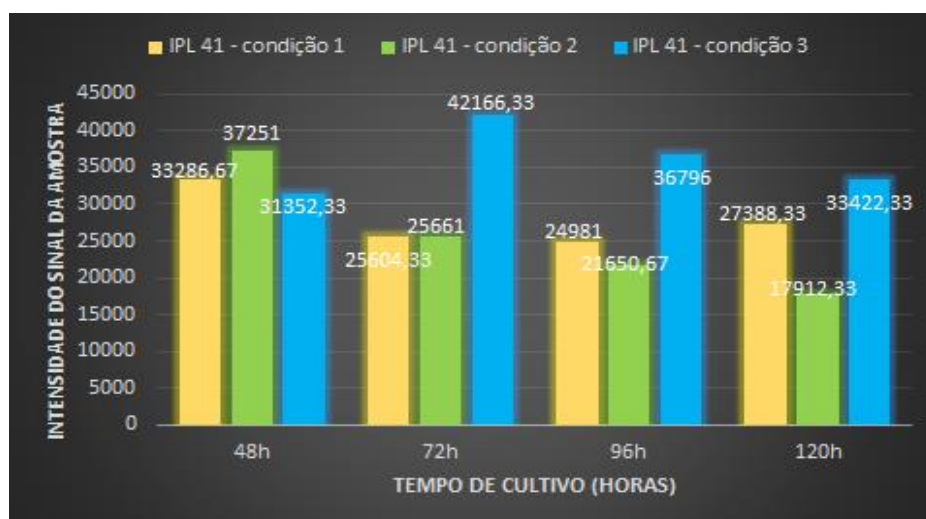
Figura 14 - Gráfico da intensidade de sinal da marcação das proteínas de CHIKV em amostras de sobrenadante das diferentes condições de indução em meio IPL-41 modificado.



Fonte: Autor.

Na análise das amostras de células, a Condição 3 apresentou diferença (Anova, $p < 0,05$) das demais, onde podemos observar um maior sinal em 48 h (figura 15). Essa análise mostra que a quantidade de proteína recombinante presente nas células diminuiu nos tempos após a indução, o que não é coerente.

Figura 15 - Gráfico da intensidade de sinal da marcação das proteínas de CHIKV em amostras de células das diferentes condições de indução em meio IPL-41 modificado.



Fonte: Autor.

c)SF900 III + CD Lipid vs IPL-41 modificado

Para a análise comparativa entre os dois meios de cultura, as membranas de *Dot blotting* foram reveladas e a imagem capturada ao mesmo tempo pelo equipamento, evitando assim diferenças de intensidade devidas ao tempo de exposição à câmera de aquisição.

Na análise das amostras de sobrenadante, foram igualmente comparadas as amostras da Condição 2 de ambos os meios, que apresentaram-se as melhores na avaliação individual. Nessa análise observa-se que o sinal mais elevado do meio IPL-41 ocorreu em 120 h. Ainda assim, esse sinal foi menor que o encontrado para 96 h em meio SF900 III + CD Lipid (figura 16).

Figura 16 - Gráfico da intensidade de sinal das marcações das proteínas de CHIKV em amostras de sobrenadante comparativo entre a condição 2 do meio SF900 III + CD Lipid e a condição 2 do meio IPL-41 modificado.



Fonte: Autor.

A análise das amostras de células mostra que a Condição 2 de indução apresentou diferença das demais, tanto em meio IPL-41 quanto em SF900 III. Quando comparamos os sinais de ambas é nítido que as amostras obtidas no meio SF900 III apresentam sinais mais intensos. Além disso com o passar das horas a intensidade aumentou, ao passo que no meio IPL 41 a intensidade diminuiu. O maior sinal é verificado em 120 h na condição 2 do meio SF900 III (figura 17).

Figura 17 - Gráfico da intensidade de sinal das marcações das proteínas de CHIKV em amostras de células comparativo entre a condição 2 do meio SF900 III + CD Lipid e a condição 2 do meio IPL-41 modificado.



Fonte: Autor.

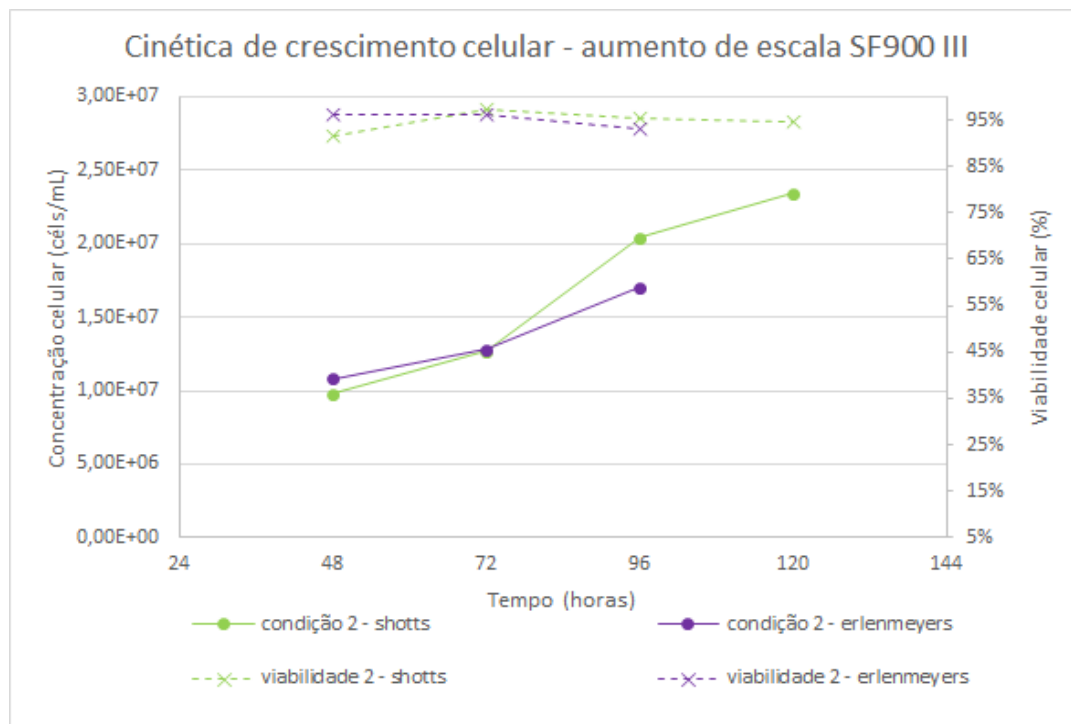
Analisando os resultados comparativos dos dois meios concluiu-se que a melhor condição para expressão das proteínas de CHIKV seria a Condição 2, utilizando o meio SF900 III + CD Lipid e o melhor tempo de coleta do sobrenadante em 96 h. Dessa forma, essa condição foi escolhida para o aumento de escala de 5x, com a produção feita em Erlenmeyers com volume final de 100 mL cada.

5.3. Experimento com aumento de escala

5.3.1. Cinética de crescimento celular

Quando comparados, os cultivos em frascos Schott e em Erlenmeyers não apresentam alterações de viabilidade significativas. Nos frascos Schott a viabilidade inicial é um pouco menor que nos Erlenmeyers, mas com o passar das horas as viabilidades passam a ser equivalentes. As curvas de crescimento também foram semelhantes, apresentando alguma diferença entre 72 e 96 h (figura 18).

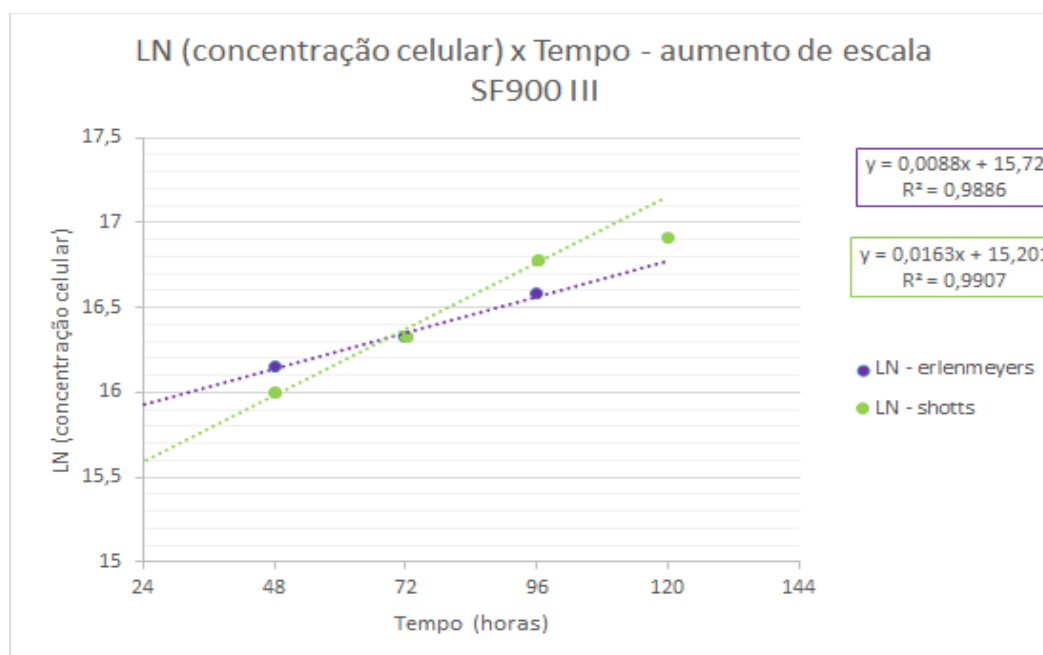
Figura 18 - Gráfico da cinética de crescimento celular com aumento de escala (Erlenmeyers) em comparação à escala menor (Frascos Schott), na Condição 2 de indução, utilizando o meio de cultura SF900 III + CD Lipid.



Fonte: Autor.

Quando comparamos a linearização do crescimento celular nas duas escalas podemos observar que a tendência de crescimento é maior nos frascos Schott que nos Erlenmeyers. Também é possível notar que em 120 h as células nos frascos Schott não estão mais em fase de crescimento linear e sim em desaceleração, perceptível pelo ponto de 120 h que se posiciona abaixo da linha de tendência de crescimento (figura 19).

Figura 19 - Gráfico da concentração celular linearizada com aumento de escala (Erlenmeyers) em comparação à escala menor (Fracos Schott), na Condição 2 de indução, utilizando o meio de cultura SF900 III + CD Lipid.



Fonte: Autor.

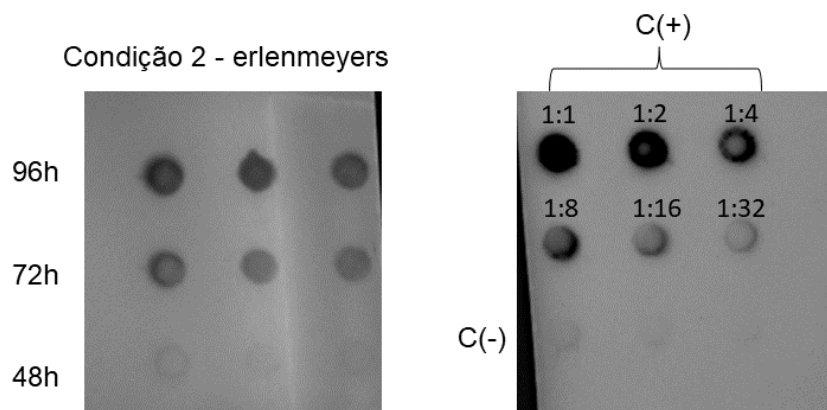
Ao analisar o crescimento celular específico (μ_x) nota-se que o aumento de escala (Erlenmeyers) apresentou uma taxa de crescimento ($0,0088 \text{ h}^{-1}$) de quase a metade daquela calculada para os frascos Schott ($0,0163 \text{ h}^{-1}$). As diferenças de velocidade de crescimento indicam que os sistemas possuem características distintas. Por um lado, e o mais provável, é que a diferença se deva às condições de oxigenação dos cultivos devido à diferença de área de contato entre meio e ar. Igualmente as forças de cisalhamento podem ser diferentes, embora isso normalmente se veria refletido na queda da viabilidade celular.

5.4. Expressão das proteínas em maior escala

5.4.1. Análise qualitativa

Na revelação da membrana de *Dot blotting* nota-se que a expressão de proteínas aumentou gradativamente entre 48 h e 96 h, sendo que em 96 h o sinal foi parecido com a diluição do vírus em 1:8 (figura 20).

Figura 20 - Imagem da membrana de *Dot blotting* de amostras de sobrenadante dos Erlenmeyers.

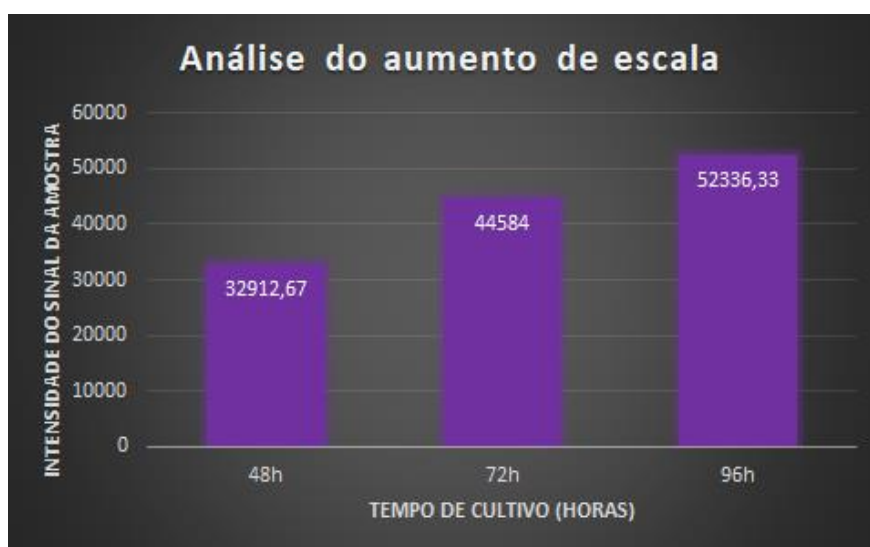


Aumento de escala da condição 2 - indução em 48 h, do meio SF900 III + CD Lipid. C(+) - vírus em suas diluições; C(-) - sobrenadante de células S2 não induzidas. **Fonte: Autor.**

5.4.2. Análise semi-quantitativa

Ao analisar a intensidade do sinal nas amostras, vemos que no aumento de escala temos resultados semelhantes à produção em frascos Schott. Vemos expressão de proteínas em todas as horas analisadas, sendo o maior sinal observado em 96 h de cultivo, como esperado (figura 21).

Figura 21 - Gráfico da intensidade de sinal de proteínas de CHIKV no sobrenadante após aumento de escala da condição 2 do meio SF900 III + CD Lipid.



Fonte: Autor.

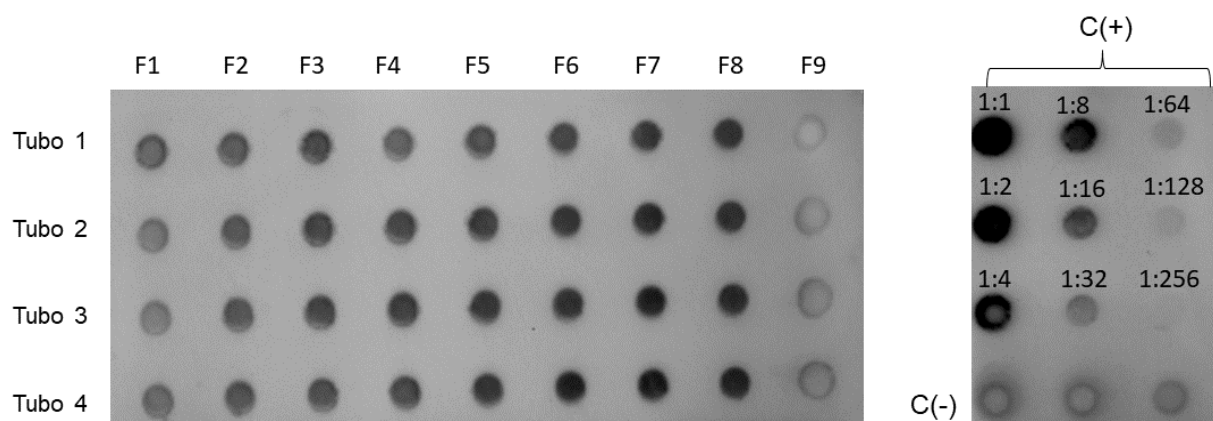
5.5. Purificação de VLP de CHIKV por gradiente de iodixanol

O sobrenadante obtido a partir da expressão em maior escala foi clarificado e posteriormente as VLP presentes foram concentradas por ultracentrifugação. Após uma primeira etapa de purificação em colchão de iodixanol, as amostras em volume reduzido foram aplicadas ao gradiente de iodixanol (em quadruplicatas) para a separação das VLP de outras proteínas contaminantes.

5.5.1. Análise qualitativa

Ao observar as marcações das amostras na membrana de *Dot blotting* do gradiente, nos deparamos com forte marcação em todas as frações e quadruplicatas desde F1 até F8, sendo que de F6 a F8 a marcação é nitidamente mais forte se assemelhando à diluição do vírus em 1:8 e 1:16. Em F9 não foi observada marcação, porém deve-se referir que esta amostra apresentou um sedimento e causou obstrução da membrana de nitrocelulose (figura 22).

Figura 22 Imagem da membrana de *Dot blotting* das frações coletadas no gradiente de iodixanol.

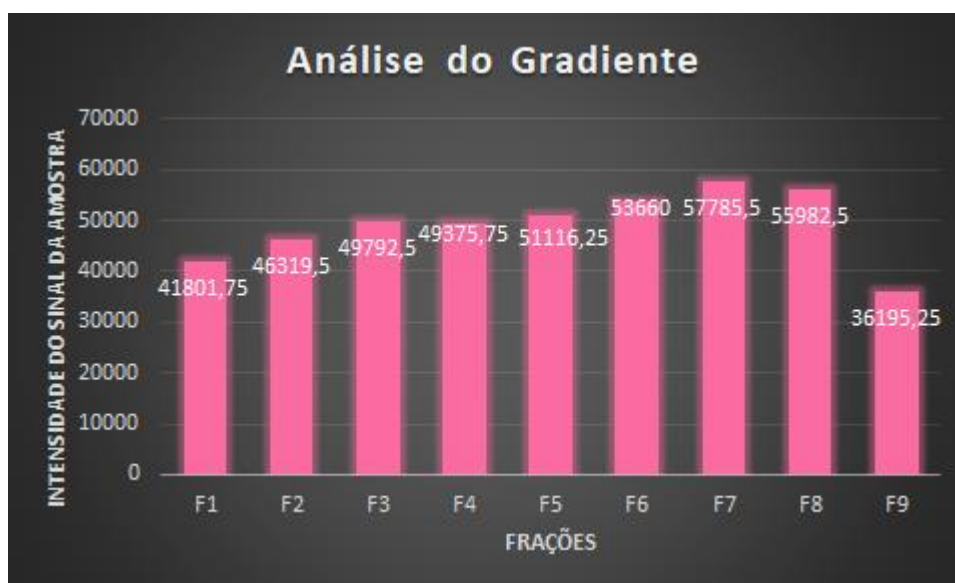


As amostras provenientes do gradiente de iodixanol (4,5 mL) foram separadas em frações de 0,5 mL cada, a partir da parte superior do tubo: F1: fração 1; F2: fração 2; F3: fração 3; F4: fração 4; F5: fração 5; F6: fração 6; F7: fração 7; F8: fração 8; F9: fração 9. C(+) - vírus em diluições; C(-) - sobrenadante de células S2 recombinantes não induzidas. **Fonte: Autor.**

5.5.2. Análise semi-quantitativa

Ao analisar a intensidade do sinal nas frações do gradiente, foi observada a presença de proteínas em todas elas, sem diferenças estatísticas significantes (Anova, $p > 0,05$) na intensidade do sinal (figura 23).

Figura 23 - Gráfico da intensidade de sinal obtido por *Dot Blotting* das frações do gradiente de iodixanol.



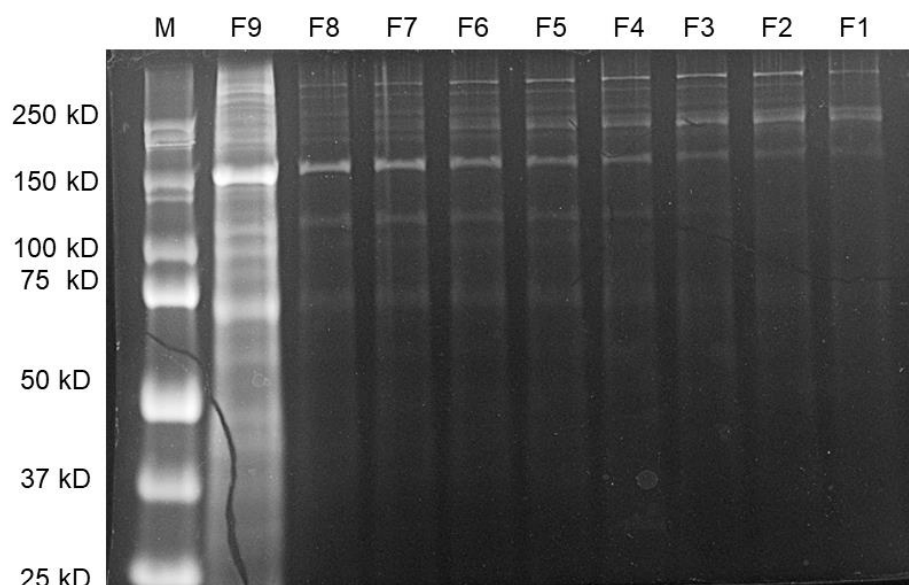
Fonte: Autor.

5.5.3. Purificação (SDS-Page)

O gel de SDS-Page foi feito com intuito de averiguar se o gradiente de iodixanol foi eficiente para a purificação das amostras e remoção de proteínas que não eram de interesse.

Na imagem abaixo podemos observar diversas bandas que não têm o peso molecular das proteínas de CHIKV (138 kDa para a poliproteína precursora C-E3-E2-6k-E1; 62 kDa para P62; 47 kDa para ambas E2 e E1; 29 kDa para a C; e 6 kDa para proteína 6K), principalmente na fração 9, que está carregada de diversas proteínas (figura 24). Algumas proteínas de alto peso molecular parecem diminuir de intensidade conforme as frações são retiradas mais para o fundo do tubo, porém é nítido que o gradiente utilizado não foi eficaz em separar adequadamente proteínas de tamanhos diferentes, uma vez que não há cortes evidentes de contaminantes entre uma fração e a seguinte.

Figura 24 - SDS-Page das frações obtidas pelo gradiente de iodixanol.



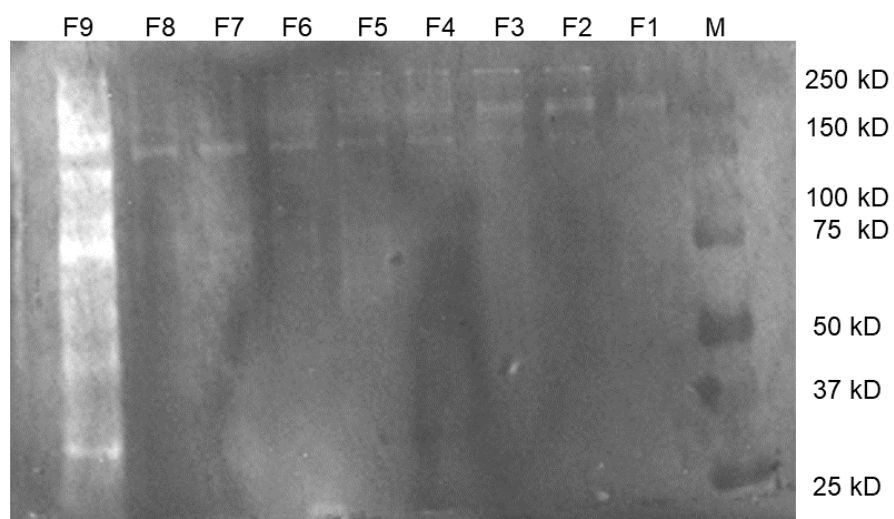
M: marcador de peso molecular. F1: fração 1; F2: fração2; F3: fração3; F4: fração 4; F5: fração 5; F6: fração 6; F7: fração 7; F8: fração 8; F9: fração 9. **Fonte: Autor.**

5.5.4. Western blotting

Para verificar se as proteínas observadas no gel de SDS correspondiam às proteínas de CHIKV, foi realizada uma análise de *Western blotting* com anticorpos capazes de se ligar à proteína E1 e C do vírus.

Foi observado que a fração 9 apresentou marcação muito forte por toda a extensão da membrana. Já nas frações de 1 a 8, a marcação foi detectada em bandas de alto peso molecular (acima de 100 kD) que não poderiam corresponder às proteínas E e C isoladamente (figura 25). É possível ver marcação forte também nas bandas correspondentes às proteínas de interesse. Provavelmente as amostras não foram eficientemente reduzidas antes da introdução no gel de poliacrilamida e acabaram retidas em diferentes pesos moleculares. Outra explicação para a presença de amostras em diferentes pesos moleculares é a possibilidade da existência de poliproteína de CHIKV não processada. Essa hipótese é menos provável contudo, uma vez que foram realizados passos de purificação para a eliminação dos debris celulares e das proteínas solúveis.

Figura 25 - Western Blotting das frações obtidas pelo gradiente de iodixanol.



M: marcador de peso molecular. F1: fração 1; F2: fração2; F3: fração3; F4: fração 4; F5: fração 5; F6: fração 6; F7: fração 7; F8: fração 8; F9: fração 9. **Fonte: Autor.**

6. DISCUSSÃO

A expressão de proteínas recombinantes em células de inseto apresenta algumas vantagens sobre a sua expressão em células de mamíferos. As principais vantagens referem-se à facilidade de cultivo em suspensão e a possibilidade da obtenção de boas quantidades de proteína em pouco tempo.

Um dos sistemas de expressão utilizados se baseia em células S2 de *Drosophila melanogaster*. Esse sistema de expressão trabalha com células capazes de produzir a proteína recombinante de maneira estável.

Neste trabalho utilizamos células S2 recombinantes que foram transfectadas com plasmídeos de expressão/seleção, tornando-as capazes de produzir proteínas do vírus Chikungunya (C, E3, E2, E1 e 6k) (Puglia, 2018). Essas células foram estabelecidas e inicialmente utilizadas para a verificação da sua capacidade de expressar proteínas recombinantes de CHIKV organizadas ou não na forma de VLP. Os resultados apresentaram estruturas compatíveis com VLP, porém os estudos foram limitados devido à baixa quantidade de material disponível para análise.

Nesse contexto, o presente trabalho visou estudar as melhores condições de expressão das proteínas de CHIKV em dois meios de cultivo e realizar a produção de uma quantidade maior de VLP para viabilizar os estudos de caracterização.

Os experimentos foram realizados com dois meios de cultura: SF900 III acrescido de CD Lipid para melhorar a expressão de VLP, pois acrescenta lipídeos à formulação que estabilizam a membrana das células que está sendo perdida pelo brotamento das VLP; e IPL-41 modificado, que foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa em estudo anterior tendo demonstrado superioridade ao SF900 III na expressão de vesículas de HBsAg, o antígeno vacinal do vírus da hepatite B (Batista et al, 2008).

Os resultados mostraram a superioridade do meio SF900 III + CD Lipid em relação ao crescimento celular, atingindo quantidades maiores de células, de maneira consistente. Isso ocorreu independentemente do tempo de indução da expressão.

Em ambos os meios de cultura e em todas as situações de indução da expressão, não houve diminuição da viabilidade celular durante a expressão das proteínas recombinantes.

As análises de *Dot blotting* se mostraram adequadas para a verificação das diferenças de expressão entre as situações estudadas. O cuidadoso tratamento das amostras de sobrenadante, através de sua concentração por ultracentrifugação (84 amostras) antes da análise, contribuiu para uma avaliação adequada dos melhores tempos de indução e coleta do material.

A melhor condição encontrada nos resultados foi a indução após 48 h de cultivo e a coleta do material em 96 h de cultivo, utilizando o meio SF900 III + CD

Lipid. Nessa condição, tanto as células quanto o sobrenadante do cultivo apresentavam quantidades de proteínas recombinantes atingindo os maiores valores.

Após a determinação da melhor condição de expressão recombinante, foi preparado um lote em escala cinco vezes maior para a produção de boas quantidades de proteínas recombinantes. A análise da produção do lote mostrou boa correlação com o que foi feito em menor escala, apontando para uma boa produção. O lote produzido foi então submetido a processos de purificação por colchão e gradiente de iodixanol.

Os processos de purificação levaram a uma maior concentração do material, contudo não foram capazes de separar adequadamente as VLP de outros contaminantes. É necessário rever o protocolo de ultracentrifugação em gradiente de iodixanol e inserir maiores gradações, de forma a permitir a ultracentrifugação por tempos mais longos e velocidades menores, buscando assim melhorar a separação promovida pelo gradiente.

7. CONCLUSÕES

- O melhor protocolo para a expressão das proteínas recombinantes de CHIKV a partir das células S2 CHIKV-HY consiste na utilização de meio de cultura SF900 III + CD Lipid, indução com 48 h de cultivo e coleta após 96 h de cultivo.

- O método de avaliação por *Dot blotting* da quantidade relativa de proteínas e CHIKV expressas pelas células se mostrou eficaz em apontar as diferenças entre as condições de indução e tempos de coleta.

- Os métodos de purificação utilizados não foram eficazes na separação das VLP de outras proteínas contaminantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. F. de. Avaliação Preliminar Da Viabilidade De Produção in Vitro De Um Isolado Brasileiro De Baculovírus Spodoptera Frugiperda Mnpv. 2005. 109 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

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.

BATISTA, F. R. et al. Behavior of wild-type and transfected S2 cells cultured in two different media. *Appl Biochem Biotechnol*, n. 163, p. 1–13. 2011. ISSN 0273-2289.

CAREY, D. E. . Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity?. *J Hist Med Allied Sci*, v. 26, n. 3, p.243–62, Jul 1971.

CHERIAN S. S. et al. Evolutionary rates and timescale comparison of Chikungunya viruses inferred from the whole genome/E1 gene with special reference to the 2005-07 outbreak in the Indian subcontinent. *Infect. Genet. Evol*, v. 9, n. 1, p. 16–23, Jan 2009.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

GRIVARD, P. et al. Molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection. *Pathol Biol (Paris)*, v. 55, n.10, p.490-4. Dec 2007.

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.

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.

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.; SANCHÀ, S.; CHARLOTTE, D. The use of *Drosophila* S2 cells in R&D and bioprocessing *Pharmaceutical Bioprocessing*. v.1, p. 197-213, 2012.

KAUR, P. et al. Inhibition of Chikungunya Virus Replication by Harringtonine, a Novel Antiviral That Suppresses Viral Protein Expression. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 57, n.1, p. 155-67, Jan 2013.

KING, L. A.; POSSEE, R. D. The Baculovirus Expression System: A laboratory guide. 1. ed. [S.I.]: SPRINGER-SCIENCE+BUSINESS MEDIA, B.V., 1992. ISBN 978-94-010-5047-0.

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.

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.

MORRISON, T. E. Reemergence of chikungunya virus. *J Virol*. v. 88, n. 20, p. 11644-7, Oct 2014. ISSN 1098-5514.

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.

PADMAKUMAR B. et al. Comparative evaluation of four therapeutic regimes in chikungunya arthritis: a prospective randomized parallel-group study. *Indian J Rheumatol*, v.4, ed.3, p.94-101, Sep 2009.

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.

POWERS, A. M. et al. Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. *Journal of Virology*, v. 75, n. 21, p. 10118–31, Nov 2001. ISSN 0022-538X.

POH, L. N. F. et al. Genotypic and Phenotypic Characterization of Chikungunya Virus of Different Genotypes from Malaysia. *PLoS ONE*, v. 7, n. 11: e50476, Nov 2012.

REDDY, V. et al. Utility of IgM ELISA, TaqMan real-time PCR, reverse transcription PCR, and RT-LAMP assay for the diagnosis of Chikungunya fever. *Journal of Med Virol*, v.84, n.11, p. 1771-1778, Nov 2012.

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.

RUNOWSKA, M. et al. Chikungunya virus: a rheumatologist's perspective. *Clin Exp Rheumatol*, Mar 2018. ISSN 0392-856X.

SEPPA, N. Chikungunya is on the move. Science News.(2 Jun 2015).

SCHWARZ, N. et al. Seroprevalence of antibodies against chikungunya, dengue, and Rift Valley fever viruses after febrile illness outbreak, Madagascar. *Emerg. Infect. v. 18, n.11, p.1780–1786, Nov 2012. ISSN 1080-6059.*

SOARES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. Tecnologia do Cultivo de Células Animais, de Biofármacos à Terapia Gênica. 1. ed. [S.I.]: Roca, 2007. ISBN 978-85-7241-730-3.

TAGLIAMONTE, M. et al. Micro and Nanotechnology in Vaccine Development. 1^a ed. [S.I.]. Elsevier, 2017. p. 205-219.

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.*

THARMARAJAH, K.; MAHALINGAM, S.; ZAID, A. Chikungunya: vaccines and therapeutics. *F1000Res, v. 6, p. 2114, 2017. ISSN 2046-1402.*

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. 2004-2013. ISSN 1935-2735.*

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.*

VOSS, J. E. et al. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature. v. 468, n. 7324, p. 709–712, Dec 2010.*

WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. *New England Journal of Medicine, v. 372, n.13, p. 1231–1239, Mar 2015.*

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (WHO). Guidelines for prevention and control of Chikungunya fever. South-East Asia: WHO; p. 1-43, 2009.

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.

APÊNDICE

Devido à necessidade do grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia Viral em analisar quantitativamente a expressão de proteínas virais e VLP tanto de CHIKV quanto de MAYV, foi iniciada a padronização de um teste de ELISA, ao qual dei prosseguimento. Caso a padronização fosse bem sucedida a técnica seria utilizada para quantificação das proteínas dos ensaios ao invés de verificação por *Dot Blotting* e análise semi quantitativa pelo aplicativo UVI Band.

O primeiro gargalo encontrado pelo grupo foi um problema ao tentar definir uma curva padrão com diluições seriadas do vírus em questão. Em diluições menores, o gráfico tendia a uma reta com tendência a zero, o que é esperado no teste ELISA, porém quando era aumentada a diluição, todos os pontos apresentavam o mesmo valor de absorbância que o controle negativo. O passo seguinte que foi realizado por mim, foi tentar contornar esse problema.

MATERIAIS E MÉTODOS

Protocolo 1 - Sensibilização da placa com vírus

A primeira mudança testada foi nos valores de diluição do vírus que antes eram 1:10; 1:100; 1:1000; 1:2000; 1:4000; e 1:8000, e que passaram a ser 1:10; 1:20; 1:40; 1:80; 1:160; 1:320; 1:640.

Preparou-se solução de tampão carbonato pH 9.6 + vírus. Após a diluição seriada, aplicou-se 100 µl por poço em duplicata.

Deixou-se 1 h na estufa a 37°C e posteriormente na geladeira por 16 h. No dia seguinte, o sobrenadante da placa foi descartado e a mesma foi bloqueada com solução 1% BSA + 5% sacarose, no volume de 300 µL por poço. Após, foi deixada 45 minutos na estufa a 37°C. A placa então foi lavada 4 vezes com 300 µL de tampão de lavagem (PBS + Tween 0,05%) por poço.

Adicionou-se anticorpo 1º (tabela 4) previamente preparado, com solução de PBS + Tween 0,05%+ BSA 0,5%. A placa foi novamente deixada na estufa por 45 minutos a 37°C. Posteriormente a placa foi lavada 4 vezes.

Adicionou-se anticorpo 2º (tabela 4) previamente preparado com solução de PBS + Tween 0,05%+ BSA 0,5%. Deixou-se 45 minutos na estufa a 37°C novamente. Após, a placa foi lavada mais 5x.

Tabela 2 - Características dos anticorpos utilizados no ELISA no Protocolo 1.

Anticorpo	Descrição	Diluição
1º: Anticorpo Policlonal anti-CHIKV (CHIKV-C)	(ATCC® VR-1241AF™) Hyperimmune ascitic fluid (Mouse) – N.I.H. Research Reference Reagent - produzido em camundongo	1:2000
2º:Anticorpo IgG anti-camundongo –HRP	Goat anti-mouse IgG (H+L) horseradishperoxidase conjugated - Invitrogen - produzido em cabra	1:2000

Preparou-se uma solução de substrato cromógeno (10 mL tampão citrato + 10 mg OPD). Em seguida adicionou-se 10 µL de H₂O₂ à solução e pipetou-se 100 µl de substrato cromógeno por poço. Deixou-se 15 minutos no escuro, e após, colocou-se 25 µl de tampão stop por poço e então foi feita a leitura dos dados a 492 nm.

Protocolo 2 - Sensibilização da placa anticorpo anti-CHIKV.

Preparou-se solução de tampão carbonato pH 9,6 + anticorpo 1º (tabela 5). Aplicou-se 100 µl por poço e em seguida a placa foi deixada 1h na estufa a 37°C e depois passada pra geladeira a 4°C onde ficou overnight.

No dia seguinte descartou-se o sobrenadante da placa que em seguida foi bloqueada com solução 1% BSA + 5% sacarose, 300 µL por poço. Após, foi deixada 45 minutos na estufa a 37°C. A placa então foi lavada 4 vezes com 300 µL de tampão de lavagem (PBS + Tween 0,05%) por poço.

Aplicou-se 100 µl por poço de cada diluição do vírus e cada diluição teve 2 poços (duplicata). As diluições foram as mesmas do “Protocolo 1”. A placa foi deixada 1 hora na estufa a 37°C, e posteriormente foi lavada 4 vezes.

Adicionou-se anticorpo 2º (tabela 3) previamente preparado, com solução de PBS + Tween 0,05%+ BSA 0,5%. A placa foi novamente deixada na estufa por 45 minutos a 37°C. Posteriormente a placa foi lavada 4 vezes.

Adicionou-se anticorpo 3º (tabela 3) previamente preparado com solução de PBS + Tween 0,05%+ BSA 0,5%. Deixou-se 45 minutos na estufa a 37°C novamente. Após, a placa foi lavada mais 5x.

Tabela 3 - Características dos anticorpos utilizados no ELISA no Protocolo 2.

Anticorpo	Descrição	Diluição
1º: Anticorpo Policlonal anti-CHIKV	Não comercial - produzido em coelho	1:2000
2º: Anticorpo Policlonal anti-CHIKV (CHIKV-C)	(ATCC® VR-1241AF™) Hyperimmune ascitic fluid (Mouse) – N.I.H. Research Reference Reagent - produzido em camundongo	1:2000
3º:Anticorpo IgG anti-camundongo –HRP	Goat anti-mouse IgG (H+L) horseradishperoxidase conjugated - Invitrogen - produzido em cabra	1:2000

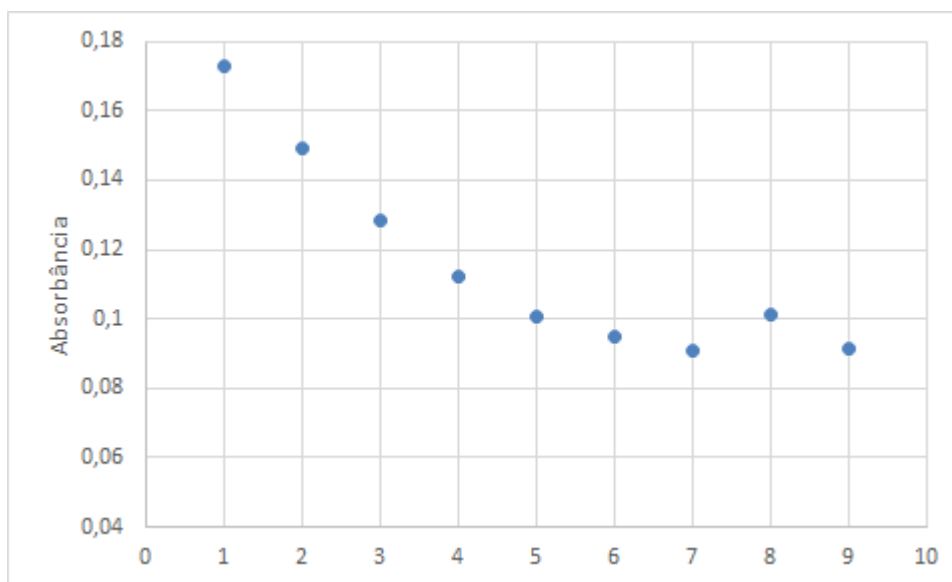
A revelação da reação e a leitura de dados foi feita da mesma forma que no “Protocolo 1”.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Protocolo 1

Com a nova alteração a curva melhorou, não havendo mais o problema de pontos terem a mesma intensidade do controle negativo. Porém surgiu outro problema: um dos brancos apresentou absorbância maior que próprias diluições com vírus (figura 26).

Figura 26 - Gráfico de absorvância do teste de Elisa do protocolo 1.



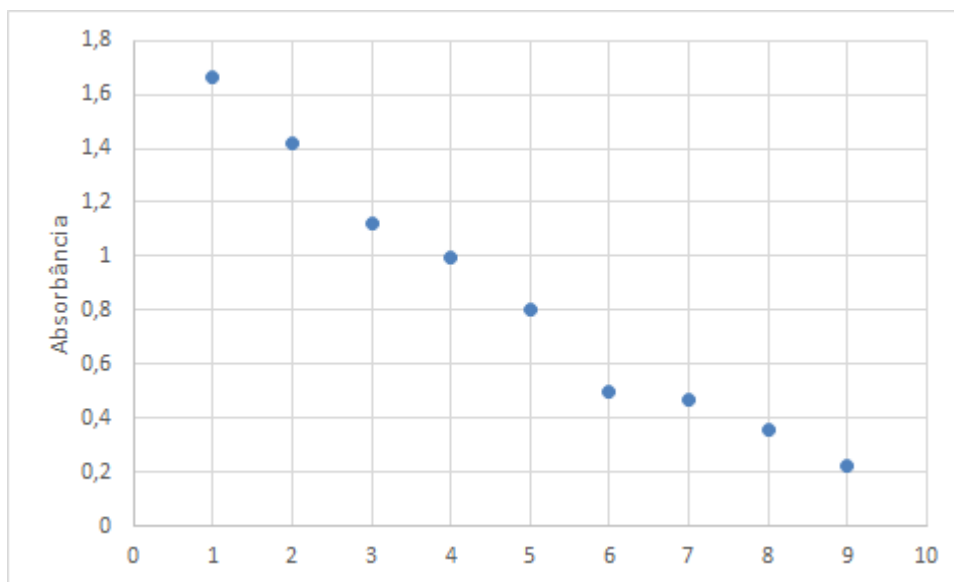
No gráfico no eixo x temos: 1(diluição 1:10); 2(diluição 1:20); 3(diluição 1:40); 4(diluição 1:80); 5(diluição 1:160); 6(diluição 1:320); 7(diluição 1:640); 8(branco: vírus + anticorpo 2º) ; 9 (apenas anticorpo 1º + 2º). **Fonte: autor.**

Os valores dos poços em branco apresentaram sinal maior que a metade do sinal obtido para a menor diluição do vírus, o que não é adequado do ponto de vista analítico, pois diminui muito o intervalo de confiança do teste, inviabilizando-o. Para tentar reverter essa situação fizemos um novo protocolo (2) em que a placa foi sensibilizada com anticorpo anti-CHIKV.

Protocolo 2

Com a sensibilização da placa com anticorpo foi obtida uma boa reta de correspondência entre a absorvância e a diluição do vírus de referência, com tendência a zero. Porém, o sinal dos poços em branco, apesar de estarem consideravelmente menores que as diluições de vírus neste protocolo, ainda apresentavam sinais muito altos (figura 27). Tipicamente os sinais de poços em branco para protocolos de ELISA não devem ultrapassar 0,2 unidades de absorvância. Nesse caso chama à atenção o fato de que quando apenas o anticorpo secundário e terciário ou apenas o terciário são colocados na placa, não há desenvolvimento de coloração inadequada para os poços em branco. Contudo, todas as vezes em que o anticorpo policlonal de coelho foi introduzido no ELISA, houve a geração de coloração, indicando algum tipo de ligação desse anticorpo, ou de contaminantes presentes nele, aos anticorpos terciários marcados.

Figura 27 - Gráfico de absorbância do teste de Elisa do protocolo 2.



No gráfico no eixo x temos: 1(diluição 1:10); 2(diluição 1:20); 3(diluição 1:40); 4(diluição 1:80); 5(diluição 1:160); 6(diluição 1:320); 7(diluição 1:640); 8(branco: anticorpos 1º + 3º) ; 9 (branco: anticorpos 1º + 2º + 3º). **Fonte: autor.**

Por conta da inespecificidade do anticorpo primário ou presença de contaminantes no mesmo (o que é plausível já que foi produzido em escala laboratorial com soro de coelhos imunizados), a padronização da técnica se tornou inviável a partir deste ponto. Sendo necessário obtenção de um novo anticorpo ou tentar purificar novamente em coluna de afinidade o anticorpo que estávamos utilizando.

Para vias de publicação:

Autorizo a reprodução e divulgação total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

A inclusão deste trabalho foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Curso em sua 57ª Sessão Ordinária, realizada em 04/10/2021.